

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

JÉSSICA VILARINHO CARDOSO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NO GENE DO FATOR DE
CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E SEU RECEPTOR NA ETIOLOGIA
DA ENDOMETRIOSE**

Rio de Janeiro

2016.

Jéssica Vilarinho Cardoso

Avaliação da influência dos polimorfismos no gene do fator de crescimento endotelial vascular e seu receptor na etiologia da endometriose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Saúde Pública e Meio Ambiente.

Subárea de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientadora: Jamila Alessandra Perini Machado

Coorientador: Daniel Escorsim Machado

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

C268a Cardoso, Jéssica Vilarinho

Avaliação da influência dos polimorfismos no gene do fator de crescimento endotelial vascular e seu receptor na etiologia da endometriose. / Jéssica Vilarinho Cardoso. -- 2016.

181 f. : il. ; tab.

Orientador: Jamila Alessandra Perini Machado
Daniel Escorsim Machado

Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública
Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2016.

1. Endometriose - epidemiologia. 2. Endometriose – diagnóstico. 3. Endometriose – terapia. 4. Endometriose – etiologia. 5. Polimorfismo Genético. 6. Neovascularização Fisiológica. I. Título.

CDD – 22.ed. – 618.1

Jéssica Vilarinho Cardoso

Avaliação da influência dos polimorfismos no gene do fator de crescimento endotelial vascular e seu receptor na etiologia da endometriose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Saúde Pública e Meio Ambiente. Subárea de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 31/03/2016

Banca Examinadora

Doutora Nathalia de Oliveira Meireles da Costa - INCA

Doutora Rosane Vianna-Jorge - ENSP / UFRJ

Doutora Jamila Alessandra Perini Machado - ENSP / UEZO

Rio de Janeiro

2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter permitido mais essa conquista e por ter me dado forças todos os dias da minha vida para nunca desistir.

Ao meu marido Maurício, por toda paciência, carinho e amor, e por me incentivar a conquistar meus sonhos.

Aos meus pais, Márcia e Fernando, por todos esses anos de muito amor e carinho e por me apoiarem na realização e concretização dos meus sonhos.

A minha família, que sempre, desde pequena, estiveram ao meu lado, torcendo por mim, com todo seu amor.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, pela amizade, parceria e ajuda nos momentos que mais precisei ao longo do curso de Mestrado.

Aos meus amigos do Mestrado, por toda amizade e pelas risadas nos momentos mais difíceis durante o curso. Vocês tornaram os dois anos de Mestrado muito mais leve.

Aos Doutores Plínio Berardo, Maurício Abrão e Renato Ferrari que acreditaram e permitiram que este projeto se desenvolvesse.

Ao meu orientador Daniel Machado pela orientação e ensinamentos para o meu crescimento acadêmico.

Um agradecimento especial a minha orientadora Jamila Perini, por toda sua paciência, dedicação e ensinamentos. Por ter me incentivado e acreditado na minha capacidade para a realização deste projeto.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Obrigado a todos. Vocês fazem parte de um momento muito especial da minha vida.

"A fé em Deus nos faz crer no incrível, ver o invisível e realizar o impossível."

DELFINO, 2014.

RESUMO

A endometriose é considerada uma doença complexa, influenciada tanto por fatores genéticos como ambientais. A angiogênese via sinalização do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do seu receptor de domínio de inserção da quinase (KDR), é um processo crucial no estabelecimento e progressão da endometriose. Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) nos genes *VEGF* e *KDR* podem influenciar no desenvolvimento da doença. O presente estudo teve como objetivo avaliar o papel dos SNPs do *VEGF* (-2578C>A, -460T>C, -1154G>A, +405G>C e +936C>T) e do *KDR* (-604 T>C, 1192C>T e 1719T>A) na etiologia da endometriose. A população do estudo foi composta por 293 mulheres com diagnóstico histopatológico de endometriose (casos) e 223 mulheres sem a evidência laparoscópica da doença (controle). A genotipagem dos SNPs estudados foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando o sistema *TaqMan*. Foi utilizado uma regressão logística, sendo obtidas razões de chances (OR) e intervalos de confiança (IC 95%) para avaliar as associações dos SNPs estudados e o desenvolvimento da endometriose, assim na presença dos sintomas. Foi observada uma associação positiva dos SNPs *VEGF* -2578C>A e -1154G>A (OR: 1,88; 95% IC: 1,06 - 3,36; OR: 1,59; 95% IC: 1,03 - 2,45, respectivamente) com o desenvolvimento da endometriose, enquanto que os SNPs *VEGF* +405G>C e *KDR* 1192C>T (OR: 0,66; 95% IC: 0,43 - 1,00; OR: 0,56; 95% IC: 0,39 - 0,81, respectivamente) foram associados negativamente com a doença. Verificou-se um efeito protetor dos haplótipos de *VEGF* (CTGC, ATGG e CCGG) e *KDR* (TTT e CTA) com a susceptibilidade da endometriose; e um risco aumentado dos haplótipos de *VEGF* (ACAG) e *KDR* (TCA e CCA) com o desenvolvimento da doença. Uma associação negativa foi encontrada nos genótipos combinados de *VEGF* e *KDR* com o desenvolvimento da endometriose e com a presença dos sintomas (dismenorreia, dor pélvica, dispareunia e sintomas urinários). Realizou-se também uma revisão sistemática, utilizando o sistema STROBE, sobre a associação dos SNPs de *VEGF* e *KDR* no desenvolvimento da endometriose, além de descrever as diferenças metodológicas dos estudos caso-controle. Como conclusão os SNPs de *VEGF* e *KDR* estão associados com o desenvolvimento da endometriose e seus sintomas, sugerindo que a via de sinalização, VEGF-KDR, é um importante fator na etiologia da doença. Este estudo serve como base de dados para futuras aplicações que visem o desenvolvimento de biomarcadores para o diagnóstico e/ou prognóstico da endometriose.

Palavras-chave: Endometriose, VEGF, KDR, Polimorfismos, Angiogênese.

ABSTRACT

Endometriosis is considered a complex diseases influenced by both genetic and environmental factors. The angiogenesis via signaling vascular endothelial growth factor (VEGF) and its kinase insert domain receptor (KDR), is a crucial process in the establishment and progression of endometriosis. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *VEGF* and *KDR* genes can influence the development of the disease. This study aimed to evaluate the role of *VEGF* (-2578C>A, -460T>C, -1154G>A +405G>C and +936C>T) and *KDR* (-604T>C, 1192C>T and 1719T>A) SNPs in the etiology of endometriosis. The study population consisted of 293 women with histopathological diagnosis of endometriosis (cases) and 223 women without laparoscopic evidence of disease (controls). Genotyping of the studied SNPs was performed by polymerase chain reaction (PCR) in real time using the *TaqMan* system. Logistic regression was used, being obtained odds ratios (OR) and confidence intervals (95% CI) to evaluate the associations of the studied SNPs and the development of endometriosis, and the presence of symptoms. Positive association of *VEGF* -2578C>A and -1154G>A SNPs with the development of endometriosis was observed (OR: 1,88; 95% CI: 1,06 - 3,36; OR: 1,59; 95% CI: 1,03 - 2,45, respectively), whereas *VEGF*+405G>C and *KDR*1192C>T SNPs were negatively associated with the disease (OR: 0,66; 95% CI: 0,43 - 1.00; OR: 0,56; 95% CI: 0,39 - 0,81, respectively). It was found a protective effect of *VEGF* (CTGC, ATGG and GGCC) and *KDR* (TTT and CTA) haplotypes susceptibility to endometriosis; and an increased risk of *VEGF* (ACAG) and *KDR* (CCA and TCA) haplotypes with the development of the disease. Negative association was found in the combined genotypes of *VEGF* and *KDR* with the development of endometriosis and the presence of symptoms (dysmenorrhea, pelvic pain, dyspareunia and urinary symptoms). It was also carried out a systematic review using the STROBE system on the association of *VEGF* and *KDR* SNPs in the development of endometriosis, and describes the methodological differences of case-control studies. In conclusion *VEGF* and *KDR* SNPs are associated with the development of endometriosis and its symptoms, suggesting that signaling pathway, VEGF-KDR, is an important factor in the etiology of the disease. This study serves as a database for future applications for the development of biomarkers for the diagnosis and / or prognosis of endometriosis.

Keywords: Endometriosis, VEGF, KDR, Polymorphism, Angiogenesis.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1. Endometriose	16
2.1.1. Epidemiologia da Endometriose.....	17
2.1.2. Diagnóstico da Endometriose.....	20
2.1.3. Tratamento da Endometriose.....	22
2.1.4. Etiologia da Endometriose.....	23
2.2. Angiogênese e Endometriose	25
2.3. Papel do Fator de Crescimento Endotelial Vascular e seu receptor VEGFR- 2 no desenvolvimento da endometriose	28
2.3.1. Gene que codifica o VEGF e o VEGFR2 e seus polimorfismos.....	30
2.3.2. Associação dos polimorfismos do <i>VEGF</i> e do <i>KDR</i> no desenvolvimento da endometriose.....	35
2.3.3. Associação dos polimorfismos do <i>VEGF</i> e do <i>KDR</i> e características clínicas da endometriose.....	37
3. JUSTIFICATIVA	39
4. OBJETIVOS	40
4.1. Geral	40
4.2. Específicos	40
5. MATERIAIS E MÉTODOS	41
5. 1. ESTUDO CASO-CONTROLE	41
5.1.1. Delineamento do estudo	41
5.1.2. População de estudo	42
5.1.2.1. Seleção da População	42

5.1.2.2. População elegível.....	43
5.1.3. Coleta de Dados	44
5.1.3.1. Questionário	44
5.1.3.2. Coleta de sangue e extração de DNA	44
5.1.3.3. Genotipagem.....	45
5.1.4. Análise de Dados.....	49
5.1.5. Aspectos Éticos.....	50
5.2. METODOLOGIA DA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	50
5.2.1. Estratégia de Busca	50
5.2.2. Critério de Inclusão e Exclusão	51
5.2.3. Coleta de Dados	51
5.2.4. Avaliação da qualidade dos estudos incluídos	52
6. RESULTADOS	53
6.1. Influência dos SNPs de VEGF no desenvolvimento da endometriose	53
6.2. Efeito combinado dos SNPs de <i>VEGF</i> e <i>KDR</i> na susceptibilidade da endometriose e nos sintomas da doença	64
6.3. Revisão sistemática: Estudos caso-controle que avaliaram os SNPs nos genes <i>VEGF</i> e/ou <i>KDR</i> no desenvolvimento da endometriose	93
7. DISCUSSÃO	131
8. CONCLUSÃO.....	138
REFERÊNCIAS	139
ANEXO I.....	157
ANEXO II	162
ANEXO III	167
ANEXO IV	168
ANEXO V	179
ANEXO VI.....	180
ANEXO VII.....	181

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Frequência (%) dos alelos de <i>VEGF</i> nas diferentes populações de mulheres saudáveis.....	34
Tabela 2 - Frequência (%) dos alelos de <i>KDR</i> nas diferentes populações de mulheres saudáveis.....	35
Tabela 3 - Ensaio TaqMan (sondas e oligonucleotídeos) para genotipagem dos SNPs estudados dos genes <i>VEGF</i> e <i>KDR</i>	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Prevalência e sobreposição de sintomas de dores ginecológicas que levaram ao diagnóstico cirúrgico de 940 mulheres com endometriose que participaram do estudo OXEGENE.....	19
Figura 2 - Teoria da menstruação retrógrada.....	25
Figura 3 - Representação esquemática da angiogênese.....	27
Figura 4 - Visão macroscópica de focos endometrióticos no peritônio. Nota-se a alta vascularização ao redor dos focos de lesões endometrióticas (▲).....	28
Figura 5 - Esquema das cinco famílias do fator de crescimento endotelial vascular e a interação com seus receptores.....	30
Figura 6 - Estrutura do gene <i>VEGF</i> e a localização dos SNPs -2578C>A (rs699947), -460C>T (rs833061), -1154G>A (rs1570360), +405G>C (rs2010963) e +936C>T (rs3025039).....	32
Figura 7 - Estrutura do gene <i>KDR</i> e a localização dos SNPs -604A>G (rs2071559), 1192C>T (rs2305948) e 1719A>T (rs1870377).....	33
Figura 8 - Fluxograma do estudo.....	44
Figura 9 - Exemplo da determinação dos genótipos do SNP <i>VEGF</i> -2578C>A por PCR em tempo real.....	48
Figura 10 - Exemplo da determinação dos genótipos do SNP <i>KDR</i> -604T>C por PCR em tempo real.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

μL	Microlitro
ANVISA	Agência De Vigilância Sanitária
ASRM	American Society for Reproductive Medicine (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva)
CA125	Cancerantigen 125
CDS	Região Codificante
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CM	Centímetro
CXCR4	Receptor 4 de Quimiocina
DIE	DeepInfiltratingEndometriosis
DP	DeepInfiltratingEndometriosis
EDTA	Desvio Padrão
EPCAM	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ER	Molécula de Adesão Celular Epitelial
	Receptor de Estrogênio
ESHRE	EuropeanSocietyofHumanReproductionandEmbryology (Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia)
FMUSP	Faculdade de Medicina Universitária de São Paulo
FR-A	Receptor de Folato – α
GA	VariantGenotype
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
H ₂ O q. s. p.	Água quantidade suficiente para
HC-FMUSP	Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da Universidade De São Paulo
ENSP	Escola Nacional De Saúde Pública Sergio Arouca
HFL	Hospital Federal da Lagoa
HFSE	Hospital Federal dos Servidores do Estado
HIF-1A	Fator de Hipóxia-Induzida 1α
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg

IC	Intervalo de Confiança
IMC	Índice De Massa Corporal
Ig	Imunoglobulinas
kDa	Kiladaltons
KDR	Receptor do domínio de inserção da cinase
Kg	Quilograma
LaPesF	Laboratório De Pesquisa De Ciências Farmacêuticas
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
Ng	Nanograma
OR	<i>OddsRatio</i> (Razão de Chance)
PCR	Reação em cadeia de polimerase
POF	Insuficiência Ovariana Prematura
PR	Receptor de Progesterona
PIGF	Fator de Crescimento Placentário
RM	Ressonância Magnética
SIR	Standardized incidenceratio (Taxa de incidência padronizada)
SNP	Polimorfismos de um único nucleotídeo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UEZO	Centro Universitário Da Zona Oeste
UTR	Região não traduzida
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR-1, -2 e -3	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular 1, -2 e -3
VPF	Fator de Permeabilidade Vascular

1. INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença ginecológica definida pela presença de tecido endometrial funcional glandular e/ou estromal fora da cavidade uterina, podendo causar dor pélvica, dismenorréia e infertilidade (GIUDICE, 2004; MORADI et al, 2014). É uma doença que afeta 3 a 20% das mulheres na população mundial, entre 15 a 45 anos (KENNEDY et al., 2005; BENAGIANO et al., 2014).

A teoria mais aceita até hoje sobre a gênese da endometriose foi descrita por Sampson (1927), o qual sugeriu que tecidos endometriais são derramados pela tuba uterina dentro da cavidade peritoneal durante a menstruação retrógrada, sofrendo proliferação e crescimento em sítios ectópicos. Essa teoria é sustentada pela presença de fragmentos de endométrio, que quando transplantados para meios de cultura ou em animais, levam à formação de focos de endometriose (KOKS, 1997; GIUDICE et al., 2010).

Para o diagnóstico definitivo da endometriose, ainda são essenciais os métodos invasivos, como a biópsia, para confirmação da doença. Atualmente, o alívio dos sintomas constitui o principal objetivo do tratamento farmacológico da endometriose, já que o arsenal medicamentoso existente não dispõe de nenhum fármaco capaz de erradicar por completo os focos ectópicos de tecido endometrial que caracterizam a doença. Assim, a cirurgia continua sendo o melhor método para identificação e remoção dos focos da doença (ABRÃO, 2000; NÁCUL & SPRITZER, 2010; HSU et al., 2010).

Apesar da endometriose não ser uma doença maligna, esta pode se conectar, invadir e danificar outros tecidos, semelhante a um tumor em desenvolvimento (COLLETTE et al., 2006; PAVONE & LYTTLE, 2015). Estudos demonstram que a vascularização dos implantes de endometriose é provavelmente um dos fatores mais importantes para a invasão de outros tecidos por células endometriais (TAHERGORABI & KHAZAEI, 2012). Em pacientes com endometriose, o processo de angiogênese é alterado em favor da sobrevivência e do reabastecimento do tecido endometrial (MAY et al., 2008; DJOKOVIC & CALHAZ-JORGE, 2014).

As características hereditárias de endometriose foram relatadas pela primeira vez, em 1980, quando parentes de primeiro grau de mulheres com endometriose grave tiveram um fator de risco aumentado de até seis vezes, do que para os familiares de mulheres sem o

histórico da doença (SIMPSON et al., 1980). Além disso, estudos recentes têm demonstrado que mulheres com história familiar de endometriose tem um aumento de 5 vezes do risco relativo em relação as mulheres que não apresentam histórico da doença na família (STEFANSSON et al., 2002; HANSEN et al., 2010; AUDEBERT et al 2015, RAHMIOGLU et al 2015).

Diversos trabalhos têm estudado a associação entre o desenvolvimento da endometriose com polimorfismos em 64 genes diferentes (TEMPFER et al., 2009; PAINTER et al., 2011; NYHOLT et al., 2012; ALBERTSEN et al., 2013; RAHMIOGLU et al., 2014). Esses genes candidatos codificam proteínas ou enzimas envolvidas na síntese de hormônios femininos, em moléculas de adesão e de matriz extracelular, em vias de detoxificação, na sinalização de citocinas, na regulação do ciclo celular e no processo de angiogênese (FALCONER et al., 2007; TEMPFER et al., 2009; PAINTER et al., 2011; TAHERGORABI & KHAZAEI, 2012)

Dentre os genes candidatos, o *VEGF* e o *KDR*, que codificam respectivamente o fator de crescimento edotelial vascular (VEGF) e seu receptor, assumem um importante papel no desenvolvimento da endometriose, por serem expressos em células epiteliais e estromais no útero humano e em células reguladas por estrogênio, além de serem importantes fatores envolvidos no crescimento de novos vasos sanguíneos, a partir de vasos já existentes, processo denominado de angiogênese (TAYLOR et al., 2009). Já se sabe que as lesões de endometriose são tipicamente caracterizadas por uma vascularização densa e que requerem um fornecimento de sangue adequado para a sua sobrevivência (ROCHA et al., 2013). Além disso, diversos estudos têm investigado e observado um aumento da expressão e da distribuição de VEGF e VEGFR2 em amostras de mulheres com endometriose quando comparadas ao seu controle, indicando que a angiogênese, via VEGF, é um importante fator para o desenvolvimento da endometriose (TAN et al., 2002; MACHADO et al., 2008; MACHADO et al., 2010; VERIT et al., 2010).

Os genes que codificam o VEGF e seu receptor são polimórficos, e diversos trabalhos já descreveram a relação de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em ambos os genes e a associação com a endometriose, entretanto, os resultados das análises ainda são controversos (COSÍN et al., 2009; LAMP et al., 2010; ALTINKAYA et al., 2011; EMAMIFAR et al., 2012; KANG et al., 2013; HENIDI et al., 2015). Em uma meta-análise de

14 estudos caso-controle, com diferentes populações (chinesa, indiana, coreana, japonesa, italiana, australiana, espanhola, turca e estoniana), foi investigada a associação entre cinco SNPs do *VEGF* e a susceptibilidade da endometriose. Os resultados desta meta-análise sugerem que o polimorfismo 936C>T aumenta o risco de endometriose, e os SNPs -2578C>A e -1154G>A podem ser fatores de proteção para a doença, entretanto os SNPs -460T>C e 405G>C não mostraram uma associação significativa com o desenvolvimento da endometriose (LI et al., 2013). Para o *KDR*, apenas um estudo do tipo caso-controle avaliou a magnitude de associação entre cinco SNPs (*KDR* 1192C>T, 1719A>T, +31C/T, IVS6+54T>C e IVS25-92G>A) e o desenvolvimento da endometriose em mulheres chinesas observando uma associação negativa na presença do alelo T para o SNP1192C>T (KANG et al., 2013).

Até o início desta dissertação não existiam dados de associações entre SNPs do *VEGF* e do *KDR* com o desenvolvimento da endometriose na população brasileira, e, apesar de muitas investigações sobre esta doença extremamente heterogênea, sua patogênese ainda não é bem esclarecida.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Endometriose

A endometriose é uma doença ginecológica caracterizada pela presença de tecido endometrial funcional, estromal e/ou glândular, fora da cavidade uterina, resultando em uma reação inflamatória crônica (ABRÃO et al., 2000; GIUDICE & KAO, 2004). O endométrio é o tecido que reveste internamente o útero e tem como função preparar o útero para receber o embrião, oferecendo condições necessárias para a implantação e nutrição do óvulo fecundado, até a formação da placenta para permitir o transporte de nutrientes e oxigênio, entre mãe e feto. Quando não há fecundação, toda a camada funcional do endométrio é expelida, dando início ao processo de menstruação (KILLEEN et al., 2014).

Os órgãos mais afetados pelo aparecimento da endometriose são os ovários, peritônio, ligamentos úteros sacros (entre o útero e o reto), região retro cervical (atrás do colo do útero), septo reto-vaginal, reto/sigmoide, intestino delgado (íleo terminal), apêndice, bexiga e ureteres (GIUDICE & KAO, 2004). Segundo Acién e Velasco, existem três formas clínicas de endometriose: a peritoneal, que corresponde a endometriose mínima ou leve, e geralmente, não é observada nenhuma progressão da doença; o cisto de endometriose ovariana, caracterizado pela presença de endometriomas (ou cistos chocolate) que não estão aderidos, ou ligeiramente aderidos, ao lado posterior do peritônio; e endometriose infiltrativa, que não apresenta nenhuma evidência de endometriomas, porém pode resultar em um bloqueio pélvico total, com infiltração no útero, intestino e no septo reto-vaginal (ACIÉN & VELASCO, 2013).

A endometriose compartilha a fisiopatologia comum com algumas neoplasias ginecológicas, como o câncer de ovário e de endométrio, e há cada vez mais evidências de que essa doença benigna pode sofrer transformação maligna (NEZHAT et al., 2008; VERIT & YUCEL, 2013; PAVONE & LYTTLE, 2015). Dados de grandes estudos de coorte e caso controle mostraram que pacientes com endometriose têm duas vezes maior risco de desenvolver câncer de ovário (BORGELDT & ANDOLF, 2004; MODUGNO et al, 2004; BRINTON et al, 2005; KOBAYASHI et al, 2007; ARIS, 2010; PEARCE et al., 2012). Melin e colaboradores, em 2006, realizaram um estudo para investigar o risco de câncer entre as mulheres portadoras de endometriose e os resultados das análises revelaram elevados riscos

para o desenvolvimento de câncer de ovário (SIR 1.43, IC 95% 1,19-1,71), linfoma não-Hodgkin (SIR 1.24, IC 95% 1,02-1,49), tumores de cérebros (SIR 1.22, IC 95% 1,04-1,41), câncer de mama (SIR 1.28, IC 95% 1.13–1.45) e tumores endócrinos (SIR 1.36, IC 95% 1.15–1.61), concluindo que mulheres com endometriose podem desenvolver algumas doenças malignas (MELIN et al., 2006). Recentemente, um estudo também avaliou 46.176 participantes, sendo 15.361 casos de câncer de ovário e 30.815 controles, e observaram uma associação significativa dos SNPs rs3754496 (gene *WNT4*), rs1333052 (gene *CDKN2B*), rs12331507 (gene *KDR*) e rs142034631 (gene *GREB1*) com a endometriose e o risco de câncer de ovário (LEE et al., 2016).

Apesar do conhecimento a respeito dos aspectos clínicos da endometriose e suas repercussões na vida da paciente, a etiopatogenia, os fatores de risco para progressão da doença, a evolução natural e a relação com a infertilidade vêm sendo exaustivamente estudados.

2.1.1. Epidemiologia da Endometriose

A epidemiologia da endometriose é um ponto bastante controverso e cujos resultados são variáveis à medida que se altera a população estudada, os procedimentos indicados, o serviço onde se realizam esses procedimentos, entre outros aspectos (MARQUES, 2005).

O real perfil da paciente portadora de endometriose é impreciso, embora exista consenso que a endometriose está presente em 3 a 20% das mulheres em idade reprodutiva, 30 a 50% das mulheres inférteis e 3 a 5% das mulheres na fase da pós-menopausa (ACIÉN & VELASCO, 2013).

As mulheres portadoras de endometriose podem ser assintomáticas (10,7%), no entanto, a maioria apresenta sintomas, em diferentes intensidades, sendo os principais, dismenorreia (79-97%), dor pélvica crônica (22-69%), infertilidade (25-40%), dispareunia de profundidade (44-71%), sintomas intestinais e urinários cíclicos (29%), como dor ou sangramento ao evacuar/urinar durante o período menstrual (OZKAN et al., 2008; FAUCONNIER et al., 2013; MORADI et al., 2014). Sinaii e colaboradores, em 2008, realizaram um estudo sobre as diferenças nas características entre 1000 mulheres com endometriose da Grã-Bretanha, Irlanda e Estados Unidos. Considerando a sobreposição de sintomas de dores ginecológicas das pacientes com endometriose que levaram a um

diagnóstico cirúrgico, 34,4% relataram ter dor pélvica, dismenorreia e dispareunia e 25,2% relataram ter dor pélvica e dismenorreia (Figura 1). Além disso, cerca de 70% dessas mulheres apresentavam, pelo menos, dois dos três tipos de dores ginecológicas. (SINAI et al., 2008).

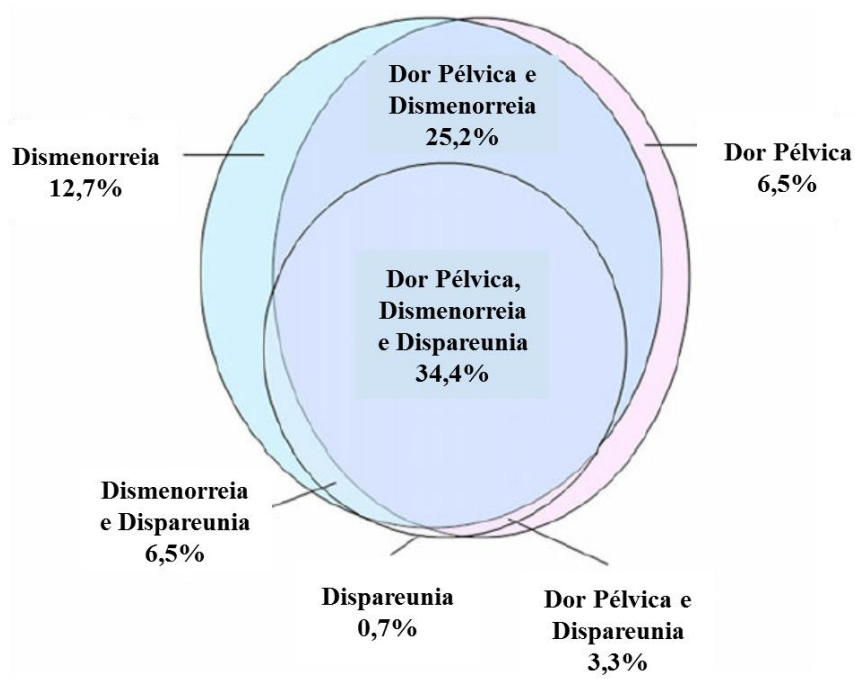


Figura 1. Prevalência e sobreposição de sintomas de dores ginecológicas que levaram ao diagnóstico cirúrgico de 940 mulheres com endometriose que participaram do estudo OXEGENE. Adaptado de SINAI et al., 2008.

Um estudo retrospectivo realizado em São Paulo teve como objetivo descrever aspectos clínicos e epidemiológicos de 892 pacientes portadoras de endometriose pélvica e como resultado foi observado que a idade média das pacientes era de $33,2 \pm 6,3$ anos no momento do diagnóstico, com uma predominância de mulheres que se auto-declaravam com a cor da pele branca (78,7%), de mulheres casadas ou com união estável (69,5%) e com 2º ou 3º graus completos (76,9%). O principal sintoma relatado foi a dismenorreia (62,2%), seguido de dor pélvica crônica (56,8%), dispareunia de profundidade (54,7%) e infertilidade (39,8%), sendo que 26,6% nunca haviam tentado engravidar. Além disso, 66,4% dos casos de endometriose apresentavam estadiamento avançado da doença com grau III e IV. Como conclusão o estudo revelou que a endometriose é uma doença geralmente diagnosticada na 4ª década da vida das pacientes, as quais apresentam queixas clínicas relacionadas com frequência à dor pélvica e infertilidade, que devem sempre ser questionadas para orientar a

hipótese diagnóstica da doença (BELLELIS et al., 2010).

Analisando a distribuição das pacientes segundo o grau de instrução, estudos em populações européias e americanas (CANDIANI et al, 1995; BELLELIS et al., 2010) mostram haver maior frequência de mulheres portadoras de endometriose com segundo grau (30%) e nível superior (27%). Outros estudos mostram achados semelhantes, mesmo quando realizados em instituições públicas, sendo o grau de escolaridade entre as pacientes com endometriose alto. Hoje em dia, as mulheres usam contraceptivos com mais frequência porque preferem uma profissão antes de ter um filho. Assim, elas só descobrem a presença da doença depois de terminar os estudos, quando decidem engravidar (ABRÃO, 2000; HEMMINGS et al., 2004).

A endometriose acarreta consequências físicas, mentais e sociais na saúde da mulher, tendo em vista que o seu corpo, sua psique e até mesmo suas relações interpessoais e conjugais são afetadas pelos problemas decorrentes dos sintomas que elas podem apresentar, em especial, pela impossibilidade de gerar filhos (NNOAHAM et al., 2011; HUGHES et al., 2015 LAGANÀ et al., 2015). Fourquet e colaboradores, em 2010, observaram que a dor menstrual, dor incapacitante, dor abdominal e depressão eram preditores de mal desempenho no trabalho e em casa quando estudaram 107 mulheres com endometriose. Além disso, a dor incapacitante e a dispareunia promovem prejuízos em relação aos aspectos sociais e sexuais na vida das mulheres (FOURQUET et al., 2010). Em 2013, De Graaff e colaboradores, revelaram que mulheres com endometriose tiveram, em algum momento durante a sua vida, uma influência negativa no trabalho (51%), nos relacionamentos (50%) e na educação (16%), devido aos sintomas de dispareunia e dor pélvica crônica. Das mulheres com dispareunia, 80% tiveram que alterar seu comportamento sexual em termos de interromper ou evitar relações sexuais devido à dor (DE GRAAFF et al., 2013).

A endometriose é uma causa importante de dor pélvica e infertilidade feminina podendo comprometer a qualidade de vida e levar ao desgaste físico e mental das pacientes acometidas, especialmente porque são frequentes as falhas e atrasos do diagnóstico, assim como as recidivas sintomáticas (BALLARD et al., 2006).

2.1.2. Diagnóstico da Endometriose

Em 2003, um estudo de coorte (ARRUDA et al., 2003) avaliou o tempo decorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico de endometriose em um grupo de 200 mulheres brasileiras, sendo que a mediana do tempo decorrido entre o início dos sintomas até o diagnóstico de endometriose foi de 7,0 anos (variação de $3,5 \pm 12,1$). Quanto mais jovem a mulher no início dos sintomas, maior o período de diagnóstico a ser feito, sendo o atraso médio de 12,1 anos (variação de $8,0 \pm 17,2$) em mulheres com idade <19 anos, e de 3,3 anos (variação de $2,0 \pm 5,5$), em mulheres com idade > 30 anos. O período de tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 4,0 anos ($2,0 \pm 6,0$) para as mulheres, cuja queixa principal era a infertilidade, mas 7,4 anos ($3,6 \pm 13,0$) para aqueles com dor pélvica. Como conclusão deste trabalho, o atraso no diagnóstico da endometriose foi considerado ser muito longo, especialmente para as mulheres jovens com dor pélvica (ARRUDA et al., 2003).

Diversas classificações têm sido propostas para o diagnóstico e estadiamento da endometriose, porém a mais utilizada até hoje foi descrita pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, em 1997, que propôs uma classificação em sistema de escores reunidos em estádios, analogamente ao que se faz para neoplasias malignas, considerando o tamanho da lesão e o grau de acometimento (superficial ou profundo); tanto no peritônio quanto nos ovários direito e esquerdo; a obliteração do fundo-de-saco posterior (parcial ou completa); e o tipo de aderências (velamentosa ou densa) nos ovários e nas trompas, ressaltando o envolvimento total das fímbrias tubárias por aderências, dividindo as pacientes em quatro estágios: I (mínima - escore 1-5, implantes isolados e sem aderências significantes), II (leve - escore 6-15, implantes superficiais com menos de 5 cm, sem aderências significantes), III (moderado - escore 16-40, múltiplos implantes aderências peritubárias e periovarianas evidentes) e IV (severo - escore > 40 , múltiplos implantes superficiais e profundos, incluindo endometriomas, aderências densas e firmes). (ASRM, 1997).

Nisolle e Donnez, em 1997, dividiram a endometriose em três afecções distintas: peritoneal, ovariana e de septo retovaginal, sendo esta última chamada de endometriose infiltrativa profunda. No primeiro caso, estariam incluídas as pacientes com implantes peritoneais; no segundo, os cistos ovarianos típicos da doença e, no terceiro caso, a endometriose infiltrativa que acomete as regiões retrocervical e paracervical, além dos tratos gastrointestinais e genitourinário. Segundo Bellelis e colaboradores, a endometriose pode ser

classificada como superficial quando sua profundidade é menor do que 5 mm e profunda quando esta profundidade é maior do que 5 mm (BELLELIS et al., 2010).

Embora o diagnóstico definitivo da endometriose necessite de uma intervenção cirúrgica, com confirmação histopatológica da doença, diversos achados nos exames físicos e de imagem, já podem prever que a paciente apresenta endometriose (NÁCUL & SPPIRITZER, 2010).

O diagnóstico clínico tem como base a exploração dos sintomas e o exame ginecológico, identificando fatores clínicos de risco que vão de encontro à teoria de que a endometriose seja um distúrbio dependente da ação estrogênica e possivelmente secundária ao refluxo menstrual para a cavidade peritoneal (MACCAGNANO et al., 2012).

O diagnóstico por imagem é indicado quando o exame físico é sugestivo de endometriose. Dois tipos de imagem são utilizados frequentemente para identificar e caracterizar as lesões da endometriose, a ultrassonografia transvaginal e a ressonância magnética (RM). A ultrassonografia transvaginal é a primeira técnica de imagem proposta, pois permite a exploração extensiva da pélvis. No entanto, o valor diagnóstico da ultrassonografia transvaginal para a avaliação da endometriose pélvica profunda e lesões peritoneais superficiais não é clara, mas é muito recomendada como a primeira modalidade de imagem para avaliar as pacientes com suspeita de endometriose (GUERRIERO et al., 2013).

A RM é cada vez mais importante na avaliação de pacientes com endometriose, pois sua capacidade de multiplanar e de contraste superior dos tecidos moles são particularmente úteis na detecção de implantes de endometriose profunda. Porém, por ter um custo elevado, perde para o ultrassom em termos de aplicabilidade no cotidiano (HOTTAT et al., 2009). Bodzak e colaboradores, em 2013, avaliaram dados atuais sobre a acurácia diagnóstica da RM na avaliação da endometriose e compararam com outros métodos de diagnóstico e concluíram que a RM é uma ferramenta útil na avaliação de pacientes com endometriose (sensibilidade = 73-96,3%; especificidade = 70-100%), tanto como um método autônomo, como um método complementar ao ultra-som transvaginal, além de permitir o mapeamento preciso de implantes de endometriose profunda.

Apesar dos métodos de imagem disponíveis apresentarem uma boa acurácia no diagnóstico da endometriose, segundo consenso da Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia (European Society of Human Reproduction and Embryology - ESHRE) e da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (American Society for

Reproductive Medicine - ASRM), o padrão ouro para diagnóstico de endometriose é a videolaparoscopia com a inspeção direta da cavidade e visualização dos implantes, além da confirmação histopatológica da doença (ASRM, 1997; ESHRE, 2008).

Ainda hoje, alguns clínicos solicitam como exame complementar para o diagnóstico de endometriose, o marcador CA125 (antígeno de câncer 125), entretanto ele não é específico para esta doença (ABRÃO, 2000; RUAN et al., 2015). Na busca de um biomarcador específico para endometriose, um estudo realizado por Berg e colaboradores, em 2013, avaliou a distribuição do receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4), da molécula de adesão celular epitelial (EpCAM), do receptor de estrogênio (ER), do receptor de folato - α (FR- α), do fator hipóxia-induzida 1 α (HIF-1 α), do receptor de progesterona (PR), e do fator de crescimento endotelial vascular – A (VEGF-A) em tecido endometrial e concluiu que os marcadores EpCAM, FR- α , e VEGF-A parecem ser os mais promissores, visto que foram altamente distribuído no tecido endometrial de pacientes com endometriose (VAN DEN BERG et al., 2013).

Até o momento, não existe um biomarcador para diagnóstico e/ou prognóstico da endometriose (ABRÃO 2015; ABRAO et al, 2003), assim, existe ainda um campo vasto de investigação nesta área, tendo em vista que entender os fatores envolvidos no desenvolvimento dos focos de endometriose, bem como a etiopatogenia da doença, pode contribuir e direcionar esforços para otimizar o diagnóstico e melhorar a eficiência do tratamento da endometriose.

2.1.3. Tratamento da Endometriose

O alívio dos sintomas constitui o principal objetivo do tratamento da endometriose, já que o arsenal medicamentoso existente não dispõe de nenhum fármaco capaz de erradicar por completo os focos ectópicos de tecido endometrial que caracterizam a doença (ABRÃO, 2000; NÁCUL & SPRITZER, 2010). O tratamento de escolha depende da idade da paciente, o nível de infertilidade, o número de órgãos afetados, a gravidade dos sintomas, ou uma patologia pélvica associada. (NÁCUL & SPRITZER, 2010). Dentre os tratamentos clínicos mais difundidos para a endometriose estão as combinações estroprogestogênicas, progestogênios isolados e análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Esses agentes inibem o crescimento dos implantes por decidualização e atrofia do endométrio ou

por meio da supressão dos hormônios esteróides ovarianos e indução de um estado de hipoestrogenismo (NÁCUL & SPRITZER, 2010; FERRERO et al., 2015; TAFI et al., 2015).

O tratamento cirúrgico da endometriose compreende desde procedimentos de baixa complexidade, como cauterização de focos superficiais e liberação de aderências velamentosas, até intervenções complexas nos ovários, intestino, bexiga e ureteres. Contudo, a vídeo-laparoscopia assume um papel relevante no controle da endometriose, pois permite ao ginecologista identificar e remover todos os focos da doença durante o ato cirúrgico (KHO & ABRÃO, 2012). Atualmente, sabe-se que não há correlação entre a gravidade dos sintomas e a extensão da doença, bem como com o prognóstico reprodutivo de infertilidade e de recorrência de dor em longo prazo (VERCELLINI et al., 2007; YE et al., 2015). Por isso muitas vezes se preconiza o tratamento cirúrgico apenas para pacientes que não respondam ao tratamento medicamentoso, bem como para aquelas que desejam engravidar espontaneamente (VERCELLINI et al., 2009).

2.1.4. Etiologia da Endometriose

Alguns pesquisadores têm proposto teorias para explicar o surgimento da endometriose, entretanto, sua etiologia ainda não está clara e é possível até que as diversas teorias se interajam. A teoria mais aceita até hoje é a de Sampson (1927), o qual descreveu que tecidos endometriais, por fluxo menstrual retrógrado, retornam pelas tubas uterinas e aderem na cavidade peritoneal (Figura 2). Essa teoria é sustentada pela presença de fragmentos de endométrio, que quando transplantados para meios de cultura ou em animais, levam à formação de focos de endometriose (KOKS et al., 1997; GIUDICE et al., 2010). Embora a teoria da menstruação retrógrada seja uma das explicações mais aceitas para o desenvolvimento da doença, os mecanismos celulares e moleculares ainda não são claros. Apesar de o fluxo menstrual retrógrado ser um processo fisiológico, o sistema imune é capaz de eliminar os restos de fragmentos endometriais e prevenir implantações e crescimento de células endometriais, porém, em algumas pacientes o tecido endometrial ectópico prolifera e cresce permitindo o desenvolvimento da endometriose (SIMPSON, 2000).

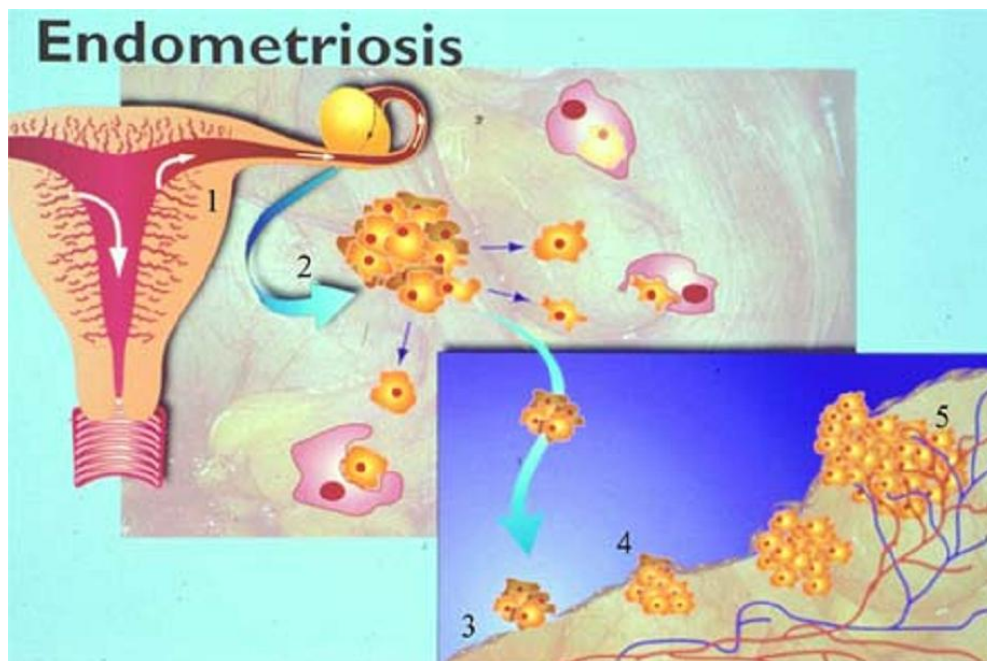


Figura 2. Teoria da menstruação retrógrada. Durante a menstruação fragmentos do endométrio sofrem refluxos (1) através das tubas uterinas para dentro da cavidade abdominal (2). Os fragmentos se aderem à superfície peritoneal (3), invadem (4), e adquirem um suprimento de vasos sanguíneos (5) (GROOTHUIS et al., 2005).

Outra teoria importante é a da metaplasia celômica, a qual assume que a degeneração do endométrio menstrual libera fatores endógenos, principalmente o estrogênio, com subsequente indução de um processo metaplásico no epitélio seroso dos ovários e nas células serosas do mesotélio, resultando no tecido endometrial (KUMAR, 2002). Como critério de definição de endometriose, glândulas e/ou estroma endometrial devem estar presentes nas lesões ectópicas. Os trabalhos suportando essa teoria possuem evidências que o epitélio endometrial e as glândulas são resultado de indução, mas não há evidências de formação de estroma endometrial no final do processo metaplásico (ABRÃO, 2000).

A deficiência imunológica também é um aspecto que tenta explicar o surgimento da endometriose, propondo que alterações neste sistema possibilitem o surgimento da doença. A literatura descreve que mulheres com endometriose apresentam uma deficiência na imunidade celular, na habilidade de reconhecer o material endometrial e uma diminuição da citotoxicidade mediada por células T (OLIVE et al, 1985; OOSTERLYNCK et al, 1992; AHN et al., 2015).

As propriedades hereditárias ou adquiridas do endométrio e defeitos hereditários ou

adquiridos do epitélio peritoneal são áreas de investigação ativa na busca de fatores que influenciam a predisposição para a implantação das células endometriais (BURNEY & GIUDICE, 2012), visto que 70 a 90% das mulheres apresentem menstruação retrógrada, apenas uma minoria desenvolve a doença (BRICOU et al., 2008). Estudos demonstraram que parentes de primeiro grau de mulheres com esta doença têm mais probabilidade de desenvolver endometriose e quando há uma ligação hereditária, a doença tende a ser pior para a próxima geração (SIMPSON et al., 1980; HANSEN et al., 2010; AUDEBERT et al 2015, RAHMIOGLU et al 2015)

Apesar das diferentes teorias propostas para explicar o desenvolvimento da endometriose, a etiologia da doença continua sendo um campo vasto para investigações. Como descrito anteriormente, a vascularização de implantes endometrióticos, é provavelmente o fator mais importante no processo de invasão das células endometriais em outros tecidos (ROCHA et al, 2013).

2.2. Angiogênese e Endometriose

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Esse processo é fortemente regulado em adultos, sendo que na maioria das vezes ocorre em órgãos lesados por um trauma ou infecção. A angiogênese envolve vários passos, os quais incluem ativação de células endoteliais, quebra de membrana basal e degradação da matriz extracelular, migração dessas células em direção a um estímulo, proliferação, fusão com o vaso original formando uma linha contínua de células endoteliais, tubulização e início do fluxo sanguíneo por esse novo vaso (Figura 3) (KLAGSBRUN, 1991, FIGG & FOLKMAN, 2008; TAHERGORABI & KHAZAEI, 2012).

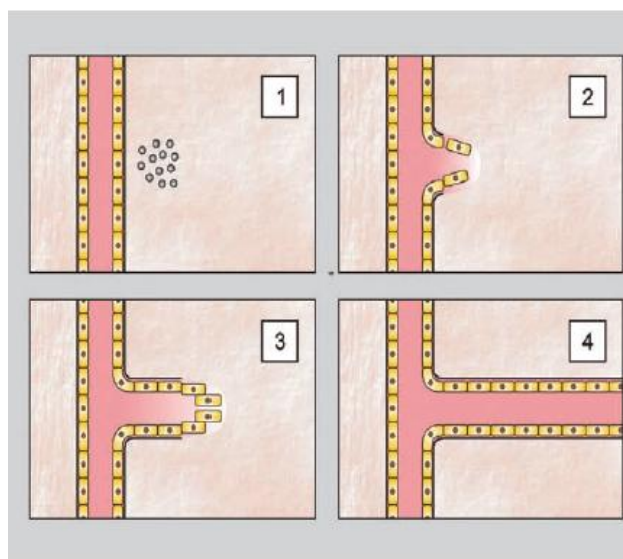


Figura 3. Representação esquemática da angiogênese (Adaptado de SILVA et al, 2007). Etapas: (1) estimulação das células endoteliais por citocinas angiogênicas; (2) degradação da lâmina basal do vaso, migração e proliferação das células endoteliais e formação do broto; (3) expansão do broto e formação do lúmen vascular e da lâmina basal; (4) novo vaso formado, amadurecido e funcional.

A formação de novos vasos sangüíneos ocorre em adultos, em casos como cicatrização de feridas, músculo cardíaco e no ciclo menstrual da mulher. A angiogênese pode ocorrer nos processos de reparo e em algumas patologias, tais como, a artrite reumatóide, a retinopatia diabética, a psoríase, a endometriose (FOLKMAN 2007, LASCHKE et al., 2012), sendo o exemplo mais clássico relacionado a processos tumorais (HANAHAHAN & FOLKMAN, 1996, FOLKMAN, 2007; YADAV et al., 2015).

Para a sobrevivência do endométrio ectópico, a formação de vasos sanguíneos é essencial e isso sugere que a angiogênese é um pré-requisito para o desenvolvimento da endometriose (NAP et al., 2004; BARAÑAO, 2014). Através da visão macroscópica, algumas lesões endometrióticas apresentam alta vascularização ao seu redor (OOSTERLYNCK et al., 1992; GROOTHUIS et al., 2005) (Figura 4). Em 2008, nosso grupo verificou um aumento significativo da distribuição do fator de von Willebrand, um marcador de densidade vascular, em amostras de endometriose de ovário, bexiga e retal quando comparadas aos respectivos tecidos normais (MACHADO et al., 2008).

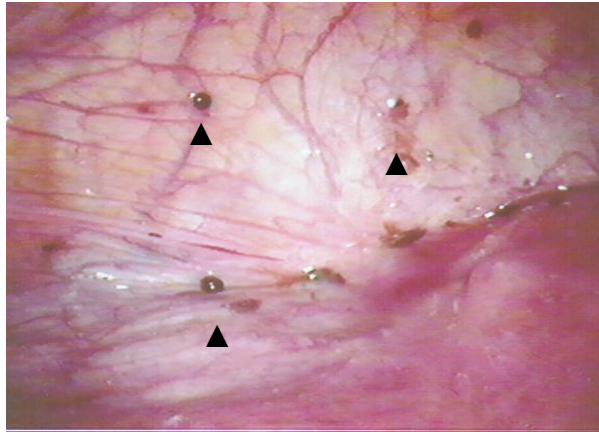


Figura 4: Visão macroscópica de focos endometrióticos no peritônio. Nota-se a alta vascularização ao redor dos focos de lesões endometrióticas (▲) (GROOTHUIS et al., 2005).

A angiogênese é um processo complexo e requer um delicado balanço entre indutores e inibidores (SCHAMS et al., 2004). Várias moléculas são identificadas como indutoras da angiogênese, pois esse processo é dependente de fatores liberados pelas células. Dentre os fatores que estão envolvidos no crescimento de vasos sanguíneos, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seu receptor VEGFR2 são os mais importantes (MCLAREN, 2000; OKADA et al., 2014).

2.3. Papel do Fator de Crescimento Endotelial Vascular e seu receptor VEGFR- 2 no desenvolvimento da Endometriose

O VEGF foi um dos primeiros fatores angiogênicos a ser descrito. Em 1983, Dvorak e colaboradores identificaram esta glicoproteína por meio da purificação de células tumorais, percebendo que esta melhorava a permeabilidade celular, sendo chamada de fator de permeabilidade vascular (VPF). Posteriormente, em 1989, Ferrara e Henzel identificaram uma proteína em células pituitárias bovinas e verificaram que ela também promovia a proliferação de células endoteliais. Finalmente, em 1990, ficou claro que as duas proteínas eram a mesma, passando a ser denominado de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e considerado um potente regulador positivo da angiogênese (RUHRBERG, 2008).

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica com peso molecular de 30 – 46 kilodaltons (kDa) caracterizada como um dos membros da superfamília de fatores de crescimento que possuem um nó de cistina, formado por oito resíduos de cisteínas ligados por pontes dissulfeto (HOLMES et al., 2007).

Atualmente, a família do VEGF em humanos consiste em seis principais membros: VEGF-A (ou VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o Fator de Crescimento Placentário (PlGF), ligados a três receptores transmembranares tirosina quinase denominados de receptor do fator de crescimento endotelial vascular - 1 (VEGFR-1), receptor do fator de crescimento endotelial vascular - 2 (VEGFR-2) e receptor do fator de crescimento endotelial vascular - 3 (VEGFR-3), conforme ilustrado na figura 5. Os dois primeiros receptores são expressos predominantemente em células endoteliais vasculares e suas progenitoras, e o VEGFR-3 é expresso principalmente em células endoteliais linfáticas (FERRARA et al., 2005).

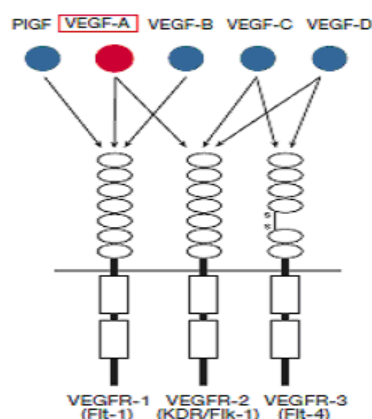


Figura 5. Esquema das cinco famílias do fator de crescimento endotelial vascular e a interação com seus receptores. Os vários membros da família do VEGF têm capacidade de sobreposição para interagir com um conjunto de receptores de superfície celular que desencadeiam respostas a estes fatores. Os principais receptores que parecem estar envolvidas na iniciação da cascata de transdução de sinal em resposta ao VEGF compreendem uma família de receptores tirosina-quinases estreitamente relacionadas, consistindo em três membros denominado VEGFR-1 (ou Flt-1), VEGFR-2 (KDR ou Flk-1) e VEGFR-3 (ou Flt-3). O VEGFR-2 parece mediar as principais ações de crescimento e de permeabilidade do VEGF, ao passo que o VEGFR-1 pode ter um papel negativo, atuando como um receptor chamariz ou suprimindo a sinalização por meio do VEGFR-2. O VEGFR-3 pode ser importante durante o desenvolvimento dos vasos sanguíneos, mas é mais exclusivo em vasos linfáticos. (YANCOPOULOS et al., 2000).

O VEGF apresenta várias funções biológicas como proliferação, migração, e permeabilidade das células endoteliais pela ligação com VEGFR-2 (FERRARA et al., 2005). A região extracelular do VEGFR2 contém sete domínios de tipo imunoglobulina (Ig), na qual o domínio 3 é uma região crítica para a ligação do VEGF e os domínios de 4 a 7 contêm características estruturais que impedem a dimerização do receptor de VEGF e a transdução de sinal (TAO et al., 2001).

Nesse contexto, estudos demonstram que o VEGF tem um papel importante no desenvolvimento e na progressão da endometriose (MUELLER et al., 2000), por ser expresso em células epiteliais e estromais no útero humano e em células reguladas por estrogênio e por ser expresso no epitélio dos implantes de endometriose (DONNEZ et al., 1998; TAN et al., 2002). Em 2008, nosso grupo observou um aumento significativo da distribuição de VEGF e de seu receptor VEGFR2 em amostras de endometriose de ovário, bexiga e reto quando comparadas aos respectivos tecidos normais (MACHADO et al., 2008). Corroborando com

nossos resultados, Cosín e colaboradores, em 2009, observaram um aumento dos níveis de VEGF no endométrio e no fluído peritoneal de mulheres com endometriose, contribuindo para a capacidade de implantação de células endometriais em locais ectópicos. Além disso, já é sabido que existe um componente genético presente na susceptibilidade da endometriose. (MATALLIOTAKIS et al., 2003). E atualmente diversos estudos tem demonstrado essa contribuição genética no desenvolvimento da doença (SUNDQVIST, 2013; SAHA et al., 2015; RAHMIOGLU, 2015). Em 2014 foi realizado uma revisão na qual descreve alguns possíveis genes candidatos no desenvolvimento da endometriose. Dentre eles, se destacam os genes envolvidos no processo angiogênico, que é o caso do gene do VEGF e seu receptor VEGFR2, que são alvos dessa dissertação (BARANOV et al., 2014).

2.3.1. Gene que codifica o VEGF e o VEGFR2 e seus polimorfismos

O VEGF é codificado por um gene com mesmo nome, localizado no cromossomo 6p21.3 e é composto por oito éxons (VINCENTI et al., 1996). Já o seu receptor, VEGFR2, é codificado pelo gene *KDR*, localizado no cromossomo 4q11-q12, sendo composto de trinta éxons (TERMAN et al., 1991; LU et al., 2000).

O gene *VEGF* apresenta, pelo menos, cinco polimorfismos importantes no estudo da endometriose (LI et al., 2013). Conforme consta na figura 6, três estão localizados na região promotora do gene, o SNP -2578C>A (rs699947), -1154G>A (rs1570360) e -460T>C (rs833061), um na região 5' não traduzida (UTR), o SNP 405G>C (rs2010963) e outro na região 3'UTR, o SNP 936C>T (rs3025039) (JAIN, et al., 2009). Estes SNPs podem afetar potenciais elementos reguladores, sensíveis à hipóxia, e podem contribuir para a alta variabilidade da produção de VEGF nos tecidos (AWATA, et al., 2002; STEFFENSEN et al., 2009; RUGGIERO, et al., 2011). Os SNPs -2578C>A, -1154G>A e -460T>C, apresentam maior atividade de transcrição e estão associados com alto nível da proteína (BROGAN et al., 1999). O SNP +405G>C, afeta a eficiência da transdução e está relacionado com a produção de VEGF a partir de células mononucleadas do sangue periférico (WATSON et al., 2000). Já o SNP +936C>T, influencia na concentração de VEGF plasmático circulante (RENNER et al., 2000).

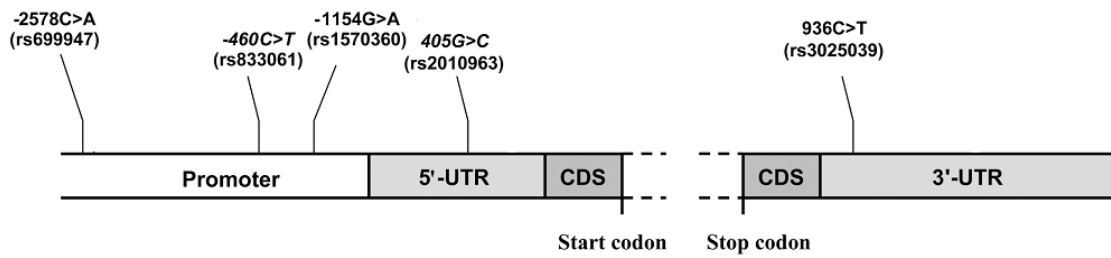


Figura 6. Estrutura do gene *VEGF* e a localização dos SNPs -2578C>A (rs699947), -460C>T (rs833061), -1154G>A (rs1570360), +405G>C (rs2010963) e +936C>T (rs3025039). A linha tracejada indica a região codificante (CDS) com a presença de sete íntrons. Adaptado de JAIN, et al., 2009.

Para o gene *KDR* existem três SNPs (Figura 7) mais comumente estudados (KANG., 2013), que inclui o -604T>C, localizado na região promotora do gene, podendo influenciar na expressão do gene (ZHANG et al., 2007), o 1192C>T, localizado no éxon 7, dentro do domínio de tipo Ig 3, com a substituição do aminoácido valina por uma isoleucina na posição 297 (Val297Ile), e o 1719T>A, localizado no éxon 11, dentro do domínio de tipo Ig 5, com a substituição do aminoácido glutamina por uma histidina na posição 472 (Gln472His). Estes dois últimos SNPs que ocorrem em regiões codificantes podem promover alterações potenciais à conformação do receptor interferindo com a capacidade de ligação com o VEGF, além de sua capacidade de sinalização. Considerando o SNP -604T>C, já foi observado que a presença do alelo -604C reduz a atividade transcricional do *KDR* (WANG et al., 2007).

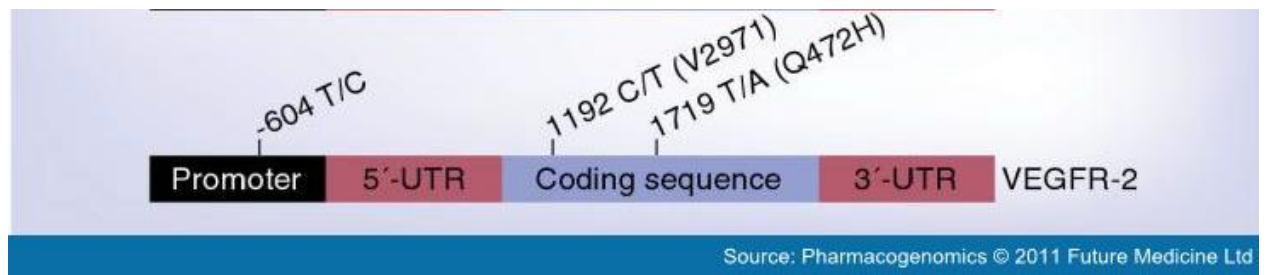


Figura 7. Estrutura do gene *KDR* e a localização dos SNPs -604T>C (rs2071559), 1192C>T (rs2305948) e 1719T>A (rs1870377). Adaptado de PHARMACOGENOMICS, 2011.

Os alelos descritos acima para os genes *VEGF* e *KDR* são importantes para o estudo da endometriose, pois também são relativamente frequentes nas diferentes populações, conforme constam, nas tabelas 1 e 2, os dados de frequência de mulheres saudáveis.

Tabela 1. Frequência (%) dos alelos de *VEGF* nas diferentes populações de mulheres saudáveis.

SNPs	N	Referências	Europeus	Afro-americanos	Brasileiros	Asiáticos
-2578C>A	1.625	Freathy et al., 2006	50			
	108	Biselli et al., 2008			49	
	61	Calderón et al., 2009		47		
	360	Liu et al., 2009				26
-460T>C	102	Summers et al., 2005	51			
	959	Zhao et al., 2008		51		
	180	Cosin et al., 2009		49		
	360	Liu et al., 2009				21
-1154G>A	1.625	Freathy et al., 2006	33			
	108	Biselli et al., 2008			30	
	180	Cosin et al., 2009		31		
	360	Liu et al., 2009				22
+405G>C	219	Kim et al., 2005				40
	102	Summers et al., 2005	31			
	334	Errera et al., 2007			35	
	140	Gentilini et al., 2008	31			
	180	Cosin et al., 2009		31		
+936C>T	108	Biselli et al., 2008			13	
	253	Fang et al., 2009	13			
	353	Guan et al., 2009		12		
	360	Liu et al., 2009				17
	199	Lamp et al., 2010		17		

Tabela 2. Frequência (%) dos alelos de *KDR* nas diferentes populações de mulheres saudáveis.

SNPs	N	Referências	Europa ^a	Asia ^b	Oceania ^c
-604T>C	1083	Andraweera et al., 2012			50
	230	Rah et al., 2013		2	
	124	Nouri et al., 2014	50		
1192C>T	912	Forsti et al., 2007	1		
	580	Kang et al., 2013		14	
	230	Rah et al., 2013		0	
	124	Nouri et al., 2014	8		
1719T>A	912	Forsti et al., 2007	4		
	580	Kang et al., 2013		45	
	230	Rah et al., 2013		15	
	124	Nouri et al., 2014	24		

^aMulheres da Austria e Alemanha. ^bMulheres da Coréia e China. ^cMulheres da Austrália e Nova Zelândia.

A identificação de variantes genéticas responsáveis pela susceptibilidade da endometriose tem sido cada vez mais estudada nos últimos anos (NYHOLT et al., 2012; ALBERTSEN et al., 2013; RAHMIOGLU et al., 2014). Diversos trabalhos têm investigado a associação de SNPs nos genes *VEGF* e *KDR* com a suscetibilidade de desenvolvimento da endometriose devido ao papel do VEGF e de seu receptor, VEGFR2, no estabelecimento das lesões endometrióticas (TROVÓ-MARQUI, 2012; KANG et al., 2013; LI et al., 2013).

2.3.2. Associação dos polimorfismos do *VEGF* e do *KDR* no desenvolvimento da endometriose.

Estudos do tipo caso-controle têm sido realizados, em diferentes populações, para avaliar a magnitude de associação entre os polimorfismos no gene *VEGF* com o desenvolvimento da endometriose, entretanto, os resultados das análises ainda são controversos (HSIEH et al., 2004; KIM et al., 2005; BHANOORI et al., 2005; IKUHASHI et al., 2007; GENTILINI et al., 2008; ZHAO et al., 2008; KIM et al., 2008; COSÍN et al., 2009; LIU et al., 2009; LAMP et al., 2010; ATTAR et al., 2010; TOKTAM et al., 2010; ALTINKAYA et al., 2011; EMAMIFAR et al., 2012; ROTMAN et al., 2013; SALIMINEJAD et al., 2013; VANAJA et al., 2013; KANG et al., 2013; HENIDI et al., 2015; SZCZEPAŃSKA et al., 2015).

Considerando o polimorfismo -2578C>A, localizado na região promotora do gene *VEGF*, três trabalhos distintos mostraram associações diferentes com o desenvolvimento da endometriose. Liu e colaboradores, em 2009, observaram que o alelo A foi associado com o efeito protetor (OR = 0,34, IC 95% = 0,17-0,70) para o desenvolvimento da endometriose em mulheres chinesas, corroborando com Lamp e colaboradores, que observaram uma associação negativa na presença do alelo A (OR = 0,40, IC 95% = 0,20–0,78) quando analisaram mulheres estonianas (LIU et al., 2009a; LAMP et al., 2010). Em contraste, em 2008, Zhao e colaboradores, estudaram 1.917 australianas e não observaram associação do SNP -2578C>A com a endometriose (ZHAO et al., 2008).

Dos doze estudos já publicados na literatura com SNP *VEGF* -460T>C (HSIEH et al., 2004; BHANOORI et al., 2005; KIM et al., 2005; IKUHASHI et al., 2007; ZHAO et al., 2008; COSÍN et al., 2009; LIU et al., 2009; ATTAR et al., 2010; ALTINKAYA et al., 2011; EMAMIFAR et al., 2012; HENIDI et al., 2015; SZCZEPAŃSKA et al., 2015), apenas um,

em 2004, observou uma associação positiva com a endometriose na presença do alelo T e do genótipo TT quando analisaram 122 mulheres chinesas com endometriose e compararam com 131 controles (HSIEH et al., 2004).

Para o SNP -1154G>A, localizado na região promotora do gene *VEGF*, dois estudos realizados, respectivamente nos Estados Unidos (ROTMAN et al., 2013) e na Estônia (LAMP et al., 2010), não observaram associação com a endometriose. Entretanto, Liu e colaboradores, observaram que o alelo A teve uma associação negativa (OR: 0.26, IC 95% 0,11-0.67) no desenvolvimento da endometriose em mulheres chinesas (LIU et al., 2009).

Considerando o SNP *VEGF* +405G>C, quatro estudos realizados em mulheres coreanas (KIM et al., 2005), italianas (GENTILINI et al., 2008), da Turquia (ATTAR et al., 2010) e do Irã (EMAMIFAR et al., 2012) revelaram um aumento de risco no desenvolvimento da endometriose na presença do alelo C, contudo, outros dois estudos mostraram resultados contrários, observando um efeito protetor à endometriose em mulheres indianas (BHANOORI et al., 2005) e da Turquia (ALTINKAYA et al., 2011). Recentemente, Szczepańska e colaboradores (2015), observaram que o SNP +405G>C não está associado com o desenvolvimento da endometriose, corroborando com cinco quatro trabalhos anteriores que avaliaram esse mesmo SNP (KIM et al., 2005; ZHAO et al., 2008; COSÍN et al., 2009; LAMP et al., 2010; SALIMINEJAD et al., 2013; HENIDI et al., 2015).

Em relação ao SNP *VEGF* +936C>T, localizado na região 3'UTR, quatro trabalhos realizados nas populações australiana, chinesa, estoniana e polonesa, não observaram associação com a endometriose (ZHAO et al., 2008; LIU et al., 2009; LAMP et al., 2010; SZCZEPAŃSKA et al., 2015). Contrariamente, em mulheres japonesas (IKUHASHI et al., 2007), espanholas (COSÍN et al., 2009) e tunisianas (HENIDI et al., 2015) foi observado uma associação positiva na presença do alelo T com um risco aumentado de aproximadamente 2 vezes para o desenvolvimento da endometriose.

Para os SNPs do gene *KDR*, estudos têm sido realizados em diversas doenças, incluindo câncer de mama, doença coronária, insuficiência ovariana prematura (POF), e aborto espontâneo recorrente (RSA) (FORSTI et al., 2007; WANG et al., 2007; SU et al., 2011; RAH et al., 2012; RAH et al., 2013). Na endometriose, apenas um estudo do tipo caso-controle avaliou a magnitude de associação entre cinco SNPs (*KDR* 1192C>T, 1719T>A, +31C/T, IVS6+54T>C e IVS25-92G>A) e o desenvolvimento da endometriose em mulheres chinesas. Como resultado foi observado associação apenas na presença do alelo T do

SNP1192C>T (OR = 0,74, IC 95% = 0,57 –0,95), revelando uma proteção no desenvolvimento da doença (KANG et al., 2013).

Até o início deste trabalho não existiam dados na população brasileira sobre a associação entre SNPs do gene *VEGF* e do *KDR* e o desenvolvimento da endometriose. A investigação para o melhor conhecimento da funcionalidade dos polimorfismos nesses genes e suas associações com a endometriose pode levar a uma melhor compreensão da etiologia da endometriose, servindo como base no entendimento da doença e contribuindo para um diagnóstico efetivo e menos invasivo. Além disso, como a endometriose é sabidamente uma doença heterogênea e que a intensidade dos sintomas não está relacionada ao grau de gravidade da doença (GIUDICE, 2010), é importante encontrar marcadores moleculares que viabilizem um diagnóstico precoce antes do procedimento. Assim, surgiu a possibilidade de se estudar a magnitude de associação entre SNPs de *VEGF* e do *KDR* com as diferentes manifestações clínicas da doença.

2.3.3. Associação dos polimorfismos do *VEGF* e do *KDR* e características clínicas da endometriose.

A endometriose está associada a infertilidade grave e incapacitante, a sintomas dolorosos, incluindo dor pélvica crônica, dismenorréia e dispareunia (BELLELIS et al., 2010). Além disso, esta patologia pode afetar negativamente o desenvolvimento do embrião já que eventos nucleares e citoplasmáticos aberrantes em embriões são seis vezes mais propensos em mulheres com endometriose quando comparado com mulheres sem a doença (BRIZEK et al., 1995; ZYGMUNI et al., 2003).

Os mecanismos envolvidos no surgimento dos sintomas da endometriose ainda não são conhecidos e nem todas as pacientes experimentam a mesma sintomatologia (GIUDICE, 2010). Com isso alguns estudos avaliaram a associação entre polimorfismos do *VEGF* e do *KDR* com sintomas relacionados à endometriose. Em 2005, Kim e colaboradores observaram que a distribuição genotípica do polimorfismo *VEGF* +405G<C foi significativamente diferente, com um predomínio do genótipo 405CC entre os casos de endometriose inférteis quando comparadas com mulheres férteis (P = 0,02) (KIM et al., 2005). Já em 2009, Cosin e colaboradores, estudaram a associação de SNPs do *VEGF* em 186 casos de endometriose em comparação com 180 mulheres férteis na população espanhola e verificaram uma maior

frequência do alelo 936T nas mulheres férteis. No entanto, a distribuição de genótipos e as frequências dos alelos dos polimorfismos -460T<C e 405G<C foram semelhantes nos dois grupos (COSIN et al., 2009).

Lee e colaboradores, em 2010, avaliaram a associação de polimorfismos do gene *VEGF* com a ocorrência do aborto espontâneo recorrente em mulheres coreanas e observaram que a frequência do SNP *VEGF* 1154G>A e os haplótipos AAGT e CAG (-2578C>A, -1154G>A, 405G>C, 936C>T) é significativamente diferente entre caso e controle, sugerindo que estes polimorfismos podem ser um determinante genético para o risco de aborto espontâneo recorrente (LEE et al., 2010).

Em 2011, Su e colaboradores, estudaram a associação de SNPs e haplótipos *VEGF* e seu receptor com o aborto espontâneo recorrente. Como resultado os autores observaram diferenças significativas nas frequências dos haplótipos ATG do *VEGF* (rs3025033, rs3025035, rs10434) e ACATG do *KDR* (rs17709898, rs6838752, rs1870377, rs7654599, rs3828550) quando compararam casos de endometriose com controles ($P < 0,05$), sugerindo o papel da via *VEGF-VEGFR2* no aborto espontâneo recorrente (SU et al., 2011).

A endometriose parece afetar, de forma negativa, cada parte do processo reprodutivo, porém a relação de causa e efeito entre a endometriose e a redução de fecundação ainda não foi estabelecida. Portanto, existe a necessidade da continua investigação sobre a presença da infertilidade associada a endometriose, principalmente, em relação aos fatores genéticos que possam estar envolvidos na fisiopatologia da doença.

3. JUSTIFICATIVA

A endometriose é uma doença ginecológica de elevada frequência, acometendo cerca de 10% das mulheres em idade reprodutiva, sendo considerado um problema de saúde pública relevante, com elevado custo de diagnóstico e tratamento, além do diagnóstico ser invasivo e do arsenal terapêutico ser limitado. Um dos principais fatores para o estabelecimento e progressão da endometriose é a angiogênese, sendo o VEGF um dos principais fatores pró-angiogênicos. Nosso grupo já verificou que distribuição do VEGF e seu receptor (KDR) são significativamente maiores em amostras de diferentes tipos de endometriose quando comparado ao controle. Além disso, a angiogênese, via VEGF-KDR é um aspecto crítico na fisiopatologia da doença.

Com o intuito de avaliar o perfil genético de casos de endometriose para tentar explicar a etiologia da doença, bem como para auxiliar no diagnóstico precoce e menos invasivo da endometriose, realizaremos um estudo caso-controle para avaliar a magnitude de associação entre polimorfismos dos genes *VEGF* e *KDR* no desenvolvimento e grau da endometriose, em virtude do papel fundamental destes fatores na cascata de sinalização via VEGF-VEGFR2 na etiologia da endometriose.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Avaliar o papel dos SNPs de *VEGF* (-2578C>A, -460T>C, -1154G>A, +405G>C e +936C>T) e do *KDR* (-604 T>C, 1192C>T e 1719T>A) na etiologia da endometriose.

4.2. Específicos

4.2.1. Determinar a frequência (genotípica, alélica e haplotípica) dos SNPs do *VEGF* (-2578C>A, -460T>C, -1154 G>A, +405G>C e +936C>T) e do *KDR* (-604 T>C, 1192C>T e 1719T>A) em pacientes com endometriose e em mulheres com o diagnóstico negativo da doença;

4.2.2. Avaliar a magnitude de associação dos SNPs estudados e o desenvolvimento da endometriose, assim como a gravidade da doença;

4.2.3. Verificar o efeito combinado dos SNPs estudados nos genes *VEGF* e *KDR* com o desenvolvimento da endometriose e com a presença dos sintomas clínicos;

4.2.4. Realizar uma revisão sistemática dos estudos caso-controle que avaliaram a magnitude de associação dos SNPs dos genes *VEGF* e *KDR* no desenvolvimento da endometriose, além de descrever as diferenças metodológicas dos estudos revisados.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Visando atingir os objetivos específicos serão realizados duas metodologias distintas. Assim, os objetivos específicos 4.2.1. a 4.2.3. foram alcançados realizando um estudo analítico observacional do tipo caso-controle, ao passo que para responder ao objetivo específico 4.2.4. foi realizada uma revisão sistemática da literatura.

5.1. ESTUDO CASO-CONTROLE

5.1.1. Delineamento do estudo

Neste projeto foi realizado um estudo analítico observacional do tipo caso-controle de base hospitalar em mulheres residentes dos municípios de São Paulo e do Rio de Janeiro.

Um estudo caso-controle é um estudo epidemiológico analítico observacional em que um grupo de casos, indivíduos com a doença, é comparado, quanto a exposição a um ou mais fatores de risco, a um grupo de indivíduos semelhante ao grupo de casos, chamado de controle (sem a doença) (SCHULZ et al., 2002). Em comparação a outros tipos de estudos, os de caso-controle podem levar a achados importantes e eficientes em termos de tempo relativamente curto com poucos recursos financeiros. É amplamente utilizado no estudo de doenças raras ou com longo período de indução e exposições frequentes. Entretanto, estudos de caso-controle tendem a ser mais suscetíveis a vieses que outros desenhos analíticos epidemiológicos (SESSO et al., 1987). O viés é um erro na forma como os indivíduos são recrutados para o estudo (seleção) ou na maneira pela qual as variáveis são medidas (informação), que distorce a estimativa da medida de efeito (RÊGO, 2010).

A definição de caso é um ponto crítico em um estudo de caso-controle sendo os critérios de diagnósticos e os de elegibilidade dois aspectos fundamentais para a seleção dos indivíduos doentes. O objetivo é assegurar que todos os verdadeiros casos tenham igual probabilidade de entrar no grupo, e que nenhum falso caso seja selecionado. A inclusão desses últimos distorceria a estimativa da medida de associação na direção da hipótese nula (CHECKOWAY, 1989; LASKY & STOLLEY, 1994).

A seleção do grupo controle requer um cuidado especial, e talvez seja o principal desafio para a garantia da validade do estudo. O grupo controle é formado por pessoas que

não têm a doença sob investigação, mas que podem ter outra(s), ou seja, não é necessário que essas pessoas sejam saudáveis, o que evita um viés de informação. É fundamental que os indivíduos, tanto do grupo caso, quanto do grupo controle, sejam selecionados sem nenhuma base de conhecimento sobre a exposição. Além disso, o grupo controle é diretamente determinado pela definição e seleção do grupo casos, ou seja, casos e controles devem ser amostrados de uma mesma fonte (ZONDERVAN et al., 2002a).

5.1.2. População de estudo

5.1.2.1. Seleção da População

Este estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose”, iniciado em março de 2011, e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Federal dos Servidores do Estado (HFSE), do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e do Hospital Moncorvo Filho.

As participantes do presente estudo foram recrutadas em quatro hospitais públicos, sendo três localizados no Rio de Janeiro, o HFSE, o Hospital Federal da Lagoa (HFL) e o Hospital Moncorvo Filho, e um localizado em São Paulo, HC-FMUSP. No HFSE as coletas ocorreram entre março de 2011 a setembro de 2015, no HC-FMUSP foram realizadas no período de março a dezembro de 2012, no HFL, entre novembro de 2013 a novembro de 2015 e no Moncorvo Filho, entre janeiro de 2015 a novembro de 2015. Todas as mulheres convidadas a participar do estudo receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO I e II) e após assinarem foram incluídas no projeto.

5.1.2.2. População elegível

Os critérios de inclusão para a participação do presente estudo foram mulheres com idade entre 18 e 55 anos, submetidas à cirurgia do tipo laparoscopia ou laparotomia nas unidades hospitalares envolvidas no estudo, com qualquer indicação de diagnóstico e/ou tratamento ginecológico, conforme fluxograma apresentado na figura 8. As mulheres com diagnóstico positivo de endometriose, seguido de confirmação histopatológica da doença, foram incluídas no grupo de casos, enquanto que as mulheres com diagnóstico cirúrgico negativo de endometriose e sem histórico da doença foram incluídas como grupo controle.

Como critérios de exclusão foram considerados as mulheres do estudo que apresentarem alguma neoplasia maligna de qualquer natureza ou presença de adenomiose. Foram considerados como perda as mulheres que se recusaram em coletar o material biológico (sangue periférico) ou que a amostra não amplificou na análise de PCR, e as pacientes que tiveram a cirurgia cancelada por qualquer razão.

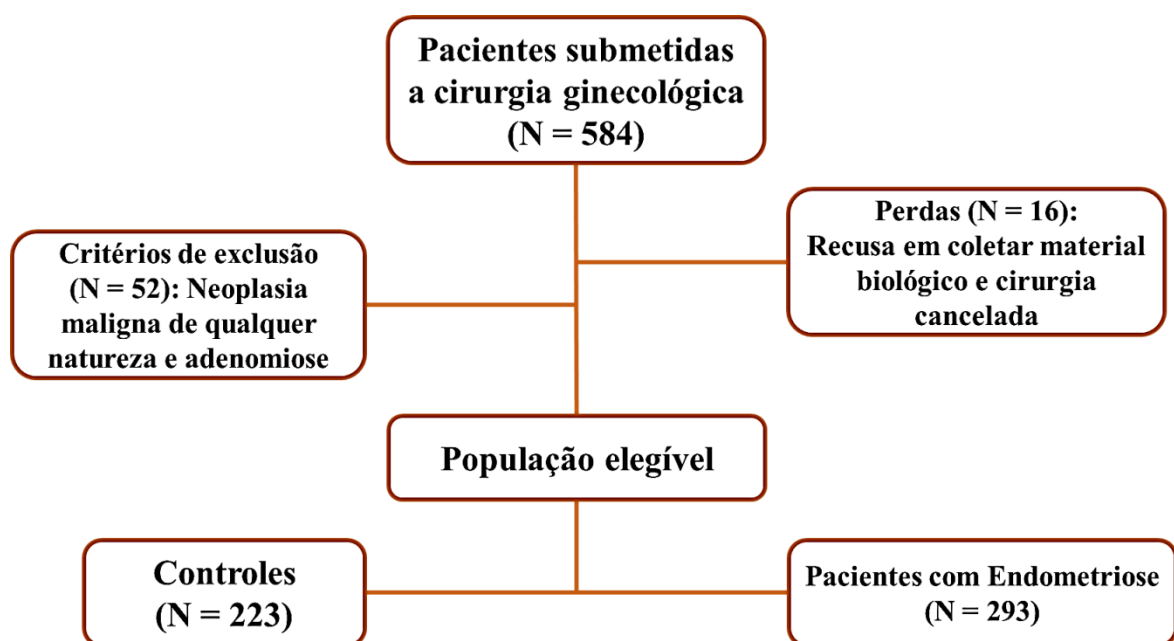


Figura 8. Fluxograma do estudo

5.1.3. Coleta de Dados

5.1.3.1. Questionário

Foi utilizado o banco de dados do projeto original, que foi preenchido com base em um questionário (ANEXO III), que contém 78 perguntas divididas em 12 itens, sendo a maioria de múltipla escolha para o fácil e rápido preenchimento. Cada questionário foi identificado com o número próprio do projeto, seguido do prontuário da voluntária do hospital de captação, nome da paciente e data de nascimento.

Neste projeto utilizamos a idade, paridade e o histórico familiar de endometriose como variáveis sócio-demográficas, o peso e a altura para calcular o índice de massa corporal (IMC), como variável antropométrica e dentre as variáveis clínicas foram consideradas a menarca, o tipo de cirurgia realizada, o sítio/local da endometriose, a profundidade do implante, o grau de estadiamento da doença, os sintomas relacionados à endometriose, como a dismenorreia, dor pélvica crônica, dispareunia, sintomas urinários ou intestinais cíclicos, além das características reprodutivas, como o tipo de infertilidade e o número de abortos.

5.1.3.2. Coleta de sangue e extração de DNA

Após obtenção do TCLE assinado e do Questionário devidamente preenchido foi coletada uma amostra de sangue periférico (3 mL) em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) devidamente identificado no dia da cirurgia ou durante as consultas de rotina das pacientes nas unidades hospitalares onde foram recrutadas. O sangue coletado foi encaminhado em recipiente adequado para transporte de material biológico, como é preconizado pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), para o laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas (LaPesF) do Centro Universitário da Zona Oeste (UEZO) para posterior extração de DNA e genotipagem dos polimorfismos.

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit de extração de DNA genômico (Genomic DNA Extraction, Real Biotech Corporation), conforme procedimentos recomendados pelo fabricante. Em resumo, foram adicionados 200 µl de sangue, em um tubo eppendorf contendo 20 µl de Proteinase K (10mg/mL). Em seguida, o tubo eppendorf foi mantido em temperatura ambiente por 5 à 10 minutos. Depois adicionado 200 µl de GB Buffer no tubo eppendorf para a lise das células, incubando-o por 10 minutos, após mistura no vórtex. O processo de extração foi realizado com etanol (96-100%), seguido da retenção do DNA em coluna específica (Real Biotech Corporation). O DNA foi recuperado com o tampão de lavagem Wash Buffer e centrifugado. E para finalizar, foi adicionado ao DNA extraído o

tampão de eluição Evolution Buffer. As amostras de cada participante foram colocadas em micro tubos de 1500 µl, devidamente etiquetados, com o código interno da voluntária, a data de extração, e em seguida, foram armazenadas em freezer (-20°C) para posterior análise de genotipagem.

5.1.3.3. Genotipagem

A genotipagem dos cinco SNPs do gene *VEGF* -2578C>A (rs699947), -460T>C (rs833061), -1154G>A (rs1570360), +405G>C (rs2010963), +936C>T (rs3025039) e dos três SNPs do gene *KDR*-604 T>C (rs2071559), 1192C>T (rs2305948) e 1719T>A (rs1870377) foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real no laboratório LaPesF da UEZO. O DNA foi amplificado utilizando oligonucleotídeos específicos e a identificação dos polimorfismos foi realizada utilizando sondas TaqMan exclusivas para cada SNP, validadas e adquiridas da empresa Applied Biosystems (Tabela 3).

Tabela 3. Ensaios TaqMan (sondas e oligonucleotídeos) para genotipagem dos SNPs estudados dos genes *VEGF* e *KDR*.

SNP	Ensaios TaqMan	Região	Sonda [SNP]	Oligonucleotídeos
rs699947	C_8311602_10	RP	GCCAGCTGTAGGCCAGACCCTGGCA[A/C]GATCTGGGTGGATAATCAGACTGAC	5'-GGATGGGGCTGACT AGGTAAGC-3' 5'-AGCCCCCTTTTCCT CCAAC-3' 5'-TGTGCGTGTGGGGTTGAGAG-3' 5'-TACGTGCGGACAGGGCCTGA-3'
rs833061	C_1647381_10	RP	GAGTGTGTGCGTGTGGGGTTGAGGG[C/T]GTTGGAGCGGGGAGAAGGCCAGGGG	5'-TCCTGCTCCCTCCT CGCCAATG-3' 5'-GGCGGGGACAGGC GAGCATC-3' 5'-TTGCTTGCCATTCCCCACTTGA-3' 5'-CCGAAGCGAGAACAGCCCAGAA-3'
rs1570360	C_1647379_10	RP	AGCCCGGGCCCGAGCCGCGTGTGGA[A/G]GGGCTGAGGCTCGCCTGTCCCCGCC	5'-AAGGAAGAGGAGAC TCTGCGC-3' 5'-TATGTGGGTGGGT GTGTCTACAG-3'
rs2010963	C_8311614_10	5'-UTR	CGCGCGGGCGTGCAGCAGCGAAAG[C/G]GACAGGGGCAAAGTGAGTGACCTGC	5'-CGCCAAATATTTTGGGAAATAGCGGGAAAG-3' 5'-TTGTTTGGCCAGTATAATTGTAGTTTAAAACG-3'
rs3025039	C_16198794_10	3'-UTR	GCATTCCCGGGCGGGTGACCCAGCA[C/T]GGTCCCTCTTGAATTGGATTGCGC	5'-GTACAATCCTTGGTCACTCCGGGGTA-3' 5'-TATGCTGTGCTTTGGAAGTTCAGTCAACTC-3'
rs2071559	C_15869271-10	RP	GAAAACGCACTTGCCCAGTTCGCCA[A/G]CATTCCCGCTATTTCCCAAAATATT	5'-TGGAAGTCCTCCACACTTCTCCAT-3' 5'-AAGGAGCCCAGTGGCTTCTAAGTT-3'
rs2305948	C__22271999_20	Éxon 7	TACAATCCTTGGTCACTCCGGGTTA[C/T]ACCATCTATAGTTAAGGTGCTCAA	
rs1870377	C__11895315_20	Éxon 11	GGTATGGGTTTGTCACTGAGACAGC[A/T]TGGCTATAAGAAAGAGATAACAGCG	

RP é a Região Promotora, 5'-UTR é a Região 5'-Não traduzida , 3'-UTR é a Região 3'- Não tra

Para todos os ensaios as reações de PCR em tempo real foram realizadas em um volume final de 8 µl, com 30 ng de DNA, 1x Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems), 1x de cada ensaio específico de oligonucleotídeo e sonda, e H₂O q.s.p. As condições da PCR foram: 95°C por 10 minutos, acompanhados de 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 1 minuto. A detecção dos alelos foi realizada após 1 minuto a 60°C no aparelho 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e, em seguida, os genótipos foram determinados diretamente, conforme ilustrado na figura 9 e 10.

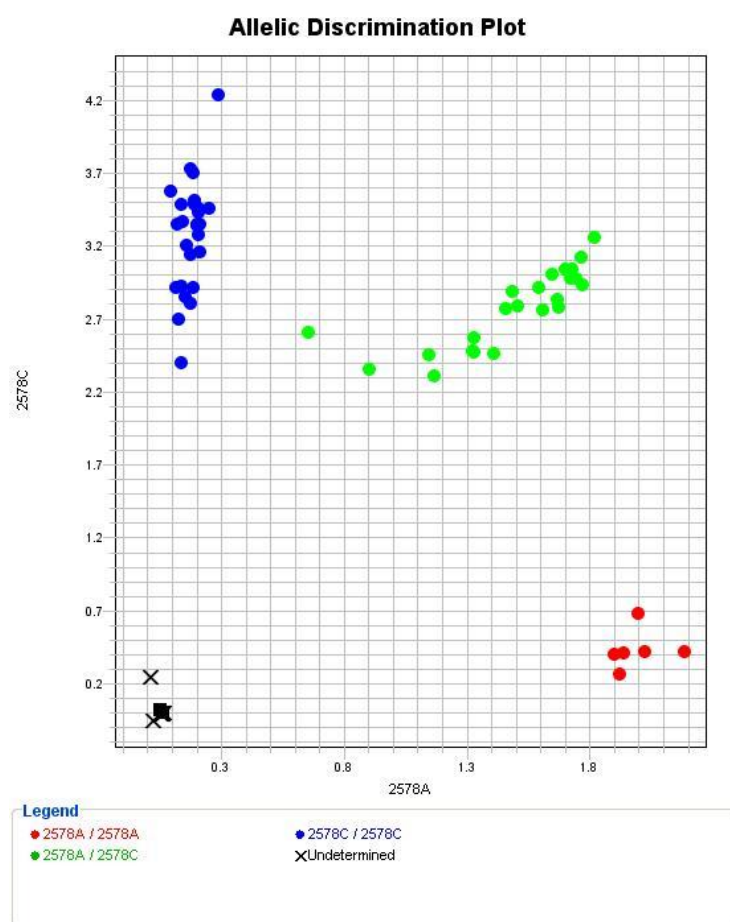


Figura 9. Exemplo da determinação dos genótipos do SNP *VEGF* -2578C>A por PCR em tempo real. Em azul estão os indivíduos com genótipo homozigoto selvagem *VEGF* -2578CC; em verde, os heterozigotos *VEGF* -2578CA e, em vermelho, os homozigotos variantes *VEGF* -2578AA. O quadrado em preto é o controle negativo, enquanto o x, em preto, indica as amostras que não amplificaram.

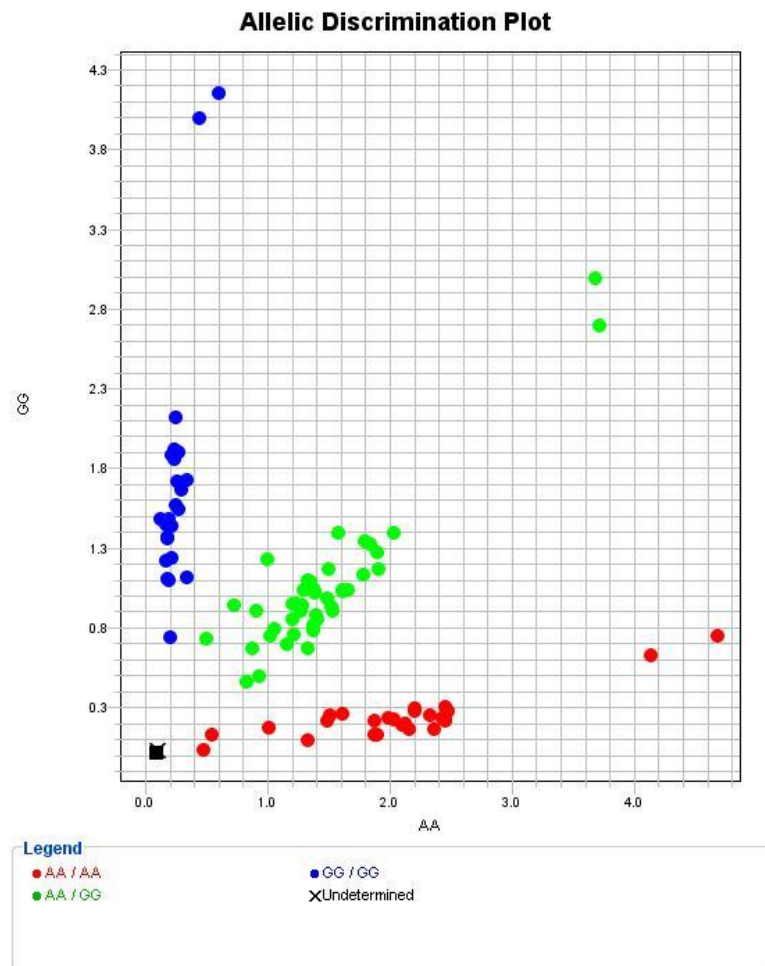


Figura 10. Exemplo da determinação dos genótipos do SNP *KDR* -604T>C por PCR em tempo real. Em azul estão os indivíduos com genótipo homozigoto selvagem *KDR*-604TT; em verde, os heterozigotos *KDR*-604TC e, em vermelho, os homozigotos variantes *KDR*-604CC. O quadrado em preto é o controle negativo, enquanto o x, em preto, indica as amostras que não amplificaram.

5.1.4. Análise de Dados

Para o cálculo do tamanho amostral deste estudo foi utilizado o programa Epi Info 7, versão 7.1.3. (<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/html/downloads.htm>) para detectar uma diferença entre os grupos caso e controle, assumindo um poder de 0,8 e 5% de erro do tipo I.

Os questionários tiveram entrada dupla no banco de dados e foi efetuada uma avaliação qualitativa da coleta das informações com uma revisão criteriosa de todos os questionários coletados.

As variáveis contínuas do estudo foram apresentadas como média $\pm$ desvio padrão (DP) e as diferenças entre as médias foram avaliadas utilizando o teste *t* de Student, enquanto que os dados categóricos foram expressos em porcentagem e avaliados pelo teste Qui-quadrado de Person (X^2) ou teste exato de Fisher, quando necessário.

A frequência alélica e genotípica dos polimorfismos dos genes *VEGF* e *KDR* foi determinada por contagem direta dos alelos, e em seguida foi calculado o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). O coeficiente dos haplótipos e os padrões de desequilíbrio de ligação (D' que é o grau de desequilíbrio no módulo e o R^2 que é o grau de correlação) foram inferidos utilizando o programa Haploview (Haploview version 4.2), com base no algoritmo de maximização de expectativa (Barrett et al., 2005). As frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas entre os grupos estudados, casos e controles, foram comparadas pelo teste χ^2 ou, quando for o caso, o teste exato de Fisher.

Para avaliar a magnitude de associação entre a exposição de interesse (SNPs de *VEGF* e do *KDR*) e o desenvolvimento da endometriose foi realizada uma regressão logística multivariada não condicional, sendo obtidas razões de chance (OR) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%), ajustados por variáveis selecionadas com $P = 0,20$ para controlar os possíveis fatores de confundimento.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS, versão 20.0 e um valor de P menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5.1.5. Aspectos Éticos

Todos os aspectos éticos e legais referentes às fases do projeto foram respeitados de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, revista na Resolução CNS/MS nº 466, de 12 de dezembro de 2012, que contém diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Assim, todas as mulheres convidadas a participar do estudo receberam o TCLE e foram orientadas a lê-lo cuidadosamente e a inquirir a respeito de qualquer dúvida quanto ao projeto. As voluntárias que concordaram em assinar o TCLE receberam uma cópia original deste documento assinada pelo pesquisador principal. O projeto original foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HFSE (Nº 000.414/2011) (ANEXO IV), do HC-FMUSP (Nº09010/2011) (ANEXO V) e do Moncorvo Filho (CAAE: 45941715.5.0000.5275) (ANEXO VI). Todas as informações pessoais serão mantidas em sigilo e serão utilizadas apenas pelos investigadores envolvidos no estudo. O projeto atual, para avaliar a magnitude de associação dos SNPs do *VEGF* e *KDR* no desenvolvimento da endometriose foi aprovado pelo CEP da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP) (CAAE: 45025915.4.0000.5240) (ANEXO VII).

5.2. METODOLOGIA DA REVISÃO SITEMÁTICA

5.2.1. Estratégia de Busca

Para identificar todos os estudos publicados até o dia 1 de setembro de 2015, sobre as associações entre SNPs de *VEGF* e/ou *KDR* e o desenvolvimento da endometriose foi realizada uma avaliação dos títulos e dos resumos (abstracts) dos estudos encontrados por dois pesquisadores (J.V.C. e J.A.P), de forma independente e “cegada”, na base de dados do PubMed, MEDLINE, BVS e Scielo, utilizando os seguintes descritores: (“endometriosis” OR “endometriose”) AND (“polymorphism” OR “polimorfismo” OR “SNP” OR “genetic polymorphism” OR “polimorfismos genéticos”) AND (“VEGF” OR “Vascular endothelial growth factor” OR “Fator de crescimento endotelial vascular” OR “VEGFR-2” OR “Vascular endothelial growth factor-2” OR “Fator de crescimento endotelial vascular-2” OR “KDR” OR “Kinase Insert

Domain Receptor” OR “Receptor do domínio de inserção da cinase”). Os estudos foram selecionados seguindo os critérios de inclusão e exclusão, pré-selecionados, conforme descritos a seguir.

5.2.2. Critério de Inclusão e de Exclusão

Como critério de inclusão para esta revisão foram selecionados estudos que utilizaram um desenho do tipo caso-controle e que avaliaram associações entre polimorfismos do gene *VEGF* e/ou *KDR* e o desenvolvimento da endometriose. Quanto ao período de publicação foram incluídos artigos publicados até setembro de 2015, sem restrição de idioma.

Os critérios de exclusão dos estudos foram: (i) ausência de uma população controle; (ii) dados de associações incompletos; (iii) dados em duplicata; (iv) meta-análise, revisão, cartas, comentários ou artigos editoriais; (v) aqueles que não analisaram SNPs no *VEGF* e/ou *KDR*; (vi) os que não incluíram pacientes com endometriose; (vii) e aqueles aos quais não tivemos acesso ao texto na íntegra.

5.2.3. Coleta de dados

Depois de realizada a estratégia de busca na base de dados do PubMed, MEDLINE, BVS e Scielo dos artigos que estudaram SNPs nos genes *VEGF* e/ou *KDR* com o desenvolvimento da endometriose, as seguintes informações foram extraídas: primeiro autor; ano de publicação; revista; país em que o estudo foi realizado; número de casos e controles; média de idade dos casos e controles com seus respectivos desvios de padrão e/ou intervalo; critérios de seleção/elegibilidade e exclusão dos casos de endometriose e dos controles; estadiamento da endometriose; fonte dos controle; tipo de SNP; técnica de genotipagem utilizada para identificação dos SNPs estudados; dados de frequência alélica e genotípica dos SNPs e dado estatístico da razão de chances (OR), com seus respectivos intervalos de confiança 95% (IC 95%).

5.2.4. Avaliação da qualidade dos estudos incluídos

Dois revisores (J.V.C. e J.A.P), independentemente, avaliaram a qualidade metodológica dos 19 estudos incluídos nesta revisão, utilizando os critérios do instrumento STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) (MALTA, 2010; VON, 2007). Vinte e dois itens de avaliação receberam uma pontuação de 0 a 1. Esses itens referem-se ao título e resumo do artigo (item 1), à introdução (itens 2 e 3), aos métodos (itens de 4 a 12), aos resultados (itens de 13 a 17), à discussão (itens de 18 a 21) e à informação sobre o financiamento (item 22). Depois da avaliação de todos os critérios, cada artigo recebeu uma nota de 0 a 22 de cada pesquisador. Para a pontuação final foi realizada uma média das duas notas, sendo transformada em percentual para melhor avaliar a qualidade dos artigos. Os revisores definiram, previamente, que os artigos que atingissem um percentual superior a 50% seriam considerados satisfatórios.

6. RESULTADOS

Os dados obtidos neste estudo constituíram três artigos e serão apresentados individualmente em três partes, assim denominadas: Influência dos SNPs de *VEGF* no desenvolvimento da endometriose; Efeito combinado dos SNPs de *VEGF* e *KDR* na susceptibilidade da endometriose e nos sintomas da doença; Revisão sistemática: Estudos caso-controle que avaliaram os SNPs nos genes *VEGF* e/ou *KDR* no desenvolvimento da endometriose.

6.1. Influência dos SNPs de *VEGF* no desenvolvimento da endometriose

Neste artigo foi avaliado a influência de cinco SNPs do gene *VEGF* (-2578C>A, -460T>C, -1154G>A, +405G>C e +936C>T) no desenvolvimento da endometriose, em mulheres atendidas em dois hospitais públicos brasileiros, um no Rio de Janeiro (HFSE) e outro em São Paulo (HC-FMUSP). Este foi o primeiro estudo a avaliar a influência combinada dos cinco SNPs de *VEGF* mais comuns com o desenvolvimento da endometriose. Participaram deste estudo 182 casos com confirmação histopatológica de endometriose, sendo 40 recrutadas no HFSE e 142 no HC-FMUSP; e 112 mulheres com diagnóstico laparoscópico negativo da doença (71 recrutadas no HFSE e 41 no HC-FMUSP).

Não houve diferença significativa na média de idade entre os casos de endometriose (35.8 ± 8.6) e os controles (34.5 ± 6.4). Entretanto, houve uma predominância significativa do IMC baixo e/ou normal ($\leq 24,9$) para os casos de endometriose (75,1%), enquanto que os controles tinham uma predominância de pacientes acima do peso e/ou obesos (≥ 40) (58,4%). Observou-se também que pacientes com endometriose apresentavam uma maior prevalência de dismenorreia (51,7%), dor pélvica crônica (51,7%), dispareunia (57,5%) e infertilidade (primária e secundária) (46,9%). Todos os SNPs estudados estavam em HWE na população total do estudo e em cada grupo (casos e controles). Foi observado diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas entre caso e controle na presença do SNP *VEGF* -1154G>A ($P=0,005$ e $P=0,01$, respectivamente). Entretanto, não houve diferença significativa entre os dois grupos considerando as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs *VEGF* -2578C>A, -460T>C, +405G>C e +936C>T. O SNP *VEGF* -1154G>A apresentou uma associação positiva com a endometriose, considerando todos os

casos da doença (OR: 1,90; 95 % IC: 1,23 – 2,97), ou apenas pacientes com DIE (OR: 1,83; 95 % IC: 1,16 – 2,90) e com os estágios III e IV (OR: 1,97; 95 % IC: 1,21 – 3,19). Além disso, observou-se que o haplótipo *VEGF* CCGG (–2578C>A, –460T>C, –1154G>A e +405G>C) foi associado com um efeito protetor na susceptibilidade da endometriose, considerando todos os casos de endometriose (OR: 0,36; 95 % IC: 0,15 – 0,86), ou pacientes com DIE (OR: 0,37 95 % IC: 0,15 – 0,90) e com os estágios III e IV (OR: 0,35; 95 % IC: 0,13 – 0,95). Nossos resultados sugerem que os SNPs do gene *VEGF* podem estar associados com etiologia da endometriose.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms ($-2578C > A$, $-460 T > C$, $-1154G > A$, $+405G > C$ and $+936C > T$) in endometriosis: a case-control study with Brazilians

Jamila Alessandra Perini^{1,2*}, Jessica Vilarinho Cardoso^{1,2}, Plínio Tostes Berardo³, Rosane Vianna-Jorge^{2,4,5}, Luiz Eurico Nasciutti⁴, Marta Bellodi-Privato⁶, Daniel Escorsim Machado^{1,4} and Mauricio Simões Abrão⁶

Abstract

Background: Endometriosis is regarded as a complex and heterogeneous disease in which genetic and environmental factors contribute to the phenotype. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) plays important roles in the pathogenesis of endometriosis. The present study was aimed at investigating the contribution of VEGF polymorphisms as risk factors for the development of endometriosis. This is the first study to evaluate the combined influence of the five most common VEGF polymorphisms.

Methods: This study was conducted at two hospitals from the Brazilian public health system, and comprised 294 women submitted to laparoscopic or laparotomy surgery: 182 patients had a histologically confirmed diagnosis of endometriosis (cases), whereas 112 had no evidence of the disease (controls). The VEGF polymorphisms were determined by TaqMan real-time polymerase chain reaction. The odds ratio (OR) with their 95% confidence intervals (CI) were calculated using an unconditional logistic regression model.

Results: Endometriosis patients and controls did not differ regarding age distribution, whereas the body mass index was significantly lower in endometriosis patients, when compared with controls (23.1 ± 3.9 versus 27.3 ± 5.9 , $P < 0.001$). The evaluation of gynecological symptoms, including dysmenorrhea, non-cyclic chronic pelvic pain, dyspareunia and infertility, indicates significantly higher prevalences among endometriosis cases. The variant allele $-1154A$ was significantly associated with endometriosis, either considering all cases (OR: 1.90, 95% CI: 1.23–2.97), deep infiltrating endometriosis (DIE) (OR: 1.83, 95% CI: 1.16–2.90) or moderate and severe endometriosis (stages III–IV) (OR: 1.97, 95% CI: 1.21–3.19). No significant differences were found in allele or genotype distributions of the $-2578C > A$, $-460 T > C$, $+405G > C$ and $+936C > T$ polymorphisms between endometriosis cases and controls. A total of six haplotypes were inferred derived from four polymorphisms ($-2578C > A$, $-460 T > C$, $-1154G > A$ and $+405G > C$). There was a protective association between CCGG haplotype and endometriosis, either considering all cases (OR: 0.36, 95% CI: 0.15–0.86), DIE (OR: 0.37 95% CI: 0.15 – 0.90) or stages III–IV (OR: 0.35 95% CI: 0.13 – 0.95).

Conclusions: The present results indicate a positive association between VEGF $-1154G > A$ and the risk of developing endometriosis, whereas the CCGG haplotype may be protective against the development of disease.

Keywords: Endometriosis, Vascular endothelial growth factor, Polymorphisms, Brazilian population

* Correspondence: jamilaperini@yahoo.com.br

¹Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Av. Manoel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, Rio de Janeiro, RJ 23070-200, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Endometriosis is a benign estrogen-dependent disease, characterized by the presence and growth of endometrial tissue outside the uterus, and represents one of the most common benign gynecological disorders nowadays [1]. This disease is associated with infertility, severe and incapacitating painful symptoms, including chronic pelvic pain, dysmenorrhea and dyspareunia [2,3]. It has been estimated that endometriosis affects 10% of women of reproductive age, but the real prevalence may even be higher because it is often not diagnosed due to its heterogeneous clinical manifestation [4]. Endometriosis frequently produces serious effects on professional, social and marital life [5].

Despite many investigations about endometriosis, the pathogenesis of the disease remains unclear, although the predominant theory is that it is due to retrograde menstruation [6]. In addition, endometriotic lesions require an adequate blood supply to survive in their ectopic sites, and angiogenesis represents a crucial step during this process [7]. The development of new blood vessels is a complex dynamic process, which is regulated by a signal sequence of different angiogenic factors. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is one of the most potent angiogenic factors and several authors postulated that it would be involved in the progress of the ectopic lesions in endometriosis [8,9]. Accordingly, our group demonstrated that VEGF-induced angiogenesis is a critical aspect in the pathophysiology of this disease [10-12].

VEGF is encoded by the *VEGF* gene [13], which is polymorphic, with several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in regulatory regions [14]. Recently, there is growing interest in investigating if *VEGF* SNPs may affect the inheritable susceptibility to endometriosis [15-18]. The results are conflicting, possibly due to the diversity of populations studied and because endometriosis is a heterogeneous disease [15]. In addition, no investigation regarding the susceptibility to endometriosis considered the combined effect of the five most studied *VEGF* SNPs ($-2578C > A$, $-460 T > C$, $-1154G > A$, $+405G > C$ and $+936C > T$) in their possible haplotypes.

In the present work, we aimed to describe the frequency of alleles, genotypes and haplotypes of five *VEGF* SNPs among Brazilian women, and to evaluate their impact on endometriosis susceptibility.

Methods

Study population

The case-control study was approved by the Human Research Ethics Committee of the *Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo* and of the *Hospital Federal dos Sevidores do Estado* (Protocols number 910/11 and 414/11, respectively). All participating

patients ($n = 294$) provided written informed consent and answered a questionnaire about their demographics and preoperative painful symptoms. Data were obtained by in-person interviews at two hospitals from the Brazilian public health system, carried out from 2011 through 2013.

Patients assigned for laparoscopy or laparotomy for gynecological procedures were considered eligible. Individuals with any history or diagnosis of cancer or adenomyosis were not included, since both are angiogenesis-related pathologies [19,20]. One hundred eighty-two patients undergoing laparoscopy ($n = 174$) or laparotomy ($n = 8$) for the diagnosis and treatment of endometriosis were enrolled as cases. The diagnosis of endometriosis, after their operative findings, was confirmed histologically, according to the presence of endometrial glands and/or stroma in the lesions. According to the revised American Fertility Society classification, 71 (39.0%) patients had minimal or mild endometriosis (stages I–II), 110 (60.4%) had moderate or severe endometriosis (stages III–IV) and 1 (0.6%) had these information missing. According to Nisolle and Donnez [21] three types of disease must be considered: superficial endometriosis (SUP), ovarian endometrioma (OMA) and DIE. The distribution of endometriotic patients according to their worst endometriotic lesion was as follows: SUP (14 patients; 7.7%), OMA (17 patients; 9.3%) and DIE (151 patients; 83.0%).

Controls ($n = 112$) were patients without visible endometriosis at surgery and who reported no previous diagnosis of endometriosis. In the control group, surgical laparoscopy ($n = 106$) or laparotomy ($n = 6$) was proposed in order to perform tubal ligation ($n = 51$) or treatment of benign diseases, such as ovarian cysts ($n = 22$), myoma ($n = 10$), hydrosalpinx ($n = 8$) or other reasons ($n = 21$).

The body mass index (BMI) was calculated as the weight (kg) divided by the square of height (m^2). According to WHO's expert committee [22], the weight status is classified into five groups: underweight ($BMI < 18.5$), normal weight ($18.5 \leq BMI \leq 24.9$), overweight ($25 \leq BMI \leq 29.9$), obesity ($30 \leq BMI < 40$) and morbid obesity ($BMI \geq 40$).

The present study focused specifically on objective symptoms, such as dysmenorrhea, chronic pelvic pain, deep dyspareunia and infertility. As suggested in our previous report [3], only severe and incapacitating symptoms of pain were included for statistical analysis purposes. Infertility (primary or secondary) was defined by the couple not being able to conceive after one year of regular, contraceptive-free intercourse.

VEGF genotyping

Peripheral blood samples (3 mL) were collected in EDTA tubes, and DNA was extracted by using a commercial kit (Genomic DNA Extraction, Real Biotech

Corporation) according to the manufacturer's instructions. A validated TaqMan assay (VIC- and FAM-labeled) for detection of each *VEGF* -2578C > A (rs699947), -460 T > C (rs833061), -1154G > A (rs1570360), +405G > C (rs2010963), +936C > T (rs3025039) SNPs was purchased from Applied Biosystems. Table 1 summarizes the sets of probes and primers used for each analysis. PCR amplification for all SNPs was performed in 8 µL reactions with 30 ng of template DNA, 1× TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1× each primer and probe assay, and H₂O *q.s.* Thermal cycling was initiated with a first denaturation step of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 92°C for 15 s and annealing at 60°C for 1 min. The allele-detection process was performed on a 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to determine the allelic discrimination.

Statistical analysis

Comparisons of age and BMI in the study groups were performed using the Student's *t* test, and data were presented as mean ± standard deviation (SD). Otherwise, the nominal data, such as spontaneous abortion, parity, infertility and preoperative painful symptoms, as well as the categories of BMI, were expressed as percentages and evaluated by Chi-Square Test or Fisher's exact test, where applicable.

Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were assessed by the goodness-of-fit χ^2 test. *VEGF* allele frequency and genotype distribution were derived by gene counting. Allele and genotype frequencies between the groups were compared using the χ^2 test or, when appropriate, the Fisher's exact test. The haplotype patterns and linkage disequilibrium coefficients (*D'* is degree of imbalance in module and *R*² is degree of correlation) were inferred using Haploview [23], based on the algorithm of expectation and maximization [24]. The risk

associations for endometriosis were estimated by the odds ratio (OR) with 95% confidence interval (95% CI). Confounding factors that could potentially influence the risk for endometriosis (*P* = 0.20) were taken into account in unconditional logistic regression models. All statistical analyses were conducted using Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) for Windows, version 15.0 and a *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

No significant difference was observed in the mean age between the endometriosis patients (35.8 ± 8.6) and the control group (34.5 ± 6.4). Conversely, BMI, parity, number of spontaneous abortion, infertility and all preoperative endometriosis symptoms were significantly different between the two groups (Table 2). There was a predominance of low or normal BMI values (≤24.9) among endometriosis patients (75.1%), whereas controls had a predominance of overweight or obesity (58.4%), with 3.4% of patients showing morbid obesity (BMI ≥ 40). The distribution of endometriotic patients according to the worst endometriotic lesion was as follows: DIE (151 patients; 83.0%) and not DIE (31 patients; 17.0%).

The *VEGF* -2578C > A, -460 T > C, -1154G > A, +405G > C, +936C > T SNPs were in HWE in the overall study population and in each group (cases and controls). Figure 1 and Table 3 show, respectively, the minor allelic and genotypic frequencies of the *VEGF* SNPs. Significant differences in the allele and genotype frequencies were observed between the two groups with respect to the -1154G > A (*P* = 0.005 and *P* = 0.01, respectively). By contrast, no significant differences were detected in allele or genotype distribution of the -2578C > A, -460 T > C +405G > C, +936C > T SNPs between endometriosis patients and controls. The analysis of risk associations for the -1154G > A in developing either endometriosis

Table 1 Characterization of *VEGF* polymorphisms, probes and primers sequences for genotyping by TaqMan real time PCR

Identified SNP	TaqMan assays	Region	Probe [SNP]	Primer
rs699947	C_8311602_10	PR	GCCAGCTGTAGGCCAGACCTGGCA[A/C] GATCTGGGTGATAATCAGACTGAC	5'-GGATGGGGCTGACT AGGTAAGC-3' 5'-AGCCCCCTTTCT CCAAC-3'
rs833061	C_1647381_10	PR	GAGTGTGTGCGTGTGGGTTGAGGG[C/T] GTTGGAGCGGGGAGAAGGCCAGGGG	5'-TGTGCGTGTGGGTTGAGAG-3' 5'-TACGTGCGGACAGGCGCTGA-3'
rs1570360	C_1647379_10	PR	AGCCCGGGCCCGAGCCGCTGTGGA[A/G] GGGCTGAGGCTCGCCTGTCCCGCC	5'-TCCTGCTCCCTCT CGCCAATG-3' 5'-GGCGGGGACAGGC GAGCATC-3'
rs2010963	C_8311614_10	5'-UTR	CGCGCGGGCGTGGAGCAGCGAAAG[C/G] GACAGGGGCAAGTGAGTGACCTGC	5'-TTGCTTGCCATTCCCACTTGA-3' 5'-CCGAAGCGAGAACAGCCAGAA-3'
rs3025039	C_16198794_10	3'-UTR	GCAATCCCGGGCGGTGACCCAGCA[C/T] GGTCCCTCTGGAAATTGGATCGCC	5'-AAGGAAGAGGAGAC TCTGCGC-3' 5'-TATGTGGGTGGGT GTGTCTACAG-3'

PR is Promoter Region, 5'-UTR is 5'-Untranslated Region, 3'-UTR is 3'-Untranslated Region.

Table 2 Demographics and clinical characteristics of the endometriosis patients and controls

Variable	Controls No (%)	Endometriosis No (%)	P value ^b
BMI			
<18.5	3 (3.4)	13 (7.7)	<0.001
18.5 ≤ BMI ≤ 24.9	31 (34.8)	113 (67.3)	
25 ≤ BMI ≤ 29.9	25 (28.1)	31 (18.5)	
30 ≤ BMI < 40	27 (30.3)	11 (6.5)	
≥ 40	3 (3.4)	0 (0)	
Parity			
0	21 (22.1)	116 (66.3)	<0.001
1	14 (14.7)	35 (20.0)	
2	26 (27.4)	18 (10.3)	
≥ 3	34 (35.8)	6 (3.4)	
Spontaneous abortion	21 (22.8)	22 (12.6%)	0.032
Infertility			
No	88 (92.6)	93 (53.1)	<0.001
Primary	6 (6.3)	60 (34.3)	
Secondary	1 (1.1)	22 (12.6)	
Symptom ^a			
Dysmenorrhoea	21 (22.3)	91 (51.7)	<0.001
Non-cyclic chronic pelvic pain	36 (38.3)	91 (51.7)	0.036
Deep dyspareunia	12 (12.9)	100 (57.5)	<0.001

BMI is Body mass index. ^aA patient can have more than one concomitant symptom; ^bChi-Square Test or Fisher's exact test.

or DIE (Table 4) suggests an approximate 2-fold increased risk for individuals with any variant genotype (GA + AA), or an approximate 6-fold increased risk for individuals with the homozygous variant genotype AA. Although no statistically significant risk association was detected for individuals with

the heterozygous variant genotype (GA), a codominance model was inferred for the *-1154G > A* polymorphism ($P_{\text{trend}} = 0.008$).

Haplotypes of the *VEGF* gene were determined for all patients and also for endometriosis cases and controls separately. The results revealed that SNPs *-2578C > A*, *-460 T > C*, *-1154G > A* and *+405G > C* were in strong linkage disequilibrium, forming a single haplotype, while *+936C > T* was not linked to the other SNPs (Figure 2). Therefore, haplotype analysis was only conducted between *VEGF -2578C > A*, *-460 T > C*, *-1154G > A* and *+405G > C* SNPs, and six haplotypes were inferred (Table 5). There was negative risk association for the development of endometriosis for the haplotypes *CCGG* and *ATGG*, when compared with the reference haplotype *CTGG*, either considering all cases, only DIE patients or stages III-IV of endometriosis. In addition, the haplotype *ATGG* showed negative risk associations for the development of endometriosis when considering all cases or DIE, but not stages III-IV, whereas the haplotype *CTGC* was protective only for the development of stages III-IV.

Discussion

The pathogenesis and the molecular mechanisms that underlie the development of endometriosis have troubled investigators through many years, remaining an enigma. Endometriosis is regarded as a complex trait in which genetic and environmental factors contribute to the disease heterogeneous phenotype. Regarding the epidemiological evaluation of the study population, we observed that women with endometriosis have lower BMI and are less frequently obese than control subjects. Our results corroborate previous findings [25-29], although the reason for inverse correlation between BMI and

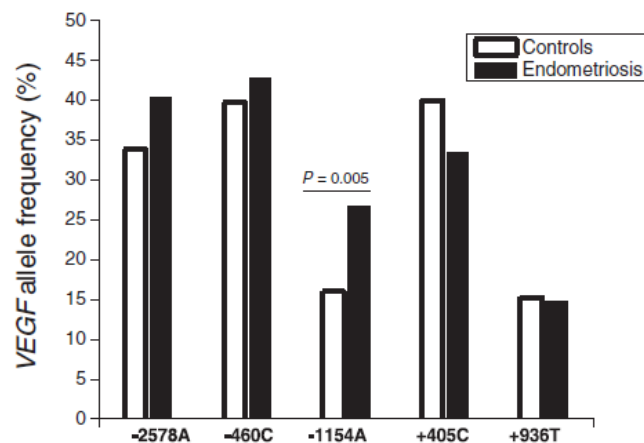


Figure 1 Allelic frequencies of *VEGF* polymorphism in cases and controls. P value from Chi-square test (Pearson p-value).

Table 3 Genotypic distribution of VEGF SNPs in endometriosis patients and controls

SNP	Population	N*	Genotypic distribution N (%)			P χ^2
-2578C > A			CC	CA	AA	
	Controls	111	50 (45.0)	47 (42.3)	14 (12.7)	0.19
	Cases	178	61 (34.3)	90 (50.6)	27 (15.1)	
-460 T > C			TT	TC	CC	
	Controls	107	39 (36.4)	51 (47.7)	17 (15.9)	0.50
	Cases	179	54 (30.2)	97 (54.2)	28 (15.6)	
-1154G > A			GG	GA	AA	
	Controls	106	74 (69.8)	30 (28.3)	2 (1.9)	0.01
	Cases	161	90 (55.9)	56 (34.8)	15 (9.3)	
+405G > C			GG	GC	CC	
	Controls	110	38 (34.6)	56 (50.9)	16 (14.5)	0.16
	Cases	181	83 (45.9)	75 (41.4)	23 (12.7)	
+936C > T			CC	CT	TT	
	Controls	95	67 (70.5)	27 (28.4)	1 (1.1)	0.63
	Cases	165	120 (72.8)	41 (24.8)	4 (2.4)	

N* is the number of examined samples of cases and controls for each SNP. Differences in sample sizes are due to available data from PCR amplification for each SNP. P χ^2 is P from Chi-square test (Pearson p-value) or Fisher's exact test.

endometriosis risk is still unclear. It can be hypothesized that genetic factors contributing to endometriosis may also be linked to BMI [30,31]. Although epidemiological data can be used to better understand the endometriosis, further studies should investigate the genetics, environmental and physiopathological basis of the decreased BMI in women with endometriosis.

Because angiogenesis represents a critical step in the establishment and pathogenesis of endometriosis, this process has been viewed as a potential new target to better define the mechanisms that cause the disease. A large

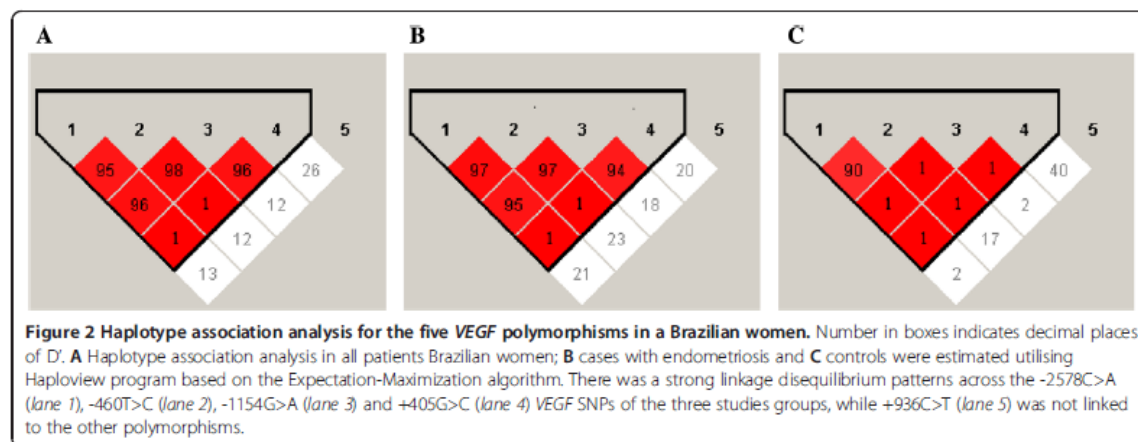
number of studies have observed that VEGF was significantly higher in women with endometriosis, which supported a key role for VEGF in the pathological angiogenesis in endometriosis [9-11]. Polymorphisms in VEGF may alter protein concentrations, influence the process of angiogenesis and relate to inter-individual variation in the risk of endometriosis. The promoter, and the 5'- and 3'- UTR of the VEGF gene contain key regulatory elements, which contribute to the high variability in VEGF production among tissues [14,32,33].

The inheritable susceptibility to endometriosis justifies the growing interest in identifying genetic polymorphisms that could lead to an increased risk or severity of the disease, in order to provide additional support for treatment planning. The present results indicate a positive association between VEGF -1154G > A and the risk of developing endometriosis, which is maintained when considering only the cases of DIE or stages III-IV. Such risk association was not observed previously [34-36]. Thus, Liu et al. [34] proposed that the -1154AA genotype decreased endometriosis risk compared to the -1154GG genotype, whereas the latter reports showed no difference in the distribution of VEGF -1154G > A genotypes between cases and controls [35,36]. Nevertheless, recent studies suggest that the VEGF -1154G > A SNP poses an increased risk of recurrent spontaneous abortion [37,38]. Because such studies did not evaluate the occurrence of endometriosis as a possible cause of the recurrent spontaneous abortions, it cannot be excluded as a confounding factor in the association analyses. In addition, it has been reported that the frequency of the VEGF -1154G > A SNP in Brazilians might be different between individuals self-identified as "Blacks" or "Whites" [39]. The present study did not collect information on race or skin color. However, all individuals came from the same region of Brazil, had similar

Table 4 Association analyses of the -1154G > A VEGF polymorphism in endometriosis patients compared with women without disease

-1154G > A	Controls (n = 106) N (%)	Cases (n = 161) N (%)	OR (95% CI) ^b	DIE Cases (n = 131) N (%)	OR (95% CI) ^c	Stages III-IV (n = 97) N (%)	OR (95% CI) ^d
Genotypes							
GG	74 (69.8)	90 (55.9)	1 ^a	75 (57.3)	1 ^a	56 (57.7)	1 ^a
GA	30 (28.3)	56 (34.8)	1.54 (0.90 - 2.63)	44 (33.6)	1.45 (0.82 - 2.54)	29 (29.9)	1.28 (0.69 - 2.37)
AA	2 (1.9)	15 (9.3)	6.17 (1.37 - 27.8)	12 (9.1)	5.92 (1.28 - 27.4)	12 (12.4)	7.93 (1.70 - 36.9)
Non-GG (GA + AA)	32 (30.2)	71 (44.1)	1.82 (1.09 - 3.06)	56 (42.7)	1.73 (1.01 - 2.96)	41 (42.3)	1.69 (0.95 - 3.02)
Allele							
G	178 (84.0)	236 (73.3)	1 ^a	194 (74.1)	1 ^a	141 (72.7)	1 ^a
A	34 (16.0)	86 (26.7)	1.90 (1.23 - 2.97)	68 (25.9)	1.83 (1.16 - 2.90)	53 (27.3)	1.97 (1.21 - 3.19)

OR is odds ratio, CI is confidence interval. ^aReference Group; ^bControls vs. Cases (All patients with endometriosis); ^cControls vs. Deeply infiltrating endometriosis patients (DIE); ^dControls vs. Moderate or severe endometriosis patients (stages III or IV). Due to insufficient DNA samples, some of the patients were not genotyped for -1154G > A SNP.



social backgrounds, and were recruited at two public hospitals, when assigned for laparoscopic procedures, regardless of the therapeutic indication. Therefore, no major racial or color differences is expected between cases and controls, which had equal access to the public health system.

With regards to the other four VEGF SNPs (-2578C > A, -460 T < C, +405G > C, +936C < T), our results suggest no significant effect on the susceptibility to endometriosis. It is noteworthy that our result is in agreement with Zhao and colleagues [40], which suggested no evidence for an association between endometriosis and the VEGF -2578C > A, -460 T < C, +405G > C and +936C < T SNPs, when considered together in a larger number (958 cases and 959 controls) of Australian women. Such findings appear to be corroborated by other studies which evaluated the different VEGF SNPs independently from their effect on the risk of endometriosis in different populations, and found no significant associations with -2578C > A [16,40], -460 T < C [16,34,40-48], +405G > C [16,35,40,43,44,49,50] or +936C < T [34,35,40,51]. Nevertheless, results from a meta-analysis suggest that the VEGF -2578C > A might be protective for the development of endometriosis [18], whereas +936C > T was pointed as a risk factor [16-18]. The increased risk of endometriosis for +936C < T was found independently on a single study, although the SNP showed no correlation with VEGF mRNA in endometriosis lesions or VEGF protein levels in peritoneal fluid [44]. Accordingly, Kim and colleagues [51] showed a lack of association between +936C < T genotypes and serum VEGF levels in endometriosis patients and controls.

The discrepancies between different studies involving the impact of VEGF SNPs on the susceptibility to endometriosis may be caused by different allele frequencies and heterogeneity in the study populations, besides

environmental backgrounds. A strong point of our study is that all patients recruited (cases and controls) were surgically evaluated to explore for endometriosis. The histological confirmation of endometriosis was required to define cases, whereas controls had no visible ectopic endometrium sites to excluding possibly asymptomatic endometriosis. As a limitation, our controls included women with other non-endometriosis gynecological diseases, and might provide lower risk estimates if they are also associated with the polymorphisms under study.

As far as we know, the present work is the first study to focus on the possible contribution of the five most studied VEGF SNPs (-2578C > A, -460 T > C, -1154G > A, +405G > C and +936C < T) and its haplotypes on the susceptibility of endometriosis. In agreement with previous studies, -2578C > A, -460 T > C, -1154G > A [34] and -2578C > A, -1154G > A, +405G > C [35] were in linkage disequilibrium, while the +936C < T was visibly physically far, and had low LD with the other 4 markers in the gene [34,35]. Only three studies reported association between VEGF haplotypes and susceptibility to endometriosis; however, the haplotypes with only two [41,46] or three SNPs [34,35] were evaluated. In the present study, we observed negative risk associations with the development of endometriosis for the haplotypes CTGC (only for stages III-IV), ATGG (for all cases combined or DIE), and CCGG haplotype (for all conditions). The haplotype ACAG, which was the only one containing the -1154A allele showed a non-significant positive risk association for endometriosis, in all conditions evaluated. Taken together, the results suggest that the effects of VEGF haplotypes in the risk of endometriosis are more significant and clinically relevant than those of each SNP evaluated separately. It is becoming increasingly important to derive data from different populations to build a database which can then be used in

Table 5 Haplotype distributions of VEGF polymorphisms in cases and controls and their association with the risk of developing endometriosis

-2578C > A/ -460 T > C/ -1154G > A/ +405G > C VEGF haplotypes	Controls (N = 112) No (%)	All Cases (N = 182) No (%)	P value ^b	OR (95% CI) ^c	DIE Cases (N = 151) N (%)	P value ^b	OR (95% CI) ^d	Stages III-IV (N = 110) N (%)	P value ^b	OR (95% CI) ^e
CTGG	42 (18.7)	85 (23.4)		1 ^a	69 (22.9)		1 ^a	55 (25.0)		1 ^a
CTGC	90 (40.1)	121 (33.2)	0.10	0.66 (0.42 – 1.05)	104 (34.4)	0.18	0.70 (0.44 – 1.13)	69 (31.3)	0.05	0.58 (0.35 – 0.97)
ACAG	36 (16.0)	96 (26.4)	0.38	1.32 (0.77 – 2.24)	78 (25.8)	0.40	1.32 (0.76 – 2.29)	58 (26.4)	0.58	1.23 (0.69 – 2.19)
ACGG	37 (16.5)	51 (14.0)	0.23	0.68 (0.39 – 1.19)	42 (13.9)	0.27	0.69 (0.38 – 1.24)	31 (14.1)	0.21	0.64 (0.34 – 1.19)
CCGG	15 (6.7)	11 (3.0)	0.03	0.36 (0.15 – 0.86)	9 (3.0)	0.05	0.37 (0.15 – 0.90)	7 (3.2)	0.05	0.35 (0.13 – 0.95)
ATGG	4 (2.0)	0 (0.0)	0.03	-	0 (0.0)	0.05	-	0 (0.0)	0.09	-

OR is odds ratio, CI is confidence interval. ^aReference Group; ^bChi-Square Test or Fisher's exact test; ^cControls vs. Cases (All patients with endometriosis); ^dControls vs. Deeply infiltrating endometriosis patients (DIE); ^eControls vs. Moderate or severe endometriosis patients (stages III or IV).

future investigations to a better understanding of the genetic and environmental factors affecting risk to development endometriosis.

Conclusion

In conclusion, our findings with *VEGF* SNPs and endometriosis in Brazilian women indicate a risk association for the polymorphism *-1154G > A*, and protective effect for the haplotype *CCGG*. This is the first study to evaluate the combined influence of the five most common *VEGF* SNPs. Therefore, further studies on the functional relevance of the *VEGF* polymorphisms and exposure to environmental factors in endometriosis are required to confirm our observations.

Abbreviations

BMI: Body mass index; CI: Confidence interval; DIE: Deeply infiltrating endometriosis; HWE: Hardy-Weinberg equilibrium; OR: Odds ratio; SD: Standard deviation; q.s: quantum sufficit; SNPs: Single-nucleotide polymorphisms; VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

JAP designed the research, analyzed data, wrote the manuscript and obtained funding. JVC recruited the patients from the HFSE/RJ, contributed to data collection, genotyping and analysis. PTB followed the patients from the Servidores Federal Hospital of Rio de Janeiro (HFSE/RJ), contributed to data collection and edited the manuscript. RVJ contributed to interpretation of data, critical discussion and edited the manuscript. LEN contributed to the idea and edited the manuscript. MBP recruited the patients from the University of Sao Paulo's School of Medicine (FMU/SP) and contributed to data collection. DEM contributed to the idea, edited the manuscript and obtained funding. MSA followed the patients from the FMU/SP, contributed to data analysis, edited the manuscript and revisions for critical content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Aline Cristina Silva de Jesus from University State of West Zone of Rio de Janeiro, Brazil, for her technical assistance. This study was supported by the Brazilian agency Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, Brazil (E-26/110.175/2010 and E-26/111.669/2011).

Author details

¹Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Av. Manoel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, Rio de Janeiro, RJ 23070-200, Brasil.
²Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
³Serviço de Ginecologia, Hospital Federal dos Servidores do Estado, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
⁴Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
⁵Programa de Farmacologia, Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brasil.
⁶Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Received: 25 June 2014 Accepted: 22 September 2014

Published: 26 September 2014

References

1. Burney RO, Giudice LC: Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012, **98**:511-519.
2. Bulun SE: Endometriosis. *N Engl J Med* 2009, **360**:268-279.

3. Belleli P, Dias-Jr JA, Podgaec S, Gonzales M, Barakat EC, Abrão MS: Epidemiological and clinical aspects of pelvic endometriosis - a case series. *Rev Assoc Med Bras* 2010, **56**:467-471.
4. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E: ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005, **20**:2698-2704.
5. Fourquet J, Gao X, Zavala D, Orengo JC, Abac S, Ruiz A, Laboy J, Flores I: Patients' report on how endometriosis affects health, work, and daily life. *Fertil Steril* 2010, **93**:2424-2428.
6. Sampson JA: Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927, **14**:422-469.
7. Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E, Grummer R: Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 2005, **8**:147-156.
8. McLaren J: Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* 2000, **6**:45-55.
9. Taylor RN, Yu J, Torres PB, Schickedanz AC, Park JK, Mueller MD, Sidell N: Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. *Reprod Sciences* 2009, **16**:140-146.
10. Pupo-Nogueira A, de Oliveira RM, Petta CA, Podgaec S, Dias JA Jr, Abrão MS: Vascular endothelial growth factor concentrations in the serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2007, **99**:33-37.
11. Machado DE, Abrão MS, Berardo PT, Takiya CM, Nasciutti LE: Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. *Fertil Steril* 2008, **90**:148-155.
12. Machado DE, Berardo PT, Palmero CY, Nasciutti LE: Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases. *J Exp Clin Cancer Res* 2010, **29**:4.
13. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G: Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996, **93**:1493-1495.
14. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE: Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: Correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000, **12**:1232-1235.
15. de Marqui AB T: Genetic polymorphisms and endometriosis: contribution of genes that regulate vascular function and tissue remodeling. *Rev Assoc Med Bras* 2012, **58**:620-632.
16. Liang S, Huang Y, Fan Y: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and endometriosis risk: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2012, **286**:139-146.
17. Xu S, Wu W, Sun H, Lu J, Yuan B, Xia Y, De Moor B, Marchal K, Wang X, Xu P, Cheng W: Association of the vascular endothelial growth factor gene polymorphisms (-460C/T, +405G/C and +936 T/C) with endometriosis: a meta-analysis. *Ann Hum Genet* 2012, **76**:464-471.
18. Li YZ, Wang LJ, Li X, Li SL, Wang JL, Wu ZH, Gong L, Zhang XD: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms contribute to the risk of endometriosis: an updated systematic review and meta-analysis of 14 case-control studies. *Genet Mol Res* 2013, **12**:1035-1044.
19. Folkman J: Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007, **6**:273-286.
20. Kang S, Zhao J, Liu Q, Zhou R, Wang N, Li Y: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with the risk of developing adenomyosis. *Environ Mol Mutagen* 2009, **50**:361-366.
21. Nisolle M, Donnez J: Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997, **68**:585-596.
22. WHO Expert Committee: Physical status: the use and interpretation of anthropometry. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1995, **854**:1-452.
23. Haploview version 4.2. <http://haploview.software.informer.com/4.2/>.
24. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005, **21**:263-265.
25. Ferrero S, Anserini P, Remorgida V, Ragni N: Body mass index in endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005, **121**:94-98.
26. Hediger ML, Hartnett HJ, Louis GM: Association of endometriosis with body size and figure. *Fertil Steril* 2005, **84**:1366-1374.
27. Metalliotakis IM, Cakmak H, Fragouli YG, Goumenou AG, Mahutte NG, Arici A: Epidemiological characteristics in women with and without endometriosis in the Yale series. *Arch Gynecol Obstet* 2008, **277**:389-393.

28. Parazzini F, Cipriani S, Bianchi S, Gotsch F, Zanconato G, Fedele L: Risk factors for deep endometriosis: a comparison with pelvic and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 2008, **90**:174-179.
29. Pillet MCL, Schneider A, Borghese B, Santulli P, Souza C, Streuli I, Ziegler D, Chapron C: Deep infiltrating endometriosis is associated with markedly lower body mass index: a 476 case-control study. *Human Reproduction* 2012, **27**:265-272.
30. Ravussin E, Bogardus C: Energy balance and weight regulation: genetics versus environment. *Br J Nutr* 2000, **83**:17-20.
31. Kennedy S: Genetics of endometriosis: a review of the positional cloning approaches. *Semin Reprod Med* 2003, **21**:111-118.
32. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E: A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res* 2000, **37**:443-448.
33. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E: VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004, **46**:293-298.
34. Liu Q, Li Y, Zhao J, Sun DL, Duan YN, Wang N, Zhou RM, Kang S: Association of polymorphisms -1154G/A and -2578C/A in the vascular endothelial growth factor gene with decreased risk of endometriosis in Chinese women. *Hum Reprod* 2009, **24**:2660-2666.
35. Lamp M, Saare M, Laisk T, Karro H, Kadastik U, Metspalu A, Peters M, Salumets A: Genetic variations in vascular endothelial growth factor but not in angiotensin I-converting enzyme genes are associated with endometriosis in Estonian women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010, **153**:85-89.
36. Rotman C, Fischel I, Cortez G, Greiss H, Rana N, Rinehart J, Coulam CB: A search to identify genetic risk factors for endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2013, **69**:92-95.
37. Coulam CB, Jeyendran RS: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2008, **59**:301-305.
38. Lee HH, Hong SH, Shin SJ, Ko JJ, Oh D, Kim NK: Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 2010, **93**:1244-1247.
39. Muniz JJ, Izidoro-Toledo TC, Metzger IF, Sandrim VC, Tanus-Santos JE: Interethnic differences in the distribution of clinically relevant vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms. *DNA Cell Biol* 2009, **28**:567-572.
40. Zhao ZZ, Nyholt DR, Thomas S, Treloar SA, Montgomery GW: Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of familial endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2008, **14**:531-538.
41. Bhanoori M, Arvind Babu K, Pavankumar Reddy NG, Lakshmi Rao K, Zondervan K, Deenadayal M, Kennedy S, Shivaji S: The vascular endothelial growth factor (VEGF) +405G > C 5'-untranslated region polymorphism and increased risk of endometriosis in South Indian women: A case control study. *Hum Reprod* 2005, **20**:1844-1849.
42. Kim SH, Choi YM, Choung SH, Jun JK, Kim JG, Moon SY: Vascular endothelial growth factor gene +405 C/G polymorphism is associated with susceptibility to advanced stage endometriosis. *Hum Reprod* 2005, **20**:2904-2908.
43. Ikuhashi Y, Yoshida S, Kennedy S, Zondervan K, Takemura N, Deguchi M, Ohara N, Maruo T: Vascular endothelial growth factor +936 C/T polymorphism is associated with an increased risk of endometriosis in a Japanese population. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007, **86**:1352-1358.
44. Cosin R, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, España F, Gilabert J, Romeu A, Estellés A: Vascular endothelial growth factor polymorphisms (-460C/T, +405G/C, and 936C/T) and endometriosis: their influence on vascular endothelial growth factor expression. *Fertil Steril* 2009, **92**:1214-1220.
45. Liu Q, Li Y, Zhao J, Zhou RM, Wang N, Sun DL, Duan YN, Kang S: Association of single nucleotide polymorphisms in VEGF gene with the risk of endometriosis and adenomyosis. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2009, **26**:165-169.
46. Attar R, Agachan B, Kuran SB, Toptas B, Eraltan IY, Attar E, Isbir T: Genetic variants of vascular endothelial growth factor and risk for the development of endometriosis. *In Vivo* 2010, **24**:297-301.
47. Atinkaya SO, Ugur M, Ceylaner G, Ozat M, Gungor T, Ceylaner S: Vascular endothelial growth factor +405 C/G polymorphism is highly associated with an increased risk of endometriosis in Turkish women. *Arch Gynecol Obstet* 2011, **283**:267-272.
48. Emamifar B, Salehi Z, Mehrafza M, Mashayekhi F: The vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphisms and the risk of endometriosis in northern Iran. *Gynecol Endocrinol* 2012, **28**:447-450.
49. Toktam M, Koomars SN, Kourosh K, Adel S, Behrokh MM, Mohamad Mehdi A, Hamid Reza KK: Association of vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 G > C polymorphism with endometriosis in an Iranian population. *J Reprod Infertil* 2010, **11**:33-37.
50. Saliminejad K, Memariani T, Ardekani AM, Kamali K, Edalatkhah H, Pahlevanzadeh Z, Khorram Khorshid HR: Association study of the TNF- α -1031 T/C and VEGF +450G/C polymorphisms with susceptibility to endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2013, **29**:974-977.
51. Kim JG, Kim JY, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Choi YM: Association between endometriosis and polymorphisms in endostatin and vascular endothelial growth factor and their serum levels in Korean women. *Fertil Steril* 2008, **89**:243-245.

doi:10.1186/1472-6874-14-117

Cite this article as: Perini et al.: Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C > A, -460 T > C, -1154G > A, +405G > C and +936C > T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. *BMC Women's Health* 2014 **14**:117.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



6.2. Efeito combinado dos SNPs de *VEGF* e *KDR* na susceptibilidade à endometriose e nos sintomas da doença;

Neste trabalho foi investigado o papel dos SNPs do gene *KDR* (-604T>C, 1192C>T e 1719T>A) e o efeito combinado dos SNPs dos genes *VEGF* e *KDR* no desenvolvimento da endometriose, além de investigar a influência destes SNPs nos sintomas da doença. A população do estudo foi composta de 293 casos de endometriose com confirmação histopatológica da doença, e 223 controles com diagnóstico cirúrgico negativo de endometriose.

Foram encontradas diferenças significativas na média de idade entre os casos de endometriose ($24,4 \pm 4,6$) e os controles ($27,9 \pm 5,7$). Além disso, observou-se que a média do IMC foi significativamente menor em casos de endometriose que nos controles ($P < 0.001$). Houve uma predominância significativa no histórico familiar de endometriose e em todos os sintomas da doença nos casos em comparação com os controles. A média de intervalo de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico de endometriose foi de $5,8 \pm 6,7$ anos. Observou-se um número significativo de pacientes com endometriose em estágios avançados e DIE.

Foi observado diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas entre casos e controles na presença dos SNPs *VEGF* -2578C>A, -1154G>A, +405G>C e *KDR* 1192C>T. Uma associação negativa foi encontrada para o SNP *KDR* 1192C>T (OR: 0,56; 95% IC: 0,39 - 0,81) no desenvolvimento da endometriose. Além disso, observou-se uma associação positiva para os SNPs *VEGF* -2578C>A e -1154G>A (OR: 1,88; 95% IC: 1,06 - 3,36; OR: 1,59; 95% IC: 1,03 - 2,45, respectivamente) e uma associação negativa para o SNP *VEGF* +405G>C (OR: 0,66; 95% IC: 0,43 - 1,00) no desenvolvimento da doença.

Foi encontrada uma associação positiva dos haplótipos TCA e CCA do gene *KDR* (-604T>C, 1192C>T e 1719T>A) com a endometriose, considerando todos os casos da doença e também nos casos DIE. Já na presença dos haplotipos *KDR* TTT e CTA foi observado um efeito protetor no desenvolvimento da endometriose.

Os genótipos combinados dos SNPs de *VEGF* e *KDR* (*VEGF*-2578CC/*VEGF*-1154GG/*VEGF*+405GC+CC/*KDR*1192CC, *VEGF*-2578CC/*VEGF*-1154GG/*VEGF*+405GC+CC/*KDR*1192CT+TT e *VEGF*-2578CA+AA/*VEGF*-1154GG/*VEGF*+405GC+CC/*KDR*1192CT+TT) foram associados negativamente com a

endometriose, para todos os casos de endometriose e também considerando os casos DIE, enquanto o genótipo combinado *VEGF*-2578CA+AA/*VEGF*-1154GA+AA/*VEGF*+405GG/*KDR*1192CT+TT foi associado com um efeito protetor unicamente para casos de endometriose DIE.

Considerando os sintomas associados à endometriose, observamos que o SNP *VEGF* 2578C>A foi associado com o risco aumentado para dismenorreia, dor pélvica crônica e sintomas urinários (OR: 1,95; 95% IC: 1,20 – 3,17; OR: 2,46; 95% IC: 1,20 – 5,05 e OR: 5,32; 95% IC: 1,04 – 27,3, respectivamente), enquanto o SNP *KDR* 1192C>T foi associado negativamente com a dispareunia (OR: 0,47; 95% IC: 0,22 – 0,99). Um efeito positivo também foi encontrado no SNP *VEGF* 1154G>A para dismenorreia (OR: 2,03; 95% IC: 1,09 – 3,78).

Nossos resultados sugerem uma possível contribuição da combinação dos SNPs dos genes *VEGF* e *KDR* na susceptibilidade da endometriose, na gravidade da doença e na presença dos sintomas associados a endometriose.

Genetic association study of vascular endothelial growth factor and kinase insert domain containing receptor polymorphisms in women with endometriosis.

Jessica Vilarinho Cardoso^{1,2}, Mauricio Simões Abrão³, Rosane Vianna-Jorge^{1,4}, Renato Ferrari⁵, Plínio Tostes Berardo⁶, Mayara Calixto da Silva^{2,7}, Daniel Escorsim Machado², Jamila Alessandra Perini^{1,2,7}

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

²Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

³Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Rio de Janeiro, SP, Brasil;

⁴Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

⁵Instituto de Ginecologia da UFRJ, Hospital Moncorvo Filho, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

⁶Serviço de Ginecologia, Hospital Federal dos Servidores do Estado, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

⁷Divisão de Pesquisa, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, Brasil.

Abstract

Background: Endometriosis is a multifactorial gynecological disease in which angiogenesis is involved. The vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (KDR) have an important role in angiogenesis in the disease and polymorphisms in *VEGF* and *KDR* genes can influence the its development.

Objective(s): This study aims to determine the role of *KDR* gene and the combined effect of *KDR* and *VEGF* in the development of endometriosis, besides to investigate influence of the polymorphisms of these genes in endometriosis symptoms.

Study Design: A case-control study was conducted at three hospitals from the Brazilian public health system, and was comprised of 293 patients with endometriosis submitted to laparoscopic or laparotomy surgery and 223 controls. Genotyping of the *VEGF* (-2578C>A, -460T>C, -1154G>A, +405G>C and +936C>T) and *KDR* (-604T>C, 1192C>T and 1719T>A) polymorphisms were performed by TaqMan real-time polymerase chain reaction. The odds ratio (OR) with their 95% confidence intervals (CI) were calculated using a binary logistic regression model.

Results: The *KDR*1192T polymorphism was associated with lower risk of endometriosis development (OR: 0.56, 95% CI: 0.39-0.81). *VEGF*-2578CC/*VEGF*-1154GG/*VEGF*+405GC+CC/*KDR*1192CC, *VEGF*-2578CC/*VEGF*-1154GG/*VEGF*+405GC+CC/*KDR*1192CT+TT and *VEGF*-2578CA+AA/*VEGF*-1154GG/*VEGF*+405GC+CC/*KDR*1192CT+TT combined genotypes demonstrated a negative association in the development of endometriosis for all cases and deep infiltrating endometriosis (DIE), whereas the combined genotype *VEGF*-2578CA+AA/*VEGF*-1154GA+AA/*VEGF*+405GG/*KDR*1192CT+TT was protective only for the DIE. Eight haplotypes were inferred derived from three *KDR* polymorphisms (*KDR*-604T>C, *KDR*1192C>T and *KDR*1719T>A). The haplotypes TCA and CCA showed a positive association for the development of endometriosis for all cases and DIE, however, TTT and CTA showed a negative association with the diseases. With regards to the symptoms, allele *VEGF*2578A were more frequent among endometriosis cases for dysmenorrhea, cyclic chronic pelvic pain and bladder symptoms. However, was observed that the allele *KDR*1192T were less frequent among endometriosis cases for dyspareunia. In addition, was observed that the allele *VEGF*1154A were associated with risk

for dysmenorrhea.

Conclusion(s): Our results indicate a protective effect for the polymorphism *KDR1192C>T* with development of endometriosis. The analysis of combined genotypes suggest a possible contribution of *VEGF-KDR* interaction in the susceptibility of disease. In addition, polymorphisms of *VEGF* and *KDR* gene were associated with severity of the endometriosis symptoms.

Key words:angiogenesis, endometriosis, *KDR*, polymorphisms, *VEGF*.

Introduction

Endometriosis is a complex, heterogeneous and polygenic disease in which angiogenesis factors contribute to the phenotype ¹. The retrograde menstruation theory, proposed by Sampson may be regarded as a main factor to explain the disease appearance ², in most of the cases. The establishment of a new blood supply is a crucial event for the survival of ectopic endometrial implants, and angiogenesis represents a key role during this process ³. Angiogenesis is under the control of numerous inducers and growth factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF) ⁴. In 2008, our group observed that vascularization, VEGF and VEGFR-2 expression are significantly higher in ovarian, bladder and rectum sigmoid deeply infiltrating endometriosis compared to their control, suggesting that angiogenesis via VEGF to VEGFR-2 signaling is an important event in the development of the disease ⁵.

VEGF and its receptor VEGFR 2 are encoded by *VEGF* and kinase insert domain receptor (*KDR*) gene, respectively ^{6,7}. Both genes are highly polymorphic and their single nucleotide polymorphisms (SNPs) can interfere in the activity or expression of the enzyme ^{8,9,10}. Recently, our group observed a risk association of *VEGF1154G>A* SNP with endometriosis development in Brazilian women, and protective effect for the haplotype (-2578C>A, -460T>C, -1154G>A, +405G>C)CCGG¹¹. Only one study investigated the association of *KDR* SNPs and endometriosis development, which showed that *KDR1192C>T* was associated with diseases lower risk ¹². In addition, no investigation regarding the susceptibility to endometriosis considered the combined effect of *VEGF* and *KDR* SNPs.

The aim of the present study was to evaluate the role of *KDR* gene in the development of endometriosis, the combined effect of *KDR* and *VEGF*, and the effects of *VEGF* and *KDR* polymorphisms in the endometriosis symptoms.

Materials and Methods

Subjects

The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of São Paulo University, Hospital Federal dos Servidores do Estado and Hospital Moncorvo Filho (Protocols number 910/2011, 414/2011 and 1.244.294/2015, respectively). Written informed consent was obtained from all the participating individuals.

Women submitted for laparoscopy or laparotomy for gynecological procedures were considered eligible. Individuals with diagnosis of adenomyosis were not eligible. Women with any history or diagnosis of cancer were excluded from both cases and controls due to the possible relation with angiogenesis. Thus, peripheral blood samples were obtained from 293 endometriosis patients and 223 controls.

Patients with endometriosis were underwent laparoscopy (n = 230) or laparotomy (n = 24) and had a histologically confirmed diagnosis. The stage of endometriosis was determined according to the revised American Fertility Society classification. According to Nisolle and Donnez ¹³ three types of disease were considered: superficial endometriosis (SUP), ovarian endometrioma (OMA) and deep infiltrating endometriosis (DIE). Both superficial peritoneal and ovarian endometrioma may be found in association with deep endometriosis ¹⁴, thus in these case were considered DIE.

The control group consisted of women assigned to laparoscopy (n = 155) or laparotomy (n = 15), because did tubal ligation (n = 69) or treatment of benign diseases, such as myoma (n = 54), ovarian cysts (n = 38), hydrosalpinx (n = 11) or other reasons (n = 37). All women of control group did have no surgical diagnosis of endometriosis.

The body mass index (BMI) was calculated as the weight (kg) divided by the square of height (m²). Only severe and incapacitating endometriosis symptoms were included, and infertility was defined by the couple not being able to conceive after one year of regular, contraceptive-free intercourse ¹¹.

VEGF and *KDR* genotyping

Genomic DNA was obtained from blood samples as previously described ¹¹. A validated TaqMan assay (VIC- and FAM-labeled) for detection of each *VEGF*-2578C>A (rs699947), -460T>C(rs833061), -1154G>A (rs1570360) +405G>C (rs2010963), +936C>T (rs3025039) and *KDR*-604T>C (rs2071559), 1192C>T (rs2305948) and 1719A>T (rs1870377) SNPs was purchased from Applied Biosystems. Table 1 summarizes the sets of probes and primers used for each *KDR* SNPs analysis, because *VEGF* SNP Genotyping Assays already previously described ¹¹. The allele-detections process were performed on a 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to determine the allelic discrimination.

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) for Windows, version 20.0. The Student's *t* test was conducted for the comparison of the quantitative variables, such as age and interval between the onset of symptoms and diagnosis of endometriosis, with results expressed in mean $\pm$ standard deviation (SD). While, the categories of BMI, the menopause status, familiar history of endometriosis and painful symptom, were expressed as percentages and evaluated by Chi-Square Test or Fisher's exact test, where applicable. Hardy-Weinberg equilibrium analysis was performed to compare the observed and the expected genotype frequencies using the χ^2 test. Comparison of the allele and genotype distributions in the study groups was performed using the χ^2 test or, when appropriate, the Fisher's exact test.

The risk associations for endometriosis were estimated by the odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI). The analyses were performed and adjusted by age and BMI for consider them as a potential confounder ($p > 0.05$), using a binary logistic regression model. The level of significance considered was smaller than 0.05.

Results

Analyses of descriptive variables showed that mean age was 37.6 ± 8.4 years in the controls group and 34.9 ± 7.2 years in the endometriosis patients ($P < 0.001$). We also observed mean BMI was significantly lower in endometriosis patients, when compared with controls (24.4 ± 4.6 versus 27.9 ± 5.7 , $P < 0.001$). The overweight, obese women or morbid obese ($BMI \geq 25$) was significantly lower ($P < 0.001$) among women with endometriosis (39.6%) than in controls (70.8%). The clinical variables of endometriosis patients and controls are summarized in Table 2. There was a predominance of endometriosis familiar history and all endometriosis symptoms among cases compared with controls. In addition, the mean of interval between the outset of symptoms and diagnosis of endometriosis was 5.8 ± 6.7 years. Observed a significant number of endometriosis patients in advanced stages and deep infiltrating.

The minor allele and genotype frequencies of *VEGF* (-2578C>A, -1154G>A, +405G>C) and *KDR* (-604T>C, 1192C>T, 1719T>A) polymorphisms found in the controls and endometriosis patients are shown in Table 3. The *VEGF* -2578A and -1154A SNPs were significantly associated with endometriosis risk. Conversely, the SNPs *VEGF* +405C and *KDR* 1192T were associated with diseases lower risk. The *VEGF* -460T>C and +936C>T variant allele frequencies among the cases were 42.6 % and 15.9%, respectively. While among the controls were 41.7 % and 16.2%, respectively. There were no significant differences in genotypes and the alleles distribution for the SNPs *VEGF* -460T>C, +936C>T, *KDR* -604T>C and 1719T>A between the controls and endometriosis patients.

A combinatory analysis of the four polymorphisms (*VEGF*-2578, *VEGF*-1154, *VEGF*+405 and *KDR*1192) was performed to investigate whether the presence of more than one polymorphisms in the same patients increases the risk of endometriosis (Table 4). There was negative risk association for the development of endometriosis for the *VEGF*-2578CC/*VEGF*-1154GG/*VEGF*+405GC+CC/*KDR*1192CC, *VEGF*-2578CC/*VEGF*-1154GG/*VEGF*+405GC+CC/*KDR*1192CT+TT and *VEGF*-2578CA+AA/*VEGF*-1154GG/*VEGF*+405GC+CC/*KDR*1192CT+TT combined genotypes when compared with the reference combined genotype *VEGF*-2578CC/*VEGF*-1154GG/*VEGF*+405GG/*KDR*1192CC, either considering all cases and only DIE patients, whereas the combined genotype *VEGF*-

2578CA+AA/*VEGF*-1154GA+AA/*VEGF*+405GG/*KDR*1192CT+TT was protective only for the DIE.

Eight haplotypes were inferred derived from three *KDR* polymorphisms (Table 5). The haplotypes *TCA* and *CCA* were more frequent in the endometriosis patients and DIE patients, showed a positive association for the development of endometriosis. In contrast, the haplotypes *TTT* and *CTA* were less frequent in the endometriosis patients and DIE patients, showed a negative association with the diseases. In addition, seven haplotypes (*CTGG*, *CTGC*, *CCGC*, *CCGG*, *ATGG*, *ACGG*, *ACAG*) were inferred, among the four polymorphisms of the *VEGF* gene (-2578C>A, -460T>C, -1154 G>A and +405G>C). The haplotype *VEGF CTGC* is more frequent among controls (30.0%) and cases (35.9%). There was negative risk association for the development of endometriosis for the haplotypes *CCGG*(OR: 0.40; CI: 0.23 - 0.72) and *CTGC* (OR: 0.68; CI: 0.49 - 0.95).

The genotypic and allelic distribution of *VEGF* and *KDR* polymorphisms among cases and controls in relation to endometriosis symptoms are summarized in Table 6. There was observed that the *VEGF* 2578C>A, 1154G>A e *KDR* 1192C>T SNPs were associated with the endometriosis symptoms. A positive association was found between allele *VEGF* 2578A and genotype *VEGF* 2578CA+AA for dysmenorrhea and cyclic chronic pelvic pain. However, a negative association was observed between allele *KDR* 1192T for dyspareunia. In addition, was observed that the allele *VEGF* 2578A and *VEGF* 1154A were associated with risk for bladder symptoms and dysmenorrhea, respectively.

Discussion

Endometriosis is a complex gynecological disease and molecular mechanisms involved are not well elucidated. Biochemical or genetic markers for endometriosis even needs future investigation ^{15,16}. This retrospective study of 516 gynecological patients attending in three Brazilian public hospitals is the first to focus on the combined effect of *KDR* and *VEGF* SNPs in the development and symptoms of endometriosis.

Family studies have observed a genetic basis of endometriosis and suggested a familial tendency for development to disease ^{15,17,18,19}. We also observed higher incidence of endometriosis for first and second degree relatives of cases group as compared to controls. Audebert and colleagues reported a familial history of endometriosis in about one-third of adolescent patients with a confirmed diagnosis of endometriosis, since 25% had a first-degree relative affected with endometriosis. ¹⁸. In addition, one population-based study using an extensive genealogy database demonstrated that 750 endometriosis patients were more interrelated than control, and the risk ratio for sisters and for cousins was around 5 and 2, respectively ¹⁷.

The endometriosis risk associated to a lower BMI has been described but remaining an enigma ^{20,21,22,23,24}. In addition, endometriosis patients with the lowest BMI had a high risk of deep endometriosis ²². Our findings in agreement with earlier studies linking an inverse association between endometriosis and BMI ^{11,22,23,24,25}. Recently, a genome-wide association study (GWAS) included 3194 endometriosis cases and 7060 controls described a locus on 7p15.2 associated with endometriosis and fat distribution, demonstrating that there is a shared genetic basis between endometriosis and fat distribution ¹⁹.

Several studies have demonstrated that endometriosis can occurs in postmenopausal women ^{26,27,28,29,30}, corroborates with our findings. Haas et al. (2012) ²⁶ conducted a retrospective epidemiologic study of 42,079 endometriosis patients and observed that 3% women were in the postmenopausal age group (55–95 years). It is possible that asymptomatic women had endometriosis or may be women who had symptoms, but did not undergo a diagnostic laparoscopy and thus the disease progresses in post-menopausal ³⁰.

Nowadays, DIE has been a main challenge for the gynecologist ¹⁴. In the present study, we observed a predominance of deep infiltrative lesions and endometriosis advanced stages (III and

IV), accordingly previous studies^{14,31}. Endometriosis DIE are significantly associated with disease stages III and IV³¹.

Angiogenesis via VEGF-KDR signaling is a fundamental process in the pathogenesis of endometriosis, whereas endometriotic lesions are characterized by a dense vascularization and require an adequate supply of blood to survive¹. Furthermore, it has been observed an increase in expression and distribution of VEGF and VEGFR2 in samples of women with endometriosis when compared to the control^{5,32,33,34}. Our results revealed that the *1192C>T* SNP of the *KDR* gene, located at the exon 7, was associated with endometriosis lower risk. Only one study investigated association this *KDR* SNP with endometriosis and their results corroborates with our findings¹². Studies have suggest that the *KDR 1192C>T* SNP could decrease the efficiency of VEGF binding to VEGFR-2 in the presence of the *KDR 1192T* allele⁹. It is suggested that the binding ability of VEGF to VEGFR-2 in the presence of the SNP may decrease the activity of angiogenesis and thus reduce the risk of endometriosis. Concerning the *KDR -604T>C* and *1719T>A*, our results have observed no significant association on the development to endometriosis. According our findings, Kang et al. (2013)¹² also studied the *KDR 1719T>A* SNP and observed no significant association on the susceptibility to endometriosis. So far no studies have investigated the association of *KDR604T>C* SNP and the development of disease. With regards to the *VEGF* SNPs, we observed that the *VEGF-2578A* allele was significantly associated with endometriosis risk; while, the *VEGF+405C* allele was significantly associated with decrease the risk of disease development. Moreover, we found a positive association for *-1154G>A* SNP with endometriosis, as previously observed¹¹. There are relationship between functional polymorphisms and effect on the regulation of gene expression or influence on the efficiency of protein binding to receptor. This effect may be caused by a single polymorphism, or by the combination with other polymorphisms³⁵. In the present study, we observed that *TCA* and *CCA* haplotypes in the *KDR* gene (involving SNPs *-604T>C*, *1192C>T* and *1719T>A*) could significantly increase the risk of endometriosis development, while, *TTT* and *CTA* haplotypes could significantly decrease the risk of disease development. In 2013, Kang¹² and colleagues explored 26 *KDR* SNPs in Chinese Hans population, and selected 5 tag SNPs (*1192C>T*, *1719T>A*, *+31C/T*, *IVS25-92A/G* and *IVS6+54C/T*) to investigate the association with susceptibility to endometriosis. However, the authors not evaluated the haplotypes of these SNPs

¹². In addition, we investigated *VEGF* haplotypes and we observed a positive effect in development of endometriosis for the haplotypes *CCGG* and *CTGC*, as previously observed in Perini et al., 2014 ¹¹.

As far as we know, the present study is the first study to focus on the possible contribution of the combined effect of SNPs in *KDR* and *VEGF* genes on the susceptibility of endometriosis. Our results demonstrated a negative association among the combined genotypes *VEGF*-2578CC/*VEGF*-1154GG/*VEGF*+405GC+CC/*KDR*1192CC, *VEGF*-2578CC/*VEGF*-1154GG/*VEGF*+405GC+CC/*KDR*1192CT+TT and *VEGF*-2578CA+AA/*VEGF*-1154GG/*VEGF*+405GC+CC/*KDR*1192CT+TT (for all cases or DIE) and endometriosis. Whereas, the combined genotype *VEGF*-2578CA+AA/*VEGF*-1154GA+AA/*VEGF*+405GG/*KDR*1192CT+TT showed a negative association only for the DIE. These findings suggest a possible gene-gene interaction between *VEGF* and *KDR* in which together may contribute to the development of endometriosis. In addition, the uses of combination analysis to demonstrate the both effects of gene are of paramount importance for the understanding of the disease.

The mechanism involved in the onset of symptoms of endometriosis is not known and not all patients experience the same symptoms ³⁶. Women with endometriosis exhibit various symptoms at different intensities, including, dysmenorrhea (28-97%), chronic pelvic pain (57-69%), infertility (40-59%), deep dyspareunia (55-71%) and cyclic intestinal and urinary symptoms (48-71%) ^{11,37,38}. In the present study, we observed that the delay between the outset of symptoms and the diagnosis of endometriosis was very long, corroborating with other studies ^{38,39}. In addition, infertility (primary and secondary) was significant more frequent in endometriosis patients than controls, and several studies have shown that the incidence of endometriosis-related infertility women can reach 50% of cases ^{13,40,41,42}. Furthermore, the relationship between *VEGF* and *KDR* SNPs and endometriosis symptoms were evaluated in the present study. The results indicate that the genetic variant *VEGF* 2578A is a positive genetic factor for dysmenorrhea, cyclic chronic pelvic pain and bladder symptoms, while, the genetic variant *KDR* 1192T is a protective genetic factor for dyspareunia. In addition, we found a positive association for dysmenorrhea in the presence of the genetic variant *VEGF* 1154A. As far as we know, no studies have investigated the association between *VEGF* and *KDR* SNPs with symptoms of endometriosis. Our results are

supported because the endometriosis symptoms are due to interaction of several factors and cytokine-releasing immune cells, such as macrophages⁴³. Various evidences indicate that macrophages are recruited at sites of hypoxia and tissue stress, where they generate pro-inflammatory and pro-angiogenic signals^{44,45,46}. In endometriotic lesions, infiltrating macrophages presence is a consistent feature as a consequence of signals generated within ectopic lesion^{47,48,49,50}. Several authors have reported that macrophages are the principal source of VEGF produced in the inflammation areas^{51,52,53}. Interestingly, studies have suggested that ovarian endometriomas patients with pelvic pain have higher vascularization than in asymptomatic women^{54,55}. Thus, these findings suggest that the macrophages recruitment into the lesions is directly involved in the perpetuation of inflammation, pain and abnormal bleeding.

Our study has distinct strengths because is the first report to providing the combined analysis of SNPs in both genes (*VEGF* and *KDR*) and susceptibility of endometriosis, in addition to considering the symptoms of the disease. Moreover, cases and controls were surgically (laparoscopic or laparotomy)evaluated, whereas histological confirmation of endometriosis was required to define cases, and controls confirmed surgically the absence of ectopic endometrial sites to excluding women with asymptomatic endometriosis. We tried to recruit women undergoing tubal ligation as control subjects, due to the fertility history, and probably do not have any gynecological disease associated with endometriosis. Nevertheless, our controls also included women with gynecological diseases contributing to provide lower risk estimates if they are likewise associated with the SNPs investigated. We also acknowledge that this study has limitations, most of which already have been described in previous reports with a similar design. With regards to the *KDR1719T>A* SNP, our study is limited by the low frequency found in the *KDR 1719A* allele in both groups (cases and controls). This is due to the data available from PCR amplification are insufficient for this polymorphism.

The functional understanding of genetics variants in the pathogenesis of endometriosis is fundamental, since hereditary susceptibility may be involved in the development of the disease. Our results suggest that SNPs in both genes (*VEGF* and *KDR*) may be involved in the pathogenesis of endometriosis because altered VEGF-VEGFR2 signaling.

Conclusion

The present results indicate a negative association between *KDR* 1192C>T with development of endometriosis. A negative association was found among the combined genotypes, suggesting a possible contribution of *VEGF-KDR* interaction in the susceptibility of disease. In addition, SNPs of *VEGF* and *KDR* gene may be associated with symptoms of dysmenorrhea, chronic pelvic pain, dyspareunia and bladder symptoms. This is the first study to assess the combined effect of polymorphisms of *VEGF* and *KDR* gene. Therefore, further studies on the functional relevance of the *VEGF* and *KDR* SNPs and its influence on the expression of these genes in women with endometriosis are required to confirm our results.

Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian agency Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, Brazil (E-26/110.175/2010 and E-26/111.669/2011) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Rocha ALL, Reis FM, Taylor RN. Angiogenesis and Endometriosis. *Obstetrics and Gynecology International* 2013; 2013:859619.
2. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 3:93-110.43.
3. Taylor RN, Yu J, Torres PB, Schickedanz AC, Park JK, Mueller MD, Sidell N: Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. *Reprod Sciences* 2009, 16:140-146.
4. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000; 407:242-8.
5. Machado DE, Abrao MS, Berardo PT, Takiya CM, Nasciutti LE. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. *Fertil Steril* 2008; 90:148-55.
6. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1991; 6(9):1677-83.
7. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996.
8. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res*. 2000; 37:443-8.
9. Wang Y, Zheng Y, Zhang W, Yu H, Lou K, Zhang Y, et al. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:760-7.
10. Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, et al. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther*. 2009; 8:2496-508.
11. Perini JA, Cardoso JV, Berardo PT, Vianna-Jorge R, Nasciutti LE, Bellodi-Privato M, Machado DE, Abrao MS. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C>A, -460 T>C, -1154G>A, +405G>C and +936C>T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. *BMC Womens Health*. 2014; 14:117.

12. Kang S, Shi YY, Li Y, Wang N, Lu YC, Zhou RM, et al. Association between genetic variants of the VEGFR-2 gene and the risk of developing endometriosis in Northern Chinese Women. *Gynecol Obstet Invest* 2013; 76:32-7.
13. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997.
14. Abrao MS, Petraglia F, Falcone T, Keckstein J, Osuga Y, Chapron C. Deep endometriosis infiltrating the recto-sigmoid: critical factors to consider before management. *Hum Reprod Update*. 2015 May-Jun;21(3):329-39.
15. Hansen KA and Eyster KM. Genetics and Genomics of Endometriosis. *Clin Obstet Gynecol*. 2010 June ; 53(2): 403–412.
16. Borrelli GM, Abrao MS, Mechsner S. Reply: Biochemical markers for endometriosis: a long way to go. *Hum Reprod*. 2014 Oct 10;29(10):2353. doi: 10.1093/humrep/deu193. Epub 2014; 31.
17. Stefansson H, Geirsson RT, Steinhorsdottir V et al. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. *Hum. Reprod*. 2002;17, 555–559.
18. Audebert A, Lecointre L, Afors K, Koch A, Wattiez A, Akladios C. Adolescent Endometriosis: Report of a Series of 55 Cases With a Focus on Clinical Presentation and Long-Term Issues. *J Minim Invasive Gynecol*. 2015 Jul-Aug;22(5):834-40.
19. Rahmioglu, Montgomery & Zondervan. Genetics of endometriosis. *Womens Health* 2015; 11(5), 577–586.
20. Hediger ML, Hartnett HJ, Louis GM: Association of endometriosis with body size and figure. *Fertil Steril* 2005, 84:1366–1374.
21. Yi KW, Shin JH, Park MS, Kim T, Kim SH, Hur JY. Association of body mass index with severity of endometriosis in Korean women. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009 Apr;105(1):39-42.
22. Pillet MCL, Schneider A, Borghese B, Santulli P, Souza C, Streuli I, Ziegler D, Chapron C: Deep infiltrating endometriosis is associated with markedly lower body mass index: a 476 case–control study. *Human Reproduction* 2012, 27:265–272.

23. Shah DK, Correia KF, Vitonis AF, Missmer SA. Body size and endometriosis: results from 20 years of follow-up within the Nurses' Health Study II prospective cohort. *Hum Reprod.* 2013; 28:1783-92.
24. Shahbazi S, Shahrabi-Farahani M. Evaluation of the correlation between body mass index and endometriosis among Iranian fertile women. *Gynecol Endocrinol.* 2016 Feb;32(2):157-60.
25. Matalliotakis IM, Cakmak H, Fragouli YG, Goumenou AG, Mahutte NG, Arici A: Epidemiological characteristics in women with and without endometriosis in the Yale series. *Arch Gynecol Obstet* 2008, 277:389–393.
26. Haas D, Chvatal R, Reichert B, Renner S, Shebl O, Binder H, Wurm P, Oppelt P. Endometriosis: a premenopausal disease? Age pattern in 42,079 patients with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2012 Sep;286(3):667-70.
27. Morotti M, Remorgida V, Venturini PL, Ferrero S. Endometriosis in menopause: a single institution experience. *Arch Gynecol Obstet.* 2012 Dec;286(6):1571-5.
28. Jeon DS, Kim TH, Lee HH, Byun DW. Endometriosis in a postmenopausal woman on hormonal replacement therapy. *J Menopausal Med.* 2013 Dec;19(3):151-3.
29. Sun PR1, Leng JH, Jia SZ, Lang JH. Postmenopausal endometriosis: a retrospective analysis of 69 patients during a 20-year period. *Chin Med J (Engl).* 2013 Dec;126(23):4588-9.
30. Inceboz U. Endometriosis after menopause. *Womens Health (Lond Engl).* 2015 Aug;11(5):711-5.
31. Abrao MS, Neme RM, Carvalho FM, Aldrighi JM, Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;82:31–40.
32. Tan X, Lang J, Liu D. [Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in the ectopic and eutopic endometrium of women with endometriosis]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2001; 36:727-30.
33. Machado DE, Berardo PT, Palmero CY, Nasciutti LE. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010 Jan 19;29:4.

34. Verit FF, Ayas S. Elevated ghrelin levels in the peritoneal fluid of patients with endometriosis: associations with vascular endothelial growth factor (VEGF) and inflammatory cytokines. *Fertil Steril*. 2010 Jun;94(1):e31.
35. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med*. 2002 Mar-Apr;4(2):45-61.
36. Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2010; 362:2389-98.
37. Bellelis P, Dias JA Jr, Podgaec S, Gonzales M, Baracat EC, Abrão MS. Epidemiological and clinical aspects of pelvic endometriosis: a case series. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(4):467-71.
38. Moradi M, Parker M, Sneddon A, Lopez V, Ellwood D. Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. *BMC Womens Health*. 2014, 4;14:123.
39. Staal AH, van der Zanden M, Nap AW. Diagnostic Delay of Endometriosis in the Netherlands. *Gynecol Obstet Invest*. 2016.
40. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012; 98:511-9.
41. Petraglia F, Serour GI, Chapron C. The changing prevalence of infertility. *Int J Gynaecol Obstet*. 2013 Dec;123 Suppl 2:S4-8.
42. Vannuccini S, Clifton VL, Fraser IS, Taylor HS, Critchley H, Giudice LC, Petraglia F. Infertility and reproductive disorders: impact of hormonal and inflammatory mechanisms on pregnancy outcome. *Hum Reprod Update*. 2016 Jan;22(1):104-15.
43. Barcena de Arellano ML, Mechsner S. The peritoneum--an important factor for pathogenesis and pain generation in endometriosis. *J Mol Med (Berl)*. 2014 Jun;92(6):595-602.
44. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004 Dec;25(12):677-86.
45. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005 Dec;5(12):953-64.
46. Capobianco A, Rovere-Querini P. Endometriosis, a disease of the macrophage. *Front Immunol*. 2013 Jan 28;4:9.

47. Zhang C, Maeda N, Izumiya C, Yamamoto Y, Kusume T, Oguri H, Yamashita C, Nishimori Y, Hayashi K, Luo J, Fukaya T. Killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen expression as immunodiagnostic parameters for pelvic endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2006 Feb;55(2):106-14.
48. Lawson C, Al-Akoum M, Maheux R, Akoum A. Increased expression of interleukin-1 receptor type 1 in active endometriotic lesions. *Reproduction*. 2007 Jan;133(1):265-74.
49. Minici F, Tiberi F, Tropea A, Miceli F, Orlando M, Gangale MF, Romani F, Catino S, Campo S, Lanzone A, Apa R. Paracrine regulation of endometriotic tissue. *Gynecol Endocrinol*. 2007 Oct;23(10):574-80.
50. Lousse JC, Defrère S, Van Langendonck A, Gras J, González-Ramos R, Colette S, Donnez J. Iron storage is significantly increased in peritoneal macrophages of endometriosis patients and correlates with iron overload in peritoneal fluid. *Fertil Steril*. 2009 May;91(5):1668-75.
51. Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology*. 2006 Mar;147(3):1278-86.
52. Dionyssopoulou E, Vassiliadis S, Evangeliou A, Koumantakis EE, Athanassakis I. Constitutive or induced elevated levels of L-carnitine correlate with the cytokine and cellular profile of endometriosis. *J Reprod Immunol* 2005;65:159–70.
53. Machado DE, Berardo PT, Landgraf RG, Fernandes PD, Palmero C, Alves LM, Abrao MS, Nasciutti LE. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. *Fertil Steril*. 2010 May 15;93(8):2674-9.
54. Alcázar JL. Transvaginal color Doppler in patients with ovarian endometriomas and pelvic pain. *Hum Reprod* 2001;16:2672–5.
55. Alcázar JL, García-Manero M. Ovarian endometrioma vascularization in women with pelvic pain. *Fertil Steril*. 2007 Jun;87(6):1271-6.

TABLE 1. Characterization of *KDR* polymorphisms, probes and primers sequences for genotyping by TaqMan real time PCR.

Identified SNP	TaqMan assays	Region	Probe [SNP]	Primer
rs2071559	C__15869271_10	PR	GGTATGGGTTTGTCAGTCTGAGACAGC[A/T]TGGCTATAAGAAAGAGATAACAGCG	5'-CCTCCTGTATCCTGAATGAATCT-3' 5'-GCCTCACATATTATTGTACCATCC-3'
rs2305948	C__22271999_20	Exon 7	AATATTTTGGGAAATAGCGGGAATG[C/T]TGGCGAACTGGGCAAGTGCGTTTTTC	5'-CAAACCTTTCAGTGGGCTCTTCGT-3' 5'-AGCCACAAGGAGAGAGCGGATA-3'
rs1870377	C__11895315_20	Exon 11	TACAATCCTTGGTCACTCCGGGTTA[C/T]ACCATCTATAGTTAAGGTGCTCAAA	5'-TGAGGTAAAAAGTTCTGGTGTCCCTGTT-3' 5'-AATGTACAATCCTTGGTCACTCCGGGGTA-3'

PR is Promoter Region.

TABLE 2. Clinical characteristics of controls and endometriosis patients.

	Controls	Endometriosis	
Variable	(n = 223)	(n = 293)	P value ^d
	No (%)	No (%)	
Menopause			
No	100 (96.2)	138 (95.2)	0.71
Yes	4 (3.8)	7 (4.8)	
Familiar history of endometriosis			
No	153 (87.9)	107 (75.9)	0.005
Yes	21 (12.1)	34 (24.1)	
Symptom ^a			
Dysmenorrhoea	68 (33.8)	169 (58.7)	<0.001
Non-cyclic chronic pelvic pain	33 (16.4)	89 (30.9)	<0.001
Deep dyspareunia	46 (22.9)	174 (61.3)	<0.001
Gastro-intestinal symptoms	19 (11.0)	113 (40.4)	<0.001
Bladder symptoms	7 (4.0)	74 (26.4)	<0.001
Infertility (primary or secondary)	23 (10.3)	135 (46.1)	<0.001
Site of Endometriosis ^b			

Ovary	152 (51.9)
Bowel	121 (41.3)
Peritoneum	102 (34.8)
Bladder	51 (17.4)
Uterosacral ligaments	40 (13.7)
Ureter	25 (8.5)
Appendix	24 (8.2)
Uterine tubes	21 (7.2)
Recto vaginal septum	14 (4.8)
Others	17 (5.8)

Stages of endometriosis

N (%)

I and II	111 (39.2)
III and IV	172 (60.8)
Missing	10 (3.4)

Types of endometriosis

Not deep infiltrating endometriosis ^c	81 (27.7)
Deep infiltrating endometriosis	202 (68.9)
Missing	10 (3.4)

^aA patient can have more than one concomitant symptom; ^bA endometriosis patient can have more than one concomitant local of endometriosis; ^cSuperficial endometriosis and ovarian endometrioma; ^dChi-Square Test or Fisher's exact test.

TABLE 3. Genotypic and allelic distribution of *VEGF* and *KDR* polymorphism among controls and endometriosis patients and the associations with the risk of endometriosis.

Polymorphisms	Controls No (%)	Endometriosis No (%)	<i>P</i> value ^a	OR (95% CI) ^c
<i>VEGF -2578 C>A</i>				
CC	101 (46.3)	98 (34.0)		1 ^b
CA	94 (43.1)	150 (52.1)	0.03	1.98 (1.07 – 3.65)
AA	23 (10.6)	40 (13.9)	0.30	1.68 (0.63 – 4.49)
CA+AA	117 (53.7)	190 (66.0)	0.03	1.88 (1.06 -3.36)
A	140 (32.1)	230 (39.9)	0.05	1.33 (1.00 – 1.79)
<i>VEGF 1154 G>A</i>				
GG	144 (69.6)	157 (58.8)		1 ^b
GA	59 (28.5)	92 (34.5)	0.11	1.45 (0.92 – 2.27)
AA	4 (1.9)	18 (6.7)	0.99	-
GA+AA	63 (30.4)	110 (41.2)	0.04	1.59 (1.03 – 2.45)
A	67 (16.2)	128 (24.0)	0.01	1.61 (1.11 – 2.34)
<i>VEGF +405 G>C</i>				
GG	77 (35.6)	139 (47.8)		1 ^b
GC	112 (51.9)	122 (41.9)	0.05	0.65 (0.42 – 1.00)
CC	27 (12.5)	30 (10.3)	0.30	0.71 (0.37 – 1.36)
GC+CC	139 (64.4)	152 (52.2)	0.05	0.66 (0.44 – 1.00)
C	166 (38.4)	182 (31.3)	0.05	0.66 (0.43 – 1.00)
<i>KDR 604 T>C</i>				

TT	49 (23.3)	62 (22.6)		1 ^b
TC	109 (51.9)	148 (54.0)	0.81	0.91 (0.39 – 2.08)
CC	52 (24.8)	64 (23.4)	0.80	0.89 (0.38 – 2.13)
TC+CC	161 (76.7)	212 (77.4)	0.79	0.90 (0.42 – 1.95)
C	213 (50.7)	276 (50.4)	0.82	0.95 (0.63 – 1.44)

KDR 1192 C>T

CC	130 (60.2)	211 (74.6)		1 ^b
CT	77 (35.6)	61 (21.6)	0.004	0.50 (0.32 – 0.80)
TT	9 (4.2)	11 (3.9)	0.33	0.61 (0.22 – 21.65)
CT+TT	86 (39.8)	72 (25.4)	0.003	0.52 (0.34 – 0.80)
T	95 (22.0)	83 (14.7)	0.002	0.56 (0.39 – 0.81)

KDR 1719 T>A

TT	141 (77.5)	102 (67.1)		1 ^b
TA	40 (22.0)	50 (32.9)	0.27	1.46 (0.74 – 2.89)
AA	1 (0.5)	0 (0.0)	-	-
TT+TA	41 (22.5)	50 (32.9)	0.27	1.46 (0.74 – 2.89)
A	42 (11.6)	50 (16.4)	0.32	1.37 (0.74 – 2.55)

Differences in sample sizes are due to available data from PCR amplification for each SNP. OR: odds ratio; CI: confidence interval; ^aTeste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher; ^bReference group; ^cAdjusted by age and BMI.

TABLE 4. Combined genotype frequencies of *VEGF* and *KDR* polymorphism among controls and endometriosis patients.

Characteristic	Controls No (%)	Endometriosis No (%)	<i>P</i> value ^a	OR (95% CI) ^c	Deep infiltrating endometriosis No (%)	<i>P</i> value ^d	OR (95% CI) ^{d,e}
<i>VEGF-2578/-1154/+405/KDR 1192</i>							
CC/GG/GG/CC	8 (4.0)	18 (6.9)		1 ^b			1 ^b
CC/GG/GG/CT+TT	6 (3.0)	9 (3.4)	0.48	0.49 (0.07 – 3.56)	6 (3.8)	0.34	0.45 (0.09 – 2.32)
CC/GG/GC+CC/CT+TT	31 (15.6)	15 (5.7)	0.02	0.86 (0.75 – 0.98)	9 (5.6)	0.02	0.83 (0.72 – 0.96)
CC/GG/GC+CC/CC	43 (21.6)	48 (18.4)	0.01	0.39 (0.19 – 0.83)	35 (21.6)	0.055	0.57 (0.32 – 1.01)
CA+AA/GA+AA/CC+CC/CC	16 (8.0)	33 (12.6)	0.92	0.98 (0.75 – 1.30)	23 (14.2)	0.36	0.92 (0.77 – 1.10)
CA+AA/GA+AA/GG/CC	17 (8.5)	49 (18.8)	0.57	0.97 (0.86 – 1.09)	35 (21.6)	0.92	1.00 (0.92 – 1.10)
CA+AA/GG/GG/CC	16 (8.0)	26 (10.0)	0.39	0.82 (0.52 – 1.28)	14 (8.6)	0.19	0.81 (0.59 – 1.11)
CA+AA/GG/GC+CC/CC	18 (9.0)	24 (9.2)	0.50	0.95 (0.82 – 1.10)	18 (11.1)	0.42	0.96 (0.87 – 1.06)
CA+AA/GA+AA/GG/CT+TT	14 (7.0)	15 (5.7)	0.35	0.88 (0.66 – 1.16)	7 (4.3)	0.04	0.78 (0.62 – 0.99)
CA+AA/GG/GC+CC/CT+TT	9 (4.5)	5 (1.9)	0.05	0.57 (0.33 – 1.00)	1 (0.6)	0.04	0.66 (0.45 – 0.98)
CA+AA/GG/GG/CT+TT	8 (4.0)	8 (3.1)	0.16	0.84 (0.67 – 1.07)	7 (4.3)	0.10	0.87 (0.73 – 1.03)
CA+AA/GA+AA/GC+CC/CT+TT	10 (5.0)	11 (4.2)	0.57	0.95 (0.80 – 1.30)	7 (4.3)	0.12	0.90 (0.79 – 1.03)

OR: odds ratio; CI: confidence interval; ^aTeste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher; ^bReference group; ^cAdjusted by age, BMI, family history of endometriosis and menopause. ^dControls vs deep infiltrating endometriosis ^eAdjusted by age and BMI.

TABLE 5. Haplotype distributions of *KDR* polymorphism among controls and endometriosis patients and their association with the risk of endometriosis.

<i>-604T>C, 1192C>T and 1719T>A KDR haplotype</i>	Controls n = 446 No (%)	Endometriosis n = 586 No (%)	<i>P value</i> ^a	OR (95% CI)	Deep infiltrating endometriosis No (%)	<i>P value</i> ^c	OR (95% CI)
TCT	161 (36.1)	207 (35.3)		1 ^b	160 (61.5)		
TCA	28 (6.3)	59 (10.1)	0.05	1.64 (1.00 - 2.69)	34 (13.1)	0.56	1.22 (0.70 – 2.11)
TTT	30 (6.7)	19 (3.2)	0.03	0.49 (0.27 - 0.91)	15 (5.8)	0.05	0.50 (0.26 – 0.97)
TTA	0 (0.0)	6 (1.0)	-	-	0 (0.0)	-	-
CCT	151 (33.9)	207 (35.3)	0.72	1.07 (0.79 - 1.43)	134 (51.5)	0.54	0.89 (0.64 – 1.23)
CCA	9 (2.0)	28 (4.8)	0.03	2.42 (1.11 - 5.27)	24 (9.2)	0.02	2.68 (1.21 – 5.95)
CTT	51 (11.4)	54 (9.3)	0.44	0.82 (0.53 - 1.27)	32 (12.3)	0.09	0.63 (0.39 – 1.03)
CTA	16 (3.6)	6 (1.0)	0.01	0.29 (0.11 - 0.76)	5 (1.9)	0.03	0.31 (0.11 – 0.88)

OR: odds ratio; CI: confidence interval; ^aTeste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher; ^bReference group; ^cControls vs deep infiltrating endometriosis

TABLE 6. Genotypic and allelic distribution of *VEGF* and *KDR* polymorphism among controls and endometriosis patients, in relation to different symptoms.

Symptoms	Polymorphisms	Controls No (%)	Endometriosis No (%)	<i>P</i> value ^a	OR (95% CI) ^c
Dysmenorrhoea	<i>VEGF 2578 C>A</i>				
	CC	36 (55.4)	58 (35.2)		1 ^b
	CA	27 (41.5)	84 (50.9)	0.05	1.90 (1.00 – 3.62)
	AA	2 (3.1)	23 (13.9)	0.02	5.84 (1.26 – 27.2)
	CA+AA	29 (44.6)	107 (64.8)	0.01	2.20 (1.18 – 4.11)
	A	31 (23.8)	130 (39.4)	0.007	1.95 (1.20 – 3.17)
	<i>VEGF 1154 G>A</i>				
	GG	47 (74.6)	98 (60.9)		1 ^b
	GA	16 (25.4)	53 (32.9)	0.14	1.69 (0.84 – 3.40)
	AA	0 (0.0)	10 (6.2)	0.99	-
	GA+AA	16 (25.4)	63 (39.1)	0.058	1.95 (0.98 – 3.90)
	A	16 (12.7)	73 (22.7)	0.03	2.03 (1.09 – 3.78)
Non-cyclic chronic pelvic pain	<i>VEGF 2578 C>A</i>				
	CC	17 (54.8)	30 (33.7)		1 ^b

CA	14 (45.2)	46 (51.7)	0.12	2.07 (0.84 – 5.15)
AA	0 (0.0)	13 (14.6)	0.99	-
CA+AA	14 (45.2)	59 (66.3)	0.03	2.65 (1.08 – 6.50)
A	14 (22.6)	72 (40.4)	0.01	2.46 (1.20 – 5.05)

Dyspareunia

KDR 1192 C>T

CC	26 (56.6)	132 (75.9)		1 ^b
CT	18 (39.1)	37 (21.2)	0.04	0.43 (0.19 – 0.96)
TT	2 (4.3)	5 (2.9)	0.72	0.71 (0.11 – 4.48)
CT+TT	20 (42.4)	42 (24.1)	0.05	0.47 (0.22 – 0.99)
T	70 (76.1)	290 (86.3)	0.09	1.72 (0.91 – 3.24)

Bladder symptoms

VEGF 2578 C>A

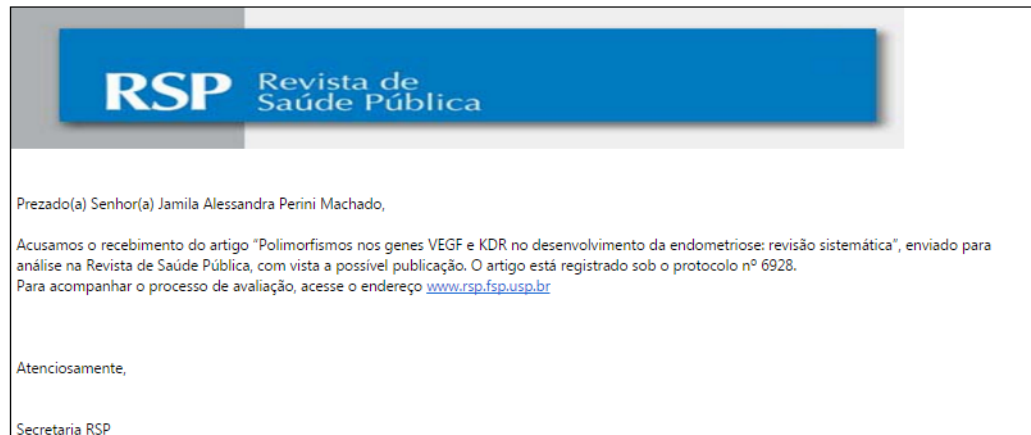
CC	5 (71.4)	23 (31.5)		1 ^b
CA	2 (28.6)	39 (53.4)	0.13	4.31 (0.63 – 29.3)
AA	0 (0.0)	11 (15.1)	0.99	-
CA+AA	2 (28.6)	50 (68.5)	0.053	6.35 (0.98 – 41.5)
A	2 (14.3)	61 (41.8)	0.04	5.32 (1.04 – 27.3)

Differences in sample sizes are due to available data from PCR amplification for each SNP. OR: odds ratio; CI: confidence interval; ^aTeste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher; ^bReference group; ^cAdjusted by age and BMI.

6.3. Revisão sistemática: Estudos caso-controle que avaliaram os SNPs nos genes *VEGF* e/ou *KDR* no desenvolvimento da endometriose

Este estudo revisou todos os trabalhos que utilizaram delineamento de estudos do tipo caso-controle para investigar a magnitude de associação de polimorfismos nos genes *VEGF* e/ou *KDR* no desenvolvimento da endometriose. O delineamento de estudo do tipo caso-controle está sendo cada vez mais utilizado nas análises epidemiológicas que exploram o perfil molecular das mulheres com endometriose. Entretanto, observamos, ainda, resultados controversos quando revisamos os estudos que exploraram SNPs nos genes *VEGF* e/ou *KDR* no desenvolvimento da endometriose. Além disso, no presente estudo descrevemos diferenças metodológicas, especialmente, em relação a seleção do grupo controle, o que pode contribuir para as discrepâncias dos resultados encontrados na literatura. Sugerimos que a seleção de um grupo controle ideal para avaliar a magnitude de associação de polimorfismos e o desenvolvimento da endometriose são controles livres de doenças, submetidas à cirurgia para realização de laqueadura. Este trabalho de revisão teve a finalidade de revisar as investigações epidemiológicas e moleculares, que focam na busca de polimorfismos que possam estar associados com o desenvolvimento da endometriose, especialmente, em genes envolvidos na via de angiogênese pela sinalização do VEGF ao KDR.

De: RSP <rspline@fsp.usp.br>
Data: 1 de fevereiro de 2016 15:57:24 BRST
Para: Jamila Alessandra Perini Machado <jamilaperini@yahoo.com.br>
Assunto: RSP - Confirmação do recebimento de artigo



Polimorfismos nos genes *VEGF* e *KDR* no desenvolvimento da endometriose: revisão sistemática

Jessica Vilarinho Cardoso^{1,2}, Daniel Escorsim Machado¹, Plínio Tostes Berardo³, Renato Ferrari⁴,
Jamila Alessandra Perini^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

²Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

³Serviço de Ginecologia, Hospital Federal dos Servidores do Estado, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴Serviço de Ginecologia, Hospital Moncorvo Filho, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

***Correspondência:** J.A.P., Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Av. Manoel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, 23070-200, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. (Fax: 55 21 2332-7533 E-mail: jamilaperini@yahoo.com.br)

Resumo

A endometriose é uma doença ginecológica que pode causar dor pélvica e infertilidade. Para o estabelecimento da doença, a angiogênese, via VEGF-KDR, desempenha papel fundamental. O objetivo deste estudo foi revisar trabalhos que utilizaram o delineamento caso-controle para verificar a magnitude de associação de polimorfismos nos genes *VEGF* e/ou *KDR* no desenvolvimento da endometriose. Foram identificados 107 estudos nas bases de dados e a qualidade dos artigos incluídos (n=19) foi avaliada pelo STROBE. Os resultados controversos observados podem ser explicados pelas diferenças metodológicas, pelo tipo de controle elegível e pela utilização da estimativa de risco não ajustada. Concluimos que estudos multicêntricos com delineamento adequado, envolvendo diferentes populações e análise combinada de polimorfismos nos genes *VEGF* e *KDR* ainda são necessários. Sugerimos que o grupo controle ideal para este tipo de estudo deve ser formado por mulheres férteis e livres de doenças ginecológicas, que se submetem ao procedimento de laqueadura.

Palavras-chave: Endometriose; *VEGF*; *KDR*; Polimorfismos.

Abstract

Endometriosis is defined as the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity and can cause pelvic pain and infertility. For the establishment of the disease, angiogenesis via VEGF-KDR plays a key role. The objective of this study was to review articles that used the case-control design to verify the magnitude of association of polymorphisms in *VEGF* and/or *KDR* genes in the development of endometriosis. A search of databases was conducted and identified 107 studies, the quality of the articles included was assessed by STROBE (n =19). The controversial results can be explained by methodological differences regarding the type of eligible control and the use of the unadjusted risk estimation. We conclude that multicenter studies with correct design, involving different populations and combined analysis of polymorphisms in the *VEGF* and *KDR* genes are still needed; and that the ideal control group for this type of study should be consisting of fertile women without gynecological diseases undergoing tubal ligation.

Keywords: Endometriosis; *VEGF*; *KDR*; Polymorphism.

INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença ginecológica, caracterizada pela presença de tecido endometrial funcional fora da cavidade uterina, representando um dos distúrbios ginecológicos benignos mais comuns.^{14,27} O real perfil das pacientes com endometriose é impreciso, embora haja consenso de que ela esteja presente em pelo menos 10% da população, em cerca de 3 a 20% das mulheres em idade reprodutiva, 30 a 50% das mulheres inférteis e 3 a 5% das mulheres na pós-menopausa.^{17,68,78}

As mulheres portadoras de endometriose podem ser assintomáticas (10,7%), no entanto, a maioria apresenta sintomas, em diferentes intensidades, sendo os principais: dismenorreia (52-97%), dor pélvica crônica (22-69%), infertilidade (25-47%), dispareunia de profundidade (44-71%) e sintomas intestinais e urinários cíclicos (29%).^{22,53,55,56} A endometriose acarreta consequências físicas, mentais e sociais na mulher, tendo em vista que sua psique e suas relações interpessoais e conjugais são afetadas pelos problemas decorrentes dos sintomas, em especial, pela impossibilidade de gerar filhos.^{18,54}

Várias são as teorias para explicar o surgimento da endometriose, entretanto sua etiologia ainda não está clara. A teoria mais aceita até hoje é a proposta por Sampson⁶⁵ (1927), que descreveu que o tecido endometrial, por fluxo menstrual retrógrado, retorna pelas tubas uterinas e adere à cavidade peritoneal. Para que isso ocorra, o processo de angiogênese, caracterizado pelo crescimento de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, é essencial.^{51,60}

Dentre os fatores pró-angiogênicos destaca-se o fator de crescimento edotelial vascular (VEGF), que assume um importante papel no desenvolvimento da endometriose.^{11,52,84} Em 2008, nosso grupo observou um aumento da distribuição de VEGF e seu receptor, VEGFR-2, em amostras de endometriose de ovário, bexiga e no reto sigmóide, quando comparadas ao seu controle, sendo que a maior distribuição de VEGF e VEGFR-2 foi observada na endometriose do reto-sigmóide, considerada a mais grave.⁴⁹

O VEGF é codificado por um gene com o mesmo nome, localizado no cromossomo 6p21.3, composto por oito éxons,⁷⁹ enquanto que o seu receptor, VEGFR2, é codificado pelo gene *KDR* (receptor do domínio de inserção da cinase), localizado no cromossomo 4q11-q12, sendo composto por trinta éxons.⁴⁷ Ambos os genes são polimórficos, destacando-se no estudo da endometriose cinco polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene *VEGF* (rs699947,

rs833061, rs1570360, rs2010963 e rs3025039) e três no gene *KDR* (rs1870377, rs2305948 e rs2071559), em virtude da alta frequência em que ocorrem nas diferentes populações, além de todos interferirem de forma significativa na atividade ou expressão da enzima.^{35,37,59,81}

Recentemente, nosso grupo observou uma associação positiva para o SNP *VEGF* rs1570360 no desenvolvimento da endometriose (OR: 1,90; IC95%: 1,23 – 2,97) em mulheres brasileiras.⁵⁶ Diversos estudos do tipo caso-controle também já investigaram a influência de SNPs no gene *VEGF* ou *KDR* no desenvolvimento da endometriose. Entretanto, os resultados das análises ainda são controversos,^{1,2,5,7,15,19,26,32-34,37,39-41,45,56,61,63,70,74,87} além de haver um questionamento em relação ao grupo de controle ideal para estudar polimorfismos, que predispõem a endometriose, quando se utiliza um delineamento metodológico de estudos analíticos observacionais do tipo caso-controle.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi revisar todos os trabalhos que utilizaram o delineamento de estudo do tipo caso-controle para investigar a magnitude de associação de SNPs dos genes *VEGF* e/ou *KDR* no desenvolvimento da endometriose. Adicionalmente, pretendemos descrever e discutir os critérios de inclusão/exclusão utilizados para definir o grupo de casos com endometriose e, principalmente, dos controles, com o intuito de verificar diferenças metodológicas que possam ter contribuído para as discrepâncias dos resultados encontrados na literatura. Este trabalho de revisão visa contribuir para definição do tipo de sujeito elegível para estudos analíticos observacionais do tipo caso-controle, que busquem identificar SNPs envolvidos com o desenvolvimento da endometriose.

MÉTODOS

Estratégia de Busca

Para identificar todos os estudos publicados até o dia 1 de setembro de 2015, sobre as associações entre SNPs de *VEGF* e/ou *KDR* e o desenvolvimento da endometriose foi realizada uma avaliação dos títulos e dos resumos (*abstracts*) dos estudos encontrados por dois pesquisadores (J.V.C. e J.A.P), de forma independente e “cegada”, na base de dados do PubMed, MEDLINE, BVS e Scielo, utilizando os seguintes descritores: (“endometriosis” OR “endometriose”) AND (“polymorphism” OR “polimorfismo” OR “SNP” OR “genetic

polymorphism” OR “polimorfismos genéticos”) AND (“VEGF” OR “Vascular endotelial growth factor” OR “Fator de crescimento endotelial vascular” OR “VEGFR-2” OR “Vascular endotelial growth fator-2” OR “Fator de crescimento endotelial vascular-2” OR “KDR” OR “Kinase Insert Domain Receptor” OR “Receptor do domínio de inserção da cinase”). Os estudos foram selecionados seguindo os critérios de inclusão e exclusão, pré-selecionados, conforme descritos a seguir.

Critério de Inclusão e de Exclusão

Como critério de inclusão para esta revisão foram selecionados estudos que utilizaram um desenho do tipo caso-controle e que avaliaram associações entre polimorfismos do gene *VEGF* e/ou *KDR* e o desenvolvimento da endometriose. Quanto ao período de publicação foram incluídos artigos publicados até setembro de 2015, sem restrição de idioma.

Os critérios de exclusão dos estudos foram: (i) ausência de uma população controle; (ii) dados de associações incompletos; (iii) dados em duplicata; (iv) meta-análise, revisão, cartas, comentários ou artigos editoriais; (v) aqueles que não analisaram SNPs no *VEGF* e/ou *KDR*; (vi) os que não incluíram pacientes com endometriose; (vii) e aqueles aos quais não tivemos acesso ao texto na íntegra.

Coleta de dados

Depois de realizada a estratégia de busca na base de dados do PubMed, MEDLINE, BVS e Scielo dos artigos que estudaram SNPs nos genes *VEGF* e/ou *KDR* com o desenvolvimento da endometriose, as seguintes informações foram extraídas: primeiro autor; ano de publicação; revista; país em que o estudo foi realizado; número de casos e controles; média de idade dos casos e controles com seus respectivos desvios de padrão e/ou intervalo; critérios de seleção/elegibilidade e exclusão dos casos de endometriose e dos controles; estadiamento da endometriose; fonte dos controle; tipo de SNP; técnica de genotipagem utilizada para identificação dos SNPs estudados; dados de frequência alélica e genotípica dos SNPs e dado estatístico da razão de chances (OR), com seus respectivos intervalos de confiança 95% (IC 95%).

Avaliação da qualidade dos estudos incluídos

Dois revisores (J.V.C. e J.A.P), independentemente, avaliaram a qualidade metodológica dos 19 estudos incluídos nesta revisão, utilizando os critérios do instrumento STROBE (*Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology*).^{50,80} Vinte e dois itens de avaliação receberam uma pontuação de 0 a 1. Esses itens referem-se ao título e resumo do artigo (item 1), à introdução (itens 2 e 3), aos métodos (itens de 4 a 12), aos resultados (itens de 13 a 17), à discussão (itens de 18 a 21) e à informação sobre o financiamento (item 22). Depois da avaliação de todos os critérios, cada artigo recebeu uma nota de 0 a 22 de cada pesquisador. Para a pontuação final foi realizada uma média das duas notas, sendo transformada em percentual para melhor avaliar a qualidade dos artigos. Os revisores definiram, previamente, que os artigos que atingissem um percentual superior a 50% seriam considerados satisfatórios.

RESULTADOS

A figura 1 apresenta o fluxograma da seleção dos artigos para esta revisão. A estratégia de busca identificou 101 publicações para o gene *VEGF* e 6 publicações para o *KDR*, não tendo sido encontrado nenhum artigo que avaliasse simultaneamente a influência de SNPs em ambos os genes com o desenvolvimento da endometriose. Após a remoção de artigos duplicados, 35 foram selecionados para a leitura dos títulos e resumos. No entanto, ainda foram excluídos 14 estudos: 5 porque eram meta-análises,^{21,36,43,44,83} 2 porque eram trabalhos de revisão,^{28,75} um porque era uma crítica a uma meta-análise publicada anteriormente,⁷² um porque explorou SNPs no gene *IL-10*, em vez de polimorfismos nos genes *VEGF* e/ou *KDR*,³¹ 4 porque estudaram pacientes com adenomiose^{38,46,77,86} e um porque avaliou mulheres com pterígio em vez de pacientes com endometriose.⁷⁶ Após a seleção dos resumos, 2 foram excluídos por não termos tido acesso ao texto na íntegra.^{1,33} Sendo assim, após a leitura completa dos artigos, foram incluídos nesta revisão 19 estudos caso-controle, que avaliaram SNPs nos genes *VEGF* (n = 18, 94,7%) ou *KDR* (n = 1, 5,3%) com o desenvolvimento da endometriose, no período de 2005 a 2015.^{2,5,7,15,19,26,32,34,37,39-41,45,56,61,63,70,74,87} Em relação à avaliação da qualidade dos 19 estudos selecionados para esta revisão, todos os artigos atingiram percentuais maiores que 50%^{50,80} e a pontuação média variou

entre 12 a 21 pontos (54,5-95,5%). Os estudos que tiveram a menor e a maior pontuação, segundo os critérios do STROBE, foram Kim et al.¹⁵ (2008) e Perini et al.⁵⁶ (2014), respectivamente (Tabela 1).

Nesta revisão foram incluídos dados de 9.050 mulheres (4.430 com endometriose e 4.620 controles) de países da Ásia,^{7,19,34,37,39,40,45,63,74} América do Norte, 61 América do Sul,⁹ Europa,^{15,26,41,70} Euro-asiáticos,^{2,45} África³² e Oceania.⁸⁷

A Tabela 1 descreve os critérios de inclusão e exclusão do grupo de casos de endometriose, ressaltando que todos os estudos consideraram elegíveis as mulheres que fizeram o diagnóstico cirúrgico da doença. Dentre os 19 estudos, 14 (74%) tiveram também a confirmação histopatológica^{2,15,19,26,32,34,37,39-41,45,56,70,74} e 3 (16%) estudos incluíram também a ultrassonografia transvaginal (TVS) como método de triagem para o diagnóstico da endometriose.^{5,7,15} Considerando o estadiamento da doença, verificamos que 6 (32%) estudos incluíram pacientes com estágio I, II, III ou IV;^{2,32,34,39,41,61} 5 (26%) agruparam em estadiamento I-II ou III-IV,^{5,15,26,56,87} 2 (10%) incluíram apenas mulheres com estágio I e II,^{19,70} 3 (16%) incluíram pacientes apenas com estadiamento III e IV^{7,37,40} e outros 3 (16%) não apresentaram informação quanto ao estadiamento cirúrgico da doença.^{45,63,74} Em relação aos critérios de exclusão do grupo de casos de endometriose, 7 (36,8%) estudos não informaram nenhum critério, enquanto que os demais, num total de 12 (63,2%), consideraram pacientes que apresentaram histórico de doenças angiogênese-dependentes²³ ou que poderiam estar associadas a polimorfismos do *VEGF*,^{6,8,30,64} além de mulheres que apresentaram adenomiose, cisto ovariano, doença inflamatória pélvica, oclusão tubária bilateral e mioma.

Para o grupo controle (Tabela 2), 16 (84,2%) estudos tiveram como critério de inclusão mulheres com o diagnóstico cirúrgico negativo de endometriose,^{2,5,7,15,19,26,32,37,39,40,45,56,61,63,70,87} e 3 (15,8%), que não realizaram procedimento cirúrgico também não fizeram nenhuma triagem por imagem para descartar a presença da doença.^{34,41,74} Apenas 3 (15,8%) estudos realizaram triagem por imagem.^{5,7,37} Dos 16 estudos que realizaram procedimento cirúrgico no grupo controle, 4 (25%) incluíram mulheres submetidas à cirurgia de ligadura tubária,^{5,15,19,56} 3 (18,8%) incluíram mulheres submetidas à cirurgia para retirada de cisto de ovário;^{26,40,56} 2 (12,5%) incluíram mulheres submetidas à cirurgia para retirada de mioma;^{26,56} 4 (25%) incluíram mulheres

submetidas à histerectomia^{37,40,45,87} e 9 (56,3%) incluíram mulheres que se submeteram à cirurgia por causa de problemas diversos como, apendicite, carcinoma *in situ* do colo uterino, cistos dermóides, cistos parovários, cistos serosos e mucinosos, dismenorreia, dor pélvica, fibroma ovariano, hemorragia uterina disfuncional, hidrossalpinge, infertilidade, malformações uterinas, massa anexial e pelve normal.^{2,5,26,37,40,56,63,70} Como critério de exclusão para o grupo controle, 5 (26,3%) estudos não informaram nenhum critério de exclusão.^{5,34,39,41,87} Os demais, (73,7%) consideraram praticamente os mesmos critérios de exclusão do grupo de casos de endometriose.

Na tabela 3 são apresentadas as características dos SNPs investigados nos estudos elegíveis para esta revisão. Foram estudados 5 SNPs no gene *VEGF* e 5 no *KDR*, sendo genotipados pelas técnicas de PCR-RFLP (78,9%), PCR em tempo real (10,5%), LDR-PCR (5,3%) e MALDI-TOF (5,3%). O SNP rs699947 foi avaliado em 4 (21,1%) estudos e a frequência do alelo *VEGF* -2578A variou entre 19-63% e 26-53% nos casos e controles, respectivamente, sendo que Liu et al.⁴⁵ (2009) e Lamp et al.⁴¹ (2010) observaram efeitos opostos, enquanto Zhao et al.⁸⁷ (2008) e Perini et al.⁵⁶ (2014) não encontraram associação com a doença (Tabela 4). O SNP rs833061 foi avaliado em 12 (63,2%) estudos e a frequência do alelo *VEGF* -460C variou entre 3-53% nos casos e 1-51% nos controles, porém nenhum trabalho encontrou associação deste SNP com o desenvolvimento da doença.^{2,5,7,15,19,32,34,40,45,56,70,87} Quatro (21,1%) estudos avaliaram o SNP rs1570360 e a frequência do alelo *VEGF* -1154A variou entre 16-42% e 16-37% nos casos e controles, respectivamente (Tabela 3). Contudo, 2 estudos não encontraram associação do SNP rs1570360 com endometriose:^{41,61} Liu et al.⁴⁵ (2009) observaram uma associação negativa e Perini et al.⁵⁶ (2014), uma associação positiva com o desenvolvimento da doença (Tabela 4). O SNP rs2010963 foi investigado em 15 (78,9%) estudos e a frequência do alelo *VEGF* +405C variou entre 18-74% nos casos e 26-95% nos controles (Tabela 3), sendo que 9 estudos (Tabela 4) não encontraram associação com endometriose,^{15,32,34,41,56,63,70,74,87} 2 estudos verificaram associação positiva na presença do genótipo *VEGF* +405GG^{2,7} e, contrariamente, 4 estudos verificaram associação positiva na presença do alelo ou genótipo +405C^{5,19,26,40}. Nove estudos (47,4%) avaliaram o SNP rs3025039 e a frequência do alelo *VEGF* +936T variou entre 13-27% e 13-20% nos casos e controles, respectivamente (Tabela 3), todavia 6 estudos não encontraram associação^{39,41,45,56,70,87} e 3 verificaram associação positiva com a endometriose na presença do alelo +936T.^{15,32,34} Apenas um estudo³⁷ avaliou SNPs do gene *KDR* (rs1531289, rs2305948, rs1870377, rs7692791 e rs7667298) com o desenvolvimento da endometriose, encontrando

associação positiva com a doença na presença do alelo *KDR1192T* (Tabela 4).

DISCUSSÃO

Esta revisão apresenta uma descrição detalhada dos trabalhos que utilizaram o delineamento de estudo do tipo caso-controle para investigar a magnitude de associação de SNPs de *VEGF* e/ou *KDR* no desenvolvimento da endometriose. A angiogênese, via sinalização do VEGF-KDR, é um evento importante para o desenvolvimento da doença,^{16,49,51,85} já que lesões de endometriose são caracterizadas por uma vascularização densa e que requerem um fornecimento de sangue adequado a sua sobrevivência.⁶⁰ Além disso, já foi observado um aumento da expressão e da distribuição de VEGF e VEGFR2 em amostras de mulheres com endometriose quando comparadas ao seu controle.^{49,73}

A expressão dos genes *VEGF* e *KDR*, assim como a atividade destas proteínas podem ser alteradas pela presença de polimorfismos em regiões codificantes e não codificantes dos genes.^{35,37,81} Os SNPs que ocorrem nas regiões promotoras, 5'-UTR e 3'-UTR, afetam potenciais elementos reguladores, sensíveis à hipóxia e contribuem para a alta variabilidade da produção de VEGF nos tecidos.^{6,81,62,69} Os SNPs rs699947, rs833061 e rs1570360, presentes na região promotora do gene *VEGF*, apresentam maior atividade de transcrição e estão associados com alto nível da proteína.¹⁰ O SNP rs2010963, localizado na região 5'-UTR do gene *VEGF*, afeta a eficiência da transdução e está relacionado com a produção de VEGF a partir de células mononucleadas do sangue periférico.⁸² Já o SNP rs3025039, na região 3'-UTR do gene *VEGF*, influencia na concentração de VEGF plasmático circulante.⁵⁹ Os SNPs rs2305948 e rs1870377, localizados em éxons do gene *KDR*, diminuem a eficiência de ligação do KDR ao VEGF.⁸¹ O possível efeito do SNP rs7667298, localizado na região 5'-UTR do gene *KDR*, não está bem claro. No entanto, esse SNP está associado ao SNP rs2071559 (*KDR-604T>C*), localizado na região promotora. Já foi observado que a presença do alelo -604C reduz a atividade transcricional do *KDR*.⁸¹ Os SNPs rs1531289 e rs7692791, localizados nos íntrons do gene *KDR*, ainda não foram estudados em relação aos seus efeitos funcionais.

O papel do VEGF-KDR na fisiopatologia da endometriose, assim como a influência do SNPs em modular os níveis e a atividade destas proteínas justificam o elevado número de estudos

que buscaram descrever a magnitude de associação dos SNPs nos genes *VEGF* e *KDR* no desenvolvimento da endometriose.^{1,2,5,7,15,19,26,32-34,37,39-41,45,56,61,63,70,74,87} Em 2013, Li et al.,⁴³ realizaram um estudo de meta-análise, envolvendo 14 trabalhos, que investigaram a magnitude de associação de 5 SNPs do gene *VEGF* (rs699947, rs833061, rs1570360, rs2010963 e rs3025039) e a susceptibilidade da endometriose. O aumento do risco em desenvolver a endometriose foi observado na presença do SNP *VEGF* 936C>T, enquanto que os SNPs *VEGF* -2578C>A e -1154G>A foram fatores de proteção para o desenvolvimento da doença. Já os SNPs *VEGF* -460T>C e 405G>C não foram associados ao desenvolvimento da endometriose. Para o *KDR*, apenas um estudo do tipo caso-controle avaliou a magnitude de associação entre cinco SNPs (rs1531289, rs2305948, rs1870377, rs7692791 e rs7667298) e o desenvolvimento da endometriose em mulheres chinesas, observando uma associação negativa na presença do alelo 1192T (rs2305948).³⁷ Até o presente momento, não existem dados na literatura que avaliem de forma combinada SNPs nos genes *VEGF* e *KDR* e o desenvolvimento da endometriose.

Os resultados controversos observados nos estudos do tipo caso-controle, descritos nesta revisão, podem ser explicados pelas diferenças metodológicas delineadas em cada estudo, principalmente, pelo tipo de controle elegível e pela utilização da medida de associação, razão de chances (OR) não ajustada, utilizada para avaliar a magnitude de associação de polimorfismos nos genes *VEGF* e *KDR* no desenvolvimento da endometriose. As técnicas de estratificação e regressão múltipla são dois métodos estatísticos, que podem ser utilizados para excluir possíveis variáveis de confusão e, consequentemente, produzir ORs ajustados.^{12,24,25,71} Dentre os 19 estudos incluídos nesta revisão, apenas 7 (36,8%) utilizaram OR ajustado (Tabela 4) para avaliar a magnitude de associação de SNPs nos genes *VEGF* e *KDR* e o desenvolvimento da endometriose.^{15,37,41,45,56,63,74} A maneira pela qual as variáveis são medidas pode inserir um viés e distorcer a estimativa da medida de efeito.⁵⁷ As variáveis de confusão ocorrem quando parte da associação encontrada é resultado da presença de uma terceira variável que está relacionada tanto com a doença quanto com a exposição de interesse, resultando em uma alteração na estimativa de risco.⁴⁸

Os estudos epidemiológicos analíticos observacionais do tipo caso-controle são aplicados para avaliar exposições entre grupos semelhantes, que apresentam (casos) ou não (controles) a doença.⁶⁶ São amplamente utilizados no estudo de doenças raras ou com longo período de indução

e exposições frequentes,⁵⁸ como no caso da endometriose. Além disso, os estudos do tipo caso-controle podem contribuir para encontrar achados importantes e eficientes em termos de tempo relativamente curto com poucos recursos financeiros.⁵⁷ Entretanto, estudos do tipo caso-controle tendem a ser mais suscetíveis a vieses que outros desenhos analíticos epidemiológicos e a forma como os indivíduos são recrutados para o estudo pode distorcer a estimativa da medida de efeito.^{58,67} A definição do grupo caso é um ponto crítico em um estudo caso-controle, sendo os critérios de diagnóstico e de elegibilidade, dois aspectos fundamentais para a seleção dos indivíduos. O objetivo é assegurar que todos os verdadeiros casos tenham igual probabilidade de entrar no grupo, e que nenhum falso caso seja selecionado, pois isso pode distorcer a estimativa da medida de associação na direção da hipótese nula.^{13,42} Em todos os estudos publicados, que analisaram polimorfismos do *VEGF* e *KDR* no desenvolvimento da endometriose, apresentados nesta revisão, foi observado que os casos de endometriose tiveram o diagnóstico cirúrgico da doença. Apesar dos métodos de imagem disponíveis apresentarem uma boa acurácia no diagnóstico da endometriose, segundo consenso da Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) e da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM), o padrão ouro para o diagnóstico da endometriose é a viodeolaparoscopia com a inspeção direta da cavidade pélvica e visualização dos implantes, além da confirmação histopatológica da doença.^{4,20} Assim, a seleção dos casos incluídos nos artigos descritos nesta revisão apresentou um bom critério de diagnóstico e elegibilidade, assegurando que todas as 4.430 mulheres incluídas fossem verdadeiros casos de endometriose.

A seleção do grupo controle requer um cuidado especial e talvez seja o principal desafio para a garantia da validade do estudo, considerando a complexidade da doença investigada (endometriose). O grupo controle dos estudos incluídos nesta revisão foi formado por mulheres que poderiam ter outras doenças, inclusive distúrbios ginecológicos associados ao desenvolvimento da endometriose, com o processo de angiogênese e/ou com polimorfismos nos genes *VEGF* e *KDR*.^{6,8,16,30,38,64,85} Cerca de 74% (n=14) dos estudos incluídos nesta revisão utilizaram controles que apresentavam outras doenças ginecológicas ou não apresentavam informação sobre a razão da realização do procedimento cirúrgico, realizado por médico ginecologista (laparoscopia e/ou laparotomia), podendo assim fornecer baixas estimativas de risco, considerando que estas doenças e/ou a razão pela qual a mulher foi submetida à cirurgia possam

estar associadas à exposição sob investigação (SNPs do gene *VEGF* e *KDR*). É fundamental que o grupo controle seja diretamente determinado pela definição e seleção do grupo de casos, sendo amostrados de uma mesma fonte.⁸⁸ Dentre os 19 estudos incluídos nesta revisão, cerca de 74% (n = 14) utilizaram controles de base hospitalar (Tabela 2). Contudo, os critérios de inclusão e exclusão foram variados,^{2,15,19,26,32,37,39,40,41,56,61,63,70,74} além de 2 estudos (14,3%), dentre os 14, não terem realizado procedimento cirúrgico e/ou ultrassonografia para excluir o diagnóstico de endometriose.^{41,74} Já está descrito na literatura que cerca de 11% das mulheres com endometriose não apresentam os sintomas da doença.^{22,53} Além disso, o tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico definitivo de endometriose é extensamente longo, variando entre aproximadamente 7 a 12 anos.^{3,29} Destacamos, ainda, que no artigo de Zhao et al.,⁸⁷ os controles eram mulheres que relataram não serem portadoras de endometriose, sendo que apenas 27% tinham diagnóstico negativo de endometriose por laparoscopia ou histerectomia. Toktam et al.,⁷⁴ utilizaram controle de base hospitalar, contudo não informaram se as mulheres haviam realizado procedimento cirúrgico, apenas relataram que não apresentavam problemas ginecológicos. Lamp et al.⁴¹ utilizaram mulheres saudáveis férteis (com pelo menos 2 filhos), sem suspeita clínica de endometriose e sem realizar procedimento cirúrgico para descartar a presença da doença. Ikuhashi et al.,³⁴ utilizaram cordão umbilical como controle material, obtido a partir de neonatos fêmeas.

As principais limitações dos estudos do tipo caso-controle são: a falta de validade devido ao viés de seleção; o recrutamento de controles não representativos da população sob risco; erros de medidas de associação, em função dos diferentes vieses de lembrança entre casos e controles e as variáveis de confusão que falseiam uma associação causal.^{9,66} De acordo com Zondervan et al.⁸⁸ (2002a), a escolha do grupo controle ideal para o estudo da base genética da endometriose é o livre de doenças, que se submete à cirurgia para realização de laqueadura. Dentre os 19 estudos incluídos nesta revisão, cerca de 21% (n=4) utilizaram mulheres submetidas à laqueadura no grupo controle,^{5,15,19,56} sendo que apenas 2 (11%) estudos foram formados exclusivamente por um grupo controle de mulheres submetidas ao procedimento de laqueadura.^{15,19} Corroborando com esses achados, sugerimos também que o grupo controle ideal para realizar estudos do tipo caso-controle, que avaliam o perfil genético de mulheres com endometriose, deve ser formado por mulheres submetidas à laqueadura, já que é possível fazer a inspeção direta da cavidade pélvica e excluir a presença das lesões endometrióticas.

Os estudos analíticos observacionais do tipo caso-controle, quando são cuidadosamente

delineados, podem fornecer informações relevantes para a identificação dos fatores de risco, especialmente no caso da endometriose, que é uma doença complexa e multifatorial. As análises epidemiológicas que exploram também o perfil molecular das mulheres com endometriose podem contribuir para as investigações etiológicas e para construir um instrumento para as ações e intervenções no âmbito da saúde pública.

Em conclusão, estudos mais abrangentes com delineamento metodológico correto, envolvendo diferentes populações, assim como a análise combinada de SNPs nos genes *VEGF* e/ou *KDR*, ainda são necessários em virtude do papel fundamental desses fatores no desenvolvimento da endometriose. Sugerimos que a seleção de um grupo controle de base hospitalar, sem histórico de infertilidade e distúrbios ginecológicos, como é o caso das mulheres submetidas ao procedimento de laqueadura, corresponde ao tipo de controle adequado para avaliar a magnitude de associação de SNPs nos genes *VEGF* e/ou *KDR* no desenvolvimento da endometriose.

Contribuição dos Autores:

JVC e JAP tiveram a ideia, planejaram o estudo, realizaram a revisão bibliográfica, análise e interpretação dos dados, redigiram e revisaram o manuscrito. DEM contribuiu com a ideia e editou o manuscrito. PTB contribuiu com as revisões críticas do conteúdo. RF contribuiu com a discussão crítica e editou o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Tabela 1. Descrição dos critérios de inclusão e exclusão do grupo de casos de endometriose, estabelecidos pelos estudos elegíveis para esta revisão.

Referência (ano)	População	Casos (N)	Cirurgia ^a	Estadiamento da Endometriose ^b (N)	Diagnóstico Histológico	Crítérios de exclusão	Pontuação de qualidade Strobe (%)
Bhanoori et al. ⁷ (2005)	Indiana	215	Laparoscopia ^c	III = 80 IV = 135	Não	Cisto ovariano, adenomiose, câncer de ovário, mioma e endometriose I-II.	16 (73%)
Kim et al. ⁴⁰ (2005)	Coreana	215	Laparoscopia ou Laparotomia	III = 65 IV = 150	Sim	Artrite reumatoide, ACG, retinopatia diabética, psoríase, doença de Behçet e endometriose I-II.	19 (86%)
Ikuhashi et al. ³⁴ (2007)	Japonesa	147	Sim	I = 9; II = 15 III = 27; IV = 96	Sim	Sem informação	14 (64%)
Gentilini et al. ²⁶ (2008)	Italiana	203	Laparoscopia	I-II = 78 III-IV = 125	Sim	Doença inflamatória pélvica.	18 (82%)
Kim et al. ³⁹ (2008)	Coreana	105	Laparoscopia	I = 20; II = 41 III = 11; IV = 33	Sim	Amenorreia, cirurgia anterior de endometriose ou outra patologia pélvica, como por exemplo mioma.	12 (55%)
Zhao et al. ⁸⁷ (2008)	Australiana	958	Sim	I-II = 565 III-IV = 393	Não	Sem informação	17 (77%)

Cosin et al. ¹⁵ (2009)	Espanhola	186	Laparoscopia ^c	I-II = 19 III-IV = 167	Sim	Suspeita de endometriose, mas sem confirmação histopatológica da doença, menorragia, hipermenorreia, que engravidou ou amamenta nos últimos 6 meses.	20 (91%)
Liu et al. ⁴⁵ (2009)	Chinesa	344	Laparoscopia ou Laparotomia	Sem informação	Sim	Sem informação	19 (86%)
Attar et al. ⁵ (2010)	Turca	52	Laparoscopia ^c	I-II = 11 III-IV = 41	Não	Sem informação	17 (77%)
Toktam et al. ⁴¹ (2010)	Iraniana	105	Laparoscopia	Sem informação	Não	Artrite reumatoide, ACG, retinopatia diabética, psoríase e doença de Behçet.	16 (73%)
Lamp et al. ⁷⁴ (2010)	Estoniana	150	Sim	I = 53; II = 39 III = 36; IV = 22	Sim	Sem informação	20 (91%)
Altinkaya et al. ² (2011)	Turca	98	Sim	I = 4; II = 18 III = 41; IV = 35	Sim	Artrite reumatoide, ACG, retinopatia diabética, psoríase ou doença de Behçet.	17 (77%)
Emamifar et al. ¹⁹ (2012)	Iraniana	480	Sim	I-II	Sim	Terapia endócrina antes da cirurgia.	15 (68%)

Rotman et al. ³⁹ (2013)	Americana	24	Laparoscopia	I = 3; II = 2 III = 2; IV = 17	Sim	Sem informação	13 (59%)
Kang et al. ³⁷ (2013)	Chinesa	571	Laparoscopia ou Laparotomia	III-IV	Sim	Sem informação	19 (86%)
Saliminejad et al. ⁶³ (2013)	Iraniana	135	Laparoscopia	Sem informação	Não	Artrite reumatoide, retinopatia diabética e doença de Behçet.	19 (86%)
Perini et al. ⁵⁶ (2014)	Brasileira	182	Laparoscopia ou Laparotomia	I-II = 71, III-IV = 110, Sem informação = 1	Sim	Histórico de câncer ou adenomiose.	21 (96%)
Henidi et al. ³² (2015)	Tunisiana	105	Laparoscopia	I = 27; II = 36, III = 18; IV = 24	Sim	Artrite reumatoide, ACG, retinopatia diabética, câncer de mama, doença de Behçet, leiomioma, adenomiose, mioma, carcinoma <i>in situ</i> do colo uterino ou câncer de ovário.	17 (77%)
Szczepańska et al. ⁷⁰ (2015)	Polonesa	154	Laparoscopia	I = 83 II = 71	Sim	Distorção mecânica da cavidade endometrial por miomas, oclusão tubária bilateral e fator de infertilidade masculina.	17 (77%)

ACG = arterite de células gigantes. ^aTipo de cirurgia para o diagnóstico da endometriose. Sim = não especificado o

tipo de cirurgia realizada. ^bClassificação do estadiamento da endometriose descrito pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (1996, 1997), Sociedade Americana de Fertilidade (1985, 1997). ^cRealizaram também ultrassonografia transvaginal (TVS).

Tabela 2. Descrição dos critérios de inclusão e exclusão do grupo controle, estabelecidos pelos estudos que foram elegíveis para esta revisão.

Referência (ano)	Controles (N)	Fonte dos controles	TVS (N)	Cirurgia ^a (N)	Motivo da cirurgia		Critérios de exclusão
					Laqueadura (N)	Outros ^b (N)	
Bhanoori et al. ⁷ (2005)	210	Base populacional	Sim (210)	Laparoscopia (141)	Sem informação	Sem informação	Cisto ovariano, adenomiose, câncer de ovário, mioma e endometriose I-II.
Kim et al. ⁴⁰ (2005)	219 ^c	Base hospitalar	Não	Laparoscopia ou Laparotomia	Não	Sim (253)	Artrite reumatoide, ACG, retinopatia diabética, psoríase, doença de Behçet, endometriose I-II, leiomioma, adenomiose, carcinoma <i>in situ</i> do colo uterino ou câncer do ovário.
Ikuhashi et al. ³⁴ . (2007)	181	Base populacional	Não	Não	Não	Não	Sem informação
Gentilini et al. ²⁶ (2008)	140	Base hospitalar	Não	Laparoscopia	Não	Sim (140)	Doença inflamatória pélvica.
Kim et al. ³⁹ (2008)	101 ^e	Base hospitalar	Não	Laparoscopia	Não	Sem informação	Amenorreia, cirurgia anterior de endometriose ou outra patologia pélvica, como por exemplo mioma.
Zhao et al. ⁸⁷	959	Base	Não	Laparoscopia ou Laparotomia	Não	Sem	Sem informação

(2008)		populacional		(259)		informação	
Cosin et al. ¹⁵ (2009)	180	Base hospitalar	Não	Laparoscopia	Sim (180)	Não	Menorragia, hipermenorreia, que engravidou ou amamenta nos últimos 6 meses
Liu et al. ⁴⁵ (2009)	360	Base populacional	Não	Laparoscopia ou Laparotomia	Não	Sim (sem informação)	Doença maligna ou endometriose.
Attar et al. ⁵ (2010)	60	Base populacional	Sim	Laparoscopia	Sim (sem informação)	Sim (sem informação)	Sem informação
Toktam et al. ⁴¹ (2010)	150	Base hospitalar	Não	Sem informação	Sem informação	Não	Artrite reumatoide, ACG, retinopatia diabética, psoríase e doença de Behçet.
Lamp et al. ⁷⁴ (2010)	199	Base hospitalar	Não	Não	Sem informação	Não	Sem informação
Altinkaya et al. ² (2011)	94	Base hospitalar	Não	Laparoscopia	Não	Sim (94)	Artrite reumatoide, ACG, retinopatia diabética, psoríase e doença de Behçet.
Emamifar et al. ¹⁹ (2012)	600	Base hospitalar	Não	Sim	Sim (600)	Não	Terapia endócrina antes da cirurgia, endometriose, doença inflamatória e mioma.
Rotman et al. ⁶¹ (2013)	18	Base hospitalar	Não	Laparoscopia	Sem informação	Sem informação	Sem informação
Kang et al. ³⁷ (2013)	580	Base hospitalar	Sim	Laparoscopia ou Laparotomia	Não	Sim (sem informação)	Neoplasia maligna, endometriose ou adenomiose.
Saliminejad et al. ⁶³ (2013)	173	Base hospitalar	Não	Laparoscopia	Não	Sim (173)	Artrite reumatoide, retinopatia diabética e

							doença de Behçet.
Perini et al. ⁵⁶ (2014)	112	Base hospitalar	Não	Laparoscopia ou Laparotomia	Sim (51)	Sim (61)	Histórico de câncer ou adenomiose
Henidi et al. ³² (2015)	150	Base hospitalar	Não	Laparoscopia	Sem informação	Sem informação	Artrite reumatoide, ACG, retinopatia diabética, câncer de mama, doença de Behçet, leiomioma, adenomiose, mioma, carcinoma <i>in situ</i> do colo uterino ou câncer de ovário.
Szczepańska et al. ⁷⁰ (2015)	135	Base hospitalar	Não	Laparoscopia	Não	Sim (135)	Sinais de inflamação, passado ou presente, anormalidades pélvicas e oclusão tubária bilateral.

TVS = ultrassonografia transvaginal. (-) = não se aplica. ACG = arterite de células gigantes. ^aTipo de cirurgia realizada. Sim = não especificado o tipo de cirurgia realizada. ^bOutras razões para realização de procedimento cirúrgico incluem apendicite, carcinoma *in situ* do colo uterino, cisto de ovário, cistos dermóides, cistos parovários, cistos serosos e mucinosos, dismenorreia, dor pélvica, fibroma ovariano, hemorragia uterina disfuncional, hidrossalpinge, histerectomia, infertilidade, malformações uterinas, massa anexial, mioma e pelve normal. ^cMais 70 mulheres férteis (idade 43±3, mín e máx = 40-49) e sem histórico de problemas ginecológicos foram incluídas também como grupo controle. ^dAmostra de cordão umbilical de neonatos do sexo feminino. ^eCem homens recém-nascidos também foram incluídos como controle negativo.

Tabela 3. Características dos polimorfismos dos genes *VEGF* e *KDR*, analisados nos estudos elegíveis desta revisão.

Gene	rs	Local no gene	Técnica de genotipagem	Referência (ano)	Frequência dos genótipos (selvagem/heterozigoro/ homozigoto variante)		Frequência do alelo variante	
					Caso	Controle	Caso	Controle
-2578A								
VEGF	rs699947	RP	MALDI-TOF	Zhao et al. ⁸⁷ (2008)	Sem informação	Sem informação	49	50
			PCR-RFLP	Liu et al. ⁴⁵ (2009)	65 / 32 / 3	56 / 36 / 8	19	26
			PCR-RFLP	Lamp et al. ⁷⁴ (2010)	12 / 51 / 37	25 / 44 / 31	63	53
			TaqMan - PCR em tempo real	Perini et al. ⁵⁶ (2014)	34 / 51 / /15	45 / 42 / 13	40	34
-460C								
VEGF	rs833061	RP	PCR-RFLP	Bhanoori et al. ⁷ (2005)	26 / 52 / 22	27 / 53 / 20	48	47
			PCR-RFLP	Kim et al. ⁴⁰ (2005)	52 / 39 / 9	55 / 38 / 7	28	26
			PCR-RFLP	Ikuhashi et al. ³⁴ (2007)	49 / 46 / 5	44 / 46 / 10	28	33
			PCR-RFLP	Zhao et al. ⁸⁷ (2008)	Sem informação	Sem informação	50	51
			PCR-RFLP	Cosin et al. ¹⁵ (2009)	27 / 52 / 21	27 / 48 / 25	47	49
			PCR-RFLP	Liu et al. ⁴⁵ (2009)	58 / 38 / 4	63 / 32 / 5	23	21
			PCR-RFLP	Attar et al. ⁵	52 / 27 / 21	50 / 18 / 32	35	41

				(2010)			
			PCR-RFLP	Altinkaya et al. ² (2011)	94 / 6 / 0	98 / 2 / 0	3 1
			PCR-RFLP	Emamifar et al. ¹⁹ (2012)	47 / 39 / 14	50 / 38 / 12	33 31
			TaqMan - PCR em tempo real	Perini et al. ⁵⁶ (2014)	30 / 54 / 16	36 / 48 / 16	43 40
			PCR-RFLP	Henidi et al. ³² (2015)	35 / 51 / 14	36 / 45 / 19	40 42
			PCR em tempo real	Szczepańska et al. (2015) ⁷⁰	25 / 44 / 31	24 / 51 / 25	53 51
							-1154A
VEGF	rs1570360	RP	PCR-RFLP	Liu et al. ⁴⁵ (2009)	69 / 29 / 2	61 / 33 / 6	16 22
			PCR-RFLP	Lamp et al. ⁷⁴ (2010)	35 / 47 / 18	39 / 48 / 13	42 37
			PCR-RFLP	Rotman et al. ⁶¹ (2013)	49 / 45 / 6	65 / 15 / 20	28 27
			TaqMan - PCR em tempo real	Perini et al. ⁵⁶ (2014)	56 / 35 / 9	70 / 28 / 2	27 16
							+405C
VEGF	rs2010963	5'UTR	PCR-RFLP	Bhanoori et al. ⁷ (2005)	65 / 33 / 2	54 / 38 / 8	18 27
			PCR-RFLP	Kim et al. ⁴⁰ (2005)	35 / 42 / 23	34 / 53 / 13	44 40
			PCR-RFLP	Ikuhashi et al. ³⁴ (2007)	33 / 52 / 15	31 / 52 / 17	41 43
			PCR-RFLP	Gentilini et al. ²⁶	34 / 52 / 14	48 / 42 / 10	40 31

			(2008)			
		PCR-RFLP	Zhao et al. ³⁹ (2008)	Sem informação	Sem informação	31 30
		PCR-RFLP	Cosin et al. ¹⁵ (2009)	42 / 49 / 9	47 / 44 / 9	34 31
		PCR-RFLP	Attar et al. ⁵ (2010)	13 / 31 / 56	15 / 50 / 35	71 60
		PCR-RFLP	Toktam et al. ⁴¹ (2010)	32 / 53 / 15	58 / 33 / 9	36 41
		PCR-RFLP	Lamp et al. ⁷⁴ (2010)	63 / 35 / 2	54 / 39 / 7	20 26
		PCR-RFLP	Altinkaya et al. ² (2011)	16 / 58 / 26	0 / 11 / 89	55 95
		PCR-RFLP	Emamifar et al. ¹⁹ (2012)	20 / 48 / 32	43 / 46 / 11	56 34
		PCR-RFLP	Saliminejad et al. ⁶³ (2013)	41 / 43 / 16	35 / 50 / 15	37 41
		TaqMan – PCR em tempo real	Perini et al. ⁵⁶ (2014)	46 / 41 / 13	35 / 51 / 14	33 40
		PCR-RFLP	Henidi et al. ³² (2015)	35 / 42 / 23	41 / 45 / 14	44 37
		PCR em tempo real	Szczepańska et al. ⁷⁰ (2015)	7 / 39 / 54	8 / 40 / 52	74 72
						+936T
VEGF	rs3025039	3'UTR				
		PCR-RFLP	Ikuhashi et al. ³⁴ (2007)	54 / 38 / 8	65 / 29 / 6	27 20
		PCR-RFLP	Kim et al. ³⁹ (2008)	63 / 35 / 2	Sem informação	20 Sem informação

			PCR-RFLP	Zhao et al. ⁸⁷ (2008)	Sem informação	Sem informação	16	15
			PCR-RFLP	Cosin et al. ¹⁵ (2009)	71 / 26 / 3	81 / 18 / 1	16	10
			PCR-RFLP	Liu et al. ⁴⁵ (2009)	68 / 29 / 3	69 / 29 / 2	17	17
			PCR-RFLP	Lamp et al. ⁷⁴ (2010)	69 / 29 / 2	69 / 28 / 3	16	17
			TaqMan - PCR em tempo real	Perini et al. ⁵⁶ (2014)	73 / 25 / 2	71 / 28 / 1	15	15
			PCR-RFLP	Henidi et al. ³² (2015)	59 / 31 / 10	78 / 17 / 5	25	13
			PCR em tempo real	Szczepańska et al. ⁷⁰ (2015)	76 / 22 / 2	68 / 30 / 2	13	17
								-92A
<i>KDR</i>	rs1531289	Intron 25	LDR-PCR	Kang et al. ³⁷ (2013)	66 / 31 / 3	63 / 34 / 3	19	21
								1192T
	rs2305948	Éxon 7	LDR-PCR	Kang et al. ³⁷ (2013)	80 / 19 / 1	75 / 22 / 3	11	14
								1719A
	rs1870377	Éxon 11	LDR-PCR	Kang et al. ³⁷ (2013)	30 / 50 / 20	30 / 51 / 19	45	45
								+54T
	rs7692791	Intron 6	LDR-PCR	Kang et al. ³⁷ (2013)	37 / 46 / 17	35 / 50 / 15	40	41
								+31T
	rs7667298	5'UTR	LDR-PCR	Kang et al. ³⁷ (2013)	42 / 48 / 10	41 / 48 / 11	34	35

RP = região promotora, 5'UTR = região 5' não traduzida, 3'UTR = região 3' não traduzida. PCR-RFLP = Reação em cadeia da polimerase - polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição. LDR-PCR = Reação em cadeia da ligase - reação em cadeia da polimerase. MALDI-TOF = *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*.

Tabela 4. Descrição dos resultados referentes à magnitude de associação dos polimorfismos de *VEGF* e *KDR* com a endometriose, segundo os estudos elegíveis desta revisão.

Gene/SNP	Referência (ano)	Associação	Alelo ou genótipo associado	OR (95% IC)
<i>VEGF</i>	Liu et al. ⁴⁵ (2009) ^a	Sim	AA	0,34 (0,17 – 0,70)
-2578C>A	Lamp et al. ⁴¹ (2010) ^a	Sim	CC	0,40 (0,20 – 0,78)
(rs699947)	Zhao et al. ⁸⁷ (2008) e Perini et al. ⁵⁶ (2014)	Não	-	-
<i>VEGF</i>	Bhanoori et al. ⁷ (2005), Kim et al. ⁴⁰ (2005), Ikuhashi et al. ³⁴ (2007), Zhao et al. ⁸⁷ (2008), Cosín et al. ¹⁵ (2009), Liu et al. ⁴⁵ (2009), Attar et al. ⁵ (2010), Altinkaya et al. ² (2011), Emamifar et al. ¹⁹ (2011), Perini et al. ⁵⁶ (2014), Henidi et al. ³² (2015) e Szczepańska et al. ⁷⁰ (2015)	Não	-	-
-460T>C				
(rs833061)				
<i>VEGF</i>	Liu et al. ⁴⁵ (2009)	Sim	AA	0,26 (0,11 – 0,67)
-1154G>A	Perini et al. ⁵⁶ (2014) ^a	Sim	AA	6,17 (1,37 – 27,8)
(rs1570360)	Lamp et al. ⁷⁴ (2010) e Rotman et al. ⁶¹ (2013)	Não	-	-
<i>VEGF</i>	Bhanoori et al. ⁷ (2005)	Sim	GG	Risco (sem informação)
+405G>C	Kim et al. ⁴⁰ (2005)	Sim	CC	1,99 (1,20 – 3,28)
(rs2010963)	Gentilini et al. ²⁶ (2008)	Sim	C	1,8 (1,2 – 2,8)

	Attar et al. ⁵ (2010)	Sim	CC	2,34 (1,09 – 5,01)
	Altinkaya et al. ² (2011)	Sim	GG	19,92 (9,06 – 43,8)
	Emamifar et al. ¹⁹ (2012)	Sim	CC	3,78 (2,74 – 5,21)
	Ikuhashi et al. ³⁴ (2007), Zhao et al. ⁸⁷ (2008), Cosín et al. ¹⁵ (2009), Lamp et al. ⁴¹ (2010), Toktam et al. ⁷⁴ (2010) ^a , Saliminejad et al. ⁶³ (2013) ^a , Perini et al. ⁵⁶ (2014), Henidi et al. ³² (2015) e Szczepańska et al. ⁷⁰ (2015)	Não	-	-
<i>VEGF</i> +936C>T (rs3025039)	Ikuhashi et al. ³⁴ (2007)	Sim	T	1,57 (1,08 – 2,29)
	Cosín et al. ¹⁵ (2009) ^a	Sim	T	1,75 (1,12 – 2,74)
	Henidi et al. ³² (2015)	Sim	T	2,19 (1,39 – 3,46)
	Kim et al. ³⁹ (2008), Zhao et al. ⁸⁷ (2008), Liu et al. ⁴⁵ (2009), Lamp et al. ⁷⁴ (2010), Perini et al. ⁵⁶ (2014) e Szczepańska et al. ⁷⁰ (2015)	Não	-	-
<i>KDR</i>				
<i>1192C>T</i> (rs2305948)	Kang et al. ³⁷ (2013) ^a	Sim	T	0,74 (0,57 – 0,95)
<i>KDR</i>				
<i>-92A>G</i> (rs1531289)	Kang et al. ³⁷ (2013)	Não	-	-
<i>KDR</i>				
<i>1719T>A</i> (rs1870377)	Kang et al. ³⁷ (2013)	Não	-	-
<i>KDR</i>	Kang et al. ³⁷ (2013)	Não	-	-

+54C>T				
(rs7692791)				
<i>KDR</i>				
+31C>T	Kang et al. ³⁷ (2013)	Não	-	-
(rs7667298)				

(-) = não se aplica. OR = Razão de chances; IC = Intervalo de confiança. ^aUtilizaram métodos estatísticos para calcular o OR ajustado.

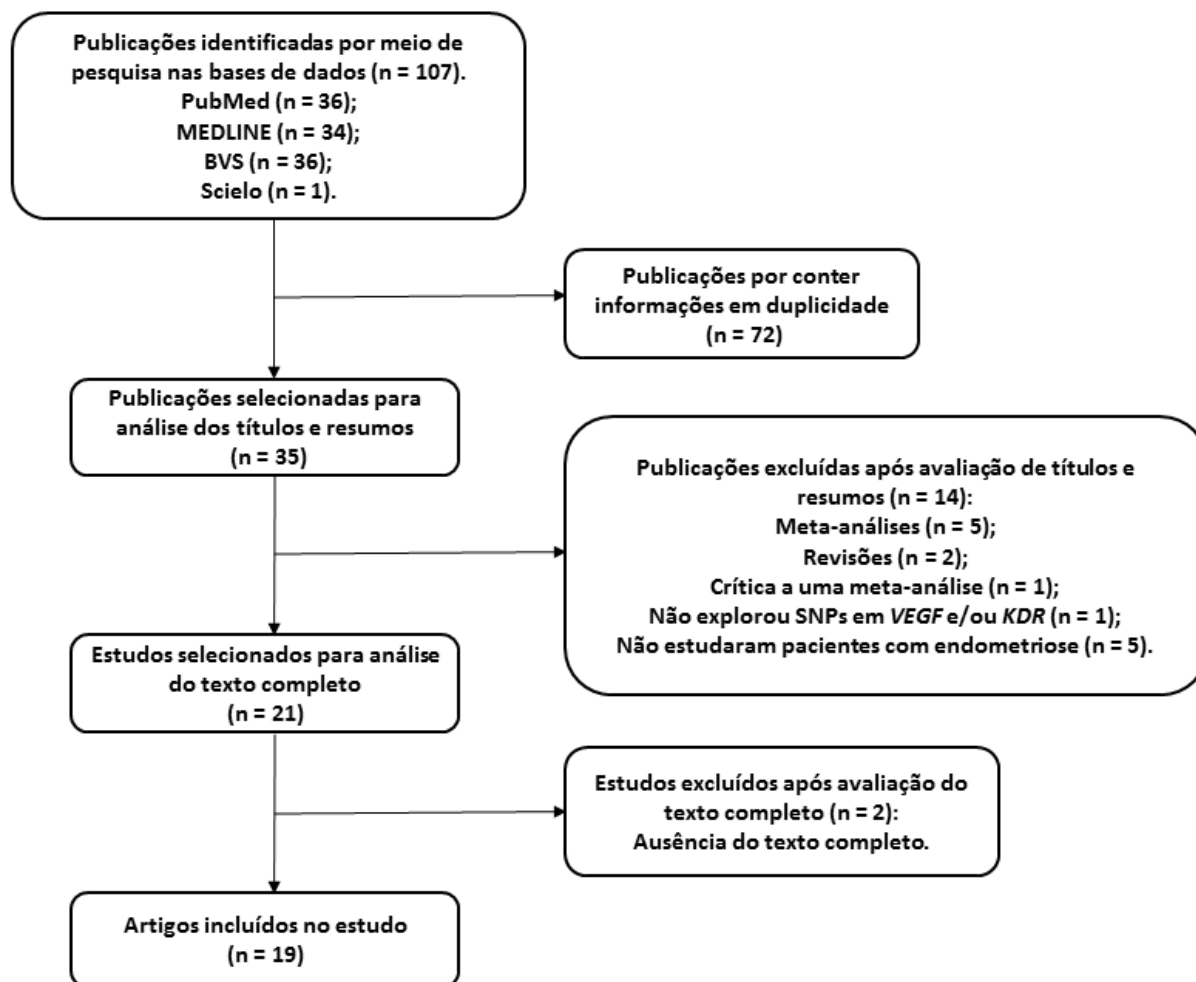


Figura 1. Fluxograma da seleção de artigos incluídos na revisão.

REFERÊNCIAS

1. Ahmed MM, Khaled ARRN, Hisham SH, Wael TE, Waleed SAE. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism as a risk factor of endometriosis. *Evidence Based Women's Health Journal* Volume 4 - Issue 2 - p 92–95, 2014.
2. Altinkaya SO, Ugur M, Ceylaner G, Ozat M, Gungor T, Ceylaner S. Vascular endothelial growth factor +405 C/G polymorphism is highly associated with an increased risk of endometriosis in Turkish women. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 283:267-72. DOI: 10.1007/s00404-009-1344-1.
3. Arruda MS, Petta CA, Abrão MS, Benetti-Pinto CL. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. *Hum Reprod.* 2003; 18:756-759. DOI: 10.1093/humrep/deg136.
4. ASRM - American Society For Reproductive Medicine. Revised American Fertility Society Classification Of Endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997.
5. Attar R, Agachan B, Kuran SB, Toptas B, Eraltan IY, Attar E, et al. Genetic variants of vascular endothelial growth factor and risk for the development of endometriosis. *In Vivo.* 2010; 24:297-301.
6. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51:1635–1639. DOI: 10.2337/diabetes.51.5.1635
7. Bhanoori M, Arvind Babu K, Pavankumar Reddy NG, Lakshmi Rao K, Zondervan K, et al. The vascular endothelial growth factor (VEGF) +405G>C 5'-untranslated region polymorphism and increased risk of endometriosis in South Indian women: a case control study. *Hum Reprod* 2005; 20:1844-9. DOI: 10.1093/humrep/deh852.
8. Boiardi L, Casali B, Nicoli D, Farnetti E, Chen Q, Macchioni P, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2003; 30:2160–2164.
9. Breslow NE. Statistics in epidemiology: the case-control study. *J Am Stat Assoc.* 1996; 91:14-28.
10. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol.* 1999; 60:1245-9.

11. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012; 98:511-9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.029.
12. Camey SA, Torman VB, Hirakata VN, Cortes RX, Vigo A. Bias of using odds ratio estimates in multinomial logistic regressions to estimate relative risk or prevalence ratio and alternatives. *Cad Saude Publica*. 2014; 30:21-9. DOI: 10.1590/0102-311X00077313
13. Checkoway H, Pearce NE, Crawford-Brown DJ. Research methods in occupational epidemiology. 1a Edição. New York: Oxford University Press, 344p., 1989.
14. Colette S, Donnez J. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2009, 360:1911-2. DOI: 10.1056/NEJMc090328.
15. Cosín R, Gilabert-Estellés J, Ramón La, España F, Gilabert J, Romeu A, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms (-460C/T, +405G/C, and 936C/T) and endometriosis: their influence on vascular endothelial growth factor expression. *Fertil Steril* 2009; 92:1214-2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.08.079.
16. Cosín R, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, Gómez-Lechón MJ, Gilabert J, Chirivella M, et al. Influence of peritoneal fluid on the expression of angiogenic and proteolytic factors in cultures of endometrial cells from women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2010; 25:398-405. DOI: 10.1093/humrep/dep419.
17. Cramer, DW & Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 955: 11–22; discussion 34–6, 396–406, 2002.
18. De Graaff AA, D'hooghe TM, Dunselman GA, Dirksen CD, Hummelshoj L; WERF EndoCost Consortium, et al. The significant effect of endometriosis on physical, mental and social wellbeing: results from an international cross-sectional survey. *Hum Reprod*. 2013; 28:2677-85. DOI: 10.1093/humrep/det284.
19. Emamifar B, Salehi Z, Mehrafza M, Mashayekhi F. The vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphisms and the risk of endometriosis in northern Iran. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28:447-50. DOI: 10.3109/09513590.2011.632791.
20. ESHRE Guideline for the Diagnosis and Treatment of Endometriosis. <http://guidelinesendometriosis.org/> 2008.
21. Fang F, Gong L, Wang X, Zhang L. The association between vascular endothelial growth factor (VEGF) +405G>C genetic polymorphism and endometriosis. *Exp Biol Med* (Maywood). 2015; 240:1177-82. DOI: 10.1177/1535370214564752.

22. Fauconnier A, Staraci S, Roman Chh, Panel P, Descamps P. Comparison of patient- and physician-based descriptions of symptoms of endometriosis: a qualitative study. *Human Reproduction* 2013; 28:2686-94. DOI: 10.1093/humrep/det310.
23. Folkman J: Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6:273–286. DOI:10.1038/nrd2115.
24. Francisco PMSB, Donalisio MR, Barros MBA, Cesar CLG, Carandina L, Goldbaum M. Medidas de associação em estudo transversal com delineamento complexo: razão de chances e razão de prevalência. *Rev. bras. epidemiol.* vol.11, n.3, 2008.
25. Fuchs SC, Paim BS. Revisão Sistemática de Estudos Observacionais com Metanálise. *Rev HCPA* 2010; 30:294-301.
26. Gentilini D, Somigliana E, Viganò P, Vignali M, Busacca M, Di Blasio AM. The vascular endothelial growth factor +405G>C polymorphism in endometriosis. *Hum Reprod* 2008; 23:211-5. DOI: 10.1093/humrep/dem341.
27. Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med.* 2010; 362:2389-98. DOI: 10.1056/NEJMcpl000274.
28. Góralczyk B, Smolarz B, Romanowicz H, Szyłło K. [Single nucleotide polymorphisms of VEGF gene in endometriosis]. *Pol Merkur Lekarski.* 2012; 32:151-3.
29. Hadfield R, Mardon H, Barlow D, Kennedy S. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. *Hum Reprod.* 1996; 11:878-80.
30. Han SW, Kim GW, Seo JS, Kim SJ, Sa KH, Park JY, et al. VEGF gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxf).* 2004; 43,1173–1177. DOI: 10.1093/rheumatology/keh281
31. He P, Zhang XM, Deng L, Ma JY. [Relationship between IL-10 promoter gene polymorphisms and the susceptibility to endometriosis]. *Yi Chuan.* 2009; 31:479-84.
32. Henidi B, Kaabachi W, Naouali A, Kaabachi S, Zhioua A, Haj Sassi F, et al. Vascular endothelial growth factor (-460 C/T, +405 G/C, and +936 C/T) polymorphisms and endometriosis risk in Tunisian population. *Syst Biol Reprod Med.* 2015; 61:238-44. DOI: 10.3109/19396368.2015.1041622.
33. Hsieh YY, Chang CC, Tsai FI, Yeh LS, Lin CC, Peng CT. T allele for VEGF gene-460 polymorphism at the 5'-untranslated region: association with a higher susceptibility to endometriosis. *J Reprod Med.* 2004; 49:468-72.

34. Ikuhashi Y, Yoshida S, Kennedy S, Zondervan K, Takemura N, Deguchi M, et al. Vascular endothelial growth factor +936 C/T polymorphism is associated with an increased risk of endometriosis in a Japanese population. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007; 86:1352-8. DOI: 10.1080/00016340701644991.
35. Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, et al. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther.* 2009; 8:2496-508. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0302.
36. Jiang Y, Tang JY, Wu Y, Zhao TF. [Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and the risk of endometriosis: a systematic review]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2012; 47:179-84. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2012.03.005.
37. Kang S, Shi YY, Li Y, Wang N, Lu YC, Zhou RM, et al. Association between genetic variants of the VEGFR-2 gene and the risk of developing endometriosis in Northern Chinese Women. *Gynecol Obstet Invest* 2013; 76:32-7. DOI: 10.1159/000350665.
38. Kang S, Zhao J, Liu Q, Zhou R, Wang N, Li Y: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with the risk of developing adenomyosis. *Environ Mol Mutagen* 2009, 50:361–366. DOI: 10.1002/em.20455.
39. Kim JG, Kim JY, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Choi YM. Association between endometriosis and polymorphisms in endostatin and vascular endothelial growth factor and their serum levels in Korean women. *Fertil Steril* 2008; 89:243-5. .DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.02.023
40. Kim SH, Choi YM, Choung SH, Jun JK, Kim JG, Moon SY. Vascular endothelial growth factor gene +405 C/G polymorphism is associated with susceptibility to advanced stage endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20:2904-8. DOI: 10.1093/humrep/dei146.
41. Lamp M, Saare M, Laisk T, Karro H, Kadastik U, Metspalu A, et al. Genetic variations in vascular endothelial growth factor but not in angiotensin I-converting enzyme genes are associated with endometriosis in Estonian women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 153:85-9. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2010.07.021.
42. Lasky T, Stolley PD. Selection of cases and controls. *Epidemiol Rev.* 1994;16:6-17.
43. Li YZ, Wang LJ, Li X, Li SL, Wang JL, Wu ZH, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms contribute to the risk of endometriosis: an updated systematic review and meta-analysis of 14 case-control studies. *Genet Mol Res* 2013; 12:1035-44. DOI: 10.4238/2013.April.2.20.

44. Liang S, Huang Y, Fan Y. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and endometriosis risk: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2012; 286:139-46. DOI: 10.1007/s00404-012-2270-1.
45. Liu Q, Li Y, Zhao J, Sun DL, Duan Yn, Wang N, et al. Association of polymorphisms -1154G/A and -2578C/A in the vascular endothelial growth factor gene with decreased risk of endometriosis in Chinese women. *Hum Reprod* 2009; 24:2660-6.
46. Liu Q, Li Y, Zhao J, Zhou RM, Wang N, Sun DL, et al. [Association of single nucleotide polymorphisms in VEGF gene with the risk of endometriosis and adenomyosis]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2009; 26:165-9. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2009.02.010.
47. Lu D, Kussie P, Pytowski B, Persaud K, Bohlen P, Witte L, et al. Identification of the residues in the extracellular region of KDR important for interaction with vascular endothelial growth factor and neutralizing anti-KDR antibodies. *J Biol Chem* 2000; 275:14321-30. DOI: 10.1074/jbc.275.19.14321.
48. Luiz Rr, & Struchiner CJ. Inferência causal em epidemiologia: o modelo de respostas potenciais [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 112 p. ISBN 85-7541-010-5.
49. Machado DE, Abrão MS, Berardo PT, Takiya CM, Nasciutti LE. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. *Fertil Steril* 2008; 90:148-55.
50. Malta M. Iniciativa STROBE: subsídios para a comunicação de estudos observacionais. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 559-565, 2010.
51. May K, Becker CM. Endometriosis and angiogenesis. *Minerva Ginecol* 2008; 60:245-54.
52. McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod.* 2000; 6:45-55. DOI: 10.1093/humupd/6.1.45.
53. Moradi M, Parker M, Sneddon A, Lopez V, Ellwood D. Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. *BMC Womens Health.* 2014; 4;14:123. DOI: 10.1186/1472-6874-14-123.
54. Nnoaham KE, Premila LH, D'hooghe T, Nardone FC, Nardone CC, Crispin Jenkinson, et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril* 2011; 96:366-373. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.090

55. Ozkan S, Murk W, Arici A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127:92-100. DOI: 10.1196/annals.1434.007.
56. Perini JA, Cardoso JV, Berardo PT, Vianna-Jorge R, Nasciutti LE, Bellodi-Privato M, et al. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C>A, -460 T>C, -1154G>A, +405G>C and +936C>T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. *BMC Womens Health*. 2014; 14:117. DOI: 10.1186/1472-6874-14-117.
57. Rego MAV. Aspectos históricos dos estudos caso-controle. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2001; 17:1017-1024.
58. Rêgo MAV. Estudos caso-controle: uma breve revisão. *Gazeta Médica da Bahia* 2010; 79:101-110.
59. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res*. 2000; 37:443-8.
60. Rocha ALL, Reis FM, Taylor RN. Angiogenesis and Endometriosis. *Obstetrics and Gynecology International* 2013; 2013:859619. DOI: 10.1155/2013/859619.
61. Rotman C, Fischel L, Cortez G, Greiss H, Rana N, Rinehart J, et al. A search to identify genetic risk factors for endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2013; 69:92-5. DOI: 10.1111/aji.12034.
62. Ruggiero D, Dalmaso C, Nutile T, Sorice R, Dionisi L, Aversano M, et al. Genetics of VEGF Serum Variation in Human Isolated Populations of Cilento: Importance of VEGF Polymorphisms. *PLoS ONE*. 2011; 6:e16982. DOI: 10.1371/journal.pone.0016982.
63. Saliminejad K, Memariani T, Ardekani AM, Kamali K, Edalatkhah H, Pahlevanzadeh Z, et al. Association study of the TNF- α -1031T/C and VEGF +450G/C polymorphisms with susceptibility to endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2013; 29:974-7. DOI: 10.3109/09513590.2013.824956.
64. Salvarani C, Boiardi L, Casali B, Olivieri I, Cantini F, Salvi F, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in Behçet's disease. *J Rheumatol*. 2004; 31,1785–1789.
65. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 3:93-110.43.
66. Schulz KF, Grimes DA. Case-control studies: research in reverse. *Lancet*, 2002; 359:431-4. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)07605-5
67. Sesso RCC, Filho AC, Marcopito LF, Atallah NA, Miranda CT. Avaliação do estudo tipo caso-controle na pesquisa médica. *Rev. Paul. Med*. 105:96-99, 1987.

68. Shah DK, Correia KF, Vitonis AF, Missmer SA. Body size and endometriosis: results from 20 years of follow-up within the Nurses' Health Study II prospective cohort. *Hum Reprod.* 2013; 28:1783-92. DOI: 10.1093/humrep/det120.
69. Steffensen KD, Waldstrøm M, Brandslund I, Jakobsen A. The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2010; 117:109. DOI: 10.1016/j.ygyno.2009.11.011
70. Szczepańska M, Mostowska A, Wirstlein P, Skrzypczak J, Jagodziński PP. Involvement of vascular endothelial growth factor -460 C/T, +405 G/C and +936 C/T polymorphisms in the development of endometriosis. *Biomed Rep.* 2015; 3:220-224. DOI: 10.3892/br.2014.409
71. Szumilas M. Explaining Odds Ratios. *Can Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2010; 19:3.
72. Tan S, Li Y, Li S. Methodological remarks concerning the recent meta-analysis on vascular endothelial growth factor polymorphism and endometriosis risk. *Arch Gynecol Obstet.* 2013; 287:167-8. DOI: 10.1007/s00404-012-2467-3.
73. Tan X, Lang J, Liu D. [Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in the ectopic and eutopic endometrium of women with endometriosis]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2001; 36:727-30.
74. Toktam M, Kioomars SN, Kourosh K, Adel S, Behrokh MM, Mohhamad Mehdi A, et al. Association of vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 g>c polymorphism with endometriosis in an Iranian population. *J Reprod Infertil* 2010; 11:33-7.
75. Trovó De Marqui AB. Genetic polymorphisms and endometriosis: contribution of genes that regulate vascular function and tissue remodeling. *Rev Assoc Med Bra* 2012; 58:620-32. DOI: 10.1590/S0104-42302012000500022
76. Tsai YY, Chiang CC, Bau DT, Cheng YW, Lee H, Tseng SH, et al. Vascular endothelial growth factor gene 460 polymorphism is associated with pterygium formation in female patients. *Cornea.* 2008; 27:476-9. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3181644581.
77. Vanaja MC, Rozati R, Nassaruddin K, Vishnupriya S. Association of VEGF +405G>C polymorphism with endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed).* 2013; 5:748-54. DOI: 10.2741/E655
78. Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004; 18:177-200.
79. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996; 93:1493-5.

80. Von EE. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *British Medical Journal*, London, v. 355, n. 7624, p. 806-808, 2007.
81. Wang Y, Zheng Y, Zhang W, Yu H, Lou K, Zhang Y, et al. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:760-7.
82. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*. 2000; 12:1232-5.
83. Xu S, Wu W, Sun H, Lu J, Yuan B, Xia Y, et al. Association of the vascular endothelial growth factor gene polymorphisms (-460C/T, +405G/C and +936T/C) with endometriosis: a meta-analysis. *Ann Hum Genet*. 2012; 76:464-71. DOI: 10.1111/j.1469-1809.2012.00726.x.
84. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000; 407:242-8.
85. Young HS, Summers AM, Bhushan M, Brenchley PE, Griffiths CE. Single-nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor in psoriasis of early onset. *J Invest Dermatol*. 2004; 122,209–215.
86. Zhao J, Li Y, Liu Q. [Study on the association of SNPs of VEGF gene with risk of endometriosis and adenomyosis]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2009; 30:751-2.
87. Zhao ZZ, Nyholt DR, Thomas S, Treloar SA, Montgomery GW. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of familial endometriosis. *Mol Hum Reprod*. 2008; 14:531-8. DOI: 10.1093/molehr/gan043.
88. Zondervan KT, Cardon LR, Kennedy SH. What makes a good case-control study? Design issues for complex traits such as endometriosis. *Hum Reprod*. 2002; 17:1415-23. DOI: 10.1093/humrep/17.6.1415.

7. DISCUSSÃO

A endometriose é uma doença ginecológica complexa multifatorial, causada pela combinação de processos hormonais, imunológicos, fatores genéticos e ambientais (CRAIG, 2008). Marcadores bioquímicos e genéticos para a endometriose ainda precisam ser investigados, já que até o momento, nenhum marcador pode ser considerado como de eleição para o diagnóstico da endometriose (HANSEN et al, 2010, BORRELLI et al 2014). Assim, este trabalho teve por finalidade descrever sobre o possível papel dos SNPs dos genes *VEGF* e *KDR* na susceptibilidade da endometriose em mulheres atendidas em quatro hospitais públicos Brasileiros.

Estudos genéticos em mulheres com endometriose mostraram uma tendência hereditária para o desenvolvimento da doença (STEFANSSON et al., 2002, HANSEN et al, 2010, AUDEBERT et al 2015, RAHMIOGLU et al 2015; SAHA et al., 2015). No presente estudo, nós observamos uma maior prevalência de endometriose em parentes de primeiro grau no grupo casos, em comparação com os controles. Audebert e colaboradores relataram uma história familiar de endometriose em cerca de um terço de pacientes adolescentes com diagnóstico de endometriose, uma vez que 25% tinha um parente de primeiro grau afetado pela doença. (AUDEBERT et al 2015). Além disso, um estudo de base populacional utilizando uma extensa base de dados de genealogia demonstrou que 750 pacientes com endometriose foram mais interligados comparado ao grupo controle, e a razão de risco para as irmãs foi de 5 e para as primas foi de 2 (STEFANSSON et al., 2002).

Em relação à avaliação epidemiológica da população do estudo, nós observamos que a média do IMC foi significativamente menor em mulheres com endometriose do que no grupo controle. Nossos resultados corroboram com outros achados (PILLET et al. 2012, SHAH et al., 2013; RAHMIOGLU et al. 2015, SHAHBAZI, et al., 2016), embora a razão dessa correlação inversa entre o IMC e o risco de endometriose ainda permanece desconhecida (FERRERO et al., 2005). Recentemente, um estudo de associação do genoma (GWAS) no qual incluiu 3194 casos de endometriose e 7060 controles, descreveu o locus 7p15.2 como estando associado à endometriose e a distribuição de gordura, demonstrando que existe uma base genética compartilhada entre a endometriose e o IMC (RAHMIOGLU et al. 2015). Embora os dados epidemiológicos possam ser

usados para compreender melhor a endometriose, novos estudos precisam investigar a base genética, ambiental e a fisiopatologia da diminuição do IMC em mulheres com endometriose.

A endometriose pode estar presente em 3 a 5 % das mulheres na fase da pós-menopausa (BIANCO, 2012; ACIÉN & VELASCO, 2013). Nossos resultados mostraram que dentre as 293 mulheres com endometriose, 4,8% estavam na fase da pós-menopausa, corroborando com outros estudos (MOROTTI et al., 2012; SUN et al., 2013; INCEBOZ et al., 2015). Haas et al. (2012) conduziram um estudo epidemiológico retrospectivo envolvendo 42,079 mulheres alemãs com endometriose e observaram que 3% delas estavam na faixa etária de pós-menopausa (55-95 anos). Sabe-se que os achados de imagens e sintomas clínicos já podem predizer que a paciente apresenta endometriose (NÁCUL & SPPRITZER, 2010), no entanto, o padrão ouro para o diagnóstico da endometriose é a videolaparoscopia com a inspeção direta da cavidade pélvica e visualização dos implantes, além da confirmação histopatológica da doença (ESHRE; ASRM). Nesse sentido, pode-se supor que mulheres assintomáticas foram diagnosticadas tardiamente com endometriose, ou essas mulheres tiveram os sintomas, mas não foram submetidas a uma laparoscopia diagnóstica e, assim, a doença progride na fase da pós-menopausa (INCEBOZ et al., 2015). Outra hipótese consistente seria a terapia de substituição hormonal (HRT) utilizada em mulheres na pós-menopausa que pode reativar a endometriose residual ou mesmo produzir novos implantes em mulheres com um histórico da doença (AL KADRI et al., 2009). Além disso, o uso de HRT, especialmente em mulheres obesas, pode aumentar o risco de endometriose recorrente, visto que mulheres na pós-menopausa obesas produzem mais estrogênio do que as mulheres não obesas (BULUN et al., 2002; JEON et al., 2013).

Atualmente, a endometriose profunda, considerada o tipo mais grave da doença, tem sido um grande desafio para os médicos ginecologistas (ABRÃO et al 2015). Em várias pacientes, a endometriose profunda pode estar associada ao endometrioma ovariano ou a endometriose infiltrativa (GONÇALVES et al., 2010). Além disso, estas lesões estão significativamente associadas com o estágio avançado da doença (III e IV) (CHAPRON, et al., 2012). No presente estudo, observou-se uma predominância de lesões infiltrativas profundas (69%), corroborando com estudos anteriores (ABRAO et al, 2003; ABRÃO et al 2015). Estudos recentes, têm indicado que mulheres com endometriose, principalmente com DIE, tem um risco aumentado de desenvolver câncer de ovário ou endometrial, especialmente por estarem envolvidas no processo

angiogênico (BURGHAUS et al., 2015; YANG et al., 2015; YU et al., 2015; WANG et al., 2014; KIM, 2014)

A angiogênese via sinalização VEGF-VEGFR2 é um processo fundamental na patogênese da endometriose, já que as lesões endometrióticas são caracterizadas por uma intensa vascularização e requerem um fornecimento adequado de sangue para a sua sobrevivência (ROCHA et al., 2013). Além disso, tem-se observado um aumento na expressão e distribuição de VEGF e de VEGFR2 em amostras de mulheres com endometriose, quando comparado com o controle (TAN et al, 2001; MACHADO et al., 2008; MACHADO et al., 2010; VERIT et al., 2010). Nossos resultados mostraram que os SNPs *VEGF* -2578C>A e -1154G>A foram significativamente associados com o risco de endometriose. Corroborando com nossos achados, Lamp et al. (2010) observaram uma associação positiva para o alelo *VEGF* -2578A com o desenvolvimento da doença. Em contraste, Liu et al. (2009) encontraram uma associação negativa com a endometriose para os SNPs *VEGF* -2578C>A e *VEGF*-1154G>A. Este SNPs, que estão presentes na região promotora do gene *VEGF*, apresentam um aumento da atividade de transcrição e estão associados com níveis elevados da proteína (BROGAN et al, 1999; JIN et al, 2005). O SNP *VEGF* +405G>C afeta a eficiência da transdução e está relacionado com a produção de VEGF a partir de células mononucleadas do sangue periférico (WATSON, 2000). O presente estudo observou que, em comparação com o alelo *VEGF* +405G, o alelo +405C diminui significativamente o risco de desenvolvimento da endometriose. De acordo com nossos resultados, Bhanoori et al. (2005) e Altinkaya et al. (2011) observaram um efeito negativo com a doença na presença do polimorfismo. Em contraste, quatro estudos encontraram um efeito positivo no desenvolvimento da endometriose (KIM et al., 2005; GENTILINI et al., 2008; ATTAR et al., 2010; EMAMIFAR et al., 2012).

Em relação aos SNPs *VEGF* -460T>C e +936C>T, nossos resultados mostraram que não há uma associação significativa no desenvolvimento da endometriose. Dos 12 estudos que avaliaram o SNP *VEGF*-460T>C, apenas um estudo observou um efeito protetor na suscetibilidade à endometriose (HSIEH et al., 2004). Oito estudos avaliaram o SNP *VEGF*+936C>T, mas cinco estudos, corroborando com os nossos resultados, não encontraram nenhuma associação (KIM et al., 2008; ZHAO et al., 2008; LIU et al., 2009; LAMP et al., 2010; Szczepańska et al., 2015) e três estudos encontraram uma associação positiva com a endometriose

na presença do alelo *VEGF* +936T (IKUHASHI et al, 2007; COSÍN et al., 2009; HENIDI et al., 2015).

Considerando os SNPs no gene KDR, nossos resultados revelaram uma associação negativa com a susceptibilidade da endometriose para o *KDR* 1192C>T. Apenas um estudo investigou a associação desse SNP com a endometriose e seus resultados corroboram com os nossos achados (KANG et al., 2013). Estudos sugerem que o SNP *KDR* 1192C>T poderia diminuir a eficiência de ligação do VEGF ao VEGFR-2, na presença do alelo 1192T (WANG et al., 2007). Sugere-se então que a capacidade de ligação de VEGF ao seu receptor, na presença do SNP pode diminuir a atividade da angiogênese e, portanto, reduzir o risco de desenvolvimento da endometriose. Em relação aos SNPs *KDR* -604T>C e 1719T>A, nossos resultados mostraram que não há associação com o desenvolvimento da endometriose. Para o SNP *KDR* 1719T>A, apenas um estudo avaliou este polimorfismo, no entanto, nenhuma associação significativa foi encontrada com a endometriose (KANG et al., 2013), corroborando com nosso achado. Até agora, nenhum estudo investigou a associação do SNP *KDR* 604T>C e o desenvolvimento da doença. O SNP *KDR* 1719T>A, presente no éxon 11, pode promover alterações na conformação do KDR interferindo com a capacidade de ligação e/ou sinalização com o VEGF. Já o SNP -604T>C, pode reduzir a atividade transcricional do KDR na presença do alelo -604C (WANG et al., 2007).

Como discutido anteriormente, existe uma relação entre os SNPs funcionais e o efeito sobre a regulação da expressão do gene, e este efeito pode ser causado por um único polimorfismo, ou pela combinação com outros polimorfismos (HIRSCHHORN et al., 2002). O presente trabalho é o primeiro a estudar a possível contribuição dos cinco SNPs do *VEGF* mais estudados (-2578C>A, -460T>C, -1154G>A, +405G>C e +936C>T) e seus haplótipos na susceptibilidade da endometriose. De acordo com estudos anteriores, os SNPs -2578C>A, -460T>C, -1154G>A e +405G>C estão em DL, enquanto o SNP +936C>T, localizado na região 3'UTR do gene *VEGF*, apresentou baixo DL com os outros 4 SNPs. Apenas cinco estudos relataram uma associação entre os haplótipos do *VEGF* e a susceptibilidade à endometriose, no entanto, estes estudos avaliaram haplótipos envolvendo apenas dois ou três SNPs. No presente estudo, observou-se um efeito protetor para os haplótipos *VEGF* CTGC (apenas para os estágios III e IV), ATGG (para todos os casos de endometriose ou DIE) e CCGG (para todos os casos de endometriose, estágios III e IV ou DIE) no desenvolvimento da endometriose. O haplótipo *VEGF*

ACAG, que foi o único que apresentava o alelo *VEGF -1154A*, foi associado positivamente com a endometriose em todas as condições da doença analisadas.

Com relação a contribuição dos três SNPs do gene *KDR* (*-604T>C*, *1192C>T* e *1719T>A*) e seus haplótipos no desenvolvimento da endometriose, nós observamos que os haplótipos *KDR TCA* e *CCA* apresentam um aumento do risco de desenvolvimento da endometriose, enquanto, os haplótipos *TTT* e *CTA* diminuíram significativamente o risco do desenvolvimento da doença. Em 2013, Kang e colaboradores exploraram 26 SNPs na população chinesa e selecionaram 5 tag SNPs (*1192C>T*, *1719T>A*, *+31C>T*, *IVS25-92A>G* e *IVS6 +54C>T*) para investigar a associação com o desenvolvimento da endometriose. No entanto, os autores não avaliaram os haplótipos do *KDR* e nem a associação deles com a susceptibilidade da endometriose (KANG, et al., 2013). Assim, o presente trabalho foi o primeiro estudo a avaliar a influência dos haplótipos do *KDR* e a susceptibilidade à endometriose. Recentemente, Rah e colaboradores (2013) observaram que os haplótipos *CCA* e *CGT* do gene *KDR* estão associados com aumento de risco de aborto espontâneo recorrente, ao passo que, o haplótipo *TGA* teve uma associação negativa com a susceptibilidade ao aborto espontâneo recorrente. No entanto, este estudo não avaliou a ocorrência de endometriose como uma possível causa dos abortos espontâneos recorrentes. O efeito do haplótipo contribui para as diferenças entre os indivíduos e pode ser mais significativo e clinicamente relevante do que um único polimorfismo quando se busca biomarcadores de susceptibilidade da endometriose.

Este também é o primeiro trabalho a investigar o efeito combinado de SNPs nos genes *VEGF* e *KDR* no desenvolvimento da endometriose. Nossos resultados demonstraram uma associação negativa entre os genótipos combinados *VEGF-2578CC / VEGF-1154GG / VEGF + 405GC + CC / KDR1192CC*, *VEGF-2578CC / VEGF-1154GG / VEGF + 405GC + CC / KDR1192CT + TT* e *VEGF-2578CA + AA / VEGF-1154GG / VEGF + 405GC + CC / KDR1192CT + TT* (para todos os casos combinados ou DIE) e a endometriose. O genótipo combinado *VEGF-2578CA + AA / VEGF-1154GA + AA / VEGF + 405GG / KDR1192CT + TT* mostrou uma associação negativa apenas para DIE. Estes achados sugerem uma possível interação gene-gene entre *VEGF* e *KDR* contribuindo para a compreensão da etiologia da endometriose. Quando o *VEGF* se liga ao *KDR*, ocorre uma dimerização e fosforilação do receptor promovendo a proliferação, pela via Raf, a migração pela via de p38MAPK, e a sobrevivência das células endoteliais, pela via PI3K/Akt (SHIBUYA et al., 2014). A região extracelular do *KDR* contém

sete domínios de tipo Ig, na qual o domínio 3 é uma região crítica para a ligação do VEGF. O SNP *KDR 1192C>T*, por exemplo, está localizado dentro deste domínio (TAO et al., 2001), o que pode contribuir para a eficiência de ligação do VEGF ao receptor KDR. Além disso, a combinação de SNPs nos genes *VEGF* e *KDR* podem influenciar na regulação da expressão gênica, alterando a cascata de sinalização da angiogênese (VEGF-KDR) e contribuir para o desenvolvimento da endometriose.

Mulheres com endometriose apresentam alguns sintomas em diferentes intensidades, tais como, dismenorréia (28-97%), dor pélvica crônica (57-69%), dispárea de profundidade (55-71%), sintomas intestinais e urinários cíclicos (48-71%) e infertilidade (40-59%) (BELLELIS et al., 2010; FAUCONNIER et al, 2013; MORADI et al, 2014; PERINI et al., 2014), sendo os mecanismos envolvidos no aparecimento dos sintomas ainda incertos. No presente estudo, os sintomas investigados (dismenorreia, dor pélvica, dispárea, sintomas intestinais e urinários e a infertilidade) foram mais frequentes em pacientes com endometriose do que nos controles ($P > 0.001$). Além disso, nós observamos que o atraso entre o início dos sintomas e o diagnóstico de endometriose foi muito longo, corroborando com outros estudos (ARRUDA, 2003; MORADI et al, 2014; STAAL et al, 2016). Este também é o primeiro trabalho a investigar a associação dos SNPs do *VEGF* e *KDR* com os diferentes sintomas de endometriose. Os resultados indicam que o SNP *VEGF 2578A* é um fator genético positivo para a presença dos sintomas: dismenorreia, dor pélvica crônica e urinários cíclicos. Enquanto que, o SNP *KDR 1192T* é um fator de proteção para dispárea. Além disso, encontramos uma associação positiva para a dismenorréia na presença da variante genética *VEGF1154A*. Até o presente momento, nenhum estudo investigou a associação de polimorfismos nos genes de *VEGF* e *KDR* com os possíveis sintomas da endometriose. Nossos resultados são suportados porque os sintomas da endometriose podem ocorrer devido à interação de vários fatores e células imunológicas de liberação de citocinas, tais como os macrófagos (BARCENA & MECHSNER, 2014). Em lesões endometrióticas, a presença de macrófagos é uma característica conhecida (ZHANG et al, 2006; LAWSON et al, 2007; MINICI et al, 2007; LOUSSE et al, 2009), sendo este a principal fonte de VEGF em processos inflamatórios (LIN et al, 2006; DIONYSOPOULOU et al, 2005; MACHADO et al., 2009). Estudos têm sugerido que pacientes com endometrioma que apresentam dor pélvica crônica têm uma vascularização mais elevada do que as mulheres assintomáticas (ALCAZAR et al, 2001; ALCAZAR et al, 2007).

Assim, estes resultados sugerem que o recrutamento de macrófagos nas lesões está diretamente envolvido na perpetuação da inflamação, dor e sangramento anormal.

O presente estudo possui pontos fortes notáveis: (i) foi o primeiro trabalho realizado na população brasileira envolvendo hospitais públicos de referência na cidade de São Paulo e do Rio de Janeiro; (ii) foi o primeiro trabalho a fornecer a análise combinada de SNPs nos genes *VEGF* e *KDR* com o desenvolvimento da endometriose, além de considerar os sintomas da doença; (iii) pela primeira vez também nós avaliamos os 5 principais SNPs do gene *VEGF* e seus haplótipos no desenvolvimento da endometriose; (iv) foi o primeiro a analisar a influência dos haplótipos do gene *KDR* no desenvolvimento da doença; (v) além disso, todos os pacientes foram avaliados cirurgicamente e a confirmação histopatológica da endometriose foi necessária para definir os casos. Em relação aos indivíduos controles desse estudo, tentamos recrutar mulheres submetidas à laqueadura, devido ao seu histórico de fertilidade e por provavelmente não terem qualquer doença ginecológica associada à endometriose. Como limitação, os controles também incluíram mulheres com outras doenças ginecológicas sem ser a endometriose, podendo fornecer menores estimativas de risco se elas também estiverem associadas com os SNPs estudados. Além disso, nosso estudo é limitado pela baixa frequência encontrada do alelo *KDR 1719A*, em ambos os grupos (casos e controles), visto que tivemos dificuldades metodológicas para amplificação e genotipagem, além de sua frequência ser baixa na maioria das populações.

No trabalho de revisão sistemática sobre os estudos que utilizaram o delineamento de estudo do tipo caso-controle para investigar o papel dos SNPs dos genes *VEGF* e/ou *KDR* no desenvolvimento da endometriose, nós encontramos 19 artigos, sendo 18 artigos referente aos SNPs no gene *VEGF* e apenas 1 artigo sobre os SNPs no gene *KDR*. As discrepâncias dos resultados observados nesses estudos podem ser explicadas: (i) pelas diferenças metodológicas encontradas, principalmente, pelo tipo de controle utilizado; (ii) pelo uso da medida de associação não ajustada utilizada para avaliar a magnitude de associação de SNPs nos genes *VEGF* e *KDR* na susceptibilidade da endometriose; (iii) pelas diferentes frequências alélicas e pela heterogeneidade das populações estudadas, além da influência dos fatores ambientais. Assim, sugerimos que o tipo de controle ideal para avaliar SNPs envolvidos com o desenvolvimento da endometriose são mulheres submetidas a laqueadura, sem histórico de infertilidade e doenças ginecológicas.

É cada vez mais importante a compreensão funcional de variantes genéticas para tentar explicar a patogênese da endometriose, bem como para auxiliar no diagnóstico precoce e menos invasivo da doença, além do planejamento de tratamento individualizado. Os nossos resultados sugerem que os SNPs dos genes *VEGF* e *KDR* podem estar envolvidos na patogênese da endometriose, já que eles podem alterar a via de sinalização da angiogênese (VEGF-VEGFR2).

8. CONCLUSÃO

O presente estudo encontrou uma associação positiva dos SNPs *VEGF* -2578C>A e -1154G>A e uma associação negativa dos SNPs *VEGF* +405G>C e *KDR* 1192C>T com o desenvolvimento da endometriose. Observou-se também um efeito protetor para os haplótipos *VEGF* CTGC, ATGG, CCGG e *KDR* TTT e CTA e um risco aumentado para os haplótipos *VEGF* ACAG e *KDR* TCA e CCA com a susceptibilidade a endometriose. Além disso, os SNPs do gene *VEGF* e *KDR* estão associados com a dismenorreia, dor pélvica crônica, dispareunia e sintomas urinários cíclicos. A análise combinada dos SNPs de *VEGF* e *KDR* sugerem uma possível contribuição da interação VEGF-KDR na susceptibilidade da doença.

Em relação a revisão sistemática proposta neste trabalho, concluímos que os estudos caso-controle revisados possuem diferenças metodológicas discrepantes e que a seleção do grupo controle é um ponto crítico para se poder avaliar a magnitude de associação de SNPs com o desenvolvimento da endometriose. Assim, concluímos que o grupo controle ideal são mulheres livres de doenças ginecológicas, com histórico de fertilidade e que são submetidas à cirurgia para realização de laqueadura.

Este trabalho serve como base de dados para futuras aplicações que visem o desenvolvimento de biomarcadores para o diagnóstico e/ou prognóstico da endometriose. Além disso, estudos *in vitro*, que avaliem o impacto funcional dos SNPs do *VEGF* e *KDR*, assim como a sua influência sobre a expressão e interação do VEGF ao KDR, ainda são necessários.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO MS, NEME RM, CARVALHO FM, et al. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. **Int J Gynaecol Obstet** 2003;82:31–40.
- ABRÃO MS, PETRAGLIA F, FALCONE T, et al. Deep endometriosis infiltrating the recto-sigmoid: critical factors to consider before management. **Hum Reprod Update**. 2015 May-Jun;21(3):329-39.
- ABRÃO, MS, Endometriose, uma visão contemporânea. **Editora Revinter** 2000.
- ACIÉN P & VELASCO I. Endometriosis: A Disease That Remains Enigmatic. **ISRN Obstet Gynecol** 2013 Jul 17;2013:242149.
- AHN SH, MONSANTO SP, MILLER C, et al. Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis. **Biomed Res Int**. 2015;2015:795976.
- AL KADRI H, HASSAN S, AL-FOZAN HM, et al. Hormone therapy for endometriosis and surgical menopause. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 1: CD005997.
- ALBERTSEN HM1, CHETTIER R, FARRINGTON P, et al. Genome-wide association study link novel loci to endometriosis. **PLoS One**. 2013 ;8(3):e58257.
- ALCÁZAR JL, García-Manero M. Ovarian endometrioma vascularization in women with pelvic pain. **Fertil Steril**. 2007 Jun;87(6):1271-6.
- ALCÁZAR JL. Transvaginal color Doppler in patients with ovarian endometriomas and pelvic pain. **Hum Reprod** 2001;16:2672–5.
- ALTINKAYA SO, UGUR M, CEYLANER G, et al. Vascular endothelial growth factor +405 C/G polymorphism is highly associated with an increased risk of endometriosis in Turkish women. **Arch Gynecol Obstet** 2011 Feb;283(2):267-72.
- ARIS A. Endometriosis-associated ovarian cancer: a ten-year cohort study of women living in the estrie region of Quebec, Canada. **J Ovarian Res**, 2010 Jan 19;3:2.
- ARRUDA MS, PETTA CA, ABRÃO MS, et al. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. **Hum Reprod**. 2003 Apr;18(4):756-9.

- ASRM - AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. REVISED AMERICAN FERTILITY SOCIETY CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS: 1996. **Fertil Steril** 1997.
- ATTAR R, AGACHAN B, KURAN SB, et al. Genetic variants of vascular endothelial growth factor and risk for the development of endometriosis. **In Vivo**. 2010 May-Jun;24(3):297-301.
- AUDEBERT A, LECOINTRE L, AFORS K, et al. Adolescent Endometriosis: Report of a Series of 55 Cases With a Focus on Clinical Presentation and Long-Term Issues. **J Minim Invasive Gynecol**. 2015 Jul-Aug;22(5):834-40.
- AWATA T, INOUE K, KURIHARA S, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. **Diabetes** 2002; 51:1635–1639.
- BALLARD KD, LOWTON K, WRIGHT JT. What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis. **Fertil Steril**. 2006 Nov;86(5):1296-301.
- BARAÑAO IR.[Endometriosis. Why is not removed by the immune system?]. **Ginecol Obstet Mex**. 2014 Nov;82(11):755-63.
- BARCENA DE ARELLANO ML, MECHSNER S. The peritoneum--an important factor for pathogenesis and pain generation in endometriosis. **J Mol Med (Berl)**. 2014 Jun;92(6):595-602.
- BARANOV VS, IVASCHENKO TE, LIEHR T, YARMOLINSKAYA MI. Systems genetics view of endometriosis: a common complex disorder. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. 2015 Feb;185:59-65.
- BELLELIS PK, DIAS JA, PODGAEC S, et al. Aspectos epidemiológicos e clínicos da endometriose pélvica -uma série de casos. **Rev Assoc Med Bras** 2010; 56(4): 467-71.
- BENAGIANO G, BROSENS I, LIPPI D. The history of endometriosis. **Gynecol Obstet Invest**. 2014;78:1–9.
- BHANOORI M, ARVIND BABU K, PAVANKUMAR REDDY NG, et al. The vascular endothelial growth factor (VEGF) +405G>C 5'-untranslated region polymorphism and

increased risk of endometriosis in South Indian women: a case control study. **Hum Reprod** 2005 Jul;20(7):1844-9.

- BIANCO B, ANDRÉ GM, VILARINO FL, et al. The possible role of genetic variants in autoimmune-related genes in the development of endometriosis. **Human Immunology** 2012 Mar;73(3):306-15.
- BISELLI PM, GUERZONI AR, DE GODOY MF, et al. Vascular endothelial growth factor genetic variability and coronary artery disease in Brazilian population. **Heart Vessels**. 2008 Nov;23(6):371-5.
- BORGFELDT C, ANDOLF E. Cancer risk after hospital discharge diagnosis of benign ovarian cysts and endometriosis. **Acta Obstet Gynecol Scand**. 2004 Apr;83(4):395-400.
- BORRELLI GM, ABRAO MS, MECHSNER S. Reply: Biochemical markers for endometriosis: a long way to go. **Hum Reprod**. 2014 Oct 10;29(10):2353.
- BRICOU A, BATT RE, CHAPRON C. Peritoneal fluid flow influences 1. Anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2008 Jun;138(2):127-34.
- BRINTON LA, SAKODA LC, SHERMAN ME, et al. Relationship of benign gynecologic diseases to subsequent risk of ovarian and uterine tumors. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2005 Dec;14(12):2929-35.
- BRIZEK CL, SCHLAFF S, PELLEGRINI VA, et al. Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis--an association with endometriosis. **J Assist Reprod Genet** 1995 Feb;12(2):106-12.
- BROGAN IJ, KHAN N, ISAAC K, et al. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. **Hum Immunol**. 1999; 60:1245-9.
- BULUN SE, YANG S, FANG Z, et al. Estrogen production and metabolism in endometriosis. **Ann N Y Acad Sci** 2002; 955: 75-85.
- BURGHAUS S, HÄBERLE L, SCHRAUDER MG, et al., Endometriosis as a risk factor for ovarian or endometrial cancer - results of a hospital-based case-control study. **BMC Cancer**. 2015 Oct 21;15:751.

- BURNEY RO, GIUDICE LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. **Fertil Steril** 2012 Sep;98(3):511-9.
- CALDERÓN JF, PUGA AR, GUZMÁN ML, et al. VEGFA polymorphisms and cardiovascular anomalies in 22q11 microdeletion syndrome: a case-control and family-based study. **Biol Res.** 2009;42(4):461-8.
- CANDIANI GB, DANESINO V, GASTALDI A, et al. Reproductive and menstrual factors and risk of peritoneal and ovarian endometriosis. **Fertil Steril.** 1995 Aug;56(2):230-4.
- CHAPRON C, SANTULLI P, DE ZIEGLER D, et al. Ovarian endometrioma: severe pelvic pain is associated with deeply infiltrating endometriosis. **Hum Reprod** 2012;27:702–711.
- CHECKOWAY H, PEARCE NE, CRAWFORD-BROWN DJ. Research methods in occupational epidemiology. 1a Edição. New York: **Oxford University Press**, 344p., 1989.
- COLLETTE T, MAHEUX R, MAILLOUX J, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. **Hum Reprod** 2006 Dec;21(12):3059-67.
- COSÍN R, GILABERT-ESTELLÉS J, RAMÓN LA, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms (-460C/T, +405G/C, and 936C/T) and endometriosis: their influence on vascular endothelial growth factor expression. **Fertil Steril** 2009 Oct;92(4):1214-20.
- CRAIG J. Complex diseases: research and applications. **Nat. Educ.** 1(1), 184, 2008.
- DE GRAAFF AA, D'HOOGHE TM, DUNSELMAN GA, et al. The significant effect of endometriosis on physical, mental and social wellbeing: results from an international cross-sectional survey. **Hum Reprod.** 2013 Oct;28(10):2677-85.
- DIONYSOPOULOU E, VASSILIADIS S, EVANGELIOU A, et al. Constitutive or induced elevated levels of L-carnitine correlate with the cytokine and cellular profile of endometriosis. **J Reprod Immunol** 2005;65:159–70.
- DJOKOVIC D, CALHAZ-JORGE C. Angiogenesis as a therapeutic target in endometriosis. **Acta Med Port.** 2014 Jul-Aug;27(4):489-97.
- DONNEZ J, SMOES P, GILLEROT S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. **Hum Reprod** 1998 Jun;13(6):1686-90.

- EMAMIFAR B, SALEHI Z, MEHRAFZA M, et al. The vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphisms and the risk of endometriosis in northern Iran. **Gynecol Endocrinol** 2012 Jun;28(6):447-50.
- ERRERA FI, CANANI LH, SILVA ME, et al. Functional vascular endothelial growth factor -634G>C SNP is associated with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study in a Brazilian population of European ancestry. **Diabetes Care.** 2007; Feb;30(2):275-9.
- FALCONER H, D'HOOGHE T, FRIED G. Endometriosis and genetic polymorphisms. **Obstet Gynecol Surv** 2007 Sep;62(9):616-28.
- FANG AM, LEE AY, KULKARNI M, et al. Polymorphisms in the VEGFA and VEGFR-2 genes and neovascular age-related macular degeneration. **Mol Vis.** 2009 Dec 10;15:2710-9.
- FAUCONNIER A, STARACI S, ROMAN CHH, et al. Comparison of patient- and physician-based descriptions of symptoms of endometriosis: a qualitative study. **Human Reproduction** 2013 Oct;28(10):2686-94.
- FERRARA N, & KERBEL RS. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature** 2005 Dec 15;438(7070):967-74.
- FERRERO S, ALESSANDRI F, RACCA A, et al. Treatment of pain associated with deep endometriosis: alternatives and evidence. **Fertil Steril.** 2015 Oct;104(4):771-92.
- FERRERO S, ANSERINI P, REMORGIDA V, et al. Body mass index in endometriosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2005;121(1):94–8.
- FIGG WD, FOLKMAN J. Angiogenesis. **An Interactive Approach From Science to Medicine** 2008.
- FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. **N Engl J Med** 1971 Nov 18;285(21):1182-6.
- FOLKMAN J: Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nat Rev Drug Discov** 2007; 6:273–286.
- FORSTI A, JIN Q, ALTIERI A, et al. Polymorphisms in the KDR and POSTN genes: association with breast cancer susceptibility and prognosis. **Breast Cancer Res Treat** 2007 Jan;101(1):83-93.

- FOURQUET J, GAO X, ZAVALA D, et al. Patients' report on how endometriosis affects health, work, and daily life. **Fertil Steril**. 2010.
- FREATHY RM, WEEDON MN, SHIELDS B, et al. Functional variation in VEGF is not associated with type 2 diabetes in a United Kingdom Caucasian population. **JOP** 2006 May 9;7(3):295-302.
- GENTILINI D, SOMIGLIANA E, VIGANO P, et al. The vascular endothelial growth factor +405G>C polymorphism in endometriosis. **Hum Reprod** 2008 Jan;23(1):211-5.
- GIUDICE LC, KAO LC. Endometriosis. **Lancet** 2004 Nov 13-19;364(9447):1789-99.
- GIUDICE LC, SWIERSZ LM, BURNEY RO. Endometriosis. In: Jameson JL, De Groot LJ, eds. Endocrinology. 6th ed. **New York: Elsevier**, 2010.
- GONÇALVES MO, PODGAEC S, DIAS JA JR, et al. Transvaginal ultrasonography with bowel preparation is able to predict the number of lesions and rectosigmoid layers affected in cases of deep endometriosis, defining surgical strategy. **Hum Reprod** 2010;25:665–671.
- GROOTHUIS PG, NAP AW, WINTERHAGER E, et al. Vascular development in endometriosis. **Angiogenesis** 2005;8(2):147-56.
- GUAN X, ZHAO H, NIU J, et al. The VEGF -634G>C promoter polymorphism is associated with risk of gastric cancer. **BMC Gastroenterol** 2009 Oct 16;9:77.
- GUERRIERO S, SPIGA S, AJOSSA S, et al., “Role of imaging in the management of endometriosis,” **Minerva Ginecologica** 2013 Apr;65(2):143-66.
- HAAS D, CHVATAL R, REICHERT B, et al. Endometriosis: a premenopausal disease? Age pattern in 42,079 patients with endometriosis. **Arch Gynecol Obstet** 2012 Sep;286(3):667-70.
- HANAHAN D, FOLKMAN J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**. 1996 Aug 9;86(3):353-64.
- HANSEN KA, EYSTER KM. Genetics and genomics of endometriosis. **Clin Obstet Gynecol** 2010 Jun;53(2):403-12.
- HEMMINGS R, RIVARD M, OLIVE DL, POLIQUIN-FLEURY J, GAGNÉ D, HUGO P, GOSSELIN D. Evaluation of risk factors associated with endometriosis. **Fertil Steril**. 2004 Jun;81(6):1513-21.

- HENIDI B, KAABACHI W, NAOUALI A, et al. Vascular endothelial growth factor (-460 C/T, +405 G/C, and +936 C/T) polymorphisms and endometriosis risk in Tunisian population. **Syst Biol Reprod Med**. 2015; 61:238-44.
- HIRSCHHORN JN, LOHMUELLER K, BYRNE E, et al. A comprehensive review of genetic association studies. **Genet Med**. 2002 Mar-Apr;4(2):45-61.
- HOLMES K, ROBERTS OLL, THOMAS A M, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. **Cellular Signalling** 2007; Oct;19(10):2003-12.
- HOTTAT N, LARROUSSE C, ANAF V, et al., “Endometriosis: contribution of 3.0-T pelvic MR imaging in preoperative assessment initial results,” **Radiology**, 2009 Oct;253(1):126-34.
- HSIEH YY, CHANG CC, TSAI FJ, et al. T allele for VEGF gene-460 polymorphism at the 5'-untranslated region: association with a higher susceptibility to endometriosis. **J Reprod Med**. 2004 Jun;49(6):468-72.
- HSU AL, KHACHIKYAN I, STRATTON P. Invasive and non-invasive methods for the diagnosis of endometriosis. **Clin Obstet Gynecol**. 2010;53:413–9.
- HUGHES CL, FOSTER WG; AGARWAL SK. “The impact of endometriosis across the lifespan of women: foreseeable research and therapeutic prospects,” **BioMed Research International**, vol. 2015, Article ID 158490, 8 pages, 2015;2015:158490
- IKUHASHI Y, YOSHIDA S, KENNEDY S, et al. Vascular endothelial growth factor +936 C/T polymorphism is associated with an increased risk of endometriosis in a Japanese population. **Acta Obstet Gynecol Scand** 2007;86(11):1352-8.
- INCEBOZ U. Endometriosis after menopause. **Womens Health (Lond Engl)**. 2015 Aug;11(5):711-5.
- JAIN L, VARGO CA, DANESI R, et al. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. **Mol Cancer Ther**. 2009 Sep;8(9):2496-508.
- JEON DS, KIM TH, LEE HH, et al. Endometriosis in a postmenopausal woman on hormonal replacement therapy. **J Menopausal Med**. 2013 Dec;19(3):151-3.

- JIN Q. Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms in Relation to Breast Cancer Development and Prognosis. **Clin Cancer Res**. 2005 May 15;11(10):3647–53.
- KANG S, SHI YY, LI Y, et al. Association between genetic variants of the *VEGFR-2* gene and the risk of developing endometriosis in Northern Chinese Women. **Gynecol Obstet Invest** 2013;76(1):32-7.
- KENNEDY S, BERGQVIST A, CHAPRON C, et al; ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. **Hum Reprod**. 2005 Oct;20(10):2698-704. Epub 2005 Jun 24.
- KHO RM, ABRÃO MS. Ovarian remnant syndrome: etiology, diagnosis, treatment and impact of endometriosis. **Curr Opin Obstet Gynecol**. 2012 Aug;24(4):210-4.
- KILLEEN AP, MORRIS DG, KENNY DA, et al. Global gene expression in endometrium of high and low fertility heifers during the mid-luteal phase of the estrous cycle. **BMC Genomics** 2014 Mar 26;15:234.
- KIM HS, KIM TH, CHUNG HH et al. Risk and prognosis of ovarian cancer in women with endometriosis: a meta-analysis. **Br J Cancer**. 2014 Apr 2;110(7):1878-90.
- KIM JG, KIM JY, JEE BC, et al. Association between endometriosis and polymorphisms in endostatin and vascular endothelial growth factor and their serum levels in Korean women. **Fertil Steril** 2008 Jan;89(1):243-5.
- KIM SH, CHOI YM, CHOUNG SH, et al. Vascular endothelial growth factor gene +405 C/G polymorphism is associated with susceptibility to advanced stage endometriosis. **Hum Reprod** 2005 Oct;20(10):2904-8.
- KLAGSBRUN M. Regulators of angiogenesis: stimulators, inhibitors, and extracellular matrix. **J Cell Biochem**. 1991 Nov;47(3):199-200.
- KOBAYASHI H1, SUMIMOTO K, MONIWA N, et al. Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. **Int J Gynecol Cancer**, 2007 Jan-Feb;17(1):37-43.
- KOKS CAM, DUNSELMAN GA, DE GOEIJ AF, et al. Evaluation of a menstrual cup to collect shed endometrium for in vitro studies. **Fertil Steril** 1997 Sep;68(3):560-4.
- KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. Robins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das doenças, 7. ed. São Paulo: **Elsevier**, 2005.

- LAGANÀ AS, CONDEMI I, RETTO G, et al. Analysis of psychopathological comorbidity behind the common symptoms and signs of endometriosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. 2015 Nov;194:30-3.
- LAMP M, SAARE M, LAISK T, et al. Genetic variations in vascular endothelial growth factor but not in angiotensin I-converting enzyme genes are associated with endometriosis in Estonian women. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2010 Nov;153(1):85-9.
- LASCHKE MW, MENDER MD. Anti-angiogenic treatment strategies for the therapy of endometriosis. **Hum Reprod Update** 2012 Nov-Dec;18(6):682-702.
- Lasky T, Stolley PD. Selection of cases and controls. **Epidemiol Rev**. 1994;16:6-17.
- LAWSON C, AL-AKOUM M, MAHEUX R, et al. Increased expression of interleukin-1 receptor type 1 in active endometriotic lesions. **Reproduction**. 2007 Jan;133(1):265-74.
- LEE AW, TEMPLEMAN C, STRAM DA, et al; Ovarian Cancer Association Consortium. Evidence of a genetic link between endometriosis and ovarian cancer. **Fertil Steril**. 2016 Jan;105(1):35-43.e10.
- LEE HH, HONG SH, SHIN SJ, et al. Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion. **Fertil Steril**. 2010 Mar 1;93(4):1244-7.
- LI YZ, WANG LJ, LI X, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms contribute to the risk of endometriosis: an updated systematic review and meta-analysis of 14 case-control studies. **Genet Mol Res** 2013 Apr 2;12(2):1035-44.
- LIN YJ, LAI MD, LEI HY, et al. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. **Endocrinology**. 2006 Mar;147(3):1278-86.
- LIU Q, LI Y, ZHAO J, et al. [Association of single nucleotide polymorphisms in VEGF gene with the risk of endometriosis and adenomyosis]. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**. 2009; 26:165-9.
- LIU Q, LI Y, ZHAO J, et al. Association of polymorphisms -1154G/A and -2578C/A in the vascular endothelial growth factor gene with decreased risk of endometriosis in Chinese women. **Hum Reprod** 2009 Oct;24(10):2660-6.

- LOUSSE JC, DEFRÈRE S, VAN LANGENDONCKT A, et al. Iron storage is significantly increased in peritoneal macrophages of endometriosis patients and correlates with iron overload in peritoneal fluid. **Fertil Steril**. 2009 May;91(5):1668-75.
- LU D, KUSSIE P, PYTOWSKI B, et al: Identification of the residues in the extracellular region of KDR important for interaction with vascular endothelial growth factor and neutralizing anti-KDR antibodies. **J Biol Chem** 2000 May 12;275(19):14321-30.
- MACCAGNANO C, PELLUCCHI F, ROCCHINI L, et al. Diagnosis and treatment of bladder endometriosis: state of the art. **Urol Int**. 2012;89(3):249-58.
- MACHADO DE, ABRÃO MS, BERARDO PT, et al. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. **Fertil Steril** 2008 Jul;90(1):148-55.
- MACHADO DE, BERARDO PT, LANDGRAF RG, et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. **Fertil Steril**. 2010 May 15;93(8):2674-9.
- MACHADO DE, BERARDO PT, PALMERO CY, et al. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases. **J Exp Clin Cancer Res** 2010 Jan 19;29:4.
- MALTA M. Iniciativa STROBE: subsídios para a comunicação de estudos observacionais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 559-565, 2010.
- MARQUES MR. Endometriose e infertilidade: revisão sistemática da literatura e relato de casos. **TCC, Universidade Federal De Santa Catarina**, 2005.
- MATALLIOTAKIS IM, GOUMENOU AG, KOUMANTAKIS GE, et al. Serum concentrations of growth factors in women with and without endometriosis: the action of anti-endometriosis medicines. **Int Immuno-pharmacol** 2003 Jan;4(1):157-8.
- MAY K, BECKER CM. Endometriosis and angiogenesis. **Minerva Ginecol** 2008 Jun;60(3):245-54.
- MCLAREN J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. **Hum Reprod** 2000 Jan-Feb;6(1):45-55.

- MELIN A, SPARÉN P, PERSSON I, et al. Endometriosis and the risk of cancer with special emphasis on ovarian cancer. **Hum Reprod.** 2006 May;21(5):1237-42.
- MINICI F, TIBERI F, TROPEA A, et al. Paracrine regulation of endometriotic tissue. **Gynecol Endocrinol.** 2007 Oct;23(10):574-80.
- MODUGNO F, NESS RB, ALLEN GO, et al. Oral contraceptive use, reproductive history, and risk of epithelial ovarian cancer in women with and without endometriosis. **Am J Obstet Gynecol** 2004 Sep;191(3):733-40.
- MORADI M, PARKER M, SNEDDON A, et al. Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. **BMC Womens Health.** 2014 Oct 4;14:123.
- MOROTTI M, REMORGIDA V, VENTURINI PL, et al. Endometriosis in menopause: a single institution experience. **Arch Gynecol Obstet.** 2012 Dec;286(6):1571-5.
- MUELLER MD, VIGNE JL, MINCHENKO A, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000 Sep 26;97(20):10972-7.
- NÁCUL AP, SPRITZER PM. [Current aspects on diagnosis and treatment of endometriosis]. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 2010 Jun;32(6):298-307.
- NAP AW, GROOTHUIS PG, DEMIR AY, et al. Pathogenesis of endometriosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2004 Apr;18(2):233-44.
- NEZHAT F, DATTA MS, HANSON V, et al. The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review. **Fertil Steril** 2008; 90:1559–70.
- NISOLLE M, DONNEZ J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertil Steril** 1997 Oct;68(4):585-96.
- NNOAHAM KE, PREMILA LH, D'HOOGHE T, et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. **Fertil Steril** 2011 Aug;96(2):366-373.e8.
- NOURI K, HASLINGER P, SZABO L, et al. Polymorphisms of VEGF and VEGF receptors are associated with the occurrence of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS)-a retrospective case-control study. **J Ovarian Res.** 2014 May 13;7:54.

- NYHOLT DR, LOW SK, ANDERSON CA, et al. Genome-wide association meta-analysis identifies new endometriosis risk loci. **Nat Genet.** 2012 Dec;44(12):1355-9.
- OKADA H, TSUZUKI T, SHINDOH H, et al. Regulation of decidualization and angiogenesis in the human endometrium: mini review. **J Obstet Gynaecol Res.** 2014 May;40(5):1180-7.
- OLIVE D. L; WEINBERG J. B; HANEY A. F. Peritoneal macrophages and infertility: the association between cell number and pelvic pathology. **Fertil. Steril** 1985 Dec;44(6):772-7.
- OOSTERLYNCK DJ, MEULEMAN C, WAER M, et al. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. **Fertil. Steril.** 1992 Aug;58(2):290-5.
- OZKAN S, MURK W, ARICI A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. **Ann N Y Acad Sci** 2008 Apr;1127:92-100.
- PAINTER JN, ANDERSON CA, NYHOLT DR, et al. Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. **Nat Genet** 2011 Dec;44(12):1355-9.
- PAVONE ME, LYTTLE BM. Endometriosis and ovarian cancer: links, risks, and challenges faced. **Int J Womens Health.** 2015 Jul 1;7:663-72.
- PEARCE CL, TEMPLEMAN C, ROSSING MA, et al. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. **Lancet Oncol** 2012;13: 385–94.
- PERINI JA, CARDOSO JV, BERARDO PT, et al. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C>A, -460T>C, -1154G>A, +405G>C and +936C>T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. **BMC Womens Health.** 2014; 14:117.
- PHARMACOGENOMICS. Clinical Implications of Genetic Variations in the VEGF System in Relation to Colorectal Cancer 2011.
- PILLET MCL, SCHNEIDER A, BORGHESE B, et al: Deep infiltrating endometriosis is associated with markedly lower body mass index: a 476 case–control study. **Human Reproduction** 2012, 27:265–272.

- RAH H, JEON YJ, CHOI Y, et al. Association between kinase insert domain-containing receptor (KDR) polymorphisms (-604T/C, 1192G>A, 1719A/T) and premature ovarian failure in Korean women. **Menopause** 2012 Sep;19(9):1037-42.
- RAH H, JEON YJ, LEE BE, et al. Association of kinase insert domain-containing receptor (KDR) gene polymorphisms with idiopathic recurrent spontaneous abortion in Korean women. **Fertil Steril** 2013 Mar 1;99(3):753-760.e8.
- RAHMIOGLU N, NYHOLT DR, MORRIS AP, et al. Genetic variants underlying risk of endometriosis: insights from meta-analysis of eight genome-wide association and replication datasets. **Hum Reprod Update.** 2014 Sep-Oct;20(5):702-16.
- RAHMIOGLU, MONTGOMERY & ZONDERVAN. Genetics of endometriosis. **Womens Health** 2015; 11(5), 577–586.
- RÊGO MAV. Estudos caso-controle: uma breve revisão. **Gazeta Médica da Bahia** 2010; 79:101-110.
- RENNER W, KOTSCHAN S, HOFFMANN C, et al. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. **J Vasc Res.** 2000; 37:443-8.
- ROCHA ALL, REIS FM, TAYLOR RN. Angiogenesis and Endometriosis. **Obstetrics and Gynecology International** 2013;2013:859619.
- ROTMAN C, FISCHER L, CORTEZ G, et al. A search to identify genetic risk factors for endometriosis. **Am J Reprod Immunol** 2013 Jan;69(1):92-5.
- RUAN YQ, LIANG WG, HUANG SH. Analysis of laparoscopy on endometriosis patients with high expression of CA125. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** 2015 Apr;19(8):1334-7.
- RUGGIERO D, DALMASSO C, NUTILE T, et al. Genetics of VEGF Serum Variation in Human Isolated Populations of Cilento: Importance of VEGF Polymorphisms. **PLoS ONE.** 2011; 6:e16982.
- RUHRBERG C. VEGF in Development. **Molecular Biology Intelligence Unit** 2008.
- SAHA R, PETTERSSON HJ, SVEDBERG P, et al. Heritability of endometriosis. **Fertil Steril.** 2015 Oct;104(4):947-52.

- SALIMINEJAD K, MEMARIANI T, ARDEKANI AM, et al. Association study of the TNF- α -1031T/C and VEGF +450G/C polymorphisms with susceptibility to endometriosis. **Gynecol Endocrinol** 2013 Nov;29(11):974-7.
- SAMPSON JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **Am J Obstet Gynecol** 1927 Mar;3(2):93-110.43.
- SCHAMS D, BERISHA B. Regulation of corpus luteum function in cattle--an overview. **Reprod Domest Anim** 2004 Aug;39(4):241-51.
- SCHULZ KF, GRIMES DA. Case-control studies: research in reverse. **Lancet**, 2002; 359:431-4.
- SESSO RCC, FILHO AC, MARCOPITO LF, et al. Avaliação do estudo tipo caso-controle na pesquisa médica. **Rev. Paul. Med.** 105:96-99, 1987.
- SHAH DK, CORREIA KF, VITONIS AF, et al. Body size and endometriosis: results from 20 years of follow-up within the Nurses' Health Study II prospective cohort. **Hum Reprod.** 2013; 28:1783-92.
- SHAHBAZI S, SHAHRABI-FARAHANI M. Evaluation of the correlation between body mass index and endometriosis among Iranian fertile women. **Gynecol Endocrinol.** 2016 Feb;32(2):157-60.
- SHIBUYA M. VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. **Biomol Ther** 2014; 22(1), 1-9.
- SILVA THAS, BUTERA AP, LEAL DHS, et al. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese – Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta 3$. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** 2007 jan./mar., 2007.
- SIMPSON ER. Role of aromatase in sex steroid action. **J Mol Endocrinol** 2000 Oct;25(2):149-56.
- SIMPSON JL, ELIAS S, MALINAK LR, et al. Heritable aspects of endometriosis, I: genetic studies. **Am J Obstet Gynecol** 1980 1980 Jun 1;137(3):327-31.
- SINAII N, PLUMB K, COTTON L, et al. Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease. **Fertil Steril** 2008 Mar;89(3):538-45.

- STAAL AH, VAN DER ZANDEN M, NAP AW. Diagnostic Delay of Endometriosis in the Netherlands. **Gynecol Obstet Invest.** 2016 Jan 8.
- STEFANSSON H, GEIRSSON RT, STEINTHORSDOTTIR V, et al. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. **Hum Reprod** 2002 Mar;17(3):555-9.
- STEFFENSEN KD, WALDSTRØM M, BRANDSLUND I, et al. The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2010; 117:109.
- SU MT, LIN SH, LEE IW, et al. Association of polymorphisms/haplotypes of the genes encoding vascular endothelial growth factor and its KDR receptor with recurrent pregnancy loss. **Hum Reprod** 2011 Apr;26(4):758-64.
- SUMMERS AM, COUPES BM, BRENNAN MF, et al. VEGF -460 genotype plays an important role in progression to chronic kidney disease stage 5. **Nephrol Dial Transplant.** 2005 Nov;20(11):2427-32.
- SUN PR, LENG JH, JIA SZ, LANG JH. Postmenopausal endometriosis: a retrospective analysis of 69 patients during a 20-year period. **Chin Med J (Engl).** 2013 Dec;126(23):4588-9.
- SUNDQVIST J, XU H, VODOLAZKAIA A, FASSBENDER A, KYAMA C, BOKOR A, GEMZELL-DANIELSSON K, D'HOOOGHE TM, FALCONER H. Replication of endometriosis-associated single-nucleotide polymorphisms from genome-wide association studies in a Caucasian population. **Hum Reprod.** 2013 Mar;28(3):835-9.
- SZCZEPAŃSKA M, MOSTOWSKA A, WIRSTLEIN P, et al. Involvement of vascular endothelial growth factor -460 C/T, +405 G/C and +936 C/T polymorphisms in the development of endometriosis. **Biomed Rep.** 2015; 3:220-224.
- TAFI E, LEONE ROBERTI MAGGIORE U, et al. Advances in pharmacotherapy for treating endometriosis. **Expert Opin Pharmacother.** 2015;16(16):2465-83.
- TAHERGORABI Z, KHAZAEI M. A review on angiogenesis and its assays. **Iran J Basic Med Sci.** 2012 Nov;15(6):1110-26.
- TAHERGORABI Z1, KHAZAEI M. A review on angiogenesis and its assays. **Iran J Basic Med Sci.** 2012 Nov;15(6):1110-26.

- TAN XJ, LANG JH, LIU DY, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis. **Fertil Steril** 2002 Jul;78(1):148-53.
- TAO Q, BACKER MV, BACKER JM, et al: Kinase insert domain receptor (KDR) extracellular immunoglobulin-like domains 4–7 contain structural features that block receptor dimerization and vascular endothelial growth factor-induced signaling. **J Biol Chem** 2001 Jun 15;276(24):21916-23.
- TAYLOR RN, YU J, TORRES PB, et al: Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. **Reprod Sciences** 2009, 16:140-146.
- TEMPFER CB, SIMONI M, DESTENAVES B, et al. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part II--endometriosis. **Hum Reprod Update** 2009 Jan-Feb;15(1):97-118.
- TERMAN BI, CARRION ME, KOVACS E, et al. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. **Oncogene**. 1991; 6(9):1677-83.
- The ESHRE Guideline for the Diagnosis and Treatment of Endometriosis. <http://guidelines endometriosis org/> 2008.
- TOKTAM M, KIOOMARS SN, KOUROSH K, et al. Association of vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 g>c polymorphism with endometriosis in an Iranian population. **J Reprod Infertil** 2010 Apr;11(1):33-7.
- TROVÓ DE MARQUI AB. Genetic polymorphisms and endometriosis: contribution of genes that regulate vascular function and tissue remodeling. **Rev Assoc Med Bra** 2012 Sep-Oct;58(5):620-32.
- VAN DEN BERG LL, CRANE LM, VAN OOSTEN M, et al. Analysis of biomarker expression in severe endometriosis and determination of possibilities for targeted intraoperative imaging. **Int J Gynaecol Obstet**. 2013 Apr;121(1):35-40.
- VAN LANGENDONCKT A, CASANAS-ROUX F, DONNEZ J: Oxidative stress and peritoneal endometriosis. **Fertil Steril** 2002 May;77(5):861-70.
- VANAJA MC, ROZATI R, NASSARUDDIN K, et al. Association of VEGF +405G>C polymorphism with endometriosis. **Front Biosci (Elite Ed)**. 2013 Jan 1;5:748-54.

- VERCELLINI P, BARBARA G, ABBIATI A, et al. Repetitive surgery for recurrent symptomatic endometriosis: what to do? **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** 2009 Sep;146(1):15-21.
- VERCELLINI P, FEDELE L, AIMI G, et al. Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients. **Hum Reprod.** 2007 Jan;22(1):266-71.
- VERIT FF, AYAS S. Elevated ghrelin levels in the peritoneal fluid of patients with endometriosis: associations with vascular endothelial growth factor (VEGF) and inflammatory cytokines. **Fertil Steril.** 2010 Jun;94(1):e31
- VERIT FF, YUCEL O. Endometriosis, leiomyoma and adenomyosis: the risk of gynecologic malignancy. **Asian Pac J Cancer Prev.** 2013;14(10):5589-97.
- VINCENTI V, CASSANO C, ROCCHI M, et al. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. **Circulation** 1996 Apr 15;93(8):1493-5.
- VON EE. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. **British Medical Journal**, London, v. 355, n. 7624, p. 806-808, 2007.
- WANG KC, CHANG WH, LEE WL, et al. An increased risk of epithelial ovarian cancer in Taiwanese women with a new surgico-pathological diagnosis of endometriosis. **BMC Cancer.** 2014 Nov 18;14:831.
- WANG Y, ZHENG Y, ZHANG W, et al. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. **J Am Coll Cardiol** 2007; 50:760-7.
- WANG Y, ZHENG Y, ZHANG W, et al. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. **J Am Coll Cardiol** 2007 Aug 21;50(8):760-7.
- WATSON CJ, WEBB NJ, BOTTOMLEY MJ, et al. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. **Cytokine.** 2000; 12:1232-5.
- YADAV L, PURI N, RASTOGI V, et al. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. **J Clin Diagn Res.** 2015 Jun;9(6):XE01-XE05.
- YANCOPOULOS GD, DAVIS S, GALE NW, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature** 2000 Sep 14;407(6801):242-8.

- YANG B, WANG D, CHEN H, et al. The association between endometriosis and survival outcomes of ovarian cancer: Evidence-based on a meta-analysis. **Niger J Clin Pract.** 2015 Sep-Oct;18(5):577-83.
- YE M, GUO H, HAN J, et al. [Relationship between endometriosis stage, characteristics of endometriotic lesions and severity of dysmenorrhoea]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi.** 2015 Mar 10;95(9):685-8.
- YU HC¹, LIN CY, CHANG WC, et al. Increased association between endometriosis and endometrial cancer: a nationwide population-based retrospective cohort study. **Int J Gynecol Cancer.** 2015 Mar;25(3):447-52.
- ZHANG WL, SUN K, WANG Y, et al: Interaction of the Ile297 variant of vascular endothelial growth factor receptor-2 gene and homocysteine on the risk of stroke recurrence. **Circulation** 2007.
- ZHAO ZZ, NYHOLT DR, THOMAS S, et al. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of familial endometriosis. **Mol Hum Reprod.** 2008 Sep;14(9):531-8.
- ZONDERVAN KT, CARDON LR, KENNEDY SH. What makes a good case-control study? Design issues for complex traits such as endometriosis. **Hum Reprod.** 2002; 17:1415-23.
- ZYGMUNI M, HERR P, MUNSTEDT K, LANG U, LIUNG OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2003 Sep 22;110.

ANEXO I

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Secretaria de Assistência à Saúde

Departamento de Desenvolvimento, Avaliação e Controle de Serviços de Saúde

Escritório de Representação do Ministério da Saúde no Estado do Rio de Janeiro

Coordenação Geral das Unidades Hospitalares Próprias

HOSPITAL FEDERAL DOS SERVIDORES DO ESTADO

=====

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose

Pesquisador Responsável: Dr. Plinio Tostes Berardo

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Federal dos Servidores do Estado - RJ.

Introdução:

Esta pesquisa visa estudar melhor uma doença chamada endometriose que significa a presença de um tumor benigno feito de tecido endometrial (o mesmo que existe dentro do útero)

que pode causar dor e dificuldade para engravidar, e desta maneira muitas vezes deve ser retirado através de cirurgia. O objetivo desta pesquisa é tentar entender por que algumas mulheres desenvolvem endometriose e outras não. Para isso, nós iremos estudar o perfil genético de mulheres com endometriose.

Desenho do estudo e objetivo(s):

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. Durante o acompanhamento clínico no HFSE, após o diagnóstico da endometriose, você deverá ter visitas ambulatoriais trimestrais, depois de um ano sem sintomas as visitas serão semestrais por mais um ano quando deverá estar apta para alta do HFSE para acompanhamento de rotina ginecológica em unidade primária ou secundária de saúde com encaminhamento detalhado feito em guia de contra referência segundo as normas de funcionamento do Serviço de Ginecologia do HFSE. No caso de falha do tratamento inicial ou retorno dos sintomas a frequência de visitas e procedimentos adicionais será individualizada de acordo com o seu caso, sendo assegurado todas as medidas necessárias para o tratamento de sua doença.

Se você concordar em participar deste estudo, uma pequena e única quantidade de sangue (3ml) será coletada para se obter o seu DNA (material genético de características únicas de cada pessoa) e identificar as características dos genes relacionados com o desenvolvimento da endometriose. Desta maneira, os objetivos deste projeto incluem: (a) Determinar se existem alterações genéticas que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da endometriose em mulheres diagnosticadas com a doença, tendo o benefício de saber se você ou sua família tem maior risco de desenvolver a doença e com isso poder definir condutas de prevenção e diagnóstico precoce; (b) Avaliar se estas alterações têm relações com a idade, tipo dos sintomas ou agressividade da doença.

Descrição dos procedimentos:

A sua participação no estudo é VOLUNTÁRIA, e caso você concorde em participar do estudo você deverá passar pelas seguintes etapas: (a) entrevista com um profissional da saúde da

equipe de pesquisa que lhe explicará as etapas e procedimentos do estudo e poderá esclarecer as suas dúvidas em relação a este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e ao Questionário Clínico-Demográfico; (b) assinatura deste Termo de Consentimento; (c) preenchimento do Questionário Clínico-Demográfico, que visa a obtenção de informações clínicas e demográficas das pacientes envolvidas no estudo (Anexo II), tais informações destinam-se a assegurar a abrangência e restringir eventuais tendências da amostra populacional; (d) coleta de uma única amostra de sangue que será utilizada para a análise de alterações genéticas relacionadas ao desenvolvimento da endometriose as quais serão realizadas no Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas (LaPesF) da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO).

Segurança do voluntário e Benefícios do estudo:

O Comitê de Ética em Pesquisa do HFSE aprovou este estudo, considerando-o ético e seguro. A sua participação no estudo é voluntária e mesmo que concorde em participar, você tem o direito de desistir e interromper a sua participação a qualquer momento, sem necessidade de justificar esta decisão e neste caso você não terá nenhum prejuízo quanto à continuidade de seu tratamento na Instituição. No caso de desistência o seu material biológico (sangue) armazenado assim como os seus dados pessoais será prontamente descartado de forma definitiva. Este estudo não trará nenhum benefício imediato para você assim como não receberá qualquer tipo de recompensa pela sua participação.

Confidencialidade:

É garantida a confidencialidade das informações obtidas, não sendo divulgados seus dados pessoais em momento algum. Seus dados pessoais somente serão conhecidos pelos médicos e demais profissionais que participam deste estudo. Os resultados de suas análises serão do seu conhecimento caso manifeste esta vontade. Qualquer publicação que seja feita com os resultados desta pesquisa não incluirá nome ou outros identificadores dos participantes da pesquisa. O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para pesquisas relacionadas à endometriose, assim o material que não for utilizado ficará estocado para estudos

futuros por um período de cinco anos Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas (LaPesF) da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO) o qual tem todas as condições adequadas para estocagem de material biológico. Caso manifeste desejo de desistência em participar do estudo, em qualquer momento poderá retirar seu consentimento para armazenamento de amostra biológica (sangue) bem como de seus dados pessoais.

Despesas e compensações:

Não haverá despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo. Não há compensação financeira relacionada à sua participação. Você não está abrindo mão de qualquer direito legal ao participar deste estudo.

Com quem devo entrar em contato em caso de dúvidas?

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é o Dr. Plinio Tostes Berardo que pode ser encontrado no Serviço de Ginecologia no 7º andar do prédio principal do HFSE ou pelos telefones: (021) 2335-7535 ramal: 171 ou 98825-0115. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HFSE, situado no 5º andar do prédio dos ambulatórios do mesmo hospital, que é o órgão responsável em avaliar a parte ética das pesquisas com seres humanos além de assegurar o bem estar e os direitos dos sujeitos da pesquisa durante o desenvolvimento da mesma.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 201__.

Dr. Plinio Tostes Berardo - Pesquisador responsável

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG _____
CPF _____, Prontuário nº _____, Matrícula nº _____,
abaixo assinado, concordo em participar do estudo
Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento
da endometriose, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador Plinio
Tostes Berardo sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos. Foi-me garantido que posso
retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou
interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Rio de Janeiro ____ de _____ de 201_.

Nome e Assinatura do sujeito:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito
em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXO II

MINISTÉRIO DA SAÚDE - DEPARTAMENTO DE GESTÃO HOSPITALAR/RJ

HOSPITAL FEDERAL DA LAGOA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose

Pesquisador Responsável: Dr. Plinio Tostes Berardo

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Federal dos Servidores do Estado - RJ.

Introdução:

Esta pesquisa visa estudar melhor uma doença chamada endometriose que significa a presença de um tumor benigno feito de tecido endometrial (o mesmo que existe dentro do útero) que pode causar dor e dificuldade para engravidar, e desta maneira muitas vezes deve ser retirado através de cirurgia. O objetivo desta pesquisa é tentar entender por que algumas mulheres desenvolvem endometriose e outras não. Para isso, nós iremos estudar o perfil genético de mulheres com endometriose e de mulheres saudáveis como você.

Desenho do estudo e objetivo(s):

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. Durante o acompanhamento clínico no HFL, após o diagnóstico da endometriose, você deverá ter visitas ambulatoriais trimestrais, depois de um ano sem sintomas as visitas serão semestrais por mais um ano quando deverá estar apta para alta do HFL para acompanhamento de rotina

ginecológica em unidade primária ou secundária de saúde com encaminhamento detalhado feito em guia de contra-referência segundo as normas de funcionamento do Serviço de Ginecologia do HFL. No caso de falha do tratamento inicial ou retorno dos sintomas a frequência de visitas e procedimentos adicionais será individualizada de acordo com o seu caso, sendo assegurado todas as medidas necessárias para o tratamento de sua doença.

Se você concordar em participar deste estudo, uma pequena e única quantidade de sangue (3ml) será coletada para se obter o seu DNA (material genético de características únicas de cada pessoa) e identificar as características dos genes relacionados com o desenvolvimento da endometriose. Desta maneira, os objetivos deste projeto incluem: (a) Determinar se existem alterações genéticas que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da endometriose em mulheres diagnosticadas com a doença, tendo o benefício de saber se você ou sua família tem maior risco de desenvolver a doença e com isso poder definir condutas de prevenção e diagnóstico precoce; (b) Avaliar se estas alterações têm relações com a idade, tipo dos sintomas ou agressividade da doença.

Descrição dos procedimentos:

A sua participação no estudo é VOLUNTÁRIA, e caso você concorde em participar do estudo você deverá passar pelas seguintes etapas: (a) entrevista com um profissional da saúde da equipe de pesquisa que lhe explicará as etapas e procedimentos do estudo e poderá esclarecer as suas dúvidas em relação a este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e ao Questionário Clínico-Demográfico; (b) assinatura deste Termo de Consentimento; (c) preenchimento do Questionário Clínico-Demográfico, que visa a obtenção de informações clínicas e demográficas das voluntárias saudáveis envolvidas no estudo (Anexo II), tais informações destinam-se a assegurar a abrangência e restringir eventuais tendências da amostra populacional; (d) coleta de uma única amostra de sangue que será utilizada para a análise de alterações genéticas relacionadas ao desenvolvimento da endometriose as quais serão realizadas no Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas (LaPesF) da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO).

Segurança do voluntário e Benefícios do estudo:

O Comitê de Ética em Pesquisa do HFSE aprovou este estudo, considerando-o ético e seguro. A sua participação no estudo é voluntária e mesmo que concorde em participar, você tem

o direito de desistir e interromper a sua participação a qualquer momento, sem necessidade de justificar esta decisão e neste caso você não terá nenhum prejuízo quanto à continuidade de seu tratamento na Instituição. No caso de desistência o seu material biológico (sangue) armazenado assim como os seus dados pessoais será prontamente descartado de forma definitiva. Este estudo não trará nenhum benefício imediato para você assim como não receberá qualquer tipo de recompensa pela sua participação.

Confidencialidade:

É garantida a confidencialidade das informações obtidas, não sendo divulgados seus dados pessoais em momento algum. Seus dados pessoais somente serão conhecidos pelos médicos e demais profissionais que participam deste estudo. Os resultados de suas análises serão do seu conhecimento caso manifeste esta vontade. Qualquer publicação que seja feita com os resultados desta pesquisa não incluirá nome ou outros identificadores dos participantes da pesquisa. O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para pesquisas relacionadas à endometriose, assim o material que não for utilizado ficará estocado para estudos futuros por um período de cinco anos no Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas (LaPesF) da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO) o qual tem todas as condições adequadas para estocagem de material biológico. Caso manifeste desejo de desistência em participar do estudo, em qualquer momento poderá retirar seu consentimento para armazenamento de amostra biológica (sangue) bem como de seus dados pessoais.

Despesas e compensações:

Não haverá despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo. Não há compensação financeira relacionada à sua participação. Você não está abrindo mão de qualquer direito legal ao participar deste estudo.

Com quem devo entrar em contato em caso de dúvidas?

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Você pode entrar em contato com um dos pesquisadores deste estudo, Jamila Perini, pelos telefones: (021) 2335-7535 ramal: 171 ou 98825-0115. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato

com o Comitê de Ética em Pesquisa do HFSE, situado no 5º andar do prédio dos ambulatórios do mesmo hospital, que é o órgão responsável em avaliar a parte ética das pesquisas com seres humanos além de assegurar o bem estar e os direitos dos sujeitos da pesquisa durante o desenvolvimento da mesma.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 201_.

Dr. Plinio Tostes Berardo - Pesquisador responsável

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG _____
CPF _____, Prontuário nº _____, Matrícula nº _____,
abaixo assinado, concordo em participar do estudo
Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento
da endometriose, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador Plinio
Tostes Berardo sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos. Foi-me garantido que posso
retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou
interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Rio de Janeiro ____ de _____ de 201__.

Nome e Assinatura da voluntária:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do
sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXO III

Pesquisa: “Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose”

Amostra de Sangue	
Nº da Caixa:	
Freezer:	_____
Quantidade Total de Sangue:	ml
Quantidade de Tubos:	

ID da voluntária: _____

Hospital: _____

Data da entrevista: _____

ENTREVISTA INICIAL

A - Critérios de Elegibilidade

A1 - Nome da voluntária:

A2 - Data nascimento: ||-||-||| **A3 - Local de nascimento (estado):** ||

A4 - Sujeito potencial para:

(1) Endometriose () Controle. Se “Controle”, qual tipo?

(2) Ginecológico – Tipo de cirurgia e/ou doença ginecológica

(3) Laqueadura (4) Acompanhante – Não cirúrgico (5) Excluídas.

Motivo: _____

A5 - Endereço Atual: _____ **Nº:**

A6 - Bairro: _____ **A7 - Cidade:** _____ **A8 - Estado:** |||

A9 - CEP: ||-||-||| **A10 - Telefones de contato:** (||-||) ||-||-|||

A11 - E-mail: _____

B - Identificação (dados do prontuário)

B1 - Prontuário: |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

B2 - Tipo de cirurgia realizada: (1)Laparoscopia (2)Laparotomia

B3 - Data do Laudo Histopatológico: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|_|

B4 - Estadiamento Endometriose: (1) I (2) II (3) III (4) IV

B5 - Infiltrativa/Profunda: (0) Não (1) Sim

B6 - Local/Órgão da Endometriose:

(1) Ovários (2) Peritônio (3) Bexiga (4) Ureter
(5) Retosigmoide/Retrocervical (6) Intestino (7) Septo Reto-vaginal (8) Útero Sacro
(9) Apêndice (10) Íleo (11) Outros. Especifique:_____

B7 - Fez dosagem do CA125?

(0) Não (1) Sim, 1 vez. **Valor:**_____ **Data:** |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|_|
(2) Sim, 2 vezes. **Valor:**_____ **Data:** |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|_| **Valor:**_____ **Data:** |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|_|
|_|_|_|_|_|

C - Características da voluntária

C1 - Peso:_____ kg **C2 -Altura:**_____ m

C3 - Estado civil: (1) Estável – casada ou companheira (2)Divorciada / separada (3)Viúva (4)Solteira (9) sem informação

C4 - Nível de Instrução (Anos de estudos completos):

(0) Analfabeto (2) Ensino Fundamental (1º Grau) (5) Ensino Superior INCOMPLETO
COMPLETO (6) Ensino Superior COMPLETO
(1) Ensino Fundamental (1º Grau) INCOMPLETO (3) Ensino Médio (2º Grau) INCOMPLETO (7) Mestrado
(4) Ensino Médio (2º Grau) COMPLETO (8) Doutorado

C5 - Em sua opinião, qual é a sua cor de pele ou etnia?

(1) Branca (2) Amarela (3) Parda (4) Indígena (5) Negra (6) Outros – especificar: _____

C6 - Cor da Pele segundo o Entrevistador:

(1) Branca (2) Amarela (3) Parda (4) Indígena (5) Negra (6) Outros – especificar: _____

D - História Clínica Pacientes com Endometriose (características iniciais da doença)

D1 - Já realizou procedimentos cirúrgicos para remoção dos focos de endometriose? (0) Não (1) Sim **(SE “NÃO”, VÁ PARA D5)**

D2 - Se sim, qual foi o número de vezes que realizou procedimentos cirúrgicos para remoção dos focos de endometriose? |__|__|

D3 - Fez algum tipo de tratamento antes do procedimento cirúrgico para remoção dos focos de endometriose? (0) Não (1) Sim

D4 - Se sim, Qual o tratamento?

D5 - Com que idade você foi diagnosticada com Endometriose? |__|__| (anos)

E - História Clínica Geral (características iniciais da doença)

E1 - Você já passou por alguma cirurgia no abdômen? (0) Não (1) Sim **Se sim, quantas?** _____ // E quais?

E2 - E outra cirurgia, já realizou? (0) Não (1) Sim. **Se sim especificar** _____

E3 - Qual foi o Motivo da sua procura pelo médico?

Motivo	Sim ou Não?	Observação
Dor? Se sim especificar onde.	(0) Não (1) Sim	
Incapacidade de Gestar?	(0) Não (1) Sim	
Outra? Especificar qual.	(0) Não (1) Sim	

E4 - Com que idade foi sua primeira ida ao médico, pelo motivo acima citado, antes dessa cirurgia para o diagnóstico ou tratamento? |__|__| (anos)

E5 - Idade da menarca: ____ (anos)

E6 - Já entrou na menopausa? (0) Não (1) Sim

E7 - Se sim, com que idade? ____ (anos)

E8 - Você considera seu fluxo: (1) Diminuído (2) Normal (3) Aumentado

E9 - Ciclo menstrual: (1) Regular (2) Irregular

E10 - Quantos dias duram a sua menstruação? ____ (dias)

E11 - Quantos dias duram em média os intervalos entre as menstruações? ____ (dias)

E12 - Em relação a sua fertilidade, você: (SE “(3)”, VÁ PARA E18)(SE “(1)”, VÁ PARA E14)

(1) Nunca conseguiu engravidar (Primária) **Quanto tempo está tentando engravidar?** ____ (meses)

(2) Possui filhos, mas atualmente não consegue engravidar (Secundária) **Quanto tempo está tentando engravidar?** ____ (meses)

(3) Não possui filhos, e não tenta engravidar (não tem vida sexual ativa, usa método anticoncepcional, etc.)

(4) Já possui filhos, e não deseja mais engravidar

E13 - Em relação as suas gestações, Quantas foram?

Paridade: (0) Não (1) Um filho (2) Dois filhos (3) Três filhos (4) Quatro filhos (5) Cinco filhos (6) Seis ou mais filhos

Partos Normais: ____

Partos Cesárea: ____

Gravidez Ectópica: ____

Idade da primeira gestação: ____ (anos)

Abortos: ____ (Espontâneos: ____ Induzidos: ____)

Idade do aborto espontâneo: ____ (anos) ____ (anos)

E14 - Se não consegue ou conseguia engravidar, isso se deve à:

(1) Motivo desconhecido (2) Fator Masculino (3) Tubário (4) Insuficiência Ovariana (5)

Outros: ____

E15 - Você já fez algum tratamento para engravidar?

(0) Não (1) Indução Ovulatória (2) Inseminação Intra-uterina (3) Fertilização In Vitro

E16 - Você já amamentou? (0) Não (1) Sim.

E17 -Quanto tempo você amamentou? (soma de todos os filhos) _____anos e _____meses

E18 - Você utiliza, ou utilizou na vida, algum Método Anticoncepcional Prévio?

(0)Não (1) Contraceptivo Oral (2) Tabela (3) Diu (4) Camisinha (5) Contraceptivo injetável

Nome da pílula anticoncepcional ou do contraceptivo injetável	Dose	Idade ao início	Idade ao término	Tempo de uso em anos
		□□□	□□□	
		□□□	□□□	
		□□□	□□□	

(Nordette, Diane 35, Femiane, Triquilar, Microdiol, Trinordiol, Gynera, Sylene, Yasmin, Yas, Qlaira, Perlutan/Mesygina, Depo-provera, Mirena, Nuvaring)

E19 - Você utilizou anticoncepcional via oral ou injetável por qual motivo?

(0) Nunca usei (1) Contraceção (2) Distúrbios menstruais (3) Dismenorreia

E20 - Uso de reposição hormonal:

(0) Não

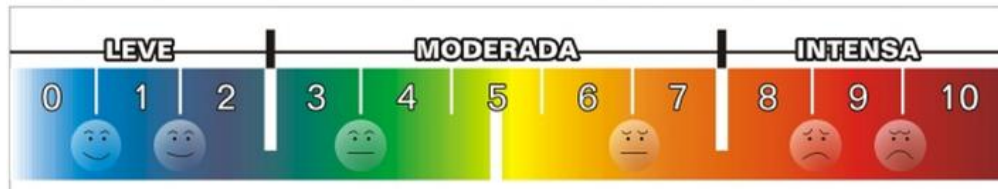
(1) Sim, alopática Qual?_____

(2) Sim, fitoterápica Qual?_____

(3) Sim, sem informação.

E21 - Tempo de uso de reposição hormonal _____ (anos)

Baseado na seguinte escala visual analógica de dor:



E22	Você sente ou sentia cólicas menstruais (dismenorréia)? Escala de dor nº _____	(0) Não (1) Sim, e não necessita de medicação. (2) Sim, e necessita de medicação para aliviá-las. (3) Sim, e necessita de medicação para aliviá-las, no entanto não melhoram. (4) Sim, e necessita de medicação, no entanto elas não melhoram e já precisou ir ao Pronto Socorro, ou faltar ao trabalho em decorrência das mesmas.
E23	Você sente cólicas que não apresentam relação nenhuma com o seu ciclo menstrual (Dor Pélvica)? Escala de dor nº _____	(0) Não (1) Sim, e não necessita de medicação. (2) Sim, e necessita de medicação para alivia-las. (3) Sim, e necessita de medicação para alivia-las, no entanto não melhoram (4) Sim, e necessita de medicação, no entanto elas não melhoram e já precisou ir ao Pronto Socorro, ou faltar ao trabalho em decorrência das mesmas.
E24	Você sente ou sentia dor durante o ato sexual (dispareunia)? Escala de dor nº _____	(0) Não (1) Na penetração (2) De profundidade (Dor no fundo da vagina) -
E25	Você sente alterações intestinais relacionadas com a menstruação?	(0) Não (1) Dor - Escala de dor nº _____ (2) Sangramento (3) Intestino Solto (4) Intestino Preso
E26	Você sente alterações urinárias relacionadas com a menstruação?	(0) Não (1) Dor - Escala de dor nº _____ (2) Sangramento (3) Aumento da frequência
E27	Qual o principal sintoma que a incomoda?	(0) Nenhum (1) Dismenorreia (2) Dor Pélvica (3) Dispareunia (4) Infertilidade (5) Alteração Intestinal Cíclica (6) Alteração Urinária Clínica

F - História de Endometriose na família

F1 - Algum familiar em 1º grau apresentou Endometriose?

(0) Não (1) Sim (Se, Sim especificar) (2) Não sabe

(SE 'NÃO'/'NÃO SABE', PULE SESSÃO "G")

F2 - Tipo de familiar:

(1) mãe (2) irmã (3) filha (4) Tia Materna sanguínea (5) Tia Paterna sanguínea (6) Avó Paterna (7) Avó Materna

G1 - Algum familiar em 1º grau apresentou Câncer?

(0) Não (1) Sim (Se, Sim especificar) (2) Não sabe **(SE 'NÃO'/'NÃO SABE', PULE SESSÃO "H")**

G2 - Tipo de familiar:

(1) Mãe (3) irmã (5) filha (7) Tia Materna sanguínea (9) Tia Paterna sanguínea (11) Avó Paterna (13) Avó Materna

(2) Pai (4) irmão (6) filho (8) Tio Materno sanguínea (10) Tio Paterno sanguínea (12) Avô Paterno (14) Avô Materno

Tipo de familiar	Local ou tipo de câncer	Tipo de familiar	Local ou tipo de câncer	Tipo de familiar	Local ou tipo de câncer
☐		☐		☐	
☐		☐		☐	

H - Alguma vez o seu médico disse que você teve algumas das doenças abaixo?

H1 - Diabetes (0) Não (1) Sim.

H2 - Obesidade (0) Não (1) Sim.

H3 - Mioma (0) Não (1) Sim.

Tratou? (0) Não (1) Sim. Qual? _____

H4 - Doença Ovariana (0) Não (1) Sim. Qual? _____

Tratou? (0) Não (1) Sim. Qual? _____

H5 - Cisto de mama (0) Não (1) Sim. Qual? _____

H6 - Hiper ou Hipotireoidismo (0) Não (1) Sim. Qual? _____

H7 - Algum tipo de câncer: (0) Não (1) Sim. Qual? _____

H8 - HIV (0) Não (1) Sim

H9 - Hepatite: (0) Não (1) Sim. Qual? _____

H10 - Outra Comorbidade: (0) Não (1) Sim. Qual? _____

I - Hábitos do Fumo

I1 - Já fumou pelo menos por 1 ano? (0) Nunca fumou (1) Somente no passado (2) Sim, ainda fuma

(SE “NUNCA”, VÁ

PARA I2)

A Sra. fumou cigarro, charuto, cachimbo ou maconha?	N · de vezes que fumava por dia ou maços ao dia	Idade ao início	Idade ao término	Tempo de fumo em anos	Observação
(1) Cigarro (2) Charuto (3) Cachimbo		□□□	□□□		
(1) Cigarro (2) Charuto (3) Cachimbo		□□□	□□□		
(1) Cigarro (2) Charuto (3) Cachimbo		□□□	□□□		
(1) Cigarro (2) Charuto (3) Cachimbo		□□□	□□□		

I2 - Já morou junto com um fumante (pai, irmão, mãe, marido, filhos, avos) ou trabalhou em um lugar fechado onde as pessoas fumassem?

(0) Não (1) Sim, em casa. (2) Sim, no trabalho.

I3 - Tempo em anos de exposição: □□□Anos

Sua idade quando essa pessoa iniciou o fumo	Sua idade quando essa pessoa parou o fumo
□□□	□□□

J - Hábitos Alimentares

J1 - Qual a frequência com que come os seguintes alimentos e bebidas?

Unidade	Alimento	Nunca	Quantas vezes ao mês?	Quantas vezes por semana?	Quantas vezes ao dia?
1 copo	Leite		□□□	□□	□□□
1 pote	Iogurte		□□□	□□	□□□
1 porção	Manteiga		□□□	□□	□□□
1 porção	Pão		□□□	□□	□□□
1 porção	Arroz		□□□	□□	□□□
1 porção	Massa		□□□	□□	□□□
1 porção	Cereal de milho (Sucrilhos e etc.)		□□□	□□	□□□
1 porção	Produtos de Soja		□□□	□□	□□□

1 porção	Mandioca		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 porção	Carne bovina		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 porção	Porco		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 porção	Galinha Industrializada		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 porção	Galinha caipira		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 porção	Outra carne (ovelha)		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 porção	Peixe		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 porção	Presunto ou salame ou salsicha		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1	Ovo		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 porção	Queijo		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 média	Batata		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 porção	Vegetais verdes não cozidos (saladas)		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 porção	Crucíferas (brócolis, repolho, etc)		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 média	Cenoura		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 média	Tomate (fresco da estação)		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 porção	Grãos (ervilha, feijão, lentilha)		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 porção	Em resumo, quantas vezes o(a) Sr(a) come uma porção de qualquer tipo de vegetal (exceto batata e cenoura)?		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 copo	Suco de frutas frescas		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 média	Maçã ou Pera		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 média	Fruta cítrica (laranja, limão, lima) na época de colheita		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 média	Banana		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 média	Em resumo, quantas vezes você come 1 fruta de qualquer tipo , fresca, por semana ?		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 fatia ou taça	Bolo e sobremesa		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 copo	Café		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐
1 porção	Grão de Bico		☐ ☐ ☐	☐	☐ ☐ ☐

1 porção	Alho		□□	□	□□
----------	------	--	----	---	----

J2 - Qual o tipo de gordura usa predominantemente: Coloque (A) usa para cozinhar, (B) usa para temperar os vegetais e (C) usa para pães, torradas e biscoitos.

(1) azeite de oliva □□	(5) margarina □□	(9) girassol □□	(13) outra gordura animal □□
(2) azeite dendê □□	(6) não usa gordura □□	(10) óleo de soja □□	(99) não sabe □□
(3) azeite de coco □□	(7) óleo de uva □□	(11) outro óleo de semente □□	
(4) manteiga □□	(8) óleo de milho □□	(12) banha de porco □□	

J3 - Você ingere ou ingeriu vitaminas (fármaco)? (0) Não (1) Sim (3) Não sabe

J4 - Qual? (1) Poli vitamínico (2) Outros _____

J5 - Com que frequência toma estas vitaminas?

(0) Nunca (2) Uma vez por semana (4) Diariamente

(1) Ocasionalmente (3) Uma vez por mês

J6 - Por quanto tempo? _____

(meses)

K - Hábitos de bebida

K1 - Já ingeriu bebidas com álcool pelo menos 1 vez por mês?

(0) Nunca (1) Só no passado (2) Sim, ainda bebe (SE “NUNCA”, PULE PARA SESSÃO “L”)

K2 - Com que frequência bebe ou bebia? (1) Diariamente (2) Semanalmente (3) Quinzenalmente (4) Mensalmente (5) Em eventos e festas

Tipo de Bebida	Idade de início	Tempo de uso em anos
(1)Cerveja (2)Vinho (3)Cachaça (4)Licores (5)Whisky ou Vodca	□□□	□□□
(1)Cerveja (2)Vinho (3)Cachaça (4)Licores (5)Whisky ou Vodca	□□□	□□□
(1)Cerveja (2)Vinho (3)Cachaça (4)Licores (5)Whisky ou Vodca	□□□	□□□
(1)Cerveja (2)Vinho (3)Cachaça (4)Licores (5)Whisky ou Vodca	□□□	□□□

L - Exercício Físico

L1 - Você pratica esporte ou exercício físico?

(0) Não (1) Sim, Atualmente.(2)Sim, No passado.(SE “NÃO”, O QUESTIONÁRIO TERMINA AQUI)

L2 - Qual esporte ou exercício físico você praticou mais frequentemente?	Horas Praticadas (por dia)	Frequência por semana	Tempo em anos
	□□□:□□□h	□□□	□□□
	□□□:□□□h	□□□	□□□
	□□□:□□□h	□□□	□□□

M - História Ocupacional

Ocupação/ Cargo	Tipo de companhia	Idade ao início	Idade ao término	Se há um período sem ocupação antes do trabalho 2, anote a razão
		□□□	□□□	
		□□□	□□□	
		□□□	□□□	
		□□□	□□□	

Fim do questionário.
OBRIGADA POR SUA PARTICIPAÇÃO EM NOSSA PESQUISA!

Rubrica da voluntária: _____

Rubrica da Entrevistadora: _____



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA SAÚDE
HOSPITAL FEDERAL DOS SERVIDORES DO ESTADO

Rio de Janeiro, 25 de março de 2011.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Federal dos Servidores do Estado (CEP-HFSE).

Ao Ilmo Sr. Dr. Plínio Tostes Berardo Carneiro da Cunha.

Assunto: Aprovação do Protocolo CEP: 000.414.

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HFSE, após analisar as respostas as pendências ao parecer consubstanciado do CEP de 13.09.10 e as respostas à carta do CEP-HFSE de 22.11.10, considerou aprovado com recomendação, o protocolo de pesquisa intitulado: "Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose", na Versão 10.08.10, assim como o termo de consentimento livre e esclarecido, na versão 2.0 de 10.03.2011, cujo pesquisador principal é o Dr. Plínio Tostes Berardo Carneiro da Cunha, médico desta instituição, estando o mesmo de acordo com o que preconiza as Resoluções 196/96, 340/04 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), devendo o pesquisador principal:

- 1- atentar para as recomendações contidas no Parecer Consubstanciado do CEP-HFSE;
- 2- observar que qualquer outra nova pesquisa utilizando o material biológico armazenado ou os dados obtidos dos sujeitos de pesquisa, necessitarão da elaboração de um novo protocolo de pesquisa com aprovação do CEP-HFSE, conforme o item III.12 da Resolução 340/04 do CNS;
- 3- comunicar ao CEP imediatamente em casos de eventos adversos ocorridos com os sujeitos de pesquisa, mesmo não se tratando de pesquisa com o envolvimento de fármacos;
- 4- comunicar ao CEP em casos de emenda ao protocolo de pesquisa ou ao TCLE e
- 5- enviar os relatórios da pesquisa nas datas estabelecidas na folha de rosto e segundo os critérios que se façam necessários pelo Comitê ou pelo pesquisador, assim como os termos de consentimento livre e esclarecidos, assinados pelos sujeitos de pesquisa, até a data do primeiro relatório parcial.

Dr. Marcos Henrique Manzoni
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa em Seres Humanos do HFSE

ANEXO V



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0910/11

Título: CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS COM A PREDISPOSIÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DA ENDOMETRIOSE

Pesquisador Responsável: Maurício Simões Abrão

Pesquisador Executante: Plínio Tostes Berardo

Co-autores: Jamila Perini, Daniel Escorsim Machado

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 01/02/2012, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

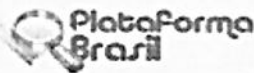
CAPPesq, 06 de Fevereiro de 2012


PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO VI



**MATERNIDADE ESCOLA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO/ ME-UFRJ**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose

Pesquisador: Jamila Alessandra Perini Machado

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45941715.5.0000.5275

Instituição Proponente: Maternidade-Escola da UFRJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.244.294

Considerações Finais a critério do CEP:

1) De acordo com o item VII.13.d, da Resolução CNS n.º 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios anuais (parciais ou finais, em função da duração da pesquisa).

2) Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	08/09/2015 10:23:16	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	08/09/2015 10:30:38	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.pdf	08/09/2015 10:31:50	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	08/09/2015 10:37:04	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Outros	Pendencia.pdf	09/09/2015 15:07:41	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_498610.pdf	09/09/2015 15:08:30		Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:
Não

RIO DE JANEIRO, 25 de Setembro de 2015

Assinado por:
Ivo Basilio da Costa Júnior
(Coordenador)

ANEXO VII

Saúde Ministério da Saúde Plataforma Brasil principal exit Cadastros Público Pesquisador Alterar Meus Dados Jéssica Vilarinho Cardoso - Pesquisador V3.0 Sua sessão expira em: 38min 54									
LISTA DE PROJETOS DE PESQUISA:									
Tipo *	CAAE *	Versão *	Pesquisador Responsável *	Comitê de Ética *	Instituição *	Origem *	Última Avaliação *	Situação *	Ação
P	45025915.4.0000.5240	2	Jéssica Vilarinho Cardoso	5240 - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - ENSP/ FIOCRUZ	Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca	PO	PO	Aprovado	