

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES *GDF-9* (c.398-39C>G, c.436C>T, c.447C>T, c.546G>A, c.557C>A e c.646G>A), *AMH* (p.Ile49Ser) E *AMHR2* (-482A>G) EM MULHERES INFÉRTEIS COM ENDOMETRIOSE

EMILY DE CONTO

Orientador: Prof. Dr. João Sabino Lahorgue da Cunha Filho

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Mestre

Porto Alegre, dezembro de 2013.

Agradecimentos

Aos meus pais por terem aceitado o desafio da paternidade que Deus lhes propôs.

À minha mãe por todas as oportunidades, por ter me dado asas e aberto as portas do mundo, apesar da saudade.

À minha avó, que não entende todas as palavras difíceis que eu falo, mas que consegue traduzi-las em 'esforço e recompensa'.

Aos amigos com quem discuto ciência seja no laboratório, pela rede social, ao telefone ou na mesa do bar, Charles e Juliana. A ele também agradeço por ter me iniciado no mundo da pesquisa. E, sim, nós dominaremos o mundo!

Aos amigos que, independente da área que estudam (Agronomia, Contabilidade, Engenharias, Geografia, Secretariado Executivo ou Serviço Social), aprenderam tudo o que acontece dentro do ovário por ocasião deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa orientado pelo professor João Sabino. Ao João Paolo, desde a seleção, pela confiança e amizade. Especialmente também à Vanessa e à Carla.

À Dra. Úrsula pelo conhecimento compartilhado e suporte técnico.

E o meu melhor muito obrigada ao professor João Sabino pelas oportunidades, pela confiança, pelos conhecimentos compartilhados e pelo exemplo que é.

Resumo

Introdução: O Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF-9) e o Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) são membros da superfamília TGF- β envolvidos na foliculogênese e têm função determinante no desenvolvimento oocitário e na reserva ovariana. Polimorfismos nesses genes apresentam importante papel na fertilidade feminina, pois foi demonstrado estarem relacionados com subfertilidade/infertilidade e antecipação da menopausa. A endometriose cursa com dois sintomas principais: dor pélvica crônica e infertilidade, sua ligação com a infertilidade ainda não foi claramente elucidada, sendo sugerido que uma série de fatores podem influenciar este processo, entre eles, os fatores da superfamília TGF- β .

Objetivos: Avaliar se os polimorfismos genéticos do *GDF-9*, *AMH* e do seu receptor *AMHR2* estão correlacionados com infertilidade associada à endometriose.

Métodos: Um estudo caso-controle foi realizado, incluindo 50 mulheres inférteis com endometriose e 50 mulheres férteis submetidas à laparoscopia para ligadura tubária como grupo controle. Critérios de não inclusão utilizados: doenças autoimunes, coexistência de outras causas de infertilidade, amenorreia ou ciclos irregulares. Foi realizada a dosagem de FSH no terceiro dia do ciclo e sangue periférico foi coletado para extração de DNA e genotipagem. Os polimorfismos c.398-39C>G, c.436C>T, c.447C>T, c.546G>A, c.557C>A e c.646G>A do gene *GDF-9* foram determinados por sequenciamento direto e os polimorfismos p.Ile49Ser do *AMH* e -482A>G do *AMHR2* foram determinados por genotipagem usando kits comerciais Taqman®.

Resultados: A idade foi similar entre os grupos (33,5 \pm 5,2 x 33,9 \pm 4,0 anos; $P=0,847$). A média dos níveis de FSH não resultou em significância estatística (6,42 \pm 2,5 x 5,12 \pm 2,9 mUI/mL; $P=0,064$). A frequência genotípica entre os grupos para os polimorfismos do gene *GDF-9* demonstra nível de significância de $P=0,433$ para c.398-39C>G, $P=0,129$ para c.447C>T e $P=0,794$ para c.546G>A. Entretanto, a frequência genotípica dos polimorfismos dos genes *AMH* e *AMHR2* apresentaram, respectivamente, $P=0,096$ e $P=0,140$, representando uma tendência estatística. Todos os SNPs foram testados e estavam de acordo para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Conclusão: O presente estudo não mostrou diferença na frequência alélica ou genotípica dos SNPs nos genes *GDF-9*, *AMH* e *AMHR2* em pacientes inférteis com endometriose. Contudo, demonstramos que existe possibilidade das alterações c.447C>T e c.546G>A do gene *GDF-9*, p.Ile49Ser do *AMH* e -482A>G do gene *AMHR2* influenciarem a fertilidade na endometriose.

PALAVRAS-CHAVE: endometriose, infertilidade, polimorfismos, *GDF-9*, *AMH*

Abstract

Background: The Growth and Differentiation Factor 9 (GDF-9) and the Anti-Müllerian Hormone (AMH) are members of the TGF- β superfamily involved in folliculogenesis and have a decisive role in oocyte development and ovarian reserve. Polymorphisms in these genes have important role in female fertility because it was demonstrated to be related to subfertility/infertility and anticipation of menopause. Endometriosis progresses with two main symptoms: chronic pelvic pain and infertility. It's link to infertility has not been yet clearly elucidated, although it's suggested that a number of factors may influence this process, including the factors of the TGF- β superfamily.

Objectives: To evaluate whether genetic polymorphisms (SNPs) of *GDF-9*, *AMH* and its receptor *AMHR2* correlates with endometriosis associated to infertility.

Methods: A case-control study was performed, including 50 infertile women with endometriosis and 50 fertile women undergoing laparoscopy for tubal ligation as a control group. Non-inclusion criteria were: autoimmune diseases, coexistence of other causes of infertility, amenorrhea or irregular cycles. The dosage of FSH was performed on the third day of the cycle and peripheral blood was collected for DNA extraction and genotyping. Polymorphisms c.398-39C>G, c.436C>T, c.447C>T, c.546G>A, c.557C>A and c.646G>A of *GDF-9* gene were determined by direct sequencing technique and polymorphisms p.Ile49Ser of gene *AMH* and -482A>G of *AMHR2* were determined by genotyping by using commercial Taqman® kits.

Results: The mean of ages were similar between groups (33.5 ± 5.2 x 33.9 ± 4.0 years, $P=0.847$). The Follicle Stimulating Hormone (FSH) mean levels did not result in statistical significance (6.42 ± 5.12 x 2.5 ± 2.9 mIU/ml, $P=0.064$). The genotypic frequency *GDF-9* gene polymorphisms demonstrated a significance level of $P=0.433$ for c.398-39C>G, $P=0.129$ for c.447C>T and $P=0.794$ for c.546G>A. However, the genotypic frequency of *AMH* and *AMHR2* genes polymorphisms presented, respectively, $P=0.096$ and $P=0.140$, representing a statistical trend. All SNPs were measuring according to Hardy-Weinberg Equilibrium.

Conclusion: This study showed no difference in allelic or genotypic frequency of *GDF-9*, *AMH* and *AMHR2* genes SNPs in infertile patients with endometriosis. However, there are possible alterations in c.447C>T and c.546G>A *GDF-9* gene, p.Ile49Ser *AMH* gene and SNP -482A>G *AMHR2* gene. Taken together, these data may suggest the influence of some genetic polymorphisms in infertility associated with endometriosis.

KEYWORDS: endometriosis, infertility, polymorphisms, GDF -9, AMH

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais SNPs descritos no gene <i>GDF-9</i>	25
--	----

Lista de Figuras

Figura 1. Membros da superfamília TGF- β envolvidos na comunicação entre o oócito e as células da granulosa e da teca que compõem o folículo.....	21
---	----

Lista de abreviaturas

SIGLA	Significado
AFC	Antral Follicle Count (Contagem de Folículos Antrais)
AMH	Anti-Müllerian Hormone (Hormônio Anti-Mülleriano)
AMHR2	Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor (Receptor tipo 2 do Hormônio Anti-Mülleriano)
ASRM	American Society for Reproductive Medicine (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva)
BMP	Bone Morphogenetic Protein (Proteína Morfogênica Óssea)
DOR	Diminished Ovarian Reserve (Reserva Ovariana Diminuída)
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology (Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia)
FOP	Premature Ovarian Failure (Falência Ovariana Prematura)
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)
GC	Granulosa Cell (Célula da Granulosa)
GDF	Growth Differentiation Factor (Fator de Crescimento e Diferenciação)
LH	Luteinizing Hormone (Hormônio Luteinizante)
PCOS	Polycystic Ovary Syndrome (Síndrome dos Ovários Policísticos)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Único Nucleotídeo)
TC	Theca Cell (Célula da Teca)
TGF- β	Transforming Growth Factor-β (Fator de Crescimento Transformante- β)

Sumário

1	Introdução	11
2	Revisão da literatura	13
2.1	Endometriose	13
2.2	Endometriose e infertilidade	15
2.3	Desenvolvimento oocitário	16
2.4	Superfamília TGF- β	18
2.5	AMH, AMHR2 e polimorfismos genéticos	22
2.6	AMH, AMHR2 e endometriose	24
2.7	GDF-9 e polimorfismos genéticos	24
2.8	GDF-9 e endometriose	26
3	Justificativa	27
4	Hipótese nula	28
5	Objetivos.....	29
6	Referências bibliográficas da revisão	30
7	Artigo	35
8	Conclusões	60
9	Perspectivas	61

1 Introdução

A endometriose é uma desordem ginecológica estrógeno-dependente caracterizada pela presença/disseminação de tecido glandular e estroma endometrial fora da cavidade uterina e afeta aproximadamente uma em cada sete mulheres em idade reprodutiva (1). Seus principais sintomas são dor pélvica cíclica ou crônica, dismenorreia, dispareunia e/ou subfertilidade/infertilidade (2). A taxa de fecundidade de um casal saudável é de 15 a 20% por mês; em um casal cuja mulher é acometida pela endometriose essa taxa cai para 2 a 10% (3). Considerando a população feminina infértil, a endometriose está presente em 25-40% (4).

Sabe-se que há comprometimento da reserva ovariana e níveis alterados de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) na endometriose, porém não se sabe ao certo quais são as causas destes eventos (5). A foliculogênese é o processo pelo qual são recrutados os folículos primordiais da reserva ovariana e onde ocorrem o desenvolvimento deste folículo e a capacitação do oócito para que possa ovular e ser fecundado. Esse processo é regulado por ação de fatores intra e extraovarianos que agem de forma autócrina e parácrina. Dentre os fatores intraovarianos estão os membros da Superfamília de Fatores de Crescimento Transformantes Beta (TGF- β) que agem por meio da ativação de fatores de transcrição intracelulares Smad regulando a expressão gênica. Este grupo de mais de 40 proteínas inclui o Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF-9) e o AMH, proteínas diretamente relacionadas com a reprodução através da foliculogênese (6).

O GDF-9 é codificado por um gene localizado no cromossomo 5q31.1 (7). Sua principal função é promover o avanço do folículo primário para o estágio de folículo secundário sinalizando a proliferação e diferenciação de células da granulosa (GC) e de células da teca (TC) no entorno do folículo primário. No folículo secundário, continua estimulando a proliferação de GC e estimula a expressão de receptores de FSH na superfície dessas células, que passam a ser responsivas às gonadotrofinas (8,9). Além dessas funções, o GDF-9 está envolvido na regulação positiva da produção de inibina B pelas GC através da ativação da via Smad2 (10). E também é responsável pela promoção da biossíntese de colesterol pelas células do cumulus momentos antes da ovulação, o que permite o aporte adequado de precursores metabólicos ao oócito (11). Alterações no gene que codifica o GDF-9 foram

associadas com infertilidade em diversas espécies e, em mulheres, essas alterações foram estudadas em várias doenças ginecológicas.

O AMH é uma proteína presente, nas mulheres, de forma restrita ao ovário, é produzida pelas GC de folículos em desenvolvimento e sua expressão ocorre imediatamente após o recrutamento folicular (6). Sua principal função está relacionada com a seleção do folículo dominante e, para isso, ele está envolvido na regulação da ativação dos folículos primordiais e na inibição do crescimento destes folículos através do ajuste fino da sensibilidade do folículo ao FSH (12).

Por ser detectável no soro humano e por refletir o estoque de folículos ovarianos recrutados, o AMH tem sido utilizado para estimar a reserva ovariana em mulheres com dificuldade para gestar (13). Os níveis séricos do AMH na endometriose estão abaixo dos níveis fisiológicos normais e variam conforme os graus da doença, sendo maior nos graus I e II e menor nos graus III e IV (14). Entre causas diferentes de infertilidade, o AMH apresentou menores níveis nas mulheres inférteis por endometriose do que nas mulheres inférteis por obstrução tubária (15). Menor quantidade de AMH disponível no ovário pode afetar negativamente o processo de seleção do folículo dominante e refletir em uma depleção mais rápida da reserva ovariana, além de alterações genéticas como o polimorfismo do *AMH* p.Ile49Ser que provoca alteração na bioatividade da proteína (16). A variante AMH 49Ser foi relacionada a maiores níveis de estradiol do que o AMH 49Ile na fase folicular em mulheres com ciclos menstruais regulares (17). A alteração -482A>G no gene do receptor tipo 2 do AMH (*AMHR2*) foi relacionada à antecipação em 2,6 anos na idade de menopausa natural (18).

Mutações genéticas vêm sendo estudadas nos genes que codificam as proteínas GDF-9, AMH e *AMHR2*, e a consequência dessas alterações pode ser a formação de uma proteína deformada, secreção alterada, variação na bioatividade e/ou redução da estabilidade da proteína (19). Dessa forma, nosso objetivo é verificar a frequência dos Polimorfismos de Único Nucleotídeo (SNPs) dos genes *GDF-9* (c.398-39C>G, c.436C>T, c.447C>T, c.546G>A, c.557C>A e c.646G>A), *AMH* (p.Ile49Ser) e do seu receptor *AMHR2* (-482A>G) em mulheres inférteis com endometriose na tentativa de entender melhor a doença e buscar melhores formas de manejar a infertilidade.

2 Revisão da literatura

2.1 Endometriose

A endometriose, por definição, é uma desordem ginecológica estrógeno-dependente caracterizada pela presença/disseminação de tecido glandular e estroma endometrial fora da cavidade uterina (1). Esta patologia pode ocorrer sem sinais ou sintomas, sendo diagnosticada, muitas vezes, em função da dificuldade ou incapacidade de gestar; ou de forma sintomática, cursando, principalmente, com dor pélvica cíclica ou crônica, dismenorreia, dispareunia e/ou infertilidade (2).

A endometriose é o resultado da interação entre diversos fatores (genéticos e ambientais) (1) e a história familiar é um dado importante a se considerar quando existe possibilidade de que o diagnóstico seja endometriose: mulheres com história familiar são afetadas sete vezes mais do que mulheres sem história familiar (20). Isso demonstra que há forte envolvimento hereditário e genético na doença. Com relação à composição genética da endometriose, sabe-se que há envolvimento dos cromossomos 7 e 10, mas genes específicos não haviam sido determinados até 2009 (20).

Menstruação retrógrada, teoria aceita pela maioria dos pesquisadores para explicar a etiologia da doença, consiste no refluxo de tecido endometrial através das trompas de Falópio em direção à cavidade peritoneal (21); esse tecido pode se disseminar, implantar e crescer, pois apresenta capacidade de angiogênese, linfangiogênese e neurogênese, e são essas características que permitem o sucesso do implante ectópico, diante disso ocorre resposta imunológica e a geração dos sintomas relacionados à endometriose (22).

Os implantes endometrióticos podem ser de diversos tamanhos e se aderir em vários órgãos. O mais frequente é que o endométrio ectópico se instale na cavidade peritoneal e no entorno dos ovários, entretanto também já foi encontrado no pericárdio, na pleura, parênquima pulmonar e, raro, no cérebro. Diferentes tamanhos e localização dos implantes é que possibilitam que a doença apresente graus de complexidade e gravidade. No entanto, é difícil classificar as pacientes que apresentam esta doença (23).

Atualmente, o sistema de classificação proposto pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) em 1996 é o mais utilizado. A ASRM categoriza a

endometriose considerando tamanho, profundidade, localização dos implantes endometrióticos e gravidade das aderências: grau 1 (mínima – implantes isolados e sem aderências significativas), grau 2 (leve – implantes superficiais com menos de 5 cm, sem aderências significativas), grau 3 (moderada – múltiplos implantes, aderências peritubárias e periovarianas evidentes) e grau 4 (severa – múltiplos implantes superficiais e profundos, incluindo endometriomas e aderências densas e firmes) (24). Este sistema não correlaciona o grau de endometriose com a possibilidade de gravidez durante a fase e nem após o tratamento da doença (25).

Outra classificação apresenta a endometriose em três formas: peritoneal, ovariana e profunda. Na endometriose peritoneal, observam-se lesões na superfície de órgãos da cavidade peritoneal, como intestino, bexiga e ureter; seus principais sintomas são cólica, irregularidade menstrual e infertilidade. A endometriose ovariana apresenta lesões na superfície externa do ovário que também aparecem como cistos ovarianos por provocarem retração para o interior do mesmo; normalmente cursa sem sintomas ou com sintomas discretos. A endometriose profunda influencia sobremaneira a fertilidade feminina e é a que apresenta maior número de sintomas e mais intensos: dor pélvica crônica, dispareunia, dismenorreia, queixas gastrointestinais; essa forma de endometriose apresenta implantes que envolvem intestino, septo reto-vaginal, bexiga, ureteres e ligamentos útero-sacos (26).

Com relação à epidemiologia, a endometriose afeta aproximadamente uma em cada sete mulheres em idade reprodutiva (1). O diagnóstico comumente é realizado por volta dos 30 anos de idade em mulheres com queixas de infertilidade e em torno dos 33 anos em mulheres que referem dor, sendo rara antes da menarca e pouco referida após a menopausa (27). Dentre a população feminina fértil, 0,5-5% das mulheres apresenta endometriose; com relação à população feminina infértil, a endometriose está presente em 25-40% (4). Estima-se que 50% das pacientes com endometriose sejam, ao menos, subférteis (28) e a taxa de fecundidade de mulheres com endometriose não tratadas é menor do que a de casais normais (2). Apesar de estar bem estabelecida a relação entre endometriose e infertilidade, relacionar o grau da endometriose com o comprometimento da fertilidade ainda é um desafio.

A investigação da endometriose considera sintomas e sinais clínicos que levam à realização de laparoscopia com inspeção direta da cavidade e visualização dos implantes (não sendo necessária a confirmação histopatológica através de biópsia)

para confirmação do diagnóstico. Esta técnica cirúrgica é considerada padrão-ouro para o diagnóstico, segundo consenso entre a Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) e a ASRM (24,29).

Realizado o diagnóstico, é chegado o momento do tratamento, no entanto, é necessário levar em consideração o desejo ou não de gestar da paciente. O tratamento pode ser hormonal ou cirúrgico. O tratamento hormonal baseia-se na informação de que a endometriose é uma doença estrógeno-dependente, dessa forma, visa moderar a produção de estrógeno pelo organismo da paciente fazendo com que seja controlada a proliferação do endométrio. Alguns medicamentos são utilizados, como contraceptivo oral, progestinas/progesterona, análogos do GnRH, Danazol e Mirena. O tratamento cirúrgico é realizado pela remoção dos implantes endometrióticos no momento em que se faz o diagnóstico. Há duas possibilidades de tratamento cirúrgico: conservador e definitivo. A cirurgia conservadora prevê a remoção dos focos da endometriose para restauração da anatomia pélvica; e a cirurgia definitiva envolve histerectomia com ou sem ooforectomia, este tipo de cirurgia não deve ser realizado nas pacientes que desejam gestar (29).

2.2 Endometriose e infertilidade

A endometriose causa decréscimo de fertilidade ou até mesmo infertilidade nas mulheres. A taxa de fecundidade de um casal saudável é de 15 a 20% por mês; em um casal cuja mulher é acometida pela endometriose essa taxa cai para 2 a 10% (3). Apesar de a associação entre endometriose e infertilidade estar bem sedimentada na literatura, ainda são escassas as informações que expliquem de forma clara esse envolvimento.

O comprometimento da fertilidade nestas mulheres pode estar relacionado ao estadiamento da doença em função do tipo da endometriose e da gravidade das lesões, entretanto determinar um prognóstico de fertilidade baseado no sistema de estadiamento é algo severamente limitado (30).

Uma evidência é a distorção anatômica que os implantes endometrióticos podem causar no sistema reprodutivo feminino ocasionando impedimento físico da chegada tanto do oócito quanto dos espermatozoides ao local ideal da fertilização e, no caso de ocorrer fertilização, esses implantes podem prejudicar o transporte do embrião ao local de nidação (31).

A inflamação decorrente da endometriose na cavidade peritoneal altera a ovulação e influencia negativamente a produção de oócitos pelo ovário. Essa inflamação também prejudica a qualidade e a funcionalidade do espermatozoides em função da maior quantidade de macrófagos ativados (31). Além disso, na endometriose ocorre insuficiência da fase lútea (32) com níveis diminuídos de progesterona (33) e isso influencia a receptividade endometrial ao embrião (31), como nosso grupo de pesquisa já mencionara. Foi sugerido que há uma comunicação bidirecional entre o endométrio ectópico e o endométrio eutópico alterando a polaridade do endométrio eutópico requerida para a fertilidade normal (31,34).

A alteração de vários genes está presente na endometriose e afeta a fertilidade. Um desses é o gene *Hoxa10* e o pico da sua expressão ocorre durante a janela de implantação em resposta ao estímulo do estrogênio e da progesterona, este gene é importante para a regeneração do endométrio após o evento menstrual. Mulheres inférteis com endometriose apresentam expressão diminuída deste gene e, conseqüentemente, a receptividade do seu endométrio é menor refletindo negativamente na taxa de implantação (35).

Além desse, outros genes vem sendo investigados na tentativa de entender o envolvimento genético na infertilidade associada à endometriose, como os genes do Hormônio Luteinizante (LH) e seu receptor LHR (36) e do receptor de dopamina D2 (37), estudados pelo nosso grupo. Desenvolvemos essa linha de pesquisa justamente para tentar entender melhor qual sinalização hormonal pode estar associada com a infertilidade em mulheres que apresentam endometriose.

Para preservar a fertilidade da mulher com endometriose que deseja gestar são realizados determinados procedimentos dependendo do grau de comprometimento do sistema reprodutivo. Remover os implantes endometrióticos por meio cirúrgico é a base do manejo e apresenta resultado positivo em todos os estágios da doença por corrigir a anatomia pélvica. Em seguida, duas técnicas de reprodução assistida podem ser utilizadas: superovulação com Inseminação Intrauterina para formas mais amenas da doença e Fertilização *in vitro* com Transferência Embrionária para casos mais complexos que envolvem dano tubário (30,38).

2.3 Desenvolvimento oocitário

A fertilidade feminina depende de dois processos que ocorrem simultaneamente no interior do ovário: oogênese e foliculogênese. O primeiro consiste na evolução do

oócito, a célula germinativa; e o segundo, na evolução das camadas de células que formam o folículo que envolve essa unidade germinativa (39). Esses processos começam na embriogênese com a formação dos folículos primordiais que compõem a reserva ovariana (estoque de folículos imaturos de oócitos ainda não capacitados que ficam armazenados no ovário em estado de dormência), e se encerram na menopausa que é consequência da depleção quase total desses folículos e marca o fim da vida reprodutiva feminina (6).

Somente durante o ciclo reprodutivo esses folículos são liberados da dormência e inicia o seu desenvolvimento através da série de fases coordenadas da foliculogênese, esse desenvolvimento culmina na ovulação (40). Esse desenvolvimento depende da comunicação bidirecional entre o oócito e as células da granulosa (GC) e da teca (TC), que formam o folículo, através da ação de fatores intra e extraovarianos que agem de forma autócrina e parácrina (41). No grupo de fatores intraovarianos, podem ser citados alguns membros da superfamília TGF- β : Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF-9), Proteínas Morfogenéticas Ósseas 15 e 6 (BMPs), Inibinas, Activinas e Hormônio Anti-Mülleriano (AMH). Os fatores extraovarianos são as gonadotrofinas, Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH), secretadas pela adenoipófise (6).

Gougeon, em 1986, propôs que o crescimento do folículo fosse subdividido em 8 categorias, no entanto, fica clara a divisão em duas fases principais: a fase pré-antral e a fase antral (39). A fase pré-antral consiste na parte inicial do crescimento do folículo, é a evolução do folículo primordial a folículo primário e secundário chegando ao tamanho de aproximadamente 0,2 mm de diâmetro. Nesta fase estão envolvidos apenas fatores de crescimento locais. A maior marca desta fase é a proliferação de GC e TC: a organização destas células leva à formação de uma cavidade cheia de líquido – o antro – e é nesse momento que se inicia a fase antral. Na fase antral, o folículo (com 0,2 mm e antro formado) começa a responder às gonadotrofinas (42). No início, o crescimento do folículo depende do balanço da ação do FSH, que promove o seu crescimento, e da ação do AMH, que regula a sua sensibilidade ao FSH (6). Este é o momento em que ocorre a seleção do folículo dominante, este folículo já tem receptores de FSH e LH em sua superfície e passa a responder a estes hormônios até que se torne folículo pré-ovulatório com 16 mm e ovulatório com aproximadamente 20 mm de diâmetro (39).

2.4 Superfamília de Fatores de Crescimento Transformantes β (TGF- β)

A superfamília TGF- β é formada por proteínas sintetizadas como pró-peptídeos que se tornam dímeros (homo ou heterodímeros) ligados por pontes dissulfeto após seu processamento (43). Esses fatores estão envolvidos em uma série de eventos fisiológicos e patológicos de vários tecidos como diferenciação, apoptose, proliferação e especificação celular, e sua ação se dá de forma autócrina ou parácrina por meio da ativação de fatores de transcrição intracelulares Smad que, junto a outros co-fatores transcricionais, regulam a expressão gênica. Este grupo de mais de 40 proteínas é subdividido em famílias menores: subfamília TGF- β , subfamília ativina/inibina, AMH, BMPs e GDFs (6).

Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* com diversas espécies mostram que fatores desta família são expressos no ovário sendo relacionados com a formação do estoque de folículos na fase embrionária e, após, nas fases de recrutamento, crescimento e diferenciação de oócitos e folículos (tanto na fase pré-antral quanto na fase antral) podendo estar relacionados com o controle da reserva ovariana (6,8).

Fator de Crescimento Transformante β (TGF- β)

Os TGF- β são citocinas homodiméricas e, em mamíferos, são sintetizadas sob três isoformas: TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3 (8). Embora alguns estudos tenham sido realizados em camundongos, ainda são escassas as informações sobre os efeitos dessas proteínas na formação dos oócitos ou na montagem e ativação dos folículos primordiais. Um estudo em ovários de camundongos recém-nascidos nocaute para os três genes sugeriu que o TGF β 2 pode apresentar papel na regulação do número de células germinativas da fêmea possivelmente por mediar a apoptose (6).

Ativina *versus* inibina e folistatina

Ativinas são homo e heterodímeros formados por subunidades β A e β B, que resultam em três moléculas: ativina A, ativina B e ativina AB, as formas A e B são as mais comuns (8). Seus receptores são expressos em células germinativas (oogônias e oócitos) e em células somáticas (células da granulosa, da teca e luteais), e seu efeito pode ser diminuído por dois tipos de proteínas: inibina e folistatina. Essas três proteínas (ativina, inibina e folistatina) são secretadas pelas células da granulosa e flutuam simultaneamente no ovário (10).

A inibina é uma proteína sintetizada em duas isoformas, A e B, formadas por subunidades α e pelas mesmas subunidades β das ativinas, isso faz com que possam se ligar aos receptores das ativinas diminuindo seu efeito por competição (6). A regulação positiva da produção dessas proteínas pelas GC é realizada pelas gonadotrofinas e pelo fator oocitário GDF-9 (10). A folistatina é uma glicoproteína extracelular encontrada em três isoformas: FST288, FST303 e FST315, e apresenta alta afinidade pela ativina de forma que, ligando-se a ela, a impede de interagir com o seu receptor de sinalização (6).

Um estudo com ovários fetais humanos revelou que a ativina e seu receptor são expressos no período anterior à formação dos folículos primordiais, este dado sugere que a ativina esteja envolvida na regulação da proliferação e da sobrevivência das células germinativas (44). A ativina também estimula a expressão de receptores para o FSH nas GC e age junto com este hormônio regulando a proliferação e a diferenciação dessas células em estágios avançados da foliculogênese (8).

A expressão de inibina e folistatina tem papel fundamental para os efeitos da ativina. É o balanço entre a expressão de ativina e dos seus antagonistas que, entre outros eventos, influencia a foliculogênese. Entretanto, ainda há lacunas para o entendimento do papel definitivo destas moléculas (8,45).

Hormônio Anti-Mülleriano (AMH)

O AMH é uma proteína presente, em mulheres, de forma restrita ao ovário sendo produzido pelas GC de folículos em desenvolvimento (primeiramente aparece em folículos primários, aumenta em folículos pré-antrais e antrais de tamanho ≤ 4 mm e desaparece gradualmente em folículos antrais de tamanho de 4-8 mm) (6,46).

As principais funções do AMH estão relacionadas com a seleção do folículo dominante, para isso ele está envolvido na regulação da ativação dos folículos primordiais e na inibição do crescimento destes folículos. Três mecanismos são sugeridos para essa ação: (i) interação direta com receptores AMHR2 nas GC de folículos em estágios de desenvolvimento iniciais; (ii) de forma indireta, por diminuir a sinalização de fatores de crescimento que promovem a transição de folículo primordial a folículo primário (fator de crescimento de fibroblasto, kit ligante, fator de crescimento de queratinócitos), e (iii) por agir nas células ovarianas diminuindo a

expressão dos receptores de ligação desses fatores de crescimento, o que diminui a responsividade das células a esses fatores (8).

Há envolvimento do AMH no ajuste fino da sensibilidade do folículo ao FSH. Na fase folicular do ciclo menstrual, há aumento do nível de FSH que recruta uma coorte de folículos quiescentes para continuar o crescimento, no entanto, destes folículos recrutados apenas um se tornará dominante e ovulará. O processo de seleção do folículo para a dominância ainda não é bem esclarecido, porém sabe-se que o AMH diminui a sensibilidade dos folículos ao FSH, inibindo seu crescimento (12). O receptor para o AMH – AMHR2 – não é expresso em folículos antrais, fazendo com que o AMH não tenha efeito sobre estes e permitindo que o FSH promova o seu crescimento (47).

O AMH é detectável no soro humano e tem sido utilizado para estimar o tamanho e a qualidade da reserva ovariana em mulheres com dificuldade para gestar (8). Essa medida é indireta uma vez que ele é expresso por folículos em crescimento e não pelos folículos primordiais que compõem a reserva ovariana (6). Um estudo com mulheres submetidas à Fertilização *in vitro* mostrou que a concentração sérica de 0,2 ng/mL de AMH pode ser utilizada como ponto de corte para prever a qualidade da reserva ovariana, uma vez que mulheres com níveis abaixo de 0,2 ng/mL apresentaram menor Contagem de Folículos Antrais (AFC) (teste realizado por ultrassonografia para predição da reserva ovariana) e menores taxas de gravidez clínica do que aquelas com níveis maiores do que este (48). Além disso, os níveis séricos de AMH diminuem com o avanço da idade ovariana (a idade ovariana avança à medida que decresce o estoque de folículos) tornando-se indetectáveis após a menopausa (46).

Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) e Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF-9)

As BMPs aparecem em vários tecidos regulando crescimento, diferenciação e morte celular. Dentre as aproximadamente 20 BMPs descritas, várias são expressas no ovário e é bem conhecido seu papel de reguladoras positivas da especificação e proliferação de células germinativas primordiais no período embrionário de vários mamíferos. O GDF-9 é a principal proteína da subfamília de GDFs, é expresso no ovário de fetos humanos e apresenta papel essencial no desenvolvimento inicial dos folículos (6,9).

Cada compartimento do complexo oócito-folículo expressa diferentes fatores que permitem a comunicação bi-direcional oócito/GC e GC/TC, como é mostrado na Figura 1 (9):

- oócito expressa BMP-6, BMP-15 e GDF-9
- GC expressam BMP-2, BMP-5 e BMP-6
- TC expressam BMP-2, BMP-3b, BMP-4 e BMP-7.

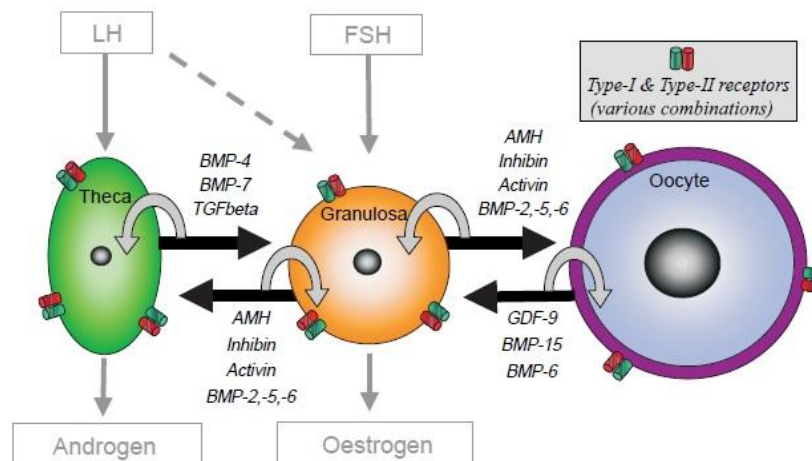


Figura 1: Membros da superfamília TGF- β envolvidos na comunicação entre o oócito e as células da granulosa e da teca que compõem o folículo. (Fonte: Knight et al., 2006)

O papel da BMP-2 ainda não foi claramente determinado. BMP-4 e BMP-7 estão relacionadas com a ativação de folículos primordiais e BMP-7 mostrou-se necessária para a proliferação de células germinativas em ovários de ratas, entretanto, esta proteína não é bem expressa em humanos (6). No folículo primário, BMP-4 e BMP-7 aumentam a proliferação das GC, promovendo o crescimento do folículo pré-antral e a sua sobrevivência. No folículo antral, essas duas proteínas aumentam: a produção basal e/ou FSH-dependente de estrógeno, a produção de ativina/inibina e a proliferação de GC; e diminuem: a produção de progesterona pelas GC e a produção basal e/ou LH-dependente de andrógeno pelas TC. No corpo lúteo, diminuem a luteinização das GC, podendo diminuir a ovulação (9).

BMP-6 é expressa pelas GC de folículos primordiais e primários e por oócitos de folículos antrais. Essa proteína promove a proliferação de GC em folículos antrais e diminui a produção de progesterona por estas células, além de diminuir a produção de andrógenos pelas TC (9).

BMP-15 (também conhecida como GDF-9b) e GDF-9 são proteínas secretadas somente pelo oócito dos folículos em estágio primário e secundário e tem sua origem em genes parálogos (genes que dão origem a proteínas de função semelhante). A sinalização dessas proteínas é parácrina e ocorre por vias distintas: a ação da BMP-15 se dá via Smad1/5/8 e a ação do GDF-9 pela via Smad2/3, mas suas ações se somam para influenciar as funções ovarianas (9).

Sabe-se que, como outros membros da superfamília TGF- β , GDF-9 e BMP-15 são sintetizados como pré-proteínas que, após clivagem proteolítica, formam homodímeros (GDF-9:GDF-9 e BMP-15:BMP-15) ou heterodímeros (GDF-9:BMP-15). Em 2013, um estudo *in vitro* mostrou que o heterodímero GDF-9:BMP-15 é, em humanos, 1000 a 3000 vezes mais potente biologicamente que o homodímero BMP-15 e que, em ratos, o heterodímero é 10 a 30 vezes mais potente que o homodímero GDF-9, além disso este heterodímero apresenta via de sinalização diferente das vias utilizadas pelos homodímeros (49).

A principal função do GDF-9 e da BMP-15 é promover o avanço do folículo primário para o estágio de folículo secundário. Para isso, eles sinalizam a proliferação de GC e a proliferação e diferenciação de TC no entorno do folículo primário. No folículo secundário, continuam estimulando a proliferação de GC, porém diminuem a produção de progesterona por estas células e aumentam a expansão e reorganização do cumulus para formação do antro. Neste momento, o GDF-9 também estimula a expressão de receptores de FSH na superfície das GC do folículo pré-antral, que passa a ser responsivo às gonadotrofinas (8,9).

Além dessas funções, o GDF-9 está envolvido, como fator local e agindo de forma parácrina, na regulação positiva da produção de inibina B pelas GC através da ativação da via Smad2 (10). E também é responsável pela promoção da biossíntese de colesterol pelas células do cumulus momentos antes da ovulação, o que permite o aporte adequado de precursores metabólicos ao oócito (11).

2.5 AMH, AMHR2 e polimorfismos genéticos

O AMH é expresso nos folículos pré-antrais e antrais pequenos e está bem estabelecido o seu envolvimento na diminuição da sensibilidade dos folículos ao FSH, o que leva à inibição do crescimento dos folículos recrutados e à seleção do folículo dominante (6). No entanto, essas funções podem ser alteradas pela presença de polimorfismos nos genes que codificam o AMH e o seu receptor.

A variante genética do AMH p.Ile49Ser (c.146T>G), substituição de uma isoleucina (aminoácido não-polar) por uma serina (aminoácido polar), provoca mudança no dobramento e na estabilidade da proteína alterando sua bioatividade (16,50).

Foi demonstrado que a variante AMH 49Ser apresenta menor bioatividade em comparação com a proteína selvagem 49Ile. Mulheres com esta variante 49Ser (tanto homozigotas Ser/Ser quanto heterozigotas Ile/Ser) apresentaram contagem menor de folículos totais do que mulheres homozigotas para AMH 49Ile. Parece, portanto, que a variante AMH 49Ser tem menor atividade biológica que a AMH 49Ile, fazendo com que iniba menos a sensibilidade individual dos folículos ao FSH (16).

Além disso, a variante AMH 49Ser foi relacionada a maiores níveis de estradiol do que o AMH 49Ile na fase folicular em mulheres com ciclos menstruais regulares. Essa informação sugere que a atividade da enzima aromatase, que converte androstenediona em estrona, está alterada positivamente. O controle da atividade desta enzima é realizado pelo balanço entre a atividade dos hormônios FSH, que a estimula, e AMH, que a inibe. Uma vez que o AMH tenha sua bioatividade diminuída geneticamente na variante 49Ser, a inibição da aromatase é prejudicada e os níveis de estradiol tendem a aumentar (17).

No gene *AMHR2* foi encontrada a alteração -482A>G, que constitui a troca do nucleotídeo adenina por guanina na posição 482 do gene e, com relação à reprodução, foi relacionada com paridade e com a idade da menopausa natural. A paridade apresenta diferença entre os genótipos do *AMHR2*: mulheres GG foram mais frequentemente nulíparas (31,6%) do que aquelas com genótipos AA (22,5%) ou AG (18,2%). Também foi observado que as mulheres nulíparas com genótipo GG chegaram à menopausa 2,6 anos antes do que as nulíparas com genótipo AA. Desta forma, pode-se associar a presença de *AMHR2* -482G à antecipação da idade de menopausa natural (18).

Os polimorfismos do *AMH* e do seu receptor foram estudados em mulheres com infertilidade normo-estrogênica e normo-ovulatória. Foi observado que nessas mulheres, comparando-se com um grupo controle formado por mulheres férteis, a frequência do alelo T e do genótipo *TT* do AMH (49Ile) foi maior e que o alelo A do *AMHR2* também foi mais frequente, porém os genótipos do *AMHR2* tiveram distribuição igual entre os grupos (50).

2.6 AMH, AMHR2 e endometriose

Na medicina reprodutiva, tem sido bastante utilizado o nível sérico do AMH na fase folicular para prever a resposta de pacientes subférteis ou inférteis submetidas a tratamentos de fertilização. Maiores concentrações de AMH no terceiro dia do ciclo estão associadas a maior número e melhor qualidade dos oócitos recuperados (13).

Os níveis séricos do AMH na endometriose estão abaixo dos níveis fisiológicos normais. Um estudo que compara a concentração deste hormônio em mulheres com e sem endometriose teve como resultado concentração média de, respectivamente, 2,75 e 3,46 ng/mL. Dentro do grupo endometriose, foi encontrada diferença entre a concentração de AMH e os graus da doença, sendo que os graus I e II apresentaram maior concentração de AMH do que os graus III e IV (14).

Nosso grupo também estudou o AMH em mulheres com infertilidade decorrente de endometriose mínima/leve ou de obstrução tubária e, como resultado, encontramos níveis séricos de AMH de 1,26 ng/mL para as mulheres com endometriose e 2,02 ng/mL para as mulheres com obstrução tubária (15).

Sabe-se que os níveis de AMH estão diminuídos na endometriose e estão relacionados com infertilidade. Os polimorfismos do gene *AMH* e do seu receptor *AMHR2* levam à diminuição da bioatividade deste hormônio, o que influencia o crescimento e a seleção dos folículos ovarianos. Desta forma, interessa estudar se os polimorfismos desses dois genes influenciam a infertilidade associada à endometriose.

2.7 GDF-9 e polimorfismos genéticos

GDF-9 e BMP-15 são fatores ovarianos pertencentes à superfamília TGF- β . Esses fatores são codificados por genes localizados, respectivamente, nas posições 5q31.1 e Xp11.2 do genoma humano (7,51). Ambos estão envolvidos em diversos processos biológicos e, no ovário, são secretados pelo oócito promovendo a sua comunicação com as células somáticas que o rodeiam, as GC e TC que compõem o folículo, através de sua ação parácrina durante a foliculogênese (41).

Alterações no gene dessas proteínas podem ter consequências nos eventos reprodutivos influenciados por esses fatores. Dentre as alterações genéticas mais comuns estão os Polimorfismos de Único Nucleotídeo (SNPs), que são mutações com frequência de pelo menos 1% na população e correspondem à troca de uma única base nitrogenada por outra na sequência do DNA. Os principais SNPs são

decorrentes de mutações silenciosas (quando a troca de bases nitrogenadas não acarreta mudança de aminoácido na proteína) ou de sentido trocado (quando há substituição de um aminoácido por outro) (52). No entanto, há evidências de que mesmo as mutações silenciosas podem estar relacionadas a diferenças qualitativas ou quantitativas da expressão gênica ao substituírem um códon mais usado por um códon mais raro (53).

Quando a mutação implica na substituição de um aminoácido por outro de características bioquímicas diferentes, pode ocorrer mudança na estrutura da proteína final. A consequência desse tipo de alteração pode ser a formação de uma proteína deformada, alteração de secreção, variação na bioatividade e redução da estabilidade da proteína (19).

O GDF-9 é codificado por um gene composto por dois exons que dá origem a uma proteína de 454 aminoácidos (7). Vem sendo descritos diversos SNPs neste gene, os principais estão listados na Tabela 1. Essas variantes foram encontradas em estudos genéticos realizados em mulheres com Falência Ovariana Prematura (FOP) (7,51,54,55), mulheres com Reserva Ovariana Diminuída (56), mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos (19) e em mães de gêmeos dizigóticos (57).

Tabela 1. Principais SNPs do gene *GDF-9*.

Nucleotídeo alterado	Aminoácido alterado	Localização do SNP	Efeito biológico	Referência
c.169G>T	p.Asp57Tyr	Exon 1	PCOS	Wang B et al., 2010
c.199A>C	p.Lys67Glu	Exon 1	POF	Dixit et al., 2005
c.307C>T	p.Pro103Ser	Exon 1	POF	Kovanci et al., 2007
c.398-39C>G	–	Intron	POF	Dixit et al., 2005
c.436C>T	p.Arg146Cys	Exon 2	POF	Zhao et al., 2007
c.447C>T	p.Thr149Thr	Exon 2	POF	Dixit et al., 2005
c.546G>A	p.Glu182Glu	Exon 2	DOR	Wang TT et al., 2010
c.557C>A	p.Ser186Tyr	Exon 2	POF	Laissue et al., 2006
c.646G>A	p.Val216Met	Exon 2	POF	Dixit et al., 2005

O SNP c.199A>C, no exon 1, leva à substituição de uma lisina, aminoácido carregado positivamente, por uma glutamina hidrofílica (54). Já o SNP c.307C>T envolve a troca do aminoácido hidrofóbico prolina pelo aminoácido hidrofílico serina (7,57). Este SNP foi descrito em mães de gêmeos dizigóticos e observou-se que as

mesmas apresentam tendência maior a entrar na menopausa antes dos 40 anos de idade do que mães de gêmeos monozigóticos. Essa tendência à antecipação da menopausa provavelmente deve-se ao aumento da taxa de ovulação observado nessas mulheres, o que tem como consequência uma depleção mais rápida da sua reserva ovariana (57).

No exon 2, o SNP c.436C>T é a troca de um resíduo de arginina, carregado positivamente, por cisteína, resíduo de aminoácido não-carregado polar (55). Em um estudo com cultura celular, observou-se que esta mutação parece reduzir a capacidade do GDF-9 em estimular a proliferação das GC e ativar a via Smad2 (58). A substituição de serina (resíduo de aminoácido não-carregado polar) por tirosina (resíduo de aminoácido aromático) na posição 186 da proteína foi revelada em uma paciente com amenorreia secundária, porém em nenhuma paciente fértil, o que sugere efeito patogênico desta mutação (51).

Na posição 546 do exon 2, pode ocorrer a troca de uma guanina (alelo selvagem) por uma adenina (alelo mutante). Esta é uma mutação silenciosa que não leva à troca de aminoácido, no entanto foi encontrada uma alta prevalência dos genótipos GA/AA em mulheres com reserva ovariana diminuída, o que indica que este SNP altere a expressão do gene *GDF-9* (56).

O resíduo de aminoácido valina (hidrofóbico não-sulfurado) pode ser substituído pelo resíduo de metionina (ligeiramente polar sulfurado) na posição 216 da proteína, consequência do SNP c.646G>A. O gene mutante foi encontrado em pacientes com FOP e, sabendo-se que esta região do gene é altamente conservada (valina), a presença da mutação pode sugerir que ocorre alteração no processamento da proteína em pacientes com esta condição (54).

2.8 GDF-9 e endometriose

O GDF-9 é um fator oocitário importante para a evolução do folículo e para a capacitação do próprio oócito. Com relação à endometriose, apenas foi encontrado que sua concentração no fluido folicular de folículos pré-ovulatórios de mulheres inférteis com endometriose severa é menor do que em mulheres sem endometriose (59). Polimorfismos no gene que o codifica podem levar à falha do desenvolvimento oocitário em diversas espécies e, em mulheres, foram estudados em várias doenças ginecológicas. No entanto, não há dados na literatura que relacionem SNPs do *GDF-9* e mulheres com dificuldade para gestar acometidas pela endometriose.

3 Justificativa

Nosso grupo tem estudado anormalidades hormonais como substrato para infertilidade em mulheres com endometriose. Já evidenciamos anormalidade na secreção de progesterona (33), maturação endometrial (32), reserva ovariana (com diminuição do AMH) (15) e, recentemente, frequência genotípica do gene do receptor de dopamina D2 (37) e do receptor do LH (36).

GDF-9, AMH e AMHR2 são proteínas estreitamente envolvidas no processo de foliculogênese, diante do fato de que alterações no gene que dá origem a essas proteínas podem ter consequências nos eventos reprodutivos influenciados por esses fatores, podemos sugerir que são genes que podem estar associados a sub-fertilidade nesta população de mulheres com endometriose.

4 Hipótese nula

Os polimorfismos nos genes *GDF-9* (c.398-39C>G, c.436C>T, c.447C>T, c.546G>A, c.557C>A e c.646G>A), *AMH* (p.Ile49Ser) e do seu receptor *AMHR2* (-482A>G) não estão associados à endometriose e infertilidade.

5 Objetivos

1. Determinar a frequência do polimorfismo c.398-39C>G do gene *GDF-9* em mulheres inférteis com endometriose quando comparadas a mulheres férteis sem endometriose.
2. Determinar a frequência do polimorfismo c.436C>T do gene *GDF-9* em mulheres inférteis com endometriose quando comparadas a mulheres férteis sem endometriose.
3. Determinar a frequência do polimorfismo c.447C>T do gene *GDF-9* em mulheres inférteis com endometriose quando comparadas a mulheres férteis sem endometriose.
4. Determinar a frequência do polimorfismo c.546G>A do gene *GDF-9* em mulheres inférteis com endometriose quando comparadas a mulheres férteis sem endometriose.
5. Determinar a frequência do polimorfismo c.557C>A do gene *GDF-9* em mulheres inférteis com endometriose quando comparadas a mulheres férteis sem endometriose.
6. Determinar a frequência do polimorfismo c.646G>A do gene *GDF-9* em mulheres inférteis com endometriose quando comparadas a mulheres férteis sem endometriose.
7. Determinar a frequência do polimorfismo p.Ile49Ser do gene *AMH* em mulheres inférteis com endometriose quando comparadas a mulheres férteis sem endometriose.
8. Determinar a frequência do polimorfismo -482A>G do gene *AMHR2* em mulheres inférteis com endometriose quando comparadas a mulheres férteis sem endometriose.

6 Referências bibliográficas da revisão

1. Begum T, Chowdhury SR. Aetiology and pathogenesis of endometriosis - a review. *Mymensingh Med J.* 2013 Jan; 22(1):218-21.
2. Bedoschi G, Turan V, Oktay K. Fertility preservation options in women with endometriosis. *Minerva Ginecol.* 2013 Apr;65(2):99-103.
3. American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2012 Sep;98(3):591-8.
4. Harb H, Gallos I, Chu J, Harb M, Coomarasamy A. The effect of endometriosis on in vitro fertilisation outcome: a systematic review and meta-analysis. *BJOG.* 2013 Oct;120(11):1308-20.
5. Yoo JH, Cha SH, Park CW, Kim JY, Yang KM, Song IO, Koong MK, Kang IS, Kim HO. Serum anti-Müllerian hormone is a better predictor of ovarian response than FSH and age in IVF patients with endometriosis. *Clin Exp Reprod Med.* 2011 Dec;38(4):222-7.
6. Pangas SA. Regulation of the ovarian reserve by members of the transforming growth factor beta family. *Mol Reprod Dev.* 2012 Oct;79(10):666-79.
7. Kovanci E, Rohozinski J, Simpson JL, Heard MJ, Bishop CE, Carson SA. Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 2007 Jan;87(1):143-6.
8. Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE. Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis. *Semin Reprod Med.* 2009 Jan;27(1):14-23.
9. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 2006 Aug;132(2):191-206.
10. Kaivo-Oja N, Bondestam J, Kämäräinen M, Koskimies J, Vitt U, Cranfield M, Vuojolainen K, Kallio JP, Olkkonen VM, Hayashi M, Moustakas A, Groome NP, ten Dijke P, Hsueh AJ, Ritvos O. Growth differentiation factor-9 induces Smad2 activation and inhibin B production in cultured human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Feb;88(2):755-62.
11. Otsuka F, McTavish KJ, Shimasaki S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol Reprod Dev.* 2011 Jan;78(1):9-21.
12. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction.* 2002 Nov;124(5):601-9.
13. Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM. Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril.* 2002 Mar;77(3):468-71.
14. Shebl O, Ebner T, Sommergruber M, Sir A, Tews G. Anti müllerian hormone serum levels in women with endometriosis: a case-control study. *Gynecol Endocrinol.* 2009 Nov;25(11):713-6.

15. Lemos NA, Arbo E, Scalco R, Weiler E, Rosa V, Cunha-Filho JS. Decreased anti-Müllerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril*. 2008 May;89(5):1064-8.
16. Kevenaar ME, Laven JS, Fong SL, Uitterlinden AG, de Jong FH, Themmen AP, Visser JA. A functional anti-mullerian hormone gene polymorphism is associated with follicle number and androgen levels in polycystic ovary syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Apr;93(4):1310-6.
17. Kevenaar ME, Themmen AP, Laven JS, Sonntag B, Fong SL, Uitterlinden AG, de Jong FH, Pols HA, Simoni M, Visser JA. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor polymorphisms are associated with follicular phase estradiol levels in normo-ovulatory women. *Hum Reprod*. 2007 Jun;22(6):1547-54.
18. Kevenaar ME, Themmen AP, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Laven JS, van Schoor NM, Lips P, Pols HA, Visser JA. A polymorphism in the AMH type II receptor gene is associated with age at menopause in interaction with parity. *Hum Reprod*. 2007 Sep;22(9):2382-8.
19. Wang B, Zhou S, Wang J, Liu J, Ni F, Yan J, Mu Y, Cao Y, Ma X. Identification of novel missense mutations of GDF9 in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2010 Sep;21(3):344-8.
20. Serdar E, Bulun MD. Mechanisms of disease Endometriosis. *N Engl J Med*. 2009 Jan 15;360:268-79.
21. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004 Nov 13-19;364(9447):1789-99.
22. Hey-Cunningham AJ, Peters KM, Zevallos HB, Berbic M, Markham R, Fraser IS. Angiogenesis, lymphangiogenesis and neurogenesis in endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013 Jun 1;5:1033-56.
23. Krikun G. Endometriosis, Angiogenesis and Tissue Factor. *Scientifica*. Volume 2012, Article ID 306830, 10 pages.
24. American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997 May 5;67(5):817-21.
25. Guzick DS, Silliman NP, Adamson GD, Buttram Jr VC, Canis M, Malinak LR, Schenken RS. Prediction of pregnancy in infertile women based on the American Society for Reproductive Medicine's revised classification of endometriosis. *Fertil Steril*. 1997 May;67(5):822-9.
26. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*. 1997 Oct;68(4):585-96.
27. Bellelis P, Dias Jr JA, Podgaec S, Gonzales M, Baracat EC, Abrão MS. Aspectos epidemiológicos e clínicos da endometriose pélvica - uma série de casos. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(4):467-71.
28. Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A. Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2010; 27:441-7.

29. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E; ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*. 2005 Oct;20(10):2698-704.
30. Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA. Endometriosis and infertility: what do we do for each stage? *Curr Womens Health Rep*. 2003 Oct;3(5):389-94.
31. Macer ML, Taylor HS. Endometriosis and Infertility A Review of the Pathogenesis and Treatment of Endometriosis-associated Infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2012 Dec;39(4):535-49.
32. Cunha-Filho JS, Gross JL, Lemos NA, Brandelli A, Castillos M, Passos EP. Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis. *Horm Metab Res*. 2001 Apr;33(4):216-20.
33. Cunha-Filho JS, Gross JL, Bastos de Souza CA, Lemos NA, Giugliani C, Freitas F, Passos EP. Physiopathological aspects of corpus luteum defect in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *J Assist Reprod Genet*. 2003 Mar;20(3):117-21.
34. Santamaria X, Massasa EE, Taylor HS. Migration of cells from experimental endometriosis to the uterine endometrium. *Endocrinology*. 2012 Nov;153(11):5566-74.
35. Zanatta A, Rocha AM, Carvalho FM, Pereira RM, Taylor HS, Motta EL, Baracat EC, Serafini PC. The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review. *J Assist Reprod Genet*. 2010 Dec;27(12):701-10.
36. Schmitz CR, de Conto E, Genro VK, de Souza CAB, Matte U, Cunha-Filho JS. A common lh receptor polymorphism is associated to infertility and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*. 2013 Sep;100(3), Supplement, Page S23.
37. Bilibio JP, Matte U, de Conto E, Genro VK, Souza CA, Cunha-Filho JS. Dopamine receptor D2 genotype (3438) is associated with moderate/severe endometriosis in infertile women in Brazil. *Fertil Steril*. 2013 Apr;99(5):1340-5.
38. Ozkan S, Murk W, Arici A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Apr;1127:92-100.
39. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod*. 1986 Feb;1(2):81-7.
40. Hutt KJ, Albertini DF. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2007 Jun;14(6):758-64.
41. Kidder GM, Vanderhyden BC. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010 Apr;88(4):399-413.
42. Craig J, Orisaka M, Wang H, Orisaka S, Thompson W, Zhu C, Kotsuji F, Tsang BK. Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. *Front Biosci*. 2007 May 1;12:3628-39.

43. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol.* 1999 Jun;13(6):1035-48.
44. Martins da Silva SJ, Bayne RA, Cambray N, Hartley PS, McNeilly AS, Anderson RA. Expression of activin subunits and receptors in the developing human ovary: activin A promotes germ cell survival and proliferation before primordial follicle formation. *Dev Biol.* 2004 Feb 15;266(2):334-45.
45. Knight PG, Satchell L, Glistler C. Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Aug 15;359(1-2):53-65.
46. Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: its role in follicular growth initiation and survival and as an ovarian reserve marker. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2005;(34):18-21.
47. Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, de Jong FH, Themmen AP. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice. *Endocrinology.* 2007 May;148(5):2301-8.
48. Merhi Z, Zapantis A, Berger DS, Jindal SK. Determining an anti-mullerian hormone cutoff level to predict clinical pregnancy following in vitro fertilization in women with severely diminished ovarian reserve. *J Assist Reprod Genet.* 2013 Aug 21. In press.
49. Peng J, Li Q, Wigglesworth K, Rangarajan A, Kattamuri C, Peterson RT, Eppig JJ, Thompson TB, Matzuk MM. Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 19;110(8):E776-85.
50. Rigon C, Andrisani A, Forzan M, D'Antona D, Bruson A, Cosmi E, Ambrosini G, Tiboni GM, Clementi M. Association study of AMH and AMHRII polymorphisms with unexplained infertility. *Fertil Steril.* 2010 Sep;94(4):1244-8.
51. Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, Bourcigaux N, Jacquesson L, Bouchard P, Frydman R, Dewailly D, Reyss AC, Jeffery L, Bachelot A, Massin N, Fellous M, Veitia RA. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol.* 2006 May;154(5):739-44.
52. Shastry BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet.* 2002;47(11):561-6.
53. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science.* 2007 Jan 26;315(5811):525-8.
54. Dixit H, Rao LK, Padmalatha V, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakravarty B, Singh L. Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure. *Menopause.* 2005 Nov-Dec;12(6):749-54.
55. Zhao H, Qin Y, Kovanci E, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. Analyses of GDF9 mutation in 100 Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 2007 Nov;88(5):1474-6.

56. Wang TT, Wu YT, Dong MY, Sheng JZ, Leung PC, Huang HF. G546A polymorphism of growth differentiation factor-9 contributes to the poor outcome of ovarian stimulation in women with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2010 Nov;94(6):2490-2.
57. Palmer JS, Zhao ZZ, Hoekstra C, Hayward NK, Webb PM, Whiteman DC, Martin NG, Boomsma DI, Duffy DL, Montgomery GW. Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Nov;91(11):4713-6.
58. Wang TT, Ke ZH, Song Y, Chen LT, Chen XJ, Feng C, Zhang D, Zhang RJ, Wu YT, Zhang Y, Sheng JZ, Huang HF. Identification of a mutation in GDF9 as a novel cause of diminished ovarian reserve in young women. *Hum Reprod*. 2013 Sep;28(9):2473-81.
59. Hendarto H, Prabowo P, Moeloek FA, Soetjpto S. Growth differentiation factor 9 concentration in the follicular fluid of infertile women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2010 Jul;94(2):758-60.

7 Artigo

Artigo formatado nas normas da Revista *Human Reproduction*.

1 **1. TITLE**

2 Evaluation of the frequency of polymorphisms of *GDF-9* (c.398-39C>G, c.436C>T,
3 c.447C>T, c.546G>A, c.557C>A, c.646G>A), *AMH* (p.Ile49Ser) e *AMHR2* (–
4 482A>G) genes in infertile women with endometriosis.

5 **RUNNING TITLE**

6 *GDF-9*, *AMH* and *AMHR2* genes in infertile women with endometriosis.

7 **AUTHORS**

8 E. De Conto^{1*}

9 Ú. Matte²

10 J.P. Bilibio¹

11 V.K. Genro⁴

12 C.A. Souza⁴

13 J.S. Cunha-Filho^{1,3}

14 1. Graduate Program in Medicine: Medical Sciences of the Federal University of Rio
15 Grande do Sul (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS), Porto
16 Alegre/Rio Grande do Sul state, Brazil.

17 2. Center for Gene Therapy, Clinical Hospital of Porto Alegre (Hospital de Clínicas de
18 Porto Alegre - HCPA)/Rio Grande do Sul state, Brazil.

19 3. Department of Gynecology and Obstetrics, School of Medicine, UFRGS, Porto
20 Alegre/Rio Grande do Sul state, Brazil.

21 4. Gynecology and Obstetrics Unit, HCPA/Rio Grande do Sul state, Brazil.

- 22 *Address for correspondence. Phone +55-51-3359-8838; E-mail:
23 emydconto@yahoo.com.br

24 2. ABSTRACT

25 **STUDY QUESTION:** Considering that endometriosis is associated with changes in
26 oocyte development, we sought to determine if there is a correlation between
27 polymorphisms in the growth differentiation factor-9 (*GDF-9*) gene (c.398-39C>G,
28 c.436C>T, c.447C>T, c.546G>A, c.557C>A, c.646G>A), the anti-Müllerian hormone
29 (*AMH*) gene (p.Ile49Ser) and its receptor, *AMHR2* (–482A>G), with endometriosis-
30 associated infertility.

31 **SUMMARY ANSWER:** This study revealed no differences in the allele or genotype
32 frequencies of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *GDF-9*, *AMH* and
33 *AMHR2* genes of infertile patients with endometriosis. However, it is possible that the
34 c.447C>T and c.546G>A mutations in the *GDF-9* gene and the –482 A>G SNP in the
35 *AMHR2* gene influence fertility in endometriosis.

36 **WHAT IS KNOWN ALREADY:** *GDF-9* and *AMH* are members of the transforming
37 growth factor beta (TGF- β) superfamily involved in folliculogenesis and have decisive
38 roles in the ovarian reserve. Among other functions, these proteins are responsible
39 for regulating follicle growth and, consequently, oocyte maturation. Polymorphisms in
40 these genes affect female fertility because it has been shown that they are related to
41 subfertility/infertility and the earlier onset of menopause. There is evidence in the
42 literature based on measurements of serum *AMH* levels that women with
43 endometriosis present abnormalities in oocyte development and decreased ovarian
44 reserve.

45 **STUDY DESIGN, SIZE, DURATION:** This case-control study included 50 infertile
46 women with endometriosis and 50 fertile women undergoing laparoscopy for tubal
47 ligation as a control group. The exclusion criteria included autoimmune diseases,
48 coexistence of other causes of infertility, amenorrhea or irregular cycles.

49 **PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS:** The c.398-39C>G, c.436C>T
50 (p.Arg146Cys), c.447C>T (p.Thr149Thr), c.546G>A (p.Glu182Glu), c.557C>A
51 (p.Ser186Tyr) and c.646G>A (p.Val216Met) polymorphisms in the *GDF-9* gene were
52 determined by direct sequencing, and the polymorphisms p.Ile49Ser in the *AMH*
53 gene and -482A>G in the *AMHR2* gene were determined by genotyping using
54 TaqMan Allelic Discrimination.

55 **MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE:** Age was similar between the two
56 groups (33.5±5.2 vs. 33.9±4.0 years; $P=0.847$). The mean follicle-stimulating
57 hormone (FSH) levels were not statistically different (6.42±2.5 vs. 5.12±2.9 mIU/mL;
58 $P=0.064$). The significance levels between the groups for the genotype frequencies
59 of the polymorphisms in the *GDF-9* gene were $P=0.433$ for c.398-39C>G, $P=0.129$
60 for c.447C>T and $P=0.794$ for c.546G>A. However, the significance levels between
61 the groups for the genotype frequencies of the polymorphisms in the *AMH* and
62 *AMHR2* genes were $P=0.096$ and $P=0.140$, respectively, which represent statistical
63 trends. All SNPs were tested and followed Hardy-Weinberg equilibrium.

64 **LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION:** Because of the genetic nature of this
65 study, the heterogeneity of the samples and of endometriosis itself can interfere with
66 the results obtained. Therefore, we only selected women presenting peritoneal
67 endometriosis.

68 **WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS:** There are no studies in the literature
69 associating SNPs in the *GDF-9* gene with endometriosis. Thus, the information
70 presented in this study reveal new perspectives for understanding the ovulatory
71 disorders related to endometriosis. To better understand the consequences of these
72 genetic changes in the physiology of endometriosis, we intend to study the

73 expression of *GDF-9*, *AMH* and *AMHR2* genes and the signaling pathways these
74 proteins utilize.

75 **STUDY FUNDING/COMPETING INTERESTS:** Financial support for this study came
76 from the Research Incentive Fund (*Fundação de Incentivo a Pesquisas e Eventos-*
77 *FIPE*)-Clinical Hospital of Porto Alegre, the Coordination for the Improvement of
78 Higher Education Personnel (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível*
79 *Superior-CAPES*) and the National Council for Scientific and Technological
80 Development (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -*
81 *CNPq*). There is no conflict of interest in this study.

82 **TRIAL REGISTRATION NUMBER:** Not applicable.

83 **3. KEYWORDS:** endometriosis, infertility, polymorphisms, GDF-9, AMH

84 4. INTRODUCTION

85 It is known that endometriosis is associated with an impairment in the ovarian reserve
86 and abnormal levels of follicle-stimulating hormone (FSH) and anti-Müllerian
87 hormone (AMH), but the causes of these events are still not fully understood (Yoo et
88 al., 2011). Folliculogenesis is the process through which primordial follicles are
89 recruited from the ovarian reserve and where follicle development and the acquisition
90 of oocyte competence for ovulation and fertilization occur. This process is regulated
91 by intra- and extra-ovarian factors that act in an autocrine and paracrine manner.
92 Among the intra-ovarian factors are the members of the transforming growth factor
93 beta (TGF- β) superfamily that act through the activation of intracellular Smad
94 transcription factors regulating gene expression (Pangas, 2012). This group is
95 composed of over 40 proteins and includes growth differentiation factor-9 (GDF-9)
96 and AMH, proteins that are directly related to reproductive actions during
97 folliculogenesis.

98 GDF-9, a protein that contains 454 amino acids, is encoded by a gene located
99 on chromosome 5q31.1 that is composed of two exons (Kovanci et al., 2007). GDF-9
100 is only secreted by oocytes in follicles in the primary and secondary stages and uses
101 the Smad2/3 signaling pathway (Knight and Glister, 2006). The main function of
102 GDF-9, along with its analogue bone morphogenic protein-15 (BMP-15), is to
103 promote the development of the primary follicle to the secondary follicle stage. For
104 this purpose, it signals the proliferation and differentiation of the granulosa and theca
105 cells that surround the primary follicle (Trombly et al., 2009). In the secondary follicle,
106 GDF-9 continues to stimulate the proliferation of granulosa cells and also stimulates
107 the expression of FSH receptors on the surfaces of these cells that then become
108 responsive to gonadotropins (Knight and Glister, 2006). In addition to these

109 functions, GDF-9 is involved in the upregulation of inhibin B production by the
110 granulosa cells through the activation of the Smad2 (Kaivo-Oja et al., 2003). GDF-9
111 is also responsible for promoting the biosynthesis of cholesterol by the cumulus cells
112 just before ovulation, allowing for the adequate supply of metabolic precursors to the
113 oocyte (Otsuka et al., 2011).

114 Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the GDF-9 gene have been
115 associated with infertility in several mammalian species. In women, these
116 polymorphisms have been studied in various gynecological diseases. The SNPs
117 c.398-39C>G (Dixit et al., 2005), c.436C>T (Zhao et al., 2007), c.447C>T (Dixit et al.,
118 2005), c.546G>A (Wang TT et al., 2010), c.557C>A (Laissue et al., 2006) and
119 c.646G>A (Dixit et al., 2005) in the GDF-9 gene have been associated with
120 reproductive failure. As yet, there are no data in the literature that correlate SNPs in
121 the GDF-9 gene and women affected by endometriosis having difficulty gestating.

122 In endometriosis, AMH serum levels are below the normal physiological range
123 and vary according to the level of the disease: the levels are higher in grades I and II
124 and lower in grades III and IV (Shebl et al., 2009). Among different causes of
125 infertility, AMH levels were lower in women with infertility due to endometriosis than in
126 women with infertility due to tubal obstruction (Lemos et al., 2008). The available
127 amount of AMH in the ovary may negatively affect the process of selection of the
128 dominant follicle and may lead to a more rapid depletion of the ovarian reserve.

129 The polymorphism p.Ile49Ser in the AMH gene alters the bioactivity of the
130 protein (Kevenaar et al., 2008). The AMH 49Ser variant has been associated with
131 higher levels of estradiol than the AMH 49Ile in the follicular phase in women with
132 regular menstrual cycles (Kevenaar et al., 2007a). The -482A>G polymorphism in

133 the AMH type 2 receptor has been correlated with a 2.6-year earlier onset of natural
134 menopause (Kevenaar et al., 2007b).

135 Genetic mutations have been studied in the genes encoding the GDF-9, AMH and
136 AMHR2 proteins. The consequences of these changes may be the formation of
137 deformed proteins, altered secretion, variations in bioactivity and/or reductions in
138 protein stability (Wang et al., 2010). Thus, the goal of the current study was to
139 determine the frequencies of polymorphisms in the GDF-9 gene (c.398-39C>G,
140 c.436C>T, c.447C>T, c.546G>A, c.557C>A and c.646G>A), the AMH gene
141 (p.Ile49Ser) and its receptor AMHR2 (-482A>G) in infertile women with
142 endometriosis in an attempt to better understand the disease and to find better ways
143 to manage infertility.

144 **5. MATERIALS AND METHODS**

145 **Study design**

146 A case-control study was performed to determine the genotype frequencies of GDF-
147 9, AMH and AMHR2 genes in infertile women with endometriosis treated at the
148 Clinical Hospital of Porto Alegre (Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA)/Rio
149 Grande do Sul state/Brazil.

150 **Study population**

151 The study group consisted of 50 infertile women with peritoneal endometriosis
152 (women with ovarian and deep endometriosis were excluded) undergoing treatment
153 to conceive through in vitro fertilization. The stages of endometriosis were
154 determined based on the American Society for Reproductive Medicine (ASRM)
155 classification of 1997. The inclusion criteria for the study group were infertility with
156 peritoneal endometriosis confirmed by diagnostic video laparoscopy and the absence
157 of endocrine disorders or autoimmune diseases. The exclusion criteria were ovarian
158 or deep endometriosis and infertility due to other causes not related to endometriosis.

159 The control group consisted of 50 healthy women with proven fertility
160 undergoing tubal ligation. The inclusion criteria for the control group were proven
161 fertility, the presence of both ovaries, excluded endometriosis by laparoscopy and the
162 absence of endocrine disorders or autoimmune diseases determined by clinical
163 interviews with the patients.

164 **Biochemical analyses**

165 Peripheral blood samples were collected in the follicular phase of the menstrual cycle
166 (third day) to measure serum FSH levels. All samples were centrifuged to separate
167 the serum, which was frozen until the analysis. The measurements were performed
168 using chemiluminescence (Immulite, USA).

169 **Preparation of DNA for genotyping**

170 Whole-blood samples were collected, and 350 μL of each sample was used for
171 genomic DNA extraction using the Easy DNA kit according to the manufacturer's
172 instructions (Invitrogen, UK).

173 **Analysis of the *GDF-9* gene**

174 The first portion of exon 2 of the *GDF-9* gene was amplified by polymerase chain
175 reaction (PCR) using the forward (5' TTGACTTGACTGCCTGTTGTG 3') and reverse
176 primers (5' AGCCTGAGCACTTGTGTCATT 3') described by Kovanci et al. (2007)
177 with an annealing temperature of 63°C. The DNA concentration used was 200 ng/ μL
178 (the product obtained was a 491 bp fragment). Amplification was performed on the
179 Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) using reagents from
180 Invitrogen (UK) and was confirmed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel. The
181 491 bp fragments were purified with PEG8000/2.5 M NaCl. The samples were
182 sequenced according to the Sanger method on an ABI 3500 Genetic Analyzer
183 automated sequencer (Applied Biosystems, USA). The reverse primer was used for
184 sequencing at a concentration of 4 pmol/ μL , and the results were compared to the
185 reference sequence from NCBI (NM_005260.3).

186 **Analysis of the *AMH* and *AMHR2* genes**

187 Genomic DNA at concentrations of 10-20 ng/ μL was used to determine the
188 genotypes of the *AMH* and *AMHR2* genes by TaqMan Allelic Discrimination (Real-
189 Time PCR). The assay used for *AMH* p.Ile49Ser was C__25599842_10, and the
190 assay used for *AMHR2* -482A>G was C_1673084_10. Both probes and the other
191 necessary reagents were supplied by Applied Biosystems (USA), and the assays
192 were performed according to the manufacturer's instructions in the StepOne device
193 from the same company.

194 **Ethical aspects**

195 This study was approved by the Ethics Committee of HCPA/Rio Grande do Sul
196 state/Brazil under project number 11-0075.

197 **Statistical analysis**

198 Categorical variables were compared using the chi-square test. Continuous variables
199 were analyzed using the Wilcoxon-Mann-Whitney test. $P < 0.05$ was considered
200 statistically significant. The distribution of genotype frequencies was calculated using
201 Hardy-Weinberg equilibrium testing.

202 6. RESULTS

203 Demographic and clinical features

204 All women recruited for this study were Latina. In the study group, 42 women were
205 white and 8 were brown; in the control group, 35 women were white, 10 were black
206 and 5 were brown. These differences were not significant between the analyzed
207 groups ($P=0.153$).

208 Age (mean \pm SD) was not statistically different ($P=0.847$) between the infertile
209 women with endometriosis and the fertile women without endometriosis (33.5 ± 5.2
210 and 33.9 ± 4.0 years, respectively). Among the infertile women with endometriosis, 43
211 presented grade I/II endometriosis and 7 presented grade III/IV endometriosis.

212 Parity was higher among the women from the fertile group compared to the
213 infertile group: 3.35 ± 1.4 children for the fertile women without endometriosis and
214 0.47 ± 0.8 for the infertile women with endometriosis ($P=0.001$).

215 The serum FSH levels were 6.42 ± 2.5 mIU/mL in infertile women with
216 endometriosis and 5.12 ± 2.9 mIU/mL in fertile women ($P=0.064$).

217 The demographic and clinical characteristics are available in Table I.

218 Genetic polymorphisms

219 From the sequencing of the first portion of exon 2 of the *GDF-9* gene, 6
220 polymorphisms were analyzed, with the first being located in the intronic region that
221 precedes exon 2 and the other 5 located in exon 2. The polymorphisms were c.398-
222 39C>G, c.436C>T (p.Arg146Cys), c.447C>T (p.Thr149Thr), c.546G>A
223 (p.Glu182Glu), c.557C>A (p.Ser186Tyr) and c.646G>A (p.Val216Met). No
224 statistically significant differences were identified in the frequency analysis of these
225 polymorphisms the two groups (Table II). The genotypic distributions of the 6 SNPs
226 within this gene followed Hardy-Weinberg equilibrium in both groups.

227 All women from the two groups were homozygous for the wild-type allele of
228 the SNPs c.436C>T (CC), c.557C>A (CC) and c.646G>A (GG). The genotypes of the
229 SNPs c.398-39C>G, c.447C>T and c.546G>A exhibited heterogeneous frequencies
230 between the groups (Figure 1).

231 The polymorphisms p.Ile49Ser in *AMH* and -482A>G in *AMHR2* were
232 marginally significant between the groups (P=0.096 and P=0.140, respectively).
233 Hardy-Weinberg equilibrium was tested for the two SNPs; neither demonstrated any
234 departure from the Hardy-Weinberg proportions in the analyzed groups. The
235 genotypic frequencies of the two SNPs are available in Table II.

236 The 49Ser variant of AMH was not homozygous in any case of infertility,
237 whereas the fertile group exhibited 2 homozygous cases. The wild-type genotype
238 49Ile was present in 27 fertile women without endometriosis and in 36 infertile
239 women with endometriosis. Heterozygosity was observed in 21 women in the fertile
240 group and in 14 women in the infertile group (Figure 1).

241 For the *AMHR2* -482A>G SNP, the homozygous wild-type genotype was the
242 most frequent and was present in 31 women in the fertile group and in 40 women in
243 the infertile group with endometriosis. The mutant genotype was present in 4 fertile
244 women and in only 2 infertile women. Heterozygosity was noted in 15 fertile women
245 and in 8 infertile women (Figure 1).

246 **7. DISCUSSION**

247 The presences of both minimal/mild (43 cases) and moderate/severe (7 cases)
248 endometriosis were related to infertility when age and parity were analyzed in the
249 studied groups. This association of endometriosis and infertility has been well
250 established in the literature, although its causes are still not fully understood.

251 Some researchers have shown that women with endometriosis present
252 reduced ovarian reserves with altered basal FSH levels when compared to women of
253 the same age who do not have the disease (Dong et al., 2013; Yoo et al., 2011). The
254 FSH measurement is considered one of the markers of ovarian reserve (in addition to
255 the antral follicle count [AFC], AMH and inhibin B levels and the clomiphene citrate
256 challenge test): FSH levels between 10-20 mIU/mL indicate a reduced ovarian
257 response and a decreased ovarian reserve (ASRM, 2012).

258 Missense mutations such as the p.Ile49Ser (c.146T>G) mutation in the AMH
259 gene have direct consequences in the formation of the primary structure of the AMH
260 protein and affect its bioactivity. It is known that this genetic variant of AMH, which
261 results from a substitution of an isoleucine (a non-polar amino acid) with a serine (a
262 polar amino acid) causes changes in protein folding and stability and thus alters the
263 protein's bioactivity (Kevenaar et al., 2008; Rigon et al., 2010). As a consequence,
264 the functions of this hormone in the control of female fertility are altered and include a
265 smaller AFC than normal, the reduced inhibition of individual follicle sensitivity to FSH
266 by AMH (Kevenaar et al., 2008) and impaired aromatase inhibition, which promotes
267 increased estradiol levels (Kevenaar et al., 2007a). However, the majority of the
268 infertile women evaluated in this study exhibited a TT genotype, which codes for the
269 49Ile version (i.e., the wild-type version) of the AMH protein; the same result was

270 reported by Rigon et al. in a group of women with idiopathic infertility (Rigon et al.,
271 2010).

272 A gene change can also alter the protein structure of a receptor; as a result, it
273 will not function as expected, leading to decreased activity of the molecule in
274 question. Therefore, the 482A>G polymorphism observed in the AMHR2 gene may
275 influence AMH activity. This SNP was associated with an earlier onset of natural
276 menopause. In another study, Kevenaar et al. confirmed that the majority of the
277 nulliparous women evaluated displayed the GG genotype (31.6%) followed by the AA
278 genotype (22.5%) and the AG genotype (18.2%) (Kevenaar et al., 2007b). In
279 contrast, we found that the AA genotype was more commonly linked to infertile
280 nulliparous women with endometriosis than the other genotypes, although there was
281 no significant difference. It is important to note the natural differences in the
282 populations studied, namely, that the population analyzed in this study was ethnically
283 heterogeneous, which may be the reason for the genetic differences identified by our
284 and other research groups.

285 The importance of GDF-9 in fertility has become evident in genetic studies in
286 different species. A study with GDF-9 knockout mice revealed that knockout females
287 were infertile, exhibited smaller ovaries and had normal follicles only until the primary
288 follicle stage. Those data reinforced the idea that GDF-9 is the first factor responsible
289 for the stimulation of mitosis in the granulosa and theca cells that form the follicle
290 (Dong et al., 1996). Small changes in the DNA that encodes GDF-9 can have
291 consequences in the final protein, thus influencing its function. Polymorphisms in this
292 gene have been identified in women with gynecological diseases that lead to
293 infertility, such as Premature Ovarian Failure (POF) (Dixit et al., 2005; Laissue et al.,
294 2006) and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) (Wang et al., 2010). The same

295 changes were not found in women with proven fertility. In the current study,
296 polymorphisms in the *GDF-9* gene that seemed to correlate with infertile women with
297 endometriosis were c.398-39C>G, c.447C>T and c.546G>A. The first is located in
298 the intronic region that precedes exon 2 and, while the polymorphism does not have
299 a direct consequence on the protein structure, this region of the gene participates in
300 DNA processing prior to translation and therefore can influence the resulting protein.
301 In the SNPs c.447C>T and c.546G>A, both the wild-type and the polymorphic
302 nucleotides result in the translation of the same amino acid in the final protein
303 structure. However, there is evidence that the substitution of the most commonly
304 used codon for a more rare codon may influence the quality of gene expression
305 (Kimchi-Sarfaty et al., 2007).

306 Laissue et al. showed that 75.9% of women with POF encoded the SNP allele
307 c.447C>T, while 55.5% of women in the control group (who had at least one child
308 and no history of infertility) encoded this allele (Laissue et al., 2006). In our
309 population of infertile women with endometriosis, 86% exhibited the polymorphic
310 allele; among the fertile women without endometriosis, 70% exhibited the
311 polymorphic allele. These results revealed a tendency for the T allele to be
312 associated with subfertility.

313 In the same study, Laissue et al. studied the SNP c.546G>A and measured
314 frequencies of 23.1% and 26% for the polymorphic allele in women with POF and
315 fertile women, respectively (Laissue et al., 2006). We demonstrated that these
316 frequencies were different when considering endometriosis: 32% of women with
317 endometriosis had the mutant allele, while 26% of fertile women had it. Thus, this
318 polymorphism seems to correlate more with endometriosis than with POF as a cause
319 of infertility. However, conclusions on this and other polymorphisms could only be

320 inferred upon analysis of a larger population and with functional studies that
321 determine the actual expression profiles of the encoded gene from wild-type and
322 mutant DNA.

323 The present study identified no differences in alleles or genotype frequencies
324 for SNPs in the *GDF-9*, *AMH* and *AMHR2* genes in infertile patients with
325 endometriosis. However, we have shown that there is a possibility that the mutations
326 c.398-39C>G, c.447C>T and c.546G>A in the *GDF-9* gene and the *AMH* and
327 *AMHR2* SNPs can influence fertility in endometriosis. Considering this trend, we
328 would reach statistical significance for the *AMHR2* SNP with 78 patients in each
329 group. With our results and data, after the comparison tests, the calculated power
330 values were 0.61 for the c.447C>T SNP in the *GDF-9* gene, 0.59 for the SNP in the
331 *AMH* gene and 0.67 for the SNP in the *AMHR2* gene. Difficulties regarding sample
332 size in studies with SNPs and the clinical significance of a given SNP encourage us
333 to continue our study with functional tests. However, based on our data, we can
334 suggest an interaction model between the variants of these genes (Figure 2).

335 This information opens up new perspectives for understanding the ovulatory
336 disorders related to endometriosis. For future studies, we intend to study the
337 expression profiles of the cited genes and the signaling pathways used by these
338 proteins to perform their functions, with the aim of broadening this understanding.
339 Such studies will allow us to better understand the consequences of these gene
340 variations in the physiology of endometriosis.

341 **8. AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

342 E. De Conto led the research, collected data, performed the experiments, analyzed
343 the results and wrote the manuscript.

344 Ú. Matte supported and assisted with the experiments and revised the manuscript.

345 J.P. Bilibio assisted in the data analysis and revised the manuscript.

346 V.K. Genro and C.A. Souza assisted in the data collection and revised the
347 manuscript.

348 J.S. Cunha-Filho participated in the preparation and execution of the research,
349 assisted in the critical analysis of results and revised the manuscript.

350 All authors approved the final version of the manuscript.

351 **9. FUNDING**

352 This work was performed with financial support from the Research Incentive Fund
353 (Fundação de Incentivo a Pesquisas e Eventos-FIPE)-Clinical Hospital of Porto
354 Alegre (Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA), the National Council for
355 Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento
356 Científico e Tecnológico - CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher
357 Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
358 Superior-CAPES).

359 **10. CONFLICT OF INTEREST**

360 The authors declare that there are no conflicts of interest.

361 **11. REFERENCES**

- 362 American Society for Reproductive Medicine. Testing and interpreting measures of
363 ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012 Dec;**98(6)**:1407-15.
- 364 Dixit H, Rao LK, Padmalatha V, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakravarty
365 B, Singh L. Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9
366 gene in Indian women with ovarian failure. *Menopause*. 2005 Nov-Dec;**12(6)**:749-54.
- 367 Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth
368 differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 1996
369 Oct 10;**383(6600)**:531-5.
- 370 Dong X, Liao X, Wang R, Zhang H. The impact of endometriosis on IVF/ICSI
371 outcomes. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013 Aug 15;**6(9)**:1911-8.
- 372 Kaivo-Oja N, Bondestam J, Kämäräinen M, Koskimies J, Vitt U, Cranfield M,
373 Vuojolainen K, Kallio JP, Olkkonen VM, Hayashi M, Moustakas A, Groome NP, ten
374 Dijke P, Hsueh AJ, Ritvos O. Growth differentiation factor-9 induces Smad2
375 activation and inhibin B production in cultured human granulosa-luteal cells. *J Clin
376 Endocrinol Metab*. 2003 Feb;**88(2)**:755-62.
- 377 Kevenaar ME, Themmen AP, Laven JS, Sonntag B, Fong SL, Uitterlinden AG, de
378 Jong FH, Pols HA, Simoni M, Visser JA. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian
379 hormone type II receptor polymorphisms are associated with follicular phase estradiol
380 levels in normo-ovulatory women. *Hum Reprod*. 2007 Jun;**22(6)**:1547-54.
- 381 Kevenaar ME, Themmen AP, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Laven JS, van Schoor
382 NM, Lips P, Pols HA, Visser JA. A polymorphism in the AMH type II receptor gene is
383 associated with age at menopause in interaction with parity. *Hum Reprod*. 2007
384 Sep;**22(9)**:2382-8.
- 385 Kevenaar ME, Laven JS, Fong SL, Uitterlinden AG, de Jong FH, Themmen AP,
386 Visser JA. A functional anti-mullerian hormone gene polymorphism is associated with
387 follicle number and androgen levels in polycystic ovary syndrome patients. *J Clin
388 Endocrinol Metab*. 2008 Apr;**93(4)**:1310-6. doi: 10.1210/jc.2007-2205.
- 389 Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV,
390 Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate
391 specificity. *Science*. 2007 Jan 26;**315(5811)**:525-8.
- 392 Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle
393 development. *Reproduction*. 2006 Aug;**132(2)**:191-206.
- 394 Kovanci E, Rohozinski J, Simpson JL, Heard MJ, Bishop CE, Carson SA. Growth
395 differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure.
396 *Fertil Steril*. 2007 Jan;**87(1)**:143-6.
- 397 Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K,
398 Bourcigaux N, Jacquesson L, Bouchard P, Frydman R, Dewailly D, Reyss AC,
399 Jeffery L, Bachelot A, Massin N, Fellous M, Veitia RA. Mutations and sequence
400 variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J
401 Endocrinol*. 2006 May;**154(5)**:739-44.
- 402 Lemos NA, Arbo E, Scalco R, Weiler E, Rosa V, Cunha-Filho JS. Decreased anti-
403 Müllerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with
404 mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril*. 2008 May;**89(5)**:1064-8.

- 405 Otsuka F, McTavish KJ, Shimasaki S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian
406 function. *Mol Reprod Dev.* 2011 Jan;**78(1)**:9-21. doi: 10.1002/mrd.21265.
- 407 Pangas SA. Regulation of the ovarian reserve by members of the transforming
408 growth factor beta family. *Mol Reprod Dev.* 2012 Oct;**79(10)**:666-79. doi:
409 10.1002/mrd.22076.
- 410 Rigon C, Andrisani A, Forzan M, D'Antona D, Bruson A, Cosmi E, Ambrosini G,
411 Tiboni GM, Clementi M. Association study of AMH and AMHRII polymorphisms with
412 unexplained infertility. *Fertil Steril.* 2010 Sep;**94(4)**:1244-8. doi:
413 10.1016/j.fertnstert.2009.05.025.
- 414 Shebl O, Ebner T, Sommergruber M, Sir A, Tews G. Anti muellerian hormone serum
415 levels in women with endometriosis: a case-control study. *Gynecol Endocrinol.* 2009
416 Nov;**25(11)**:713-6. doi: 10.3109/09513590903159615.
- 417 Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE. Roles for transforming growth factor beta
418 superfamily proteins in early folliculogenesis. *Semin Reprod Med.* 2009 Jan;**27(1)**:14-
419 23. doi: 10.1055/s-0028-1108006.
- 420 Wang B, Zhou S, Wang J, Liu J, Ni F, Yan J, Mu Y, Cao Y, Ma X. Identification of
421 novel missense mutations of GDF9 in Chinese women with polycystic ovary
422 syndrome. *Reprod Biomed Online.* 2010 Sep;**21(3)**:344-8. doi:
423 10.1016/j.rbmo.2010.04.013.
- 424 Wang TT, Wu YT, Dong MY, Sheng JZ, Leung PC, Huang HF. G546A polymorphism
425 of growth differentiation factor-9 contributes to the poor outcome of ovarian
426 stimulation in women with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2010
427 Nov;**94(6)**:2490-2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.03.070.
- 428 Yoo JH, Cha SH, Park CW, Kim JY, Yang KM, Song IO, Koong MK, Kang IS, Kim
429 HO. Serum anti-Müllerian hormone is a better predictor of ovarian response than
430 FSH and age in IVF patients with endometriosis. *Clin Exp Reprod Med.* 2011
431 Dec;**38(4)**:222-7. doi: 10.5653/cerm.2011.38.4.222.
- 432 Zhao H, Qin Y, Kovanci E, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. Analyses of GDF9
433 mutation in 100 Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 2007
434 Nov;**88(5)**:1474-6.

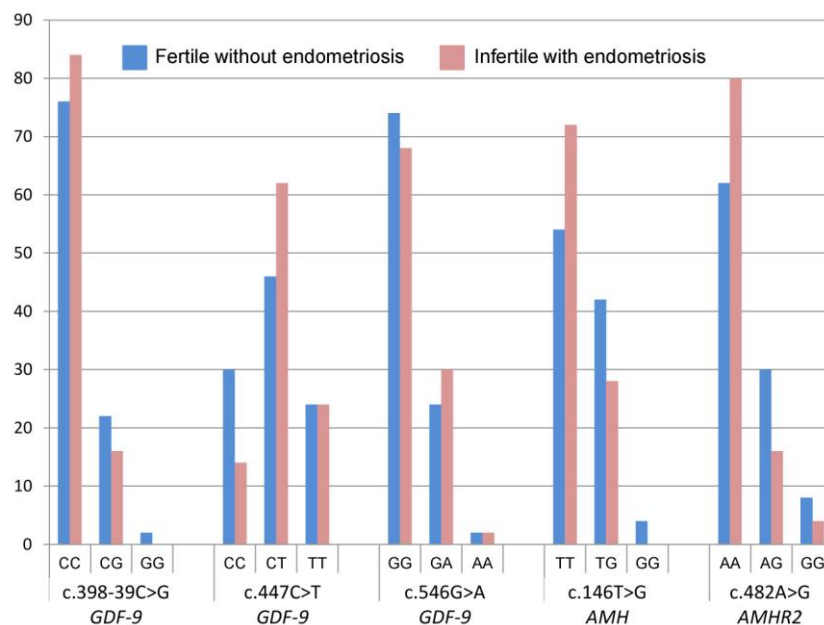
435 **ANEXAR SEPARADAMENTE**

436 Table I. Demographic and clinical characteristics of the studied groups (mean±SD).

	Fertile without endometriosis	Infertile with endometriosis	P value
Age (years)	33.5 ± 5.2	33.9 ± 4.0	0.847
Skin color			0.153
White	42	35	
Brown	8	5	
Black	0	10	
Parity (number of children)	3.35 ± 1.4	0.47 ± 0.8	0.001
FSH (mUI/mL)	5.12 ± 2.9	6.42 ± 2.5	0.064
Degree of endometriosis			
I/II	0	43	
III/IV	0	7	

437 Table II. Genotypic frequencies of the SNPs of genes *GDF-9*, *AMH* e *AMHR2*.

Gene	<i>GDF-9</i>						<i>AMH</i>		<i>AMHR2</i>				
	c.398-39C>G		c.436C>T	c.447C>T		c.546G>A		c.557C>A	c.646G>A		c.146T>G	-482A>G	
Polymorphism	CC	CG+GG	CC	CC	CT+TT	GG	GA+AA	CC	GG	TT	TG+GG	AA	AG+GG
Fertile without endometriosis (%)	76	24	100	30	70	74	26	100	100	54	46	62	38
Infertile with endometriosis (%)	84	16	100	14	86	68	32	100	100	72	28	80	20
P value	0.433		1	0.129		0.794		1	1	0.096		0.140	

Figure 1. Genotypic frequency of polymorphisms of *GDF-9*, *AMH* and *AMHR2*.

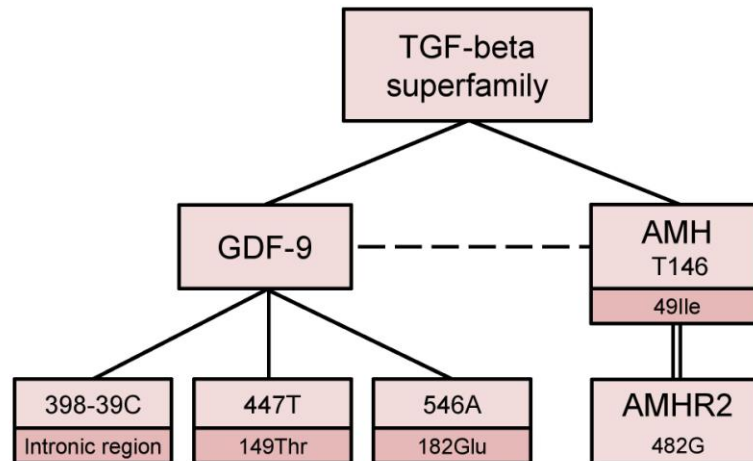


Figure 2. SNPs of GDF-9, AMH and AMHR2 possibly related infertility associated with endometriosis.

8 Conclusão

O presente estudo não demonstrou diferença estatística para a frequência genotípica ou alélica do polimorfismo c.398-39C>G do gene *GDF-9* em mulheres inférteis com endometriose comparando-as com mulheres férteis sem endometriose.

O presente estudo não demonstrou diferença estatística para a frequência genotípica ou alélica do polimorfismo c.436C>T do gene *GDF-9* em mulheres inférteis com endometriose comparando-as com mulheres férteis sem endometriose.

O presente estudo não demonstrou diferença estatística para a frequência genotípica ou alélica do polimorfismo c.447C>T do gene *GDF-9* em mulheres inférteis com endometriose comparando-as com mulheres férteis sem endometriose.

O presente estudo não demonstrou diferença estatística para a frequência genotípica ou alélica do polimorfismo c.546G>A do gene *GDF-9* em mulheres inférteis com endometriose comparando-as com mulheres férteis sem endometriose.

O presente estudo não demonstrou diferença estatística para a frequência genotípica ou alélica do polimorfismo c.557C>A do gene *GDF-9* em mulheres inférteis com endometriose comparando-as com mulheres férteis sem endometriose.

O presente estudo não demonstrou diferença estatística para a frequência genotípica ou alélica do polimorfismo c.646G>A do gene *GDF-9* em mulheres inférteis com endometriose comparando-as com mulheres férteis sem endometriose.

O presente estudo não demonstrou diferença estatística para a frequência genotípica ou alélica do polimorfismo p.Ile49Ser do gene *AMH* em mulheres inférteis com endometriose comparando-as com mulheres férteis sem endometriose.

O presente estudo não demonstrou diferença estatística para a frequência genotípica ou alélica do polimorfismo -482A>G do gene *AMHR2* em mulheres inférteis com endometriose comparando-as com mulheres férteis sem endometriose.

Contudo, demonstramos que existe uma possibilidade de as alterações C447T do *GDF-9* e os SNPs dos genes *AMH* e *AMHR2* influenciarem a fertilidade na endometriose. Considerando essa tendência, com 78 pacientes em cada grupo, alcançaríamos significância estatística para o SNP do *AMHR2*. Com nossos dados e resultados, o poder foi de 0,61 para o SNP C447T do *GDF-9*, 0,59 para o SNP do *AMH* e 0,67 para o SNP do *AMHR2* após testes de comparação.

9 Perspectivas

Os resultados deste trabalho abriram novas possibilidades para o entendimento das desordens ovulatórias relacionadas com a endometriose e, para que se amplie esse entendimento, projetamos estudar a expressão dos genes citados e das vias de sinalização que essas proteínas utilizam para exercer suas funções, dessa forma entenderemos melhor quais são as consequências dessas alterações gênicas na fisiologia da endometriose.