MARINA DE PAULA ANDRES

**Estudo de polimorfismos da região controladora (*D-loop*) do DNA
mitocondrial em amostra de mulheres brasileiras com endometriose**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Prof. Dr. Sergio Podgaec

Coorientadora: Prof^a. Dra. Cintia Fridman Rave

São Paulo

2017

MARINA DE PAULA ANDRES

**Estudo de polimorfismos da região controladora (*D-loop*) do DNA
mitocondrial em amostra de mulheres brasileiras com endometriose**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Prof. Dr. Sergio Podgaec

Coorientadora: Prof^a. Dra. Cintia Fridman Rave

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Andres, Marina de Paula

Estudo de polimorfismos da região controladora (D-loop) do DNA mitocondrial em amostra de mulheres brasileiras com endometriose / Marina de Paula Andres. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ginecologia e Obstetrícia.
Orientadora: Cintia Fridman Rave.

Descritores: 1.Endometriose 2.DNA mitocondrial 3.Polimorfismo genético
4.População brasileira 5.Genética médica 6.Haplótipos

USP/FM/DBD-255/17

Nome: ANDRES, Marina de Paula

Título: Estudo de polimorfismos da região controladora (*D-loop*) do DNA mitocondrial em amostra de mulheres brasileiras com endometriose.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico esta dissertação...

Aos meus pais, Cesar e Marcia, minha irmã Luiza e meu marido Alexandre.
Obrigada pelo incentivo incansável, apoio inabalável e amor incondicional. Sem
você nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Desejo agradecer aos meus orientadores Prof. Sergio e Prof^a. Cintia, obrigada pela confiança, oportunidade e pelo imensurável aprendizado.

Aos meus pais e família, obrigada por estimular desde sempre o espírito curioso e o contato com a ciência. As discussões sobre física e sobre o Universo foram essenciais na formação do meu espírito e caráter.

Ao meu marido, obrigada pelo incentivo e incansáveis leituras e conversas sobre mitocôndrias e Biologia Molecular.

Aos colegas do LIM 40 e do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho, obrigada pela paciência, pela ajuda, almoços e risadas durante todo esse período.

Às amigas Nathalie, Mari e Felícia, obrigada por me ensinarem um mundo novo e por manterem minha janela sempre aberta.

Aos amigos e colegas do Setor de Endometriose do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, obrigada pelo acolhimento e por permitir meu crescimento pessoal e acadêmico.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao Programa de Ginecologia e Obstetrícia, agradeço por toda a minha formação como médica e pesquisadora.

RESUMO

ANDRES, Marina de Paula. Estudo de polimorfismos da região controladora (*D-loop*) do DNA mitocondrial em amostra de mulheres brasileiras com endometriose [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: A endometriose afeta 10 a 15% das mulheres em idade reprodutiva e há evidências crescentes de que o estresse oxidativo está envolvido na sua patogênese. Os polimorfismos na região controladora do DNA mitocondrial podem levar à replicação e à transcrição alterada dos genes mitocondriais, o que pode afetar a função mitocondrial e, conseqüentemente, a geração intracelular de espécies reativas de oxigênio. Descobertas recentes indicam que os polimorfismos do DNA mitocondrial (mtDNA) estão relacionados à endometriose em populações coreana e indiana. **Objetivo:** Avaliar a associação entre polimorfismos e haplogrupos do DNA mitocondrial e a presença de endometriose em mulheres brasileiras. **Métodos:** Pacientes com idade entre 18 e 50 anos foram divididas nos grupos endometriose (n = 90) e controle (n = 92). O primeiro grupo incluiu mulheres com diagnóstico histológico de endometriose e estadiamento cirúrgico, enquanto o segundo grupo incluiu pacientes submetidas à cirurgia para laqueadura tubária, leiomioma ou cistos ovarianos benignos, sem evidência de endometriose. O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue periférico seguido do sequenciamento de Sanger e eletroforese capilar. Os polimorfismos foram determinados comparando as sequências obtidas com a Sequência padrão de Cambridge Revisada. **Resultados:** As frequências dos polimorfismos T16217C (14,4% vs. 5,4%; p = 0,049), G499A (13,3% vs. 4,3%; p = 0,038), T236C (5,6% vs. 0%; p = 0,028) e G185A (6,7% vs. 0%; p = 0,013) foram maior no grupo endometriose em comparação ao grupo controle, respectivamente, enquanto as frequências dos polimorfismos T146C (18,9% vs 32,6%; p = 0,042) e 573.2C (5,6% vs. 29,3%; p<0.001) foram menores. A distribuição dos haplogrupos foi semelhante entre os grupos endometriose e controle. Nenhuma diferença foi observada nos haplogrupos de acordo com o estágio ou localização da doença. **Conclusão:** Os polimorfismos T16217C,

G499A, T236C e G185A do DNA mitocondrial foram relacionados à presença de endometriose, enquanto T146C e 573.2C foram relacionados à ausência de doença, em amostra de mulheres brasileiras. Não foram observadas diferenças significativas entre os haplogrupos mitocondriais.

Descritores: endometriose; DNA mitocondrial; polimorfismo genético; população brasileira; genética médica; haplótipos.

ABSTRACT

Andres MP. Polymorphisms of control region (D-loop) of mitochondrial DNA in Brazilian women with endometriosis [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Background: There is increasing evidence that oxidative stress is a major factor in the pathogenesis of endometriosis, a prevalent disease that affects 5–15% of reproductive-aged women worldwide. Polymorphisms in the control region of mitochondrial DNA (mtDNA) can lead to the altered replication and transcription of mitochondrial genes, thereby affecting both overall mitochondrial function, and the intracellular generation of reactive oxygen species. **Objective:** The present study investigated whether the incidence of mtDNA polymorphisms and/or haplogroups is associated with endometriosis in a Brazilian population. **Methods:** Female patients (aged 18–50 years) were enrolled in the present study, and assigned to either endometriosis (n = 90) or control (n = 92) group. The former group comprised patients who had received a histological diagnosis of endometriosis and had been assigned a surgical stage, while the latter comprised patients who had undergone gynecological surgery for tubal ligation, leiomyoma, or ovarian cysts, and showed no evidence of endometriosis. DNA was extracted from peripheral blood samples, and then subjected to Sanger sequencing and capillary electrophoresis. Polymorphisms were identified by comparing the isolated mtDNA sequences with the revised Cambridge Reference Sequence. **Results:** The frequency of some identified polymorphisms was found to be higher in the endometriosis group than in the control group, including polymorphisms T16217C (found in 14.4% and 5.4% of endometriosis- and control-group members, respectively; p=0.049), G499A (13.3% vs. 4.3%; p=0.038), T236C (5.6% vs. 0%; p=0.028), and G185A (6.7% vs. 0%; p=0.013). In contrast, polymorphisms T146C (18.9% vs. 32.6%; p=0.042) and 573.2C (5.6% vs. 29.3%; p<0.001) were found to occur at a lower frequency in the endometriosis compared to the control group. Observed haplogroup frequencies were similar between the endometriosis and control groups, and did not appear to be affected by either disease location and/or staging.

Conclusion: mtDNA polymorphisms T16217C, G499A, T236C, and G185A were found to be associated with endometriosis, while conversely, T146C and 573.2C were shown to be associated with an absence of disease in the analyzed Brazilian population. No significant differences were observed between the mitochondrial haplogroups of patients with, versus without endometriosis.

Descriptors: endometriosis; DNA, mitochondrial; polymorphism, genetic; Brazilian population; genetics, medical; haplotypes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do genoma mitocondrial humano e diagrama da região controladora	21
Figura 2 - Representação gráfica do padrão de migração das linhagens mitocondriais	23
Figura 3 - Filogenia simplificada do DNA mitocondrial ilustrando o uso de letras do alfabeto para a designação do haplogrupo	23
Figura 4 - Eletroferogramas exemplificando heteroplasmas de ponto	25
Figura 5 - Eletroferogramas exemplificando uma heteroplasma de comprimento na região HV1	25
Figura 6 - Eletroferogramas exemplificando heteroplasma de comprimento na região HV3	25
Figura 7 - Fluxograma representando a dinâmica do estudo.....	33
Figura 8 - Eletroferogramas de indivíduos com heteroplasma de comprimento na região 16.193 e transição no nucleotídeo 16.189	45
Figura 9 - Eletroferogramas apresentando indivíduos com heteroplasma de comprimento na região HV2, posição 309 e inserção de 1C na posição 315...45	45
Figura 10 - Heteroplasma de comprimento na região HV3, entre os nucleotídeos 515 e 524	45
Figura 11 - Duplicação de 15 nucleotídeos entre as posições 16.018 e 16.032 do DNA mitocondrial	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Classificação da *American Society for Reproductive Medicine* e por tipo de lesão das pacientes incluídas no grupo endometriose (n=90) 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Volume e concentrações dos reagentes utilizados na reação de cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região controladora do DNA mitocondrial	35
Tabela 2 - Condições de temperatura, tempo e número de ciclos da reação de cadeia da polimerase (PCR) utilizadas para amplificação da região controladora do DNA mitocondrial	36
Tabela 3 - <i>Primers</i> utilizados no estudo para as reações de PCR e sequenciamento da região controladora do DNA mitocondrial	37
Tabela 4 - Dados demográficos e clínicos das pacientes incluídas no estudo nos grupos controle (CT) e endometriose (EDT)	41
Tabela 5 - Quadro clínico das pacientes incluídas nos grupos controle (CT) e endometriose (EDT)	43
Tabela 6 - Análise estatística das heteroplasmias da região controladora do DNA mitocondrial encontradas nos grupos controle (CT) e endometriose (EDT)	44
Tabela 7 - Polimorfismos na região controladora do DNA mitocondrial nos grupos controle (CT) e endometriose (EDT)	47
Tabela 8 - Distribuição e análise estatística dos haplogrupos mitocondriais nos grupos controle (CT) e endometriose (EDT)	48
Tabela 9 - Distribuição dos haplogrupos mitocondriais por estágio e tipo de lesão no grupo endometriose	48
Tabela 10 - Distribuição dos haplogrupos mitocondriais por subgrupo no grupo controle.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
A	Adenosina
α	Alfa
AF	Antecedente familiar
ATP	Trifosfato de adenosina
β	Beta
CAPPesq	Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa
C	Citosina
°C	Graus Celsius
CT	Controle
<i>D-loop</i>	<i>Displacement Loop</i> (Região controladora do DNA mitocondrial)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Tri Fosfatado
EDT	Endometriose
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EVA	Escala visual analógica de dor
<i>et al</i>	<i>et alia</i> (e outros)
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IC	Intervalo de confiança
INS	Inserções
iPSC	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>

DEL	Deleções
DP	Desvio padrão
G	Guanina
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i>
HV	Região hipervariável do DNA mitocondrial
LIM 40	Laboratório de Investigação Médica 40
MgCL ₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mt	<i>Mitochondrial</i>
mtDNA	DNA mitocondrial
MT-TP	<i>Mitochondrally encoded tRNA proline</i>
MRCA	<i>Matrilineal most recente common ancestor</i>
n	Número de indivíduos/ eventos
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
ng	Nanograma
OR	<i>Odds Ratio</i>
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Picomol

rCRS	<i>Revised Cambridge Reference Sequence</i> (Sequência Referência de Cambridge Revisada)
RNA	Ácido Ribonucleico
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (Polimorfismos de base única)
T	Timina
tRNA	RNA de transferência
uL	Microlitro
UI	Unidades internacionais
vs	<i>Versus</i>
X ²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
LISTA DE GRÁFICOS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Endometriose.....	19
1.2. DNA mitocondrial.....	20
1.3. Haplogrupos mitocondriais.....	22
1.4. Heteroplasmia.....	24
1.5. DNA mitocondrial e endometriose.....	26
1.6. Justificativa do estudo.....	27
2. OBJETIVO.....	29
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	31
3.1. Casuística.....	31
3.1.1. Critérios de inclusão.....	31
3.1.2. Critérios de exclusão.....	31
3.1.3. Dinâmica do estudo.....	32
3.1.4. Cálculo do tamanho da amostra.....	34
3.2. Métodos.....	34
3.2.1. Coleta de amostras.....	34

3.2.2.	Extração de DNA.....	34
3.2.3.	Amplificação do mtDNA	35
3.2.4.	Reação de sequenciamento.....	36
3.2.5.	Análise estatística	38
4.	RESULTADOS	40
4.1.	Avaliação Clínica	40
4.2.	Análise Genética.....	43
5.	DISCUSSÃO	50
6.	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXOS	74
	APÊNDICES.....	86

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Endometriose

Endometriose é definida pela presença de tecido endometrial (glândulas e/ou estroma) fora do útero. Estima-se que esta doença atinja de 10 a 15% das mulheres em idade fértil, chegando, entre mulheres com dor pélvica crônica ou infertilidade, a 40% e 48%, respectivamente (1).

Existem inúmeras classificações propostas para a endometriose. A *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) classifica a endometriose em estádios de I a IV, de acordo com o tamanho das lesões, presença de aderências e bloqueio do fundo de saco de Douglas (2).

Morfologicamente, podemos dividir a doença em endometriose peritoneal superficial, endometrioma ovariano ou endometriose profunda. A endometriose superficial é caracterizada por focos de lesões localizados no peritônio de forma superficial, histologicamente semelhantes ao endométrio típico (3). Os endometriomas ovarianos estão presentes em até 44% das pacientes com endometriose e caracterizam-se por cistos de conteúdo espesso de cor “achocolatada”, usualmente associados a aderências ao peritônio posterior e ao ligamento largo, com patogênese ainda controversa (3). Os implantes profundos são definidos por nódulos de profundidade maior que cinco milímetros. Usualmente, os principais sítios acometidos são: ligamentos útero-sacros, região retrocervical, terço superior de vagina, retossigmoide, bexiga e ureter (4).

A suspeita clínica da endometriose é feita com base em dados de anamnese e exame físico. Os sintomas mais comumente apresentados por essas pacientes são: dor pélvica em cólica no período menstrual (dismenorreia), dor pélvica crônica (ou acíclica), dispareunia de profundidade, sintomas intestinais ou urinários cíclicos e infertilidade. Tais queixas podem variar de acordo com o local dos implantes endometrióticos, podendo acometer praticamente todos os locais do organismo, mesmo sítios não usuais como, por exemplo, pulmão, plexo sacral e pâncreas (4).

A prevalência correta dos tipos de endometriose na população geral não é bem estabelecida, visto que o diagnóstico definitivo é histológico (4). A abordagem moderna da endometriose se baseia no reconhecimento do tipo de

acometimento das lesões, sendo o diagnóstico correto da endometriose profunda o maior desafio para a obtenção de bons resultados terapêuticos (5).

Diversas teorias foram propostas para explicar a etiopatogenia da doença e a mais aceita ainda é a da menstruação retrógrada (6). Diversos fatores determinam a adesão e proliferação das células endometriais na cavidade pélvica, como alterações imunológicas, inflamatórias e o *stress* oxidativo (7-11). Além disso, a regulação de inúmeros desses mecanismos parece ser determinada por fatores genéticos, podendo levar a perda ou ganho de função, secundárias à instabilidade de microssatélite, instabilidade cromossômica, perda de heterozigose, polimorfismos, mutações de genes nucleares e mutações do DNA mitocondrial (mtDNA) (10).

O desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio, que são metabólitos intermediários da metabolização normal do oxigênio, e os sistemas anti-oxidativos, que são designados para controlar a produção e inativar os radicais livres de oxigênio e reparar as células danificadas, caracteriza o *stress* oxidativo (12). Sendo a mitocôndria a organela responsável pelo metabolismo de oxigênio intracelular, alterações no mtDNA poderiam alterar a transcrição, tradução e replicação do mesmo, e interferir nas vias de sinalização nuclear (13).

1.2. DNA mitocondrial

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas encontradas em todas as células nucleadas, responsáveis pelo metabolismo de oxigênio intracelular (13). O mtDNA é composto por uma dupla fita circular que contém 16.569 pares de bases onde se localizam 37 genes, todos envolvidos no metabolismo de oxigênio e produção de energia na célula (14).

Os componentes da cadeia respiratória localizam-se na membrana interna da mitocôndria sob a forma de quatro complexos proteína-lipídeos: o complexo I (NADH ubiquinona oxidoreductase) com mais de 40 polipeptídeos, o complexo II (succinato-ubiquinona oxidoreductase), o complexo III (ubiquinolcitocromo c oxidoreductase) e o complexo IV (citocromo c oxidase). A cadeia respiratória mitocondrial possui ainda dois transportadores de elétrons: a ubiquinona e o citocromo c. Estes constituintes, bem como o complexo V (ATP sintetase), formam o sistema de fosforilação oxidativa, que fornece o ATP necessário à

célula (15). O complexo I mitocondrial é formado por um grande número de proteínas e possui 46 subunidades, sendo sete codificadas por genes mitocondriais e as restantes pelo DNA nuclear. Devido à complexidade desse sistema, defeitos genéticos resultam em uma grande variedade de fenótipos clínicos (15).

Há também uma região não codificadora denominada região controladora, *D-loop* (Displacement Loop) ou região hipervariável (HV), responsável pela regulação da transcrição e replicação do mtDNA. Essa região compreende três segmentos: HV1, localizado entre as posições 16.024 e 16.365; HV2, da posição 73 a 340; e HV3, da posição 438 a 574 (Figura 1) (16-18).

Figura 1 - Mapa do genoma mitocondrial humano e diagrama da região controladora

A designação dos genes tRNA são indicados por fora do círculo. A numeração na região controladora se refere à sequência referência de Anderson *et al.* (19).

Fonte: adaptado de MITOMAP (www.mitomap.org)

O mtDNA apresenta uma taxa de mutação 5 a 10 vezes maior do que o DNA nuclear, sua herança é exclusivamente materna e a molécula não sofre

recombinação, resultando no acúmulo de mutações ao longo das linhagens matrilineares (20).

As mutações encontradas em mais de 1% da população são denominadas polimorfismos e são definidas a partir da comparação da sequência do mtDNA do indivíduo analisado com uma sequência padrão, sendo atualmente utilizada a *Revised Cambridge Reference Sequence (rCRS)* (21). O conjunto de polimorfismos do DNA mitocondrial de um indivíduo é denominado de haplótipo.

1.3. Haplogrupos mitocondriais

Haplogrupo mitocondrial refere-se ao grupo de indivíduos que apresentam determinados polimorfismos em comum, característicos de um grupo étnico e de uma origem geográfica (13).

O modelo “*out of Africa*” (22) sugere uma origem única dos homens modernos originada na África há aproximadamente 250.000 anos (Figura 2). A partir de um haplogrupo ancestral, novas mutações surgiram, formando novos haplogrupos e, conseqüentemente, novas linhagens evolutivas. Com o advento das migrações e com o isolamento geográfico dessas populações, os haplogrupos e os polimorfismos mitocondriais formaram linhagens independentes, tornando-se específicos para cada região geográfica, classificados nos grandes grupos africano, europeu, asiático e ameríndio (13; 23).

Conforme o aumento no número de diferentes populações estudadas, polimorfismos adicionais população-específicos vão sendo descritos e, portanto, os haplogrupos mitocondriais vão sendo constantemente rearranjados e subdivididos. A Figura 3 ilustra um diagrama da filogenia dos haplogrupos.

Todos os mtDNA africanos estão incluídos no macro haplogrupo L. O haplogrupo africano L0 é a linhagem mais antiga do mtDNA encontrada na população Koi-San e L1 e L2 são encontrados em populações de pigmeus africanos. Os macro haplogrupos M e N surgiram na região subsaariana a partir de L3 do nordeste africano e migraram para formar as populações indígenas, europeia e asiática. Enquanto o haplogrupo M ficou confinado à Ásia, os haplogrupos A, C e D ocuparam o nordeste da Sibéria e migraram ao longo do estreito de Bering há cerca de 20.000 anos para formar os nativos americanos.

Migrações adicionais trouxeram para as Américas os haplogrupos B e X, e o haplogrupo B colonizou as Ilhas do Pacífico (9).

Figura 2 - Representação gráfica do padrão de migração das linhagens mitocondriais

As letras representam a distribuição dos haplogrupos mitocondriais para cada região do mapa.
Fonte: MITOMAP (24).

Figura 3 - Filogenia simplificada do DNA mitocondrial ilustrando o uso de letras do alfabeto para a designação do haplogrupo

A raiz da árvore é indicada pela inscrição mt-MRCA (*matrilineal most recent common ancestor*). Os haplogrupos L são as linhagens mais antigas. Haplogrupo L3 deu origem aos haplogrupos M e N, que abrangem toda a variação observada fora da África.
Fonte: *PhyloTree*, 2016. ("<http://www.phyloTree.org>").

Nesse sentido, os haplogrupos mitocondriais, por serem caracterizados por polimorfismos específicos, podem estar associados a condições fisiológicas no

metabolismo intracelular ou a doenças: os haplogrupos T e U, por exemplo, já foram associados com redução na motilidade do esperma (25); haplogrupos J e Uk são encontrados em corredores de alta performance de curtas distâncias e o haplogrupo I em corredores de alta performance de longa distância. De forma inversa, os polimorfismos e, portanto, seus respectivos haplogrupos, podem determinar alterações cruciais no metabolismo de oxigênio e aumento do *stress* oxidativo e já foram associados a diversas doenças metabólicas, degenerativas, infecciosas e autoimunes como diabetes melito, miopatias, carcinoma hepatocelular, dentre outras (23; 26-30).

1.4. Heteroplasmia

Algumas doenças associadas ao mtDNA e suas variações fenotípicas poderiam ser explicadas pela presença de heteroplasmia do mtDNA, que consiste na co-expressão, em um mesmo indivíduo, da variante selvagem e da variante polimórfica em graus variados (31; 32). Devido ao grande número de cópias do mtDNA em cada célula, uma mutação ocorrida em apenas algumas delas pode resultar em uma mistura de diversas sequências de mtDNA dentro da mitocôndria, célula, tecido ou órgão (33).

A heteroplasmia pode se manifestar de duas maneiras: sequência e comprimento (deleção ou inserção). A heteroplasmia de sequência, ou de ponto, tem origem quando duas linhagens de mtDNA diferem pela substituição de uma única base (Figura 4). A heteroplasmia de comprimento é definida quando há variação no número de bases em uma região homopolimérica, tipicamente na concentração de bases C_s ou repetições de AC_s (Figura 5). As regiões homopoliméricas de *C-stretch* estão localizadas entre as posições 16.184 e 16.193 na região HV1, entre 303 e 315 em HV2 e entre 568 e 573 em HV3. Na região HV3, entre os nucleotídeos 515 e 524, pode ser observada a ocorrência de heteroplasmia de comprimento com adição ou deleção de dinucleotídeos AC_s (Figura 6) (31; 34).

O aumento da quantidade de heteroplasmia intracelular pode conferir uma vantagem adaptativa ou determinar um defeito bioquímico no metabolismo de oxigênio celular, aumentando a produção de radicais livres de oxigênio, causando defeito na síntese de ATP, disfunção e morte celular (22).

Figura 4 - Eletroferogramas exemplificando heteroplasmas de ponto

A: Indivíduo com heteroplasma de ponto na posição 16.278, com a presença das bases T e C.
 B: Indivíduo com heteroplasma de ponto na posição 16.241, com a presença das bases A e G.
 Fonte: Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Figura 5 - Eletroferogramas exemplificando uma heteroplasma de comprimento na região HV1

A: Indivíduo sem a heteroplasma de comprimento. B: Indivíduo com heteroplasma de comprimento devido à presença de 1C na posição 16.189 (ao invés do T) e a inserção de 1C na posição 16.193, resultando em um trecho heteroplasmático, que resulta na leitura fora de fase a 3' do ponto de heteroplasma.

Fonte: Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho, FMUSP.

Figura 6 - Eletroferogramas exemplificando heteroplasma de comprimento na região HV3

A: Indivíduo sem a heteroplasma de comprimento, com 5 conjuntos de dinucleotídeos AC. B: Indivíduo com heteroplasma de comprimento devido à inserção de um dinucleotídeo AC na posição 524. C: Indivíduo com heteroplasma de comprimento devido à deleção de um dinucleotídeo AC na posição 524.

Fonte: Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho, FMUSP.

1.5. DNA mitocondrial e endometriose

Alguns trabalhos já relacionaram o DNA mitocondrial e a presença de endometriose em populações asiáticas e são descritos abaixo.

Cho *et al.* (36), em 2012, analisaram 365 mulheres coreanas na menacme submetidas a cirurgias eletivas, sendo 198 diagnosticadas com endometriose e 167 controles. As pacientes com endometriose foram classificadas como estágio I (n = 26), II (n = 11), III (n = 80) e IV (n = 81), de acordo com a ASRM (2). Foram avaliados os polimorfismos A10.398G, G13.708A e T16.189C. Dentre esses, o T16.189C foi encontrado em uma frequência significativamente maior no grupo com endometriose quando comparado ao grupo controle (45,9% versus 34,7%; $p = 0,03$), com *odds ratio* de 1,598 (IC 95%: 1,046 - 2,442).

Govatati *et al.* (37), em 2012, pesquisaram os polimorfismos do mtDNA em amostras de endométrio típico e de lesões de endometriose em 32 pacientes indianas com endometriose moderada ou grave e avaliaram os haplogrupos mitocondriais de 128 amostras de sangue periférico de pacientes com endometriose confirmada e de 90 controles. Foram observados diferentes polimorfismos na região controladora em 45,1% das amostras de endométrio, sendo 6 heteroplasmias de ponto observadas apenas nas lesões de endometriose. Foram identificados 39 haplogrupos mitocondriais entre pacientes e controles, sendo que o haplogrupo M5 (característico de populações do Sul da Ásia) apresentou frequência significativamente mais elevada entre pacientes com endometriose em comparação ao grupo controle (19,5% versus 3,3%, respectivamente; $p = 0,00069$).

Em 2013, o mesmo grupo de Govatati *et al.* (17) estudou 152 mulheres indianas com idades entre 20 e 40 anos e endometriose confirmada histologicamente. As pacientes apresentavam endometriose estágio III (n = 98) ou IV (n = 54) da ASRM (2). Foram incluídas 150 pacientes inférteis no grupo controle, submetidas à laparoscopia diagnóstica, sem endometriose. A partir do sequenciamento completo da região controladora do mtDNA de todas as amostras, observou-se que as frequências dos polimorfismos A189G (49% versus 33%; $p = 0,0455$), 310C (51% versus 43%; $p = 0,354$) e T16.189C (41% versus 17%; $p = 0,0005$) foram significativamente maiores nas pacientes com endometriose quando comparadas àquelas sem a doença.

1.6. Justificativa do estudo

Crescente evidência tem demonstrado que o *stress* oxidativo pode estar relacionado à etiopatogenia da endometriose (12). Sendo a mitocôndria o maior gerador intracelular de espécies reativas de oxigênio, polimorfismos na região controladora do DNA mitocondrial podem alterar a transcrição e expressão dos genes mitocondriais, aumentando ou diminuindo a produção de tais elementos. Além disso, estudos em famílias e irmãs gêmeas sugerem também uma predisposição genética ao desenvolvimento da endometriose. A avaliação genômica desses indivíduos já permitiu identificar diversos polimorfismos em genes que codificam proteínas relacionadas à resposta imune, citocinas, moléculas de adesão, inflamação e *stress* oxidativo relacionados com a doença (10; 38).

A relação do mtDNA e endometriose já foi descrita em alguns estudos que avaliaram o fluido peritoneal e lesões da doença (39; 40). Nas populações coreana e indiana já foi sugerida a associação de alguns polimorfismos da região controladora do mtDNA com a endometriose (17; 36; 37; 41).

Dessa forma, baseado no conhecimento de que os polimorfismos podem ser específicos para cada população estudada e que a brasileira é altamente miscigenada, elaboramos o presente estudo para avaliar de forma inédita a possível associação dos polimorfismos da região controladora do DNA mitocondrial e dos haplogrupos mitocondriais com a presença de endometriose, em amostra de mulheres brasileiras.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a associação dos polimorfismos da região controladora (*D-loop*) do DNA mitocondrial e dos haplogrupos mitocondriais com a presença de endometriose em amostra de mulheres brasileiras.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Esse estudo foi realizado no Setor de Endometriose da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), onde foram recrutadas as participantes, em colaboração com o Laboratório de Imuno-Hematologia e Hematologia Forense (LIM 40), do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da FMUSP, onde foi realizada a análise genética do mtDNA.

As pacientes foram divididas em dois grupos: endometriose (pacientes com endometriose confirmada histologicamente, n = 90) e controles (pacientes sem endometriose, n = 92). As pacientes foram previamente informadas sobre o estudo e o material biológico (sangue) foi coletado após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos A e B). A coleta das amostras respeitou os protocolos técnicos do hospital e dos médicos envolvidos e a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP sob o parecer 534714/14 (Anexo C).

3.1.1. Critérios de inclusão

Para o grupo com endometriose, os critérios de inclusão foram: mulheres com idade entre 18 e 50 anos com endometriose comprovada histologicamente. Para o grupo controle, foram selecionadas mulheres entre 18 e 50 anos submetidas a cirurgias por leiomioma uterino, hidrossalpinge, teratoma ovariano, cistos benignos ovarianos ou laqueadura tubária, de acordo com indicação apropriada dos Setores de Planejamento Familiar e Grupo Cirúrgico Geral da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da FMUSP, momento em que foi verificada a ausência de endometriose.

3.1.2. Critérios de exclusão

Foi considerado critério de exclusão a presença de comorbidades previamente associadas aos polimorfismos do mtDNA, como insuficiência renal

crônica, carcinoma hepatocelular e doença coronariana (42). Foram também excluídas pacientes com diagnóstico de adenomiose.

3.1.3. Dinâmica do estudo

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi realizada a coleta de amostra de sangue periférico das pacientes que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão acima descritos, no ambulatório do Setor de Endometriose (grupo endometriose) ou na enfermaria da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital da Clínicas da FMUSP (grupo controle). O fluxograma da dinâmica do estudo está representado na Figura 7.

Todas as pacientes incluídas responderam a um questionário (Anexo D) aplicado por esta pesquisadora, com dados demográficos, presença dos sintomas típicos da doença (dismenorreia, dor pélvica crônica, dispareunia de profundidade, dor ao evacuar cíclica, disúria cíclica e infertilidade), graduação de zero a dez dos sintomas dolorosos pela escala visual analógica de dor (EVA), uso de medicações e comorbidades.

Os dados cirúrgicos foram levantados do prontuário eletrônico, bem como o estágio da doença pela classificação da ASRM (Anexo E), resultado do exame anatomopatológico da lesão e classificação por tipo de lesão: superficial (doença exclusivamente peritoneal, com infiltração menor que 5 mm), ovariana (presença do endometrioma cístico ovariano com ou sem lesão peritoneal) ou profunda (presença de qualquer lesão profunda com infiltração maior que 5 mm) (3).

As amostras foram processadas e analisadas no Laboratório de Imuno-Hematologia e Hematologia Forense (LIM 40) da FMUSP.

Figura 7 - Fluxograma representando a dinâmica do estudo

ASRM: *American Society for Reproductive Medicine* (2).

Fonte: Departamento de Ginecologia e Obstetria, FMUSP.

3.1.4. Cálculo do tamanho da amostra

Não havendo estudo prévio sobre o mtDNA e endometriose em mulheres brasileiras, o cálculo amostral foi baseado no estudo de Govatati *et al.* (25), no qual o polimorfismo T16.189C foi encontrado em aproximadamente 17% da população geral e em 41% das mulheres com endometriose. Baseado nesses dados, com intervalo de confiança e poder de 95%, a amostra necessária para encontrar esta diferença em mulheres brasileiras seria de 87 mulheres em cada grupo (com e sem a doença).

O cálculo da amostra seguiu a fórmula abaixo (31):

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times (p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2))}{(p_1 - p_2)^2}$$

Onde: p_1 é a frequência do polimorfismo T16.189C nas mulheres sem endometriose; p_2 é a frequência do polimorfismo T16.189C nas mulheres com endometriose; e Z são os valores da distribuição normal padrão com confiança $1-\alpha$ e poder $1-\beta$.

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta de amostras

Foram coletados, por punção venosa periférica de antebraço, 4 mL de sangue total em tubo com EDTA e armazenados em geladeira a 4 °C para posterior processamento.

3.2.2. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada pelo processo de *Salting-out*, de acordo com protocolo previamente publicado (44), à medida que as amostras foram coletadas. O DNA extraído foi eluído em tampão de Tris-EDTA, quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2.000 (*Thermo Fisher*), aliqotado e armazenado em microtubos a temperatura de -20 °C para posterior sequenciamento e análise de polimorfismos.

3.2.3. Amplificação do mtDNA

A região controladora do mtDNA foi amplificada e analisada em todas as amostras para construção das sequências, análise dos polimorfismos dessa região, composição dos haplótipos e classificação dos respectivos haplogrupos mitocondriais.

Os DNAs foram submetidos a uma única reação de PCR para amplificação da sequência do nucleotídeo 15.879 ao 727, contendo 1.417 pb, abrangendo as três regiões de interesse (HV1, HV2 e HV3). Os componentes, bem como as condições de ciclagem necessárias para realização da reação de PCR, estão descritos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Os *primers* utilizados (*Invitrogen Life Technologies*) foram o L15.879 e H727 e suas respectivas sequências estão descritas na Tabela 3. Após este procedimento, foi realizada a purificação dos produtos de PCR com a utilização de *Exonuclease I* e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (EXO/SAP, *Thermo Fisher Scientific*), segundo recomendações do fabricante.

Tabela 1 - Volume e concentrações dos reagentes utilizados na reação de cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região controladora do DNA mitocondrial

Componentes	Concentração	Volume (uL)
DNA	50 ng/uL	2
<i>Primer Forward</i> (F)	2,5 pmol/uL	0,4
<i>Primer Reverse</i> (R)	2,5 pmol/uL	0,4
dNTP	1,25 mM	0,8
Enzima Taq DNA Polimerase	5U/uL	0,15
Tampão da Enzima	10x	1
MgCl ₂	50 mM	0,3
Água ultrapura	-	4,95

DNA: ácido desoxirribonucleico; dNTP: desoxirribonucleotídeo tri-fosfatado; MgCl₂: cloreto de magnésio

Tabela 2 - Condições de temperatura, tempo e número de ciclos da reação de cadeia da polimerase (PCR) utilizadas para amplificação da região controladora do DNA mitocondrial

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos (n)
Desnaturação inicial	95	1	1
Desnaturação	95	1	
Anelamento	60	1	36
Extensão	72	1	
Extensão Final	72	7	1

Min: minutos; n: número de ciclos; °C: graus Celsius.

3.2.4. Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR foram sequenciados com a utilização do *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA), conforme protocolo do fabricante. As amostras foram sequenciadas nas duas direções, *forward* e *reverse*, utilizando-se os mesmos *primers* da reação de PCR, L15.879 e H727, respectivamente. Nas amostras que apresentaram heteroplasmia de comprimento nas regiões HV1 ou HV2 foram usados adicionalmente os *primers* H16.548 e L16.413 (Tabela 3), respectivamente, em uma nova reação de sequenciamento para garantir a leitura de todas as bases dessas regiões.

Após as reações de sequenciamento, foi realizada eletroforese capilar com a utilização do sequenciador automático ABI3130 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA).

Tabela 3 - *Primers* utilizados no estudo para as reações de PCR e sequenciamento da região controladora do DNA mitocondrial

Primer	Região	Sequência	Direção
L15.879	HV 1	5'-AATGGGCCTGTCCTTGTAGT-3'	<i>Foward</i>
H16.548	HV 1	5'-GGGAACGTGTGGGCTATTTA-3'	<i>Reverse</i>
H727	HV 3	5'-AGGGTGAACCTCACTGGAACG-3'	<i>Reverse</i>
L16.413	HV 2	5'-TGAAATCAATATCCCGCACA-3'	<i>Foward</i>

As sequências individuais foram alinhadas e comparadas com a sequência padrão *Revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS) (21) utilizando o programa *BioEdit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Os polimorfismos são apresentados como sendo diferenças em relação à sequência referência rCRS. Todos os polimorfismos observados só foram considerados reais quando confirmados pelo sequenciamento da fita reversa e nomeados de acordo com as recomendações (18; 45-47).

Para definição final do haplótipo foi utilizado o programa *Haplosite* (<http://www.haplosite.com/haplosearch>) e, a partir dos haplótipos finais individuais, foi possível a classificação dos haplogrupos mitocondriais, utilizando o aplicativo *Haplogrep* (<http://haplogrep.uibk.ac.at>). Esse aplicativo é baseado em dados do site *Phylotree*, que utiliza algoritmos para a classificação automática dos haplogrupos mitocondriais. O programa apresenta como resultado a posição filogenética do respectivo haplogrupo, em forma de árvores filogenéticas, proporcionando assim, uma explicação detalhada de como e porque o indivíduo foi classificado naquele haplogrupo (48).

Para as análises das frequências dos polimorfismos encontrados e para conferir a existência de seus relatos anteriores, foi consultado o banco de dados do genoma mitocondrial humano, *MITOMAP* (24). Esse banco relata dados publicados e não publicados sobre as variações do mtDNA.

O sequenciamento e a análise dos polimorfismos da região controladora do mtDNA compreendendo as regiões HV1, HV2 e HV3 foram realizados em todas as amostras.

3.2.5. Análise estatística

As variáveis qualitativas foram descritas segundo grupos com uso de frequências absolutas e relativas e foi verificada a associação com os grupos com uso de testes qui-quadrado, teste da razão de verossimilhanças ou teste exato de Fisher. As variáveis contínuas foram descritas segundo grupos com uso de medidas resumo (média e desvio padrão) e comparadas entre os grupos com uso do teste *T-Student* ou teste Mann-Whitney (43). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de p menores que 0,05.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação Clínica

Foram incluídas 90 pacientes no grupo endometriose (EDT) e 92 no grupo controle (CT). A média etária das pacientes foi de $39,2 \pm 6,2$ anos no grupo EDT e de $40,1 \pm 9,8$ anos no grupo CT. Os grupos foram semelhantes quanto à idade, grau de instrução e cor de pele autodeclarada (Tabela 4).

As mulheres incluídas nos grupos endometriose eram, em sua maioria, casadas ou amasiadas (69,8%), de pele branca (49,4%) e sem comorbidades (63,3%). O grupo controle foi composto, em sua maioria, de mulheres casadas ou amasiadas (65,2%), de pele parda (46,2%) e sem comorbidades (64,1%). As principais comorbidades observadas foram hipertensão arterial (17,8% grupo endometriose vs. 21,7% grupo controle, respectivamente), diabetes melito tipo 2 (2,2% vs. 4,3%) e hipotireoidismo (3,3% vs. 1,0%). Quando comparadas ao grupo controle, as mulheres do grupo endometriose apresentaram menor número de gestações ($1,1 \pm 1,4$ vs. $2,0 \pm 1,7$; $p < 0,001$, respectivamente). No grupo controle, as pacientes usavam menos métodos contraceptivos hormonais, em comparação ao grupo endometriose (29,7% versus 44,9%; $p = 0,034$; Tabela 4).

Tabela 4 - Dados demográficos e clínicos das pacientes incluídas no estudo nos grupos controle (CT) e endometriose (EDT)

Variável	Grupo, n (%)		Total	p
	Controle (n=92)	EDT (n=90)		
Estado civil				
Solteira	27 (29,3)	21 (23,6)	48 (26,4)	0,116 ¹
Casada/ Amasiada	60 (65,2)	62 (69,7)	122 (67,0)	
Separada	2 (2,2)	6 (6,7)	8 (4,4)	
Viúva	3 (3,3)	0 (0)	3 (1,7)	
Instrução				
1º Grau	21 (22,8)	18 (20,2)	39 (21,5)	0,178 ¹
2º Grau	51 (55,4)	40 (44,9)	91 (50,3)	
Superior	20 (21,7)	31 (34,8)	51 (28,2)	
Cor de pele				
Branca	36 (39,6)	44 (49,4)	80 (44,4)	0,605 ¹
Parda	42 (46,2)	35 (39,3)	77 (42,8)	
Negra	12 (13,2)	9 (10,1)	21 (11,7)	
Amarela	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	
Anticoncepcional hormonal	27 (29,7)	40 (44,9)	67 (37,2)	0,034²
Sem comorbidades	59 (64,1)	57 (63,3)	116 (63,7)	0,911 ²
Tabagismo	9 (9,9)	5 (5,6)	14 (7,8)	0,285 ²
AF de endometriose	3 (3,3)	8 (9)	11 (6,1)	0,111 ²

AF: antecedente familiar. ¹Teste da razão de verossimilhanças; ²Teste qui-quadrado.

Foram incluídas no grupo controle mulheres submetidas à cirurgia por mioma uterino (47,8%, n = 44), laqueadura tubária (32,6%, n = 30), teratoma ovariano (14,1%, n = 13), cistoadenoma ovariano (3,3%, n = 3) e hidrossalpinge (2,2%, n = 2). No Gráfico 1 estão representadas as pacientes do grupo endometriose por tipo e estágio da ASRM da doença (2).

Gráfico 1 - Classificação da *American Society for Reproductive Medicine* e por tipo de lesão das pacientes incluídas no grupo endometriose (n=90)

ASRM: *American Society for Reproductive Medicine* (2).
 Fonte: Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, FMUSP.

As pacientes do grupo endometriose apresentaram como principal sintoma a dismenorreia (73,3%), seguido de dor pélvica crônica (56,7%). Os sintomas algícos típicos da doença ocorreram em maior frequência no grupo EDT quando comparados ao grupo CT para todos os sintomas avaliados. A dismenorreia foi classificada como severa ($EVA \geq 7$) em maior número de mulheres no grupo endometriose quando comparadas ao grupo controle (62,2% vs. 41,8%, $p = 0,006$). Os resultados se encontram resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Quadro clínico das pacientes incluídas nos grupos controle (CT) e endometriose (EDT)

Sintoma	Grupo, n (%)		Total	p*
	CT (n=92)	EDT (n=90)		
Infertilidade	5 (5,5)	23 (25,8)	28 (15,6)	<0,001
Dismenorreia (EVA $\geq$ 7)	38 (41,8)	56 (62,2)	94 (51,9)	0,006
Dispareunia de profundidade	28 (30,8)	48 (53,3)	76 (42)	0,002
Dor pélvica crônica	21 (23,1)	51 (56,7)	72 (39,8)	<0,001
Alterações intestinais	0 (0)	21 (23,3)	21 (11,6)	<0,001
Alterações urinárias	2 (2,2)	9 (10)	11 (6,1)	0,028

EVA: escala visual analógica de dor. *Teste qui-quadrado.

4.2. Análise Genética

Foram observados 205 polimorfismos diferentes na região controladora do mtDNA nas amostras avaliadas. Destes, 85,3% estavam localizados nas regiões hipervariáveis: 120 (58,5%) na HV1, 35 (17,0%) na HV2 e 20 (9,7%) na HV3 (Apêndices A e B).

As heteroplasmias encontradas estão resumidas na Tabela 6. Foram observadas heteroplasmias de ponto em dois indivíduos do grupo endometriose e dois do grupo controle, todas na posição 73 (A/G), sem diferença entre os grupos (2,2% vs. 2,2%, respectivamente; $p > 0,999$). A heteroplasmia de comprimento foi a forma mais comum das heteroplasmias nas mulheres incluídas. Na região HV1, a transição de T para C na posição 16.189 (T16.189C) ocorreu em 43,3% ($n = 39$) das pacientes no grupo endometriose e 34,0% ($n = 37$) no grupo controle, sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,450$). A combinação do polimorfismo T16.189C com a inserção de Cs na posição 16.193 foi também semelhante entre os grupos avaliados (Tabela 6, Figura 8). Nas regiões HV2 e HV3 também foram observadas heteroplasmias de comprimento, nas posições 310, 315, 523 e 524, com frequências semelhantes entre os grupos avaliados (Tabela 6). Alguns exemplos estão nas Figuras 9 e 10. Na posição 573, a inserção de 2 citosinas foi observada em maior frequência no grupo controle (29,3%) em comparação ao grupo endometriose (5,6%).

Tabela 6 - Análise estatística das heteroplasmias da região controladora do DNA mitocondrial encontradas nos grupos controle (CT) e endometriose (EDT)

Heteroplasmia			Grupo, n(%)		p*
Tipo	Região	Localização	CT (n=92)	EDT (n=90)	
Ponto	HV3	73 A/G	2 (2,2)	2 (2,2)	>0,999
Comprimento	HV1	16.182C	3 (3,3)	4 (4,4)	0,719
		16.189C	34 (37,0)	39 (43,3)	0,450
		16.188C.1C	2 (2,2)	7 (7,8)	0,098
		16.188C.2C	24 (26,1)	22 (24,4)	0,865
Comprimento	HV2	310.1C	44 (47,8)	48 (53,3)	0,463
		310.2C	5 (5,4)	10 (11,1)	0,187
		315.1C	89 (96,7)	90 (100)	0,246
Comprimento	HV3	524.1AC	1 (1,1)	2 (2,2)	0,619
		524.2AC	0 (0)	2 (2,2)	0,243
		523del	35 (38,0)	31 (34,4)	0,646
		524del	35 (38,0)	31 (34,4)	0,646
		573.1C	4 (4,3)	0 (0)	0,121
		573.2C	27 (29,3)	5 (5,6)	<0,001

*Teste Qui-quadrado.

Figura 8 - Eletroferogramas de indivíduos com heteroplasmia de comprimento na região 16.193 e transição no nucleotídeo 16.189

As setas pretas indicam a heteroplasmia de comprimento e as setas vermelhas a heteroplasmia de ponto.

A: inserção de 1C na posição 16.193. B: inserção de 2Cs na posição 16.193.

Fonte: Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho, FMUSP.

Figura 9 - Eletroferogramas apresentando indivíduos com heteroplasmia de comprimento na região HV2, posição 309 e inserção de 1C na posição 315

A: inserção de 1C na posição 309 e 1C na posição 315. B: inserção de 2Cs na posição 309 e 1C na posição 315.

Fonte: Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho, FMUSP.

Figura 10 - Heteroplasmia de comprimento na região HV3, entre os nucleotídeos 515 e 524

A: Indivíduo com adição de um AC na posição 524 (AC₆). B: Indivíduo com adição de 2 ACs na posição 524 (AC₇).

Fonte: Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho, FMUSP.

Uma paciente com diagnóstico de teratoma ovariano apresentou uma duplicação de 15 nucleotídeos na região HV1, da posição 16.032 à 16.118 (TCTCTGTTCTTTTCAT), representada na Figura 11, pertencente ao haplogrupo africano L1C2.

Figura 11 - Duplicação de 15 nucleotídeos entre as posições 16.018 e 16.032 do DNA mitocondrial

A: Eletroferograma de um indivíduo mostrando a sequência normal entre as posições 16.018 e 16.032 (colchetes). B: Eletroferograma mostrando a sequência de nucleotídeos de uma paciente com teratoma ovariano com duplicação de 15 nucleotídeos entre as posições 16.018 e 16.032 (colchetes).

Na Tabela 7 estão destacados os polimorfismos com diferença estatisticamente significativa entre os grupos: 4 deles relacionados com a presença de endometriose (G185A, T236C, G499A e T16.217C) e um (T146C) associado à ausência de doença. Além disso, encontram-se listados a frequência dos polimorfismos A189G e 310C, relacionados previamente à endometriose por outros autores, que, no entanto, tiveram frequência semelhante entre os grupos em nossa amostra.

Tabela 7 - Polimorfismos na região controladora do DNA mitocondrial nos grupos controle (CT) e endometriose (EDT)

Posição	rCRS	SNP	Grupo, n(%)		Total, n(%)	p [*]
			CT (n=92)	EDT (n=90)		
146	T	C	30 (32,6)	17 (18,9)	47 (25,8)	0,042
185	G	A	0 (0)	6 (6,7)	6 (3,3)	0,013
236	T	C	0 (0)	5 (5,6)	5 (2,7)	0,028
499	G	A	4 (4,3)	12 (13,3)	16 (8,8)	0,038
16.217	T	C	5 (5,4)	13 (14,4)	18 (9,9)	0,049
189	A	G	11 (12)	12 (13,3)	23 (12,6)	0,826
310	-	1C	44 (47,8)	48 (53,3)	92 (50,5)	0,463
310	-	2C	5 (5,4)	10 (11,1)	15 (8,2)	0,187

*Teste exato de Fisher; rCRS: sequência referência de Cambridge revisada (21); SNP: *single nucleotide polymorphism* ou polimorfismo de base única.

Na amostra total foram encontrados 182 haplótipos. Desses, 180 foram únicos e 2 comuns a mais de um indivíduo. A distribuição dos haplogrupos mitocondriais foi semelhante entre os grupos e está resumida na Tabela 8. Os resultados mostraram que das 92 pacientes do grupo controle, 48,9% pertenciam a haplogrupos africanos, 30,4% a haplogrupos ameríndios, 19,6% europeus e 1,1% asiáticos. No grupo endometriose, a maioria das pacientes apresentou haplogrupo africano (40,0%), seguidas do ameríndio (33,3%), europeu (21,1%) e asiático (5,6%).

Tabela 8 - Distribuição e análise estatística dos haplogrupos mitocondriais nos grupos controle (CT) e endometriose (EDT)

Haplogrupo	Grupo, n(%)		Total	p*
	CT (n=92)	EDT (n=90)		
Africano	45 (48,9)	36 (40)	81 (44,5)	0,263
Ameríndio	28 (30,4)	30 (33,3)	58 (31,9)	
Europeu	18 (19,6)	19 (21,1)	37 (20,3)	
Asiático	1 (1,1)	5 (5,6)	6 (3,3)	

*Teste da razão de verossimilhanças.

A distribuição dos subhaplogrupos mitocondriais foi semelhante entre os grupos endometriose e controle (Apêndice C). No grupo endometriose, não houve diferença nos haplogrupos entre os estádios da ASRM e os tipos de lesão (Tabela 9). Na avaliação do grupo controle, a distribuição também foi semelhante por tipo de doença tratada ou laqueadura tubária (Tabela 10).

Tabela 9 - Distribuição dos haplogrupos mitocondriais por estágio e tipo de lesão no grupo endometriose

Variável	Haplogrupo, n(%)				Total (n=90)	p*
	Africano (n=36)	Ameríndio (n=30)	Europeu (n=19)	Asiático (n=5)		
Estádio ASRM						
I - II	6 (16,7)	4 (13,3)	7 (36,8)	1 (20)	18 (20)	0,255
III - IV	30 (83,3)	26 (86,7)	12 (63,2)	4 (80)	72 (80)	
Tipo EDT						
Superficial	5 (13,9)	5 (16,7)	6 (31,6)	1 (20)	17 (18,9)	0,310
Ovariana	1 (2,8)	0 (0)	1 (5,3)	1 (20)	3 (3,3)	
Profunda	30 (83,3)	25 (83,3)	12 (63,2)	3 (60)	70 (77,8)	

ASRM: *American Society for Reproductive Medicine*; EDT: endometriose; *Teste da razão de verossimilhanças.

Tabela 10 - Distribuição dos haplogrupos mitocondriais por subgrupo no grupo controle

Diagnóstico	Haplogrupo, n(%)				Total (n=92)	p*
	Africano (n=45)	Ameríndio (n=28)	Europeu (n=18)	Asiático (n=1)		
Laqueadura	15 (33,3)	6 (21,4)	8 (44,4)	1 (100)	30 (32,6)	0,375
Mioma	23 (51,1)	14 (50)	7 (38,9)	0 (0)	44 (47,8)	
Teratoma	5 (11,1)	6 (21,4)	2 (11,1)	0 (0)	13 (14,1)	
Cistoadenoma	2 (4,4)	0 (0)	1 (5,6)	0 (0)	3 (3,3)	
Hidrossalpinge	0 (0)	2 (7,1)	0 (0)	0 (0)	2 (2,2)	

*Teste da razão de verossimilhanças.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Endometriose é uma doença ginecológica benigna, caracterizada por sintomas dolorosos intensos, relacionados ao período menstrual (49). Há evidências crescentes de que o estresse oxidativo está envolvido na sua patogênese (11; 12). Dessa forma, os polimorfismos na região controladora do mtDNA podem levar à alteração na replicação e transcrição dos genes mitocondriais, afetando a função mitocondrial e a geração intracelular de espécies reativas de oxigênio (12). Estudos recentes sugerem que os polimorfismos do mtDNA estão relacionados à endometriose (17; 36; 37).

No presente trabalho realizamos o sequenciamento e a identificação dos polimorfismos e haplogrupos da região controladora do mtDNA em mulheres com e sem endometriose.

Dados clínicos e epidemiológicos

Em nosso estudo, incluímos pacientes com endometriose confirmada histologicamente e, em aproximadamente 70% dos casos, o acometimento era do tipo profundo, sendo 70% estádios III-IV da ASRM (2).

Os sintomas foram prevalentes e acometeram a maioria das pacientes com endometriose incluídas, sendo a dismenorreia o mais importante deles, afetando 73,3% das mulheres, com intensidade classificada como severa em 62,2% dos casos. Todos os sintomas dolorosos tipicamente relacionados à endometriose foram mais prevalentes no grupo EDT em comparação ao grupo controle (4). Alguns autores, de forma concordante com nosso trabalho, já demonstraram a correlação da presença e intensidade dos sintomas com a doença, podendo chegar a uma prevalência de 62,9% de dismenorreia nas pacientes com endometriose profunda (4; 50; 51).

Em casais inférteis, 54% podem apresentar endometriose e, entre mulheres com endometriose, a prevalência de infertilidade é de aproximadamente 35% (1; 52; 53). Esses resultados são comparáveis aos obtidos em nossa amostra, na qual o grupo endometriose apresentou maior frequência de infertilidade conjugal (25,8% vs. 5,5%) e número de gestações menor ($1,1 \pm 1,4$ vs. $2,0 \pm 1,7$ gestações) em comparação ao grupo controle.

O tratamento dos sintomas da endometriose baseia-se no bloqueio ovulatório com o uso de contraceptivos hormonais, buscando, assim, a supressão hormonal dos focos de doença e diminuição da inflamação local (54). O principal objetivo desse tratamento é a melhora da qualidade de vida, relacionada à melhora do quadro clínico, estabilização da lesão e diminuição da taxa de recorrência da doença. O contraceptivo hormonal é a primeira linha no tratamento dos sintomas dolorosos relacionados à endometriose, tem baixo custo e é de fácil acesso, além de promover o planejamento familiar (49). Dessa forma, é esperada uma alta prevalência do uso de tratamento hormonal nas pacientes com endometriose que, em nossa casuística, foi observado em quase metade das pacientes com a doença.

Quanto ao grupo controle, este foi representado em 48% por mulheres portadoras de mioma uterino e 50% por laqueadura tubária ou cistoadenoma de ovário. Os miomas são os tumores ginecológicos mais frequentes em mulheres em idade reprodutiva e podem acometer até 77% das mulheres (55). Dentre os fatores de risco no seu desenvolvimento estão etnia, idade e obesidade (55). Tipicamente, esses tumores são hormônio-dependentes, surgindo durante o período reprodutivo. Estudos GWAS (*genome-wide association studies*) demonstraram que genes nucleares estão associados aos miomas uterinos; porém, até o presente momento, nenhum polimorfismo ou alteração na expressão do mtDNA foi identificado (55).

Pejić *et al.* (56), em 2009, compararam o *stress* oxidativo em amostras de endométrio de pacientes com miomas uterinos, pólipos endometriais, hiperplasia de endométrio e câncer endometrial. Os resultados mostraram que os miomas uterinos têm atividade oxidativa diminuída e atividade anti-oxidativa aumentada em relação às doenças pré-malignas e malignas (56). De forma inversa, estudo de Ota H *et al.* (57), mostrou que a atividade da enzima catalase é aumentada no endométrio tóxico e nas lesões de pacientes com endometriose e adenomiose, mostrando um aumento da atividade oxidativa. Dessa forma, tendo como limitação o número de pacientes submetidas a laqueadura tubária em nosso serviço, o fato de que não há evidência de que os miomas uterinos estão relacionados ao *stress* oxidativo e baseado na análise por subgrupo do grupo controle, que não demonstrou diferença significativa na frequência de

polimorfismos e haplogrupos mitocondriais (Tabela 10), a inclusão de pacientes submetidas à cirurgia por leiomioma uterino no grupo controle parece se justificar.

Polimorfismos do DNA mitocondrial

Os polimorfismos mitocondriais herdados, como aqueles que definem os haplogrupos mitocondriais, podem afetar diretamente o metabolismo oxidativo intracelular e a susceptibilidade a doenças (58). Em nosso estudo, encontramos diferença significativa entre as mulheres com e sem endometriose e a presença dos polimorfismos T146C, G185A, T236C, G499A, 573.2C e T16.217C, os quais serão detalhados a seguir.

Posição 146

O polimorfismo T146C é característico do haplogrupo mitocondrial africano L2 e foi observado em maior frequência no grupo controle (32,6%), em comparação ao grupo endometriose (18,9%; $p = 0,042$). Govatati *et al.*, em 2013 (1), reportaram frequência também maior no grupo controle (22,7%) em comparação ao grupo endometriose (15,8%), porém sem diferença estatisticamente significativa.

Alguns estudos já relacionaram a presença desse polimorfismo como fator de risco independente em algumas neoplasias, como linfoma não-Hodking e carcinoma hepatocelular (59-61). No entanto, no que concerne doenças ginecológicas, esse é o primeiro relato da literatura. Apesar de ser considerada uma doença benigna, a endometriose muitas vezes tem um comportamento semelhante aos tumores malignos, como invasão e destruição de tecidos, disseminação linfo-hemática e implantação à distância (62). Além disso, as lesões de endometriose podem ter expressão desregulada de genes como o *Connective Tissue Growth Factor*, *p53* e *MYC*, os quais já foram descritos em vias de sinalização do câncer, atuando na adesão celular, facilitação de metástases e contribuição ao processo de malignização das células (63).

Posição 185

O polimorfismo G185A foi observado em nossa amostra em 6 (6,7%) mulheres com endometriose e nenhuma paciente do grupo controle ($p = 0,01$). De forma semelhante, Govatati *et al.* (17) reportaram uma baixa frequência desse polimorfismo, identificado em apenas 0,6% das pacientes com endometriose (1/152) e nenhuma do grupo controle (0/150).

O polimorfismo G185A pertence aos haplogrupos J1b1a1d e J1C. O haplogrupo J é identificado em aproximadamente 12% das populações nativas da Europa, sendo o subhaplogrupo J1 o mais frequente, em torno de 80%, e espalhado uniformemente por todo o continente europeu (64). O polimorfismo G185A não foi associado a nenhuma doença até o presente momento, no entanto, o haplogrupo mitocondrial J1 já foi relacionado com o aumento de 2,4 vezes na incidência de diabetes melito tipo 2 e com o aumento da penetrância da Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (65; 66).

Posição 236

O polimorfismo T236C foi observado apenas em mulheres com endometriose em nosso estudo ($n = 5$, 5,6%; $p = 0,028$). Esse polimorfismo é característico do haplogrupo mitocondrial L0 e já foi associado à Síndrome de Leigh, caracterizada pela deficiência isolada do Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (67). Não há dados na literatura que correlacionem esse polimorfismo com endometriose ou outras doenças ginecológicas até o presente momento.

Posição 499

A troca de G por A na posição 499 esteve significativamente associada à presença de endometriose em nosso trabalho (13,3% versus 4,3%; $p = 0,03$). Esse polimorfismo é característico do haplogrupo mitocondrial U4, concentrado principalmente nas populações europeias. Embora o polimorfismo G499A não tenha sido descrito em nenhuma doença até o momento, o haplogrupo U4 foi relacionado com maior proteção contra acidente vascular cerebral (68) e diminuição da velocidade de progressão da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (69).

Posição 573

Em nossa amostra, observamos frequência menor da inserção de duas citosinas na posição 573 (573.2C) em mulheres com endometriose em relação ao grupo controle (5,6% vs. 29,3%; $p < 0,001$). Nessa posição, tipicamente pode ocorrer a heteroplasmia de comprimento, definida pela coexistência de pelo menos duas populações de moléculas de mtDNA em um extrato de DNA que diferem no número de nucleotídeos e, portanto, no seu comprimento (23). Em geral, as heteroplasmas são observadas em trechos homopoliméricos que ocorrem em grande frequência entre as posições 16,024–16,365, 73–340 e 438–574 (23).

A relevância biológica das heteroplasmas ainda não é completamente compreendida. Sabe-se que os tecidos de um mesmo indivíduo podem apresentar diferentes heteroplasmas de comprimento, o que poderia determinar diferentes fenótipos. Além disso, o acúmulo de heteroplasmas ao longo das gerações pode levar ao aparecimento de determinadas doenças, como miopatia mitocondrial ácido láctico e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral, síndrome de Kearns–Sayre e epilepsia mioclônica com fibras rotas vermelhas (70).

Futuramente, a avaliação destas heteroplasmas em amostras de endométrio tópico e ectópico poderá trazer novas informações para a patogênese da endometriose.

Posição 16217

O polimorfismo T16.217C pertencente ao haplogrupo B4, característico do sul da Ásia, foi observado em frequência maior no grupo endometriose (14,4%) em comparação ao controle (5,4%; $p = 0,049$). Em estudo de 2013, com população coreana (17), este mesmo polimorfismo foi observado em frequência menor que a nossa: 1,9% das pacientes com endometriose e 0,7% daquelas sem a doença, sem diferença significativa entre os grupos.

Outras doenças relacionadas ao *stress* oxidativo, como diabetes melito, também já foram relacionadas à presença do T16.217C (71).

Posição 10.018

Observamos uma duplicação de 15 pb potencialmente patogênica na região HV1 do mtDNA, entre os nucleotídeos 16.018 e 16.032, em uma paciente do grupo controle com teratoma ovariano maduro. Essa duplicação engloba parte do gene *mitochondrially encoded tRNA proline (MT-TP gene)*, que é compreendido entre as posições 15.955 e 16.023 do mtDNA e que codifica o MT-TP, um RNA pequeno, não codificador, de 68 nucleotídeos (19; 26). Outras mutações nesse gene já foram reportadas em pacientes com epilepsia mioclônica com fibras rotas vermelhas (72), retinose pigmentar (73), surdez (73), miopatias (74) e cardiomiopatia dilatada (26).

As duplicações mitocondriais acometem principalmente a região controladora (*D-loop*). A mais comum é uma duplicação de 260 pb entre os nucleotídeos 308 e 567, reportada em pacientes com miopatia mitocondrial (75). Duplicações já foram relatadas também em pacientes com diferentes tipos de câncer, dentre eles gástrico, mamário, hepatocelular, cólon e pulmonar (76), além de oftalmoplegia crônica progressiva externa (77; 78), síndrome de Kearns-Sayre (79) e síndrome de Pearson (80).

Os teratomas são tumores nos quais estão presentes os tipos celulares representativos das três camadas germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme) e são as neoplasia ovarianas benignas mais comuns, com incidência de 20 a 25% (81; 82). Além disso, a capacidade de formação de teratomas representa um marcador da pluripotência no estudo de indução da formação de células tronco pluripotentes (iPSCs), que são derivadas de células adultas somáticas (83; 84). As iPSCs são semelhantes às células-tronco pluripotentes naturais em muitos aspectos, tais como a expressão de genes e proteínas, padrões de metilação da cromatina e tempo de duplicação (85). Existem poucos estudos sobre o papel do metabolismo mitocondrial no mecanismo biológico das células-tronco e estes demonstraram que aquelas células que apresentam baixa taxa de consumo de oxigênio a nível mitocondrial tem uma capacidade reduzida de formar teratomas (85; 86).

A duplicação encontrada em nosso trabalho é inédita em pacientes com teratoma ovariano. Outrossim, já foi relatada previamente por nosso grupo em um indivíduo com cardiomiopatia dilatada (26). Ambos indivíduos foram

classificados como pertencentes ao haplogrupo L1c2, de forma que a duplicação pode tratar-se de uma mutação rara por efeito fundador comum aos dois pacientes.

Posições 189, 310 e 16.189

No presente estudo não encontramos associação entre endometriose e os polimorfismos T16.189C, A189G e 310C, previamente reportada nas populações coreana e indiana (17; 36).

A frequência do polimorfismo A189G em nossa amostra foi de 13,3% no grupo endometriose, enquanto na população indiana, essa frequência chegou a 41% de mulheres com a doença (17). No grupo sem endometriose, a frequência que observamos do A189G foi de 12,0%, pouco menor do que a reportada por outros autores, de 17% (17).

A inserção de uma citosina na posição 310 (310C) foi observada no nosso estudo em 53,3% das pacientes incluídas com endometriose e 47,8% daquelas sem endometriose, sem diferença estatisticamente significativa. Essa frequência foi diferente daquela reportada por Govatati *et al.*, em 2013, que observaram maior prevalência desse polimorfismo em pacientes com a doença (33,5% vs. 22,7%; $p < 0,05$) (17).

A substituição do nucleotídeo T pelo C na posição 16.189 não esteve associada a presença de endometriose em nossa casuística, resultado oposto daquele encontrado por outros autores (17; 36). A frequência desse polimorfismo em nossa amostra de mulheres com endometriose foi de 43,3%, semelhante à reportada na população coreana (45,9%), porém maior que a reportada na população indiana (27,0%). Por outro lado, nas mulheres sem endometriose, encontramos frequência de 37,0%, superior à reportada em ambos os estudos (34,7% e 11,3%, respectivamente) (17; 36).

Haplogrupos mitocondriais

A ancestralidade mitocondrial é diretamente relacionada com o processo de migração das populações, de forma que se observa uma distribuição não homogênea nas diferentes regiões do Brasil, fruto do processo de colonização. Na região Nordeste predomina a ancestralidade mitocondrial africana, resultado

da imigração dos escravos africanos; na região Norte, predomina a ancestralidade ameríndia, proveniente da ocupação dos povos indígenas sul-americanos; enquanto nas regiões Sul e Sudeste predomina a ancestralidade europeia, proveniente dos colonos europeus (87-89).

Em nosso trabalho, observamos maior prevalência do haplogrupo mitocondrial africano (44,5%), seguido do ameríndio (31,9%), europeu (20,3%) e asiático (3,3%). Essa proporção foi semelhante à relatada por outros autores em indivíduos brasileiros do estado de São Paulo (90-92).

Não encontramos associação significativa de nenhuma das ancestralidades ou haplogrupos mitocondriais com a presença de endometriose, estágio da ASRM ou por subtipo da doença (superficial, ovariana ou profunda). Esse resultado foi diferente do de Govatati *et al.*, em população indiana, que encontraram uma frequência maior dos haplogrupos mitocondriais M5 e N em mulheres com endometriose em relação aos controles (37; 41). O haplogrupo M5 é específico do sul asiático e não foi observado em nenhuma paciente em nossa amostra, enquanto o haplogrupo N é derivado do haplogrupo L3, distribuído pelo norte da África, Eurásia e Oceania, e foi observado em apenas 6 pacientes (3,2%) em nossa casuística (93; 94).

Considerações finais

O presente estudo avaliou de forma inédita da associação dos polimorfismos e haplogrupos da região controladora do mtDNA com endometriose no Brasil. As limitações deste trabalho encontram-se principalmente na heterogeneidade do subgrupo das pacientes incluídas que, por serem recrutadas em um hospital terciário, no grupo endometriose incluíram em sua maioria doenças do tipo profundo e estágios avançados e, no grupo controle, incluiu doenças do trato genital feminino, como mioma uterino e teratoma ovariano em aproximadamente metade dos casos.

Os resultados encontrados mostraram associação de determinados polimorfismos do mtDNA com a presença de endometriose em mulheres brasileiras que diferiram, porém, de estudos realizados previamente em populações homogêneas da Coreia e Índia. Vale ressaltar, que estudos genéticos na população brasileira são particularmente desafiadores, uma vez

que esta possui múltiplas ancestralidades e alta miscigenação. Tais resultados díspares suscitam a questão de fisiopatologias diferentes, multifatoriais, concorrendo para uma via final comum, a endometriose. Ademias, tendo em vista que até o presente momento poucos estudos foram conduzidos nessa temática e que a frequência das mutações do mtDNA são específicas para cada região geográfica, para a generalização dos resultados, faz-se necessária a avaliação do mtDNA em mulheres com endometriose em diferentes populações e regiões do Brasil e do mundo. Não obstante, na era da medicina de precisão, caracterizada pelo uso de análises genômicas para o desenvolvimento de diagnósticos e tratamentos direcionados para cada paciente, estudos em pesquisa básica são fundamentais não apenas para aprofundar nosso entendimento sobre a fisiopatologia de doenças complexas, como também para servir de fundamento para novos potenciais alvos terapêuticos, dando a esperança aos nossos pacientes de sempre melhorar e direcionar seus cuidados, especialmente para uma doença prevalente e debilitante como a endometriose.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os polimorfismos G185A, T236C, G499A e T16217C da região controladora do DNA mitocondrial foram associados com a presença de endometriose em amostra de mulheres brasileiras, enquanto os polimorfismos T146C e 573.2C foram associados com a ausência da doença. Não houve diferença significativa entre a ancestralidade ou haplogrupos mitocondriais e a presença, estágio da ASRM ou tipo de endometriose.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

1. von Theobald P, Cottenet J, Iacobelli S, Quantin C. Epidemiology of Endometriosis in France: A Large, Nation-Wide Study Based on Hospital Discharge Data. *Biomed Res Int*. 2016;2016:3260952.
2. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis (1996). *Fertil Steril*. 1997; 67(5):817-21.
3. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*. 1997; 68(4):585-96.
4. 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.
5. Halis G, Mechsner S, Ebert AD. The diagnosis and treatment of deep infiltrating endometriosis. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(25):446-55.
6. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14:422-69.
7. Podgaec S, Dias Junior JA, Chapron C, Oliveira RM, Baracat EC, Abrão MS. Th1 and Th2 immune responses related to pelvic endometriosis. *Rev Assoc Med Bras*. 2010; 56(1):92-8.
8. Podgaec S, Rizzo LV, Fernandes LF, Baracat EC, Abrao MS. CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) cells increased in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2012; 68(4):301-8.

*De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

9. Fairbanks F, Abrão MS, Podgaec S, Dias JA Jr, de Oliveira RM, Rizzo LV. Interleukin-12 but not interleukin-18 is associated with severe endometriosis. *Fertil Steril*. 2009; 91(2):320-4.
10. Kobayashi H, Imanaka S, Nakamura H, Tsuji A. Understanding the role of epigenomic, genomic and genetic alterations in the development of endometriosis (review). *Mol Med Rep*. 2014; 9(5):1483-505.
11. Turkyilmaz E, Yildirim M, Cendek BD, Baran P, Alisik M, Dalgaci F, *et al*. Evaluation of oxidative stress markers and intra-extracellular antioxidant activities in patients with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016;199:164-8.
12. Szczepańska M, Koźlik J, Skrzypczak J, Mikołajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril*. 2003; 79(6):1288-93.
13. Wallace DC. Mitochondrial DNA variation in human radiation and disease. *Cell*. 2015;163(1):33-8.
14. Srinivasan S, Guha M, Kashina A, Avadhani NG. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Jan 16. pii: S0005-2728(17)30005-1.
15. Ferreira M, Aguiar T, Vilarinho L. Cadeia Respiratória Mitochondrial. Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Défice do Complexo I. *Arq Med*. 2008;22(2/3):49-56.
16. Clayton DA. Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Hum Reprod*. 2000;15(2):11-7.
17. Govatati S, Deenadayal M, Shivaji S, Bhanoori M. Mitochondrial displacement loop alterations are associated with endometriosis. *Fertil Steril*. 2013 ;99(7):1980-6.
18. Lee HR, Johnson KA. Fidelity of the human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem*. 2006; 81(47):36236-40.
19. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, *et al*. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290(5806):457-65.

20. White DJ, Wolff JN, Pierson M, Gemmell NJ. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Mol Ecol*. 2008; 17(23):4925-42.
21. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999; 23(2):147.
22. Jin L, Su B. Natives or immigrants: modern human origin in east Asia. *Nat Rev Genet*. 2000;1(2):126-33.
23. Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet*. 2015; 16(9):530-42.
24. Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, Wallace DC. MITOMAP: a human mitochondrial genome database (2004). *Nucleic Acids Res*. 2005; 33:D611-3.
25. Montiei-Sosa F, Ruiz-Pesini E, Enríquez JA, Marcuello A, Díez-Sánchez C, Montoya J, Wallace DC, López-Pérez MJ. Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages. *Gene*. 2006; 368:21–27.
26. Cardena MM, Mansur AJ, Pereira Ada C, Fridman C. A new duplication in the mitochondrially encoded tRNA proline gene in a patient with dilated cardiomyopathy. *Mitochondrial DNA*. 2013; 24(1):46-9.
27. Behar DM, Villems R, Soodyall H, Blue-Smith J, Pereira L, Metspalu E, *et al*. The dawn of human matrilineal diversity. *Am J Hum Genet*. 2008; 82(5):1130-40.
28. Aral C, Akkiprik M, Caglayan S, Atabey Z, Ozişik G, Bekiroglu N, *et al*. Investigation of relationship of the mitochondrial DNA 16189 T>C polymorphism with metabolic syndrome and its associated clinical parameters in Turkish patients. *Hormones (Athens)*. 2011; 10(4):298-303.
29. Maggrah A, Robinson K, Creed J, Wittock R, Gehman K, Gehman T, *et al*. Paired ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer lesions in the D-loop of the mitochondrial genome indicate a cancerization field effect. *Biomed Res Int*. 2013;2013:379438.

30. Tang DL, Zhou X, Li X, Zhao L, Liu F. Variation of mitochondrial gene and the association with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006; 73(1):77-82.
31. Holland MM, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence analysis-validation and use for forensic casework. *Forensic Sci Ver.* 1999;11:21-50.
32. Stefano GB, Kream RM. Mitochondrial DNA heteroplasmy in human health and disease. *Biomed Rep.* 2016;4(3):259-262.
33. Krjutškov K, Koltšina M, Grand K, Võsa U, Sauk M, Tõnisson N, Salumets A. Tissue-specific mitochondrial heteroplasmy at position 16,093 within the same individual. *Curr Genet.* 2014 Feb;60(1):11-6.
34. Chung U, Lee HY, Yoo JE, Park MJ, Shin KJ. Mitochondrial DNA CA dinucleotide repeats in Koreans: the presence of length heteroplasmy. *Int J Legal Med.* 2005;119(1):50-3.
35. Shen J, Wan J, Song R, Zhao H. Length heteroplasmies in human mitochondrial DNA control regions and breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 2015;36(11):1307-13.
36. Cho S, Lee YM, Choi YS, Yang HI, Jeon YE, Lee KE, *et al.* Mitochondria DNA polymorphisms are associated with susceptibility to endometriosis. *DNA Cell Biol.* 2012; 31(3):317-22.
37. Govatati S, Tipiriseti NR, Perugu S, Kodati VL, Deenadayal M, Satti V, *et al.* Mitochondrial genome variations in advanced stage endometriosis: a study in South Indian population. *PLoS One.* 2012;7(7):e40668.
38. Wang Y, Liu VW, Tsang PC, Chiu PM, Cheung AN, Khoo US, *et al.* Microsatellite instability in mitochondrial genome of common female cancers. *Int J Gynecol Cancer.* 2006; 16(1):259-66.
39. Kao SH, Huang HC, Hsieh RH, Chen SC, Tsai MC, Tzeng CR. Oxidative damage and mitochondrial DNA mutations with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1042:186-94.

40. Shu J, Xing L, Ding G, Luo Q, Liu X, Yan Q, Sheng J, Huang H. The effect of peritoneal fluid from patients with endometriosis on mitochondrial function and development of early mouse embryos. *PLoS One*. 2013; 8(12):e82334.
41. Govatati S, Deenadayal M, Shivaji S, Bhanoori M. Mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase alterations are associated with endometriosis. *Mitochondrion*. 2013;13(6):782-90.
42. Mueller EE, Eder W, Ebner S, Schwaiger E, Santic D, Kreindl T, *et al*. The mitochondrial T16189C polymorphism is associated with coronary artery disease in Middle European populations. *PLoS One*. 2011; 6(1):e16455.
43. Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA, 2006;502.
44. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3):1215.
45. Bandelt HJ, Parson W. Consistent treatment of length variants in the human mtDNA control region: a reappraisal. *Int J Legal Med*. 2008; 122(1):11-21 ил.
46. Salas A, Carracedo A, Macaulay V, Richards M, Bandelt HJ. A practical guide to mitochondrial DNA error prevention in clinical, forensic, and population genetics. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 335(3):891-9.
47. Wilson MR, Allard MW, Monson K, Miller KW, Budowle B. Recommendations for consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region. *Forensic Sci Int*. 2002; 129(1):35-42.
48. van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat*. 2009; 30(2):E386-94.
49. Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C, Calhaz-Jorge C, D'Hooghe T, De Bie B, *et al*. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. (European Society of Human Reproduction and Embryology). *Hum Reprod*. 2014; 29(3):400-12.

50. Dai Y, Leng JH, Lang JH, Li XY, Zhang JJ. Anatomical distribution of pelvic deep infiltrating endometriosis and its relationship with pain symptoms. *Chin Med J (Engl)*. 2012; 125(2):209-13.
51. Seracchioli R, Mabrouk M, Guerrini M, Manuzzi L, Savelli L, Frascà C, *et al*. Dyschezia and posterior deep infiltrating endometriosis: analysis of 360 cases. *J Minim Invasive Gynecol*. 2008;15(6):695-9.
52. de Oliveira R, Adami F, Mafra FA, Bianco B, Vilarino FL, Barbosa CP. Causes of endometriosis and prevalent infertility in patients undergoing laparoscopy without achieving pregnancy. *Minerva Ginecol*. 2016; 68(3):250-8.
53. Santulli P, Lamau MC2, Marcellin L, Gayet V, Marzouk P, Borghese B, *et al*. Endometriosis-related infertility: ovarian endometrioma per se is not associated with presentation for infertility. *Hum Reprod*. 2016; 31(8):1765-75.
54. Vercellini P, Frontino G, Pietropaolo G, Gattei U, Daginati R, Crosignani PG. Deep endometriosis: definition, pathogenesis, and clinical management. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*. 2004;11(2):153-61.
55. Sparic R, Mirkovic L, Malvasi A, Tinelli A. Epidemiology of Uterine Myomas: A Review. *Int J Fertil Steril*. 2016; 9(4):424-35.
56. Pejić S, Todorović A, Stojiljković V, Kasapović J, Pajović SB. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in endometrium of patients with polyps, myoma, hyperplasia and adenocarcinoma. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 7:149.
57. Ota H, Igarashi S, Sato N, Tanaka H, Tanaka T. Involvement of catalase in the endometrium of patients with endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril*. 2002; 78(4):804-9.
58. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, Martínez-Romero I, López-Gallardo E, López-Pérez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822(8):1216-22.
59. DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1658(1-2):80-8.

60. Blakely EL, Yarham JW, Alston CL, Craig K, Poulton J, Brierley C, *et al.* Pathogenic mitochondrial tRNA point mutations: nine novel mutations affirm their importance as a cause of mitochondrial disease. *Hum Mutat.* 2013; 34(9):1260-8.
61. Hardy SA, Blakely EL, Purvis AI, Rocha MC, Ahmed S, Falkous G, *et al.* Pathogenic mtDNA mutations causing mitochondrial myopathy: The need for muscle biopsy. *Neurol Genet.* 2016; 2(4):e82.
62. Brockington M, Sweeney MG, Hammans SR, Morgan-Hughes JA, Harding AE. A tandem duplication in the D-loop of human mitochondrial DNA is associated with deletions in mitochondrial myopathies. *Nat Genet.* 1993; 4(1):67-71.
63. Hung WY, Lin JC, Lee LM, Wu CW, Tseng LM, Yin PH, *et al.* Tandem duplication/triplication correlated with poly-cytosine stretch variation in human mitochondrial DNA D-loop region. *Mutagenesis.* 2008; 23(2):137-42.
64. Van Goethem G, Luoma P, Rantamäki M, Al Memar A, Kaakkola S, Hackman P, *et al.* POLG mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement. *Neurology.* 2004; 63(7):1251-7.
65. Van Goethem G, Dermaut B, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet.* 2001; 28(3):211-2.
66. Kearns TP, Sayre GP. Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *AMA Arch Ophthalmol.* 1958; 60(2):280-9.
67. Damas J, Samuels DC, Carneiro J, Amorim A, Pereira F. Mitochondrial DNA rearrangements in health and disease--a comprehensive study. *Hum Mutat.* 2014; 35(1):1-14.
68. Tandon A, Gulleria K, Gupta S, Goel S, Bhargava SK, Vaid NB. Mature ovarian dermoid cyst invading the urinary bladder. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010; 35(6):751-3.

69. Kakuda M, Matsuzaki S, Kobayashi E, Yoshino K, Morii E, Kimura T. A Case of Extragonadal Teratoma in the Pouch of Douglas and Literature Review. *J Minim Invasive Gynecol.* 2015; 22(7):1311-7.
70. Bustamante-Marín X, Garness JA, Capel B. Testicular teratomas: an intersection of pluripotency, differentiation and cancer biology. *Int J Dev Biol.* 2013;57(2-4):201-10.
71. Wang XM, Yik WY, Zhang P, Lu W, Huang N, Kim BR, *et al.* Induced pluripotent stem cell models of Zellweger spectrum disorder show impaired peroxisome assembly and cell type-specific lipid abnormalities. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6:158.
72. Schieke SM, Ma M, Cao L, McCoy JP, Liu C, Hensel NF, *et al.* Mitochondrial metabolism modulates differentiation and teratoma formation capacity in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2008; 283(42):28506-12.
73. Wang C, Zhang F, Fan H, Peng L, Zhang R, Liu S, Guo Z. Sequence polymorphisms of mitochondrial D-loop and hepatocellular carcinoma outcome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 406(3):493-6.
74. Johnson DC, Shrestha S, Wiener HW, Makowsky R, Kurundkar A, Wilson CM, Aissani B. Mitochondrial DNA diversity in the African American population. *Mitochondrial DNA.* 2015;26(3):445-51.
75. Xu J, Guo Z, Bai Y, Zhang J, Cui L, Zhang H, Zhang S, Ai X. Single nucleotide polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA is associated with the kidney survival time in chronic kidney disease patients. *Ren Fail.* 2015; 37(1):108-12.
76. Bai Y, Guo Z, Xu J, Zhang J, Cui L, Zhang H, Zhang S, Ai X. Association of sequence polymorphism in the mitochondrial D-loop with chronic kidney disease. *Ren Fail.* 2014; 36(5):781-4.
77. Borrelli GM, Abrão MS, Taube ET, Darb-Esfahani S, Köhler C, Chiantera V, *et al.* (Partial) Loss of BAF250a (ARID1A) in rectovaginal deep-infiltrating endometriosis, endometriomas and involved pelvic sentinel lymph nodes. *Mol Hum Reprod.* 2016; 22(5):329-37.

78. Dentillo DB, Meola J, Ferriani RA, Rosa-E-Silva JC. Common Dysregulated Genes in Endometriosis and Malignancies. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2016; 38(5):253-62.
79. Quintana-Murci L, Chaix R, Wells RS, Behar DM, Sayar H, Scozzari R, *et al.* Where west meets east: the complex mtDNA landscape of the southwest and Central Asian corridor. *Am J Hum Genet.* 2004; 74(5):827-45.
80. Feder J, Ovadia O, Blech I, Cohen J, Wainstein J, Harman-Boehm I, *et al.* Parental diabetes status reveals association of mitochondrial DNA haplogroup J1 with type 2 diabetes. *BMC Med Genet.* 2009;10:60.
81. Khan NA, Govindaraj P, Soumittra N, Srilekha S, Ambika S, Vanniarajan A, *et al.* Haplogroup heterogeneity of LHON patients carrying the m.14484T>C mutation in India. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54(6):3999-4005.
82. Tuppen HA, Hogan VE, He L, Blakely EL, Worgan L, Al-Dosary M, *et al.* The p.M292T NDUFS2 mutation causes complex I-deficient Leigh syndrome in multiple families. *Brain.* 2010; 133(10):2952-63.
83. Rollins B, Martin MV, Sequeira PA, Moon EA, Morgan LZ, Watson SJ, *et al.* Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *PLoS One.* 2009;4(3):e4913.
84. Hendrickson SL, Hutcheson HB, Ruiz-Pesini E, Poole JC, Lautenberger J, Sezgin E, *et al.* Mitochondrial DNA Haplogroups influence AIDS Progression. *AIDS.* 2008; 22(18):2429-39.
85. Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet.* 2015;16(9):530-42.
86. Liou CW, Chen JB, Tiao MM, Weng SW, Huang TL, Chuang JH, *et al.* Mitochondrial DNA coding and control region variants as genetic risk factors for type 2 diabetes. *Diabetes.* 2012;61(10):2642-51.
87. Fridman C, Gonzalez RS, Pereira AC, Cardena MM. Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region in a population of southeastern Brazil. *Int J Legal Med.* 2014; 128(4):589-93.

88. Silva WA, Bortolini MC, Schneider MP, Marrero A, Elion J, Krishnamoorthy R, *et al.* MtDNA haplogroup analysis of black Brazilian and sub-Saharan populations: implications for the Atlantic slave trade. *Hum Biol.* 2006; 78(1):29-41.
89. Feio-Dos-Santos AC, Carvalho BM, Batista dos Santos SE, Ribeiro-dos-Santos AK. Nucleotide variability of HV-I in admixed population of the Brazilian Amazon Region. *Forensic Sci Int.* 2006; 164(2-3):276-7.
90. Cardena MM, Ribeiro-dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Amerindian genetic ancestry is associated with higher survival rates compared to African and European ancestry in Brazilian patients with heart failure. *Int J Cardiol.* 2014; 176(2):527-8.
91. Bernardo S, Hermida R, Desidério M, Silva DA, de Carvalho EF. MtDNA ancestry of Rio de Janeiro population, Brazil. *Mol Biol Rep.* 2014; 41(4):1945-50.
92. Paneto GG, Köhnemann S, Martins JA, Cicarelli RM, Pfeiffer H. A single multiplex PCR and SNaPshot minisequencing reaction of 42 SNPs to classify admixture populations into mitochondrial DNA haplogroups. *Mitochondrion.* 2011; 11(2):296-302.
93. Maji S, Krithika S, Vasulu TS. Distribution of Mitochondrial DNA Macrohaplogroup N in India with Special Reference to Haplogroup R and its Sub-Haplogroup U. *Int J Hum Genet.* 2008;8(1-2): 85-96.
94. Metspalu M, Kivisild T, Metspalu E, Parik J, Hudjashov G, Kaldma K, *et al.* Most of the extant mtDNA boundaries in south and southwest Asia were likely shaped during the initial settlement of Eurasia by anatomically modern humans. *BMC Genet.* 2004; 5:26.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo controle)

□

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº: APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº: APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo de polimorfismos da região controladora (D-loop) do DNA mitocondrial em mulheres brasileiras com endometriose.....

PESQUISADOR: Marina de Paula Andres.....

CARGO/FUNÇÃO: Médica colaboradora da Divisão de Clínica Ginecológica do HCFMUSP.....

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA Nº.CRM-SP: 144267.....

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Ginecológica do HCFMUSP e Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho.....

1. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
 RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐
2. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses.....

Continuação do ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo controle)**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): Você está sendo convidado a participar desse estudo como voluntário sadio, isto é, como uma pessoa que não tem endometriose, a doença que iremos estudar. Endometriose é uma doença benigna ginecológica que caracteriza-se pela presença de células da camada interna do útero (que forma a menstruação) fora do útero, localizando-se preferentemente no peritônio e ovários, podendo ainda atingir vagina, intestino, bexiga, etc. Esta pesquisa pretende estudar a presença de algumas variações genéticas que ocorrem naturalmente no nosso DNA (nosso material genético) para que possamos comparar a presença dessas alterações em pacientes com e sem a doença endometriose. O objetivo desse estudo é avaliar se essas alterações genéticas são fatores que podem causar essa doença.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: Para participar desse estudo você precisará ser avaliado no ambulatório de ginecologia e responder a algumas perguntas como presença de doenças, cirurgias anteriores e medicações em uso. Para ser incluída no estudo, você deverá ter sido submetida anteriormente a uma cirurgia para a confirmação que você não tem endometriose. Será coletado 5 ml de sangue da veia do braço e desse material será extraído o seu DNA que será o material usado para fazer os estudos e comparar com pacientes com a doença.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: Será realizada uma coleta de 5 ml de sangue da veia do antebraço.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Para algumas pessoas a coleta de sangue pode ser dolorida e às vezes pode ocorrer o aparecimento de uma mancha roxa. O resto do estudo não traz riscos ou desconfortos ao participante.

5 – Benefícios para o participante: Não há benefício direto para você. Trata-se apenas de estudo testando a possibilidade de que a presença dessa alteração genética possa ser relacionada com a presença da doença endometriose.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Não se aplica.

7 – Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra. Marina de Paula Andres que pode ser encontrada no endereço: Rua Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 155, Prédio dos Ambulatórios, Divisão de Clínica Ginecológica. Telefone: 3061-6054. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética para análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel.: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-7585 – E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada deste consentimento a qualquer momento e você pode deixar de participar do estudo sem qualquer prejuízo a seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros indivíduos, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante;

10 – Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Conclusão do ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo controle)

11 – **Despesas e compensações:** não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será paga por nós.

12- Estamos pedindo a sua permissão para que os materiais e dados coletados para essa pesquisa possam ser armazenados em nosso laboratório e usados de forma anônima em futuras pesquisas da mesma área, que não forem relacionadas com nenhuma doença. O tempo de armazenamento do material será definido autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq). ☐ Concordo ☐ Não Concordo

13 - Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

☐ **SIM.** Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

☐ **NÃO.** Eu dispensei a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "Estudo da associação entre o polimorfismo T16189C do DNA mitocondrial e a presença de endometriose em mulheres brasileiras". Eu discuti com o Dra. Marina de Paula Andres sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal	Data ____/____/____
--	---------------------

Assinatura da testemunha	Data ____/____/____
--------------------------	---------------------

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável do estudo	Data ____/____/____
-------------------------------------	---------------------

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo endometriose)

□

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo de polimorfismos da região controladora (D-loop) do DNA mitocondrial em mulheres brasileiras com endometriose.....

PESQUISADOR: Marina de Paula Andres.....

CARGO/FUNÇÃO: Médica colaboradora da Divisão de Clínica Ginecológica do HCFMUSP.....

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA Nº.CRM-SP: 144267.....

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Ginecológica do HCFMUSP e Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho.....

1. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

2. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses.....

Continuação do ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo endometriose)**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): Você está sendo convidado a participar desse estudo como voluntário paciente, isto é, como uma pessoa que tem a doença a ser estudada (endometriose). Endometriose é uma doença benigna ginecológica que caracteriza-se pela presença de células da camada interna do útero (que forma a menstruação) fora do útero, localizando-se preferentemente no peritônio e ovários, podendo ainda atingir vagina, intestino, bexiga, etc. Esta pesquisa pretende estudar a presença de algumas variações genéticas que ocorrem naturalmente no nosso DNA (nosso material genético) para que possamos comparar a presença dessas alterações em pacientes com e sem a doença endometriose. O objetivo desse estudo é avaliar se essas alterações genéticas são fatores que podem causar essa doença.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: Para participar desse estudo você precisará ser avaliado no ambulatório de ginecologia e responder a algumas perguntas como presença de doenças, cirurgias anteriores e medicações em uso. Para ser incluída no estudo, você deverá ter sido submetida anteriormente a uma cirurgia para a confirmação que você não tem endometriose. Será coletado 5 ml de sangue da veia do braço e desse material será extraído o seu DNA que será o material usado para fazer os estudos e comparar com pacientes com a doença.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: Será realizada uma coleta de 5 ml de sangue da veia do antebraço.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Para algumas pessoas a coleta de sangue pode ser dolorida e às vezes pode ocorrer o aparecimento de uma mancha roxa. O resto do estudo não traz riscos ou desconfortos ao participante.

5 – Benefícios para o participante: Não há benefício direto para você. Trata-se apenas de estudo testando a possibilidade de que a presença dessa alteração genética possa ser relacionada com a presença da doença endometriose.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Não se aplica.

7 – Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra. Marina de Paula Andres que pode ser encontrada no endereço: Rua Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 155, Prédio dos Ambulatórios, Divisão de Clínica Ginecológica. Telefone: 3061-6054. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética para análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel.: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-7585 – E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada deste consentimento a qualquer momento e você pode deixar de participar do estudo sem qualquer prejuízo a seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros indivíduos, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante;

10 – Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Conclusão do ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (grupo endometriose)

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será paga por nós.

12- Estamos pedindo a sua permissão para que os materiais e dados coletados para essa pesquisa possam ser armazenados em nosso laboratório e usados de forma anônima em futuras pesquisas da mesma área, que não sejam relacionadas com nenhuma doença. O tempo de armazenamento do material será definido autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq). ☐ Concordo ☐ Não Concordo

13 - Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

☐ **SIM.** Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

☐ **NÃO.** Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "Estudo da associação entre o polimorfismo T16189C do DNA mitocondrial e a presença de endometriose em mulheres brasileiras". Eu discuti com o Dra. Marina de Paula Andres sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal	Data ____/____/____
--	---------------------

Assinatura da testemunha	Data ____/____/____
--------------------------	---------------------

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável do estudo	Data ____/____/____
-------------------------------------	---------------------

ANEXO C - Parecer consubstanciado da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq)

□

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo de polimorfismos da região controladora (D-loop) do DNA mitocondrial em mulheres brasileiras com endometriose

Pesquisador: Sérgio Podgaec

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 25759314.0.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 534.714

Data da Relatoria: 19/02/2014

Apresentação do Projeto:

Adequada

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo é avaliar se polimorfismos na região controladora do DNA mitocondrial podem ser associados ao risco do desenvolvimento da endometriose na população brasileira.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos, nem benefícios diretos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto tem interesse científico relevante

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

bastante adequado

Recomendações:

não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

UF: SP **Município:** SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Conclusão do ANEXO C - Parecer consubstanciado da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq)

□

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 534.714

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 19 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

ANEXO D - Questionário para coleta de dados das pacientes incluídas no estudo**Ficha de coleta de dados****Identificação**

Nome: _____ RG HC: _____
Idade: ____ anos Estado civil: (1) solteira (2) casada (3) relação estável (4) separada (5) viúva
Instrução: (1) 1º Grau (2) 2º grau (3) Superior
Cor de pele: (1) branca (2) negra (3) amarela (4) parda
Naturalidade: _____ Mãe: _____ Avó Mat: _____ Avô Mat _____
Profissão: _____ Peso: _____ Altura: _____

Antecedentes

Menarca: ____ anos
Ciclo menstrual: (1) regular (2) irregular (3) amenorreia
MAC: (1) não (2) condom (3) ACO (4) Prog Oral (5) Injetável M (6) Injetável Trim (7) DIU cobre
(8) DIU Mirena (9) laqueadura (10) vasectomia

Antecedentes obstétricos: ____ G ____ PN ____ PC ____ A

Antecedentes pessoais:

(1) hipertensão (2) diabetes (3) cardiopatia (4) asma
(5) depressão (6) hipotireoidismo (7) IRC () outras: _____

Atividade física regular: (1) sim (2) não

Tabagismo: (1) sim: (____ cigarros/dia) (2) não

Endometriose família: (1) sim: _____ (2) não

Medicação já usada para EDT: (1) ACO (2) Mirena (3) progesterona vo (4) análogo do GnRH
(5) Injetável trim

Conclusão do ANEXO D - Questionário para coleta de dados das pacientes incluídas no estudo

Quadro clínico

Início dos sintomas: aos anos

Queixa Principal:

(1) Dismenorréia (2) Dor Pélvica Crônica (3) Dispareunia (4) Infertilidade
(5) Alteração intestinal (6) Alteração urinária

Dismenorréia: (1) sim VAS: ____ (2) não

Dispareunia profundidade: (1) sim VAS: ____ (2) não

Dor Pélvica Crônica: (1) sim VAS: ____ (2) não

Alteração urinária cíclica: (1) sim VAS: ____ (2) não

Alteração intestinal cíclica: (1) sim VAS: ____ (2) não

Infertilidade: (1) sim Tempo: ____ (2) não (3) sem atividade sexual

(1) primária (2) secundária

Tratamentos: (1) Sim: ____ (2) não

Tratamento cirúrgico:

Data: Estádio: (1) I (2) II (3) III (4) IV

Locais de doença:

(1) endometrioma (2) retrocervical (3) vagina (4) septo retovaginal
(5) reto-sigmóide (6) apêndice (7) bexiga (8) íleo terminal (9) ureter
(10) Obliteração de fundo de saco (11) peritoneal (12) outros:

Anátomo patológico: (1) estromal (2) bem diferenciado (3) misto (4) indiferenciado

Procedimento:

(1) lesões superficiais (2) lise de aderências (3) histerectomia (4) retrocervical
(5) ooforoplastia (6) ooforectomia (7) salpingectomia D
(8) sigmoidectomia (9) nódulo retosigmóide (10) apendicectomia (11) íleo
(12) lesão vagina (13) cistectomia parcial

ANEXO E - Estadiamento da endometriose proposto pela *American Society for Reproductive Medicine* em 1996 (2).

Estadiamento da endometriose ASRM (1996)

ENDOMETRIOSE		<1cm	1–3 cm	> 3 cm
PERITÔNIO	Superficial	1	2	4
	Profunda	2	4	6
OVÁRIO D	Superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
OVÁRIO E	Superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
OBLITERACAO DO FUNDO DE SACO POSTERIOR		Parcial 4	Completa 40	
ADERÊNCIAS		<1/3 Envolvido	1/3–2/3 Envolvidos	> 2/3 Envolvidos
OVÁRIO D	Velamentosa	1	2	4
	Densa	4	8	16
OVÁRIO E	Velamentosa	1	2	4
	Densa	4	8	16
TROMPA D	Velamentosa	1	2	4
	Densa	4*	8*	16
TROMPA E	Velamentosa	1	2	4
	Densa	4*	8*	16

Estádio I (mínima): 1-5

Estádio II (leve): 6-15

Estádio III (moderada): 16-40

Estádio IV (severa): >40

*Se as fimbrias tubárias estiverem totalmente envolvidas por aderências, mude o escore para 16.

Porcentagem de implantes:

Lesões vermelhas (claras, vermelhas, rosadas, em chama, vesículas): ____%

Lesões brancas (brancas, amareladas, marrons, defeitos de peritônio): ____%

Lesões pretas (pretas, depósitos de hemossiderina, azuis): ____%

Endometriose adicional: _____

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE A - Polimorfismos da região controladora do DNA mitocondrial das posições 16024 a 16387, contendo a região HV1 nos grupos endometriose e controle

Variável		Controle (N = 92)	EDT (N = 90)	Total (N = 182)	p
1.	16.031G	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
2.	16.051G	3 (3,3)	4 (4,4)	7 (3,8)	0,719
3.	16.063C	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
4.	16.067T	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
5.	16.071T	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
6.	16.073.1C	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
7.	16.078T	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
8.	16.086C	5 (5,4)	2 (2,2)	7 (3,8)	0,444
9.	16.087C	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
10.	16.092C	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
11.	16.093C	6 (6,5)	5 (5,6)	11 (6)	>0,999
12.	16.097C	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
13.	16.098G	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
14.	16.104T	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
15.	16.111T	11 (12)	4 (4,4)	15 (8,2)	0,104
16.	16.114A	3 (3,3)	1 (1,1)	4 (2,2)	0,621
17.	16.123A	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
18.	16.124C	8 (8,7)	3 (3,3)	11 (6)	0,212
19.	16.126C	11 (12)	9 (10)	20 (11)	0,814
20.	16.129A	13 (14,1)	12 (13,3)	25 (13,7)	>0,999
21.	16.129C	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
22.	16.145A	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
23.	16.148T	0 (0)	4 (4,4)	4 (2,2)	0,058
24.	16.153A	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
25.	16.154C	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
26.	16.162G	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
27.	16.163G	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999

Continuação APÊNDICE A - Polimorfismos da região controladora do DNA mitocondrial das posições 16024 a 16387, contendo a região HV1 nos grupos endometriose e controle

	Variável	Controle (N = 92)	EDT (N = 90)	Total (N = 182)	p
28.	16.168T	0 (0)	3 (3,3)	3 (1,6)	0,119
29.	16.171 DEL	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
30.	16.172C	6 (6,5)	10 (11,1)	16 (8,8)	0,306
31.	16.176T	0 (0)	4 (4,4)	4 (2,2)	0,058
32.	16.178C	1 (1,1)	3 (3,3)	4 (2,2)	0,365
33.	16.179T	2 (2,2)	1 (1,1)	3 (1,6)	>0,999
34.	16.182C	3 (3,3)	4 (4,4)	7 (3,8)	0,719
35.	18.182 DEL	0 (0)	2 (2,2)	2 (1,1)	0,243
36.	16.183C	10 (10,9)	16 (17,8)	26 (14,3)	0,208
37.	19183DEL	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
38.	16.184T	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
39.	16.185T	1 (1,1)	2 (2,2)	3 (1,6)	0,619
40.	16.187T	14 (15,2)	10 (11,1)	24 (13,2)	0,512
41.	16.188T	14 (15,2)	10 (11,1)	24 (13,2)	0,512
42.	16.188G	0 (0)	4 (4,4)	4 (2,2)	0,058
43.	16.188 INS 1C	2 (2,2)	7 (7,8)	9 (4,9)	0,098
44.	16.188 INS 2C	24 (26,1)	22 (24,4)	46 (25,3)	0,865
45.	16.189C	34 (37)	39 (43,3)	73 (40,1)	0,450
46.	16.192T	6 (6,5)	2 (2,2)	8 (4,4)	0,278
47.	16.193T	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
48.	16.197G	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
49.	16.203G	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
50.	16.207G	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
51.	16.209C	4 (4,3)	2 (2,2)	6 (3,3)	0,682
52.	16.213A	5 (5,4)	1 (1,1)	6 (3,3)	0,211
53.	16.214T	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
54.	16.215G	2 (2,2)	0 (0)	2 (1,1)	0,497
55.	16.217C	5 (5,4)	13 (14,4)	18 (9,9)	0,049

Continuação APÊNDICE A - Polimorfismos da região controladora do DNA mitocondrial das posições 16024 a 16387, contendo a região HV1 nos grupos endometriose e controle

	Variável	Controle (N = 92)	EDT (N = 90)	Total (N = 182)	p
56.	16.218T	2 (2,2)	0 (0)	2 (1,1)	0,497
57.	16.221T	0 (0)	2 (2,2)	2 (1,1)	0,243
58.	16.223T	69 (75)	55 (61,1)	124 (68,1)	0,056
59.	16.224C	1 (1,1)	4 (4,4)	5 (2,7)	0,208
60.	16.230G	0 (0)	4 (4,4)	4 (2,2)	0,058
61.	16.234T	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
62.	16.235G	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
63.	16.239T	1 (1,1)	2 (2,2)	3 (1,6)	0,619
64.	16.241G	1 (1,1)	2 (2,2)	3 (1,6)	0,619
65.	16.245T	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
66.	16.246T	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
67.	16.248T	3 (3,3)	0 (0)	3 (1,6)	0,246
68.	16.249C	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
69.	16.256T	2 (2,2)	1 (1,1)	3 (1,6)	>0,999
70.	16.260T	0 (0)	4 (4,4)	4 (2,2)	0,058
71.	16.261T	2 (2,2)	2 (2,2)	4 (2,2)	>0,999
72.	16.262T	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
73.	16.263C	2 (2,2)	1 (1,1)	3 (1,6)	>0,999
74.	16.264T	5 (5,4)	3 (3,3)	8 (4,4)	0,721
75.	16.265C	3 (3,3)	3 (3,3)	6 (3,3)	>0,999
76.	16.266T	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
77.	16.270T	8 (8,7)	3 (3,3)	11 (6)	0,212
78.	16.271C	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
79.	16.274A	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
80.	16.278T	30 (32,6)	26 (28,9)	56 (30,8)	0,632
81.	16.284G	3 (3,3)	0 (0)	3 (1,6)	0,246
82.	16.286A	0 (0)	2 (2,2)	2 (1,1)	0,243
83.	16.286G	3 (3,3)	1 (1,1)	4 (2,2)	0,621

Continuação APÊNDICE A - Polimorfismos da região controladora do DNA mitocondrial das posições 16024 a 16387, contendo a região HV1 nos grupos endometriose e controle

Variável		Controle (N = 92)	EDT (N = 90)	Total (N = 182)	p
84.	16.286T	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
85.	16.287T	2 (2,2)	0 (0)	2 (1,1)	0,497
86.	16.288C	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
87.	16.290T	12 (13)	8 (8,9)	20 (11)	0,479
88.	16.291T	3 (3,3)	4 (4,4)	7 (3,8)	0,719
89.	16.292T	4 (4,3)	4 (4,4)	8 (4,4)	>0,999
90.	16.293G	6 (6,5)	2 (2,2)	8 (4,4)	0,278
91.	16.294T	21 (22,8)	15 (16,7)	36 (19,8)	0,354
92.	16.295T	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
93.	16.296T	2 (2,2)	2 (2,2)	4 (2,2)	>0,999
94.	16.298C	8 (8,7)	8 (8,9)	16 (8,8)	>0,999
95.	16.301T	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
96.	16.302G	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
97.	16.304C	3 (3,3)	3 (3,3)	6 (3,3)	>0,999
98.	16.305G	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
99.	16.309G	7 (7,6)	8 (8,9)	15 (8,2)	0,793
100.	16.311C	21 (22,8)	17 (18,9)	38 (20,9)	0,586
101.	16.312G	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
102.	16.316G	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
103.	16.318T	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
104.	16.319A	10 (10,9)	8 (8,9)	18 (9,9)	0,805
105.	16.320T	6 (6,5)	7 (7,8)	13 (7,1)	0,781
106.	16320A	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
107.	16.324C	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
108.	16.325C	9 (9,8)	7 (7,8)	16 (8,8)	0,795
109.	16.327T	10 (10,9)	8 (8,9)	18 (9,9)	0,805
110.	16.335T	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
111.	16.342C	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999

Conclusão APÊNDICE A - Polimorfismos do *Da região controladora* do DNA mitocondrial das posições 16024 a 16387, contendo a região HV1 nos grupos endometriose e controle

Variável		Controle (N = 92)	EDT (N = 90)	Total (N = 182)	p
112.	16.343G	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
113.	16.344T	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
114.	16.355T	4 (4,3)	1 (1,1)	5 (2,7)	0,368
115.	16.360T	8 (8,7)	4 (4,4)	12 (6,6)	0,372
116.	16.362C	22 (23,9)	19 (21,1)	41 (22,5)	0,724
117.	16.368C	2 (2,2)	1 (1,1)	3 (1,6)	>0,999
118.	16.372C	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
119.	16.380A	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
120.	16.381C	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999

Dados expressos como n (%); Teste exato de Fisher.

APÊNDICE B - Polimorfismos da região controladora do DNA mitocondrial das posições 1 a 727, contendo as regiões HV2 e HV3 nos grupos endometriose e controle

Variável		Controle (N = 92)	EDT (N = 90)	Total (N = 182)	P
121.	45G	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
122.	57G	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
123.	59C	2 (2,2)	0 (0)	2 (1,1)	0,497
124.	62A	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
125.	64T	6 (6,5)	7 (7,8)	13 (7,1)	0,781
126.	65A	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
127.	73G	79 (85,9)	75 (83,3)	154 (84,6)	0,685
128.	73R	2 (2,2)	2 (2,2)	4 (2,2)	>0,999
129.	89C	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
130.	93G	5 (5,4)	7 (7,8)	12 (6,6)	0,565
131.	95C	0 (0)	3 (3,3)	3 (1,6)	0,119
132.	103A	0 (0)	3 (3,3)	3 (1,6)	0,119
133.	143A	9 (9,8)	4 (4,4)	13 (7,1)	0,249
134.	146C	30 (32,6)	17 (18,9)	47 (25,8)	0,042
135.	150T	17 (18,5)	10 (11,1)	27 (14,8)	0,211
136.	151T	12 (13)	5 (5,6)	17 (9,3)	0,125
137.	152C	49 (53,3)	41 (45,6)	90 (49,5)	0,304
138.	153G	10 (10,9)	8 (8,9)	18 (9,9)	0,805
139.	182T	18 (19,6)	9 (10)	27 (14,8)	0,095
140.	183G	2 (2,2)	1 (1,1)	3 (1,6)	>0,999
141.	185A	0 (0)	6 (6,7)	6 (3,3)	0,013
142.	185T	6 (6,5)	2 (2,2)	8 (4,4)	0,278
143.	186A	9 (9,8)	4 (4,4)	13 (7,1)	0,249
144.	188G	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
145.	189C	9 (9,8)	4 (4,4)	13 (7,1)	0,249
146.	189G	11 (12)	12 (13,3)	23 (12,6)	0,826
147.	194T	4 (4,3)	2 (2,2)	6 (3,3)	0,682
148.	195C	32 (34,8)	27 (30)	59 (32,4)	0,529

Continuação APÊNDICE B - Polimorfismos da região controladora do DNA mitocondrial das posições 1 a 727, contendo as regiões HV2 e HV3 nos grupos endometriose e controle

	Variável	Controle (N = 92)	EDT (N = 90)	Total (N = 182)	P
149.	198T	11 (12)	9 (10)	20 (11)	0,814
150.	199C	4 (4,3)	2 (2,2)	6 (3,3)	0,682
151.	200G	7 (7,6)	9 (10)	16 (8,8)	0,610
152.	204C	4 (4,3)	3 (3,3)	7 (3,8)	>0,999
153.	207A	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
154.	210G	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
155.	211G	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
156.	215G	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
157.	217C	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
158.	228A	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
159.	235G	11 (12)	9 (10)	20 (11)	0,814
160.	236C	0 (0)	5 (5,6)	5 (2,7)	0,028
161.	239C	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
162.	247A	15 (16,3)	12 (13,3)	27 (14,8)	0,678
163.	249 DEL	8 (8,7)	8 (8,9)	16 (8,8)	>0,999
164.	251A	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
165.	252C	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
166.	257G	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
167.	263G	88 (95,7)	87 (96,7)	175 (96,2)	>0,999
168.	271T	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
169.	279C	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
170.	290 DEL	7 (7,6)	7 (7,8)	14 (7,7)	>0,999
171.	291 DEL	7 (7,6)	7 (7,8)	14 (7,7)	>0,999
172.	293C	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
173.	295G	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
174.	297G	7 (7,6)	6 (6,7)	13 (7,1)	>0,999
175.	310 INS 1C	44 (47,8)	48 (53,3)	92 (50,5)	0,463
176.	310 INS 2C	5 (5,4)	10 (11,1)	15 (8,2)	0,187

Continuação APÊNDICE B - Polimorfismos da região controladora do DNA mitocondrial das posições 1 a 727, contendo as regiões HV2 e HV3 nos grupos endometriose e controle

	Variável	Controle (N = 92)	EDT (N = 90)	Total (N = 182)	P
177.	315 INS 1C	89 (96,7)	90 (100)	179 (98,4)	0,246
178.	316A	9 (9,8)	4 (4,4)	13 (7,1)	0,249
179.	325T	2 (2,2)	1 (1,1)	3 (1,6)	>0,999
180.	337 INS 1A	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
181.	340T	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
182.	357G	6 (6,5)	2 (2,2)	8 (4,4)	0,278
183.	385G	1 (1,1)	3 (3,3)	4 (2,2)	0,365
184.	408A	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
185.	418T	2 (2,2)	1 (1,1)	3 (1,6)	>0,999
186.	445A	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
187.	447T	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
188.	455 INS.1T	0 (0)	2 (2,2)	2 (1,1)	0,243
189.	460C	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
190.	471C	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
191.	489C	10 (10,9)	11 (12,2)	21 (11,5)	0,820
192.	493G	4 (4,3)	5 (5,6)	9 (4,9)	0,746
193.	497T	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	>0,999
194.	499A	4 (4,3)	12 (13,3)	16 (8,8)	0,038
195.	508G	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
196.	511T	0 (0)	1 (1,1)	1 (0,5)	0,495
197.	512A	2 (2,2)	1 (1,1)	3 (1,6)	>0,999
198.	523 DEL	35 (38)	31 (34,4)	66 (36,3)	0,646
199.	524 DEL	35 (38)	31 (34,4)	66 (36,3)	0,646
200.	524 INS.1CA	1 (1,1)	2 (2,2)	3 (1,6)	0,619
201.	524 INS.1CACA	0 (0)	2 (2,2)	2 (1,1)	0,243
202.	534T	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
203.	548G	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,5)	>0,999
204.	573 INS.1C	4 (4,3)	0 (0)	4 (2,2)	0,121
205.	573 INS.2C	27 (29,3)	5 (5,6)	32 (17,6)	<0,001

APÊNDICE C - Distribuição dos subhaplogrupos mitocondriais nos grupos controle (CT) e endometriose (EDT)

Subhaplogrupo	Haplogrupo	CT		EDT		Total		p*
		n	%	n	%	n	%	
A	Ameríndio	0	0,0	1	1,1	1	0,5	0,06
A2	Ameríndio	11	12,0	5	5,6	16	8,8	
A5	Ameríndio	1	1,1	0	0,0	1	0,5	
A6	Ameríndio	0	0,0	2	2,2	2	1,1	
B2	Ameríndio	4	4,3	6	6,7	10	5,5	
B4	Ameríndio	1	1,1	7	7,8	8	4,4	
B6	Ameríndio	0	0,0	1	1,1	1	0,5	
C0	Ameríndio	3	3,3	0	0,0	3	1,6	
C1	Ameríndio	6	6,5	2	2,2	8	4,4	
C2	Ameríndio	0	0,0	1	1,1	1	0,5	
C3	Ameríndio	0	0,0	1	1,1	1	0,5	
C4	Ameríndio	0	0,0	1	1,1	1	0,5	
C5	Ameríndio	0	0,0	1	1,1	1	0,5	
C6	Ameríndio	0	0,0	1	1,1	1	0,5	
D1	Ameríndio	1	1,1	0	0,0	1	0,5	
D4	Ameríndio	1	1,1	1	1,1	2	1,1	
H1	Europeu	3	3,3	2	2,2	5	2,7	
H10	Europeu	0	0,0	2	2,2	2	1,1	
H2	Europeu	4	4,3	0	0,0	4	2,2	
H27	Europeu	0	0,0	2	2,2	2	1,1	
H3	Europeu	0	0,0	3	3,3	3	1,6	
H4	Europeu	1	1,1	0	0,0	1	0,5	
H5	Europeu	1	1,1	0	0,0	1	0,5	
H6	Europeu	0	0,0	1	1,1	1	0,5	
HV0	Europeu	1	1,1	0	0,0	1	0,5	
JT	Europeu	1	1,1	0	0,0	1	0,5	
K1	Europeu	1	1,1	3	3,3	4	2,2	
L0	Africano	0	0,0	5	5,6	5	2,7	
L1	Africano	14	15,2	7	7,8	21	11,5	
L2	Africano	12	13,0	11	12,2	23	12,6	
L3	Africano	18	19,6	13	14,4	31	17,0	
L4	Africano	1	1,1	0	0,0	1	0,5	
M2	Asiático	0	0,0	1	1,1	1	0,5	
M9	Asiático	1	1,1	0	0,0	1	0,5	
N1	Asiático	0	0,0	1	1,1	1	0,5	
N9	Asiático	0	0,0	1	1,1	1	0,5	
R0	Europeu	0	0,0	2	2,2	2	1,1	
T2	Europeu	2	2,2	2	2,2	4	2,2	
U2	Europeu	0	0,0	1	1,1	1	0,5	
U3	Europeu	1	1,1	0	0,0	1	0,5	
U5	Europeu	2	2,2	0	0,0	2	1,1	
W3	Europeu	0	0,0	1	1,1	1	0,5	
W6	Europeu	1	1,1	0	0,0	1	0,5	
X2	Asiático	0	0,0	1	1,1	1	0,5	
Z4	Asiático	0	0,0	1	1,1	1	0,5	

*Teste da razão de verossimilhanças.