

FÁBIA LIMA VILARINO¹

BIANCA BIANCO²

DENISE MARIA CHRISTOFOLINI²

TATIANA GOBERSTEIN LERNER³

CAIO PARENTE BARBOSA⁴

Análise do polimorfismo Fok1 do gene VDR em mulheres inférteis com endometriose

Analysis of VDR gene polymorphism Fok1 in infertile women with endometriosis

Artigo original

Palavras-chave

Endometriose
Infertilidade
Receptores de calcitriol
Genótipo
Reação em cadeia da polimerase
Polimorfismo de fragmento de restrição
Polimorfismo genético

Keywords

Endometriosis
Infertility
Receptors, calcitriol
Genotype
Polymerase chain reaction
Polymorphism, restriction fragment length
Polymorphism, genetic

Resumo

OBJETIVO: avaliar a frequência do polimorfismo Fok1 do gene do receptor da vitamina D (VDR) em mulheres inférteis com endometriose e Grupo Controle, e sua associação com a doença. **MÉTODOS:** estudo caso-controle que incluiu 147 mulheres inférteis com endometriose e 154 mulheres férteis sem endometriose como Controle. O polimorfismo Fok1 (rs10735810, T2C), que promove uma troca de T/C no éxon 2 do gene VDR, foi identificado por PCR-RFLP (análise de polimorfismos de fragmentos de restrição), que envolve a combinação de amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) e digestão com endonuclease de restrição. O teste do χ^2 foi utilizado para comparar as frequências dos genótipos e alelos entre os grupos. Todos os valores de p foram bicaudais, e o nível de significância considerado foi 0,05 ($\alpha < 0,05$). **RESULTADOS:** os genótipos TT, TC e CC do polimorfismo Fok1 do gene VDR apresentaram frequência de 44,2%, 46,9% e 8,9% nas mulheres inférteis com endometriose e 41,6%, 50% e 8,4% no Grupo Controle, e não apresentaram diferença significativa quando comparados ($p=0,8$), mesmo quando as pacientes com endometriose foram subdivididas de acordo com o estadiamento da endometriose ($p=0,3$ para endometriose mínima e leve e $p=0,2$ para endometriose moderada e grave). Em relação aos alelos, T e C estavam presentes, respectivamente, em 67,6% e 32,3% das mulheres inférteis com endometriose ($p=0,8$), em 63,5% e 36,5% das mulheres com endometriose mínima/leve ($p=0,5$), em 72,5% e 27,5% das mulheres com endometriose moderada/grave ($p=0,2$), e em 66,6% e 33,4% das mulheres do Grupo Controle. Não foi observada diferença estatística significativa na comparação entre nenhum dos grupos e o Grupo Controle. **CONCLUSÃO:** o estudo mostrou que o polimorfismo Fok1 do gene VDR não confere risco genético associado ao desenvolvimento de endometriose associada à infertilidade na população brasileira.

Abstract

PURPOSE: to evaluate the frequency of VDR gene polymorphism Fok1 in infertile women with endometriosis and Control and its relation to the disease. **METHODS:** a case-control study that included 147 infertile women with endometriosis and 154 fertile women without endometriosis as Control. Fok1 polymorphism (rs10735810, T2C), which promotes a T/C exchange in exon 2 of the VDR gene, was identified by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), that involves the combination of amplification by PCR and digestion with restriction endonuclease. The χ^2 test was used to compare allele and genotype frequencies between groups. All p-values were two-tailed and a p-value < 0.05 was considered statistically significant. **RESULTS:** the TT, TC and CC genotype frequencies of VDR Fok1 polymorphism were 44.2%, 46.9% and 8.9% in infertile women with endometriosis and 41.6%, 50% and 8.4% in the Control Group. No significant difference was found ($p=0.8$), even when the patients were subdivided according to the stage of endometriosis ($p=0.3$ for minimal and mild endometriosis and $p=0.2$ for moderate and severe endometriosis). Alleles T and C were present, respectively, in 67.6% and 32.3% of infertile women with endometriosis ($p=0.8$), in 63.5% and 36.5% of women with minimal/mild endometriosis ($p=0.5$), in 72.5% and 27.5% of women with moderate/severe endometriosis ($p=0.2$), and in 66.6% and 33.4% of the Control Group. No statistically significant difference was found among any groups and the Control. **CONCLUSION:** the results suggest that VDR gene polymorphism Fok1 does not confer genetic susceptibility to endometriosis-associated infertility in the Brazilian population.

Correspondência:

Bianca Bianco
Avenida Príncipe de Gales, 821
CEP 09060-650 – Santo André (SP), Brasil
E-mail: bianca.bianco@hotmail.com

Recebido

1/2/2011

Aceito com modificações

18/2/2011

Centro de Reprodução Humana e Genética da Faculdade de Medicina do ABC (FMABC), Santo André (SP), Brasil.

¹ Discente do Programa de Pós-Graduação (Doutorado) do Centro de Reprodução Humana e Genética e da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC – Santo André (SP), Brasil.

² Professora Colaboradora do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC – Santo André (SP), Brasil.

³ Aluna de Iniciação Científica do Centro de Reprodução Humana e Genética Faculdade de Medicina do ABC – FMABC – Santo André (SP), Brasil.

⁴ Chefe do Centro de Reprodução Humana e Genética da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC – Santo André (SP), Brasil.

Conflitos de interesse: não há

Introdução

A endometriose é uma condição crônica que representa uma das doenças ginecológicas benignas mais comuns, que pode causar dor pélvica, dismenorreia e infertilidade. Estima-se que aproximadamente 10-15% das mulheres em período reprodutivo¹ e metade das mulheres com problemas de fertilidade tenham essa doença².

Por sua frequente associação com a presença de autoanticorpos e doenças autoimunes associadas, a endometriose também tem sido considerada por alguns autores como uma doença autoimune. Assim como em doenças autoimunes clássicas, na endometriose tem sido encontrada a ativação policlonal de células B, alterações imunológicas funcionais das células B e T, alterações no mecanismo de apoptose, danos tissulares e fatores genéticos³.

Estudos recentes têm relacionado a vitamina D à regulação do sistema imunológico⁴ e à fisiologia uterina⁵. A vitamina D suprime a proliferação de linfócitos e a síntese de imunoglobulinas, além de inibir a ação de fatores de transcrição pró-inflamatórios e a produção de diferentes citocinas como a interleucina (IL) 2 e IL-12⁶.

O receptor da vitamina D (VDR, OMIM 601769), gene localizado no cromossomo 12 (12q13.11), é expresso na maioria das células do sistema imune, incluindo linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, bem como as células apresentadoras de antígenos, macrófagos e células dendríticas⁷. Alterações genéticas no gene VDR podem levar a importantes defeitos na ativação gênica, afetando o metabolismo do cálcio, proliferação celular e função imune, o que pode ser explicado por mudanças na conformação da proteína⁸.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência do polimorfismo Fok1 do gene VDR em mulheres inférteis com endometriose comparando com a frequência em mulheres férteis, a fim de observar se há associação do polimorfismo com a doença.

Métodos

Trata-se de um estudo caso-controle que incluiu mulheres inférteis com endometriose e um Grupo Controle. Com esse objetivo, foram triadas do Ambulatório de Endometriose da Faculdade de Medicina do ABC (FMABC) 147 mulheres inférteis portadoras de endometriose com diagnóstico confirmado por laparoscopia e/ou laparotomia, estadiamento da doença estabelecido de acordo com as normas da *American Society for Reproductive Medicine*⁹ e diagnóstico histológico das lesões. No grupo de endometriose, a doença mínima/leve foi encontrada em 78 casos (53,1%) e moderada/grave em 69 casos (46,9%). A média de idade das pacientes foi de 35,0±3,8 anos de desvio padrão. Como critério de inclusão, as pacientes deveriam ter o diagnóstico histológico de endometriose,

sem outra causa de infertilidade. Como fatores de exclusão estão o procedimento cirúrgico realizado após 38 anos e a presença de fatores masculinos de infertilidade.

O Grupo Controle foi composto por 154 mulheres férteis submetidas à laqueadura provenientes do Ambulatório de Planejamento Familiar da FMABC, o que permitiu a confirmação da ausência de endometriose. A média de idade dessas mulheres foi de 39,9±5,6 anos. Como critério de inclusão, as mulheres deveriam ser férteis com pelo menos dois filhos, sem história de abortamento ou dificuldade para engravidar. O critério de exclusão foi a presença de endometriose em qualquer fase da vida.

A causa da infertilidade foi investigada de acordo com a propedêutica para casais inférteis: testes sorológicos, perfil hormonal e bioquímico, teste para doenças sexualmente transmissíveis, exames de imagem, investigação de anomalias genéticas e/ou imunológicas, histerossalpingografia, histeroscopia, laparoscopia (realizada em todas as mulheres ≤36 anos de idade e em pacientes com mais de 36 anos quando sintomáticas ou com anormalidades em exames de imagem) e análise seminal. Pacientes com endometriose que não conseguiram engravidar após pelo menos seis ciclos naturais ou induzidos após a laparoscopia foram consideradas inférteis. Todas as mulheres cujos parceiros tinham fatores masculinos associados à infertilidade foram excluídas do estudo.

Os dados clínicos e as amostras de sangue periférico somente foram colhidos após exposição dos objetivos do estudo e assinatura do Termo de Consentimento Informado, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMABC (CEP/FMABC No. 016/2009).

Foram colhidos 5 mL de sangue periférico a partir de venopunções periféricas, em tubo contendo EDTA. O DNA genômico foi extraído de linfócitos do sangue periférico de acordo com o protocolo de Lahiri e Nurnberger (1991)¹⁰.

Genotipagem

O polimorfismo Fok1 (T2C, rs10735810) do gene VDR foi identificado por análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), que envolve a combinação de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e digestão com endonuclease de restrição, de acordo com o protocolo modificado de Horst-Sikorska et al.¹¹.

As reações de PCR foram processadas com um volume final de 25 µL, contendo 10x de tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris-Cl; pH 8.3), 2,5 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTP, 2,0 U Taq polimerase e 50 nM de cada *primer* (*forward* e *reverse*). A amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 60°C e extensão a 72°C por 30 segundos, exceto no primeiro ciclo, no qual a desnaturação foi estendida por cinco minutos.

O produto de PCR foi digerido com 5U da enzima de restrição Fok1 (New England Biolabs®, Ipswich, MA, EUA), a reação foi encubada a 65°C por 15 minutos e o produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%. Utilizando um marcador de peso molecular de 50 pares de base (pb) como referência, identificamos os genótipos do polimorfismo Fok1: indivíduo homocigoto normal (TT) apresentava fragmento único de 265 pb; indivíduo heterocigoto (TC) apresentava três fragmentos com 265, 196 e 69 pb, e indivíduo homocigoto mutado (CC) apresentava dois fragmentos com 196 e 69 pb (Figura 1).

■ Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o *software* SPSS 11.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL). O teste do χ^2 foi utilizado para comparar as frequências dos genótipos (TT, TC e CC) e alelos (T e C) entre os grupos, e para estimar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O *odds ratio* (OR) e intervalo com 95% de confiança (IC) foram calculados em relação à presença do genótipo de referência, usando um modelo de regressão logística. Todos os valores de *p* foram bicaudais e o nível de significância considerado foi 0,05 ($\alpha < 0,05$).

As comparações realizadas foram entre os grupos de pacientes com endometriose e Controle, para investigar a associação do polimorfismo com a endometriose. As pacientes com endometriose foram subdivididas em dois grupos, de acordo com o grau da doença: um grupo com endometriose mínima e leve e outro com endometriose moderada e grave. Essa subdivisão foi realizada com a finalidade de investigar se a frequência do polimorfismo era diferente, de acordo com a gravidade da doença.

Resultados

A frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo Fok1 do gene VDR em mulheres inférteis com endometriose e no Grupo Controle foram resumidos na Tabela 1.

Os genótipos TT, TC e CC do polimorfismo Fok1 do gene VDR apresentaram frequência de 44,2% (65/147), 46,9% (69/147) e 8,9% (13/147) nas mulheres inférteis com endometriose e 41,6% (64/154), 50% (77/154) e 8,4% (13/154) no Grupo Controle (Tabela 1), e não houve diferença significativa entre a frequência quando comparados ($p=0,8$).

As pacientes com endometriose foram subdivididas de acordo com o estadiamento da endometriose e comparadas com o Grupo Controle. Os genótipos TT, TC e CC estavam presentes em 41% (32/78), 44,9% (35/78) e 14,1% (11/78) das mulheres com endometriose mínima/leve, e 47,8% (33/69), 49,3% (34/69) e 2,9% (2/69) das mulheres com endometriose moderada/grave. Nenhum dos grupos apresentou diferença significativa em relação ao Controle ($p=0,3$ para endometriose mínima e leve e $p=0,2$ para endometriose moderada e grave).

Em relação aos alelos, o alelo T estava presente em 67,6% das mulheres inférteis com endometriose, em 63,5% das mulheres com endometriose mínima/leve, em 72,5% das mulheres com endometriose moderada/grave e em 66,6% das mulheres do Grupo Controle, enquanto o alelo C estava presente em 32,3% das portadoras de endometriose, em 36,5% das mulheres com endometriose mínima/leve, em 27,5% das mulheres com endometriose moderada/grave e em 33,4% do Grupo Controle (Tabela 1). Não foi observada diferença estatística significativa na comparação entre os grupos com endometriose em relação ao Grupo Controle ($p=0,8$, OR=1,05, 95%IC=0,75-1,48 para pacientes com endometriose, $p=0,5$, OR=1,15,

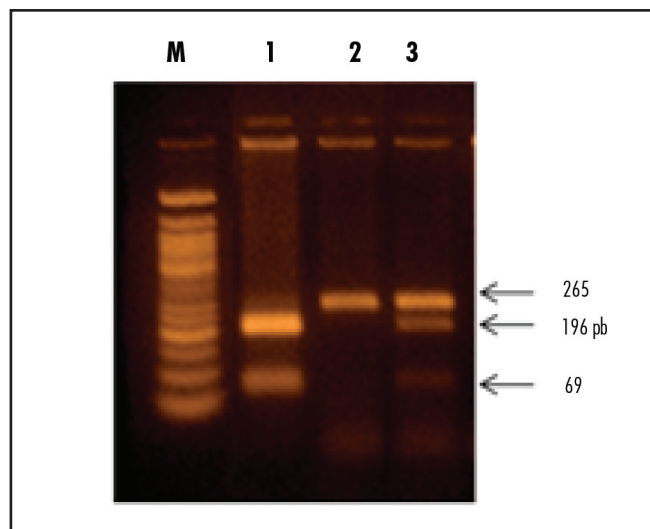


Figura 1 – A figura mostra um gel de agarose 2% representativo do polimorfismo Fok1 do gene VDR, em que (M) é o marcador de peso molecular 50 pb, (1) indivíduo heterocigoto (TC), (2) indivíduo homocigoto mutado (CC) e (3) homocigoto normal (TT).

Tabela 1 - Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo Fok1 no gene VDR nas mulheres com endometriose e no Grupo Controle.

Grupos	n	Distribuição dos genótipos			Valor de p	Alelos		Valor p	OR (95%IC)
		TT (%)	TC (%)	CC (%)		T (%)	C (%)		
Endometriose associada à infertilidade	147	65 (44,2)	69 (46,9)	13 (8,9)	0,8	199 (67,7)	95 (32,3)	0,8	1,05 (0,75-1,48)
Endometriose Mínima/Leve	78	32 (41,0)	35 (44,9)	11 (14,1)	0,3	99 (63,5)	57 (36,5)	0,5	1,15 (0,77-1,71)
Endometriose Moderada/Grave	69	33 (47,8)	34 (49,3)	2 (2,9)	0,2	100 (72,5)	38 (27,5)	0,2	0,76 (0,49-1,18)
Controles	154	64 (41,6)	77 (50,0)	13 (8,4)		205 (66,6)	103 (33,4)		

OR: *odds ratio*; IC: Intervalo de confiança.

95%IC=0,77-1,71 para endometriose mínima/leve e $p=0,2$, OR=0,76, 95%IC=0,49-1,18 para endometriose moderada/grave).

A distribuição dos genótipos nos grupos endometriose associada à infertilidade e ao Controle estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Discussão

Os polimorfismos de base única – SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) são comuns no genoma humano e, frequentemente, ocorrem em genes específicos envolvidos na gênese e predisposição a doenças humanas¹². Alterações nas regiões reguladoras do gene podem afetar sua expressão e, assim, os níveis proteicos. Sabe-se que o polimorfismo Fok1 no éxon 2 do gene VDR leva a um local alternativo de início de transcrição, resultando em uma proteína com a adição de três aminoácidos¹³.

Polimorfismos no gene VDR têm sido associados à suscetibilidade a diferentes doenças autoimunes, como esclerose múltipla, artrite reumatoide, doença de Graves, lúpus eritematoso sistêmico e doenças da tireoide com resultados conflitantes¹⁴. Na população brasileira, os polimorfismos do gene VDR foram estudados no diabetes tipo I¹³, em mulheres na pós-menopausa¹⁵ e no câncer de próstata¹⁶, mas nenhuma associação foi encontrada nesses estudos.

No presente estudo, não observamos diferença na frequência do polimorfismo Fok1 do gene VDR e na endometriose associada à infertilidade em relação aos Controles. Quando estudamos as pacientes com endometriose mínima/leve e moderada/grave separadamente, também não foi encontrada diferença significativa. Os achados sugerem que o polimorfismo Fok1 do gene VDR não está associado à patogênese da endometriose associada à infertilidade na população brasileira.

Os achados conflitantes entre os estudos sugerem heterogeneidade genética dentro do gene VDR em diferentes doenças e populações, possivelmente devido a diferentes linhagens evolutivas, resultando em *clusters* separados de origens geográficas distintas¹⁷. Assim, o mesmo polimorfismo pode ter diferentes padrões de associação com marcadores e haplótipos em diferentes populações¹⁸.

Um estudo¹⁹ demonstrou expressão aumentada do gene VDR por imuno histoquímica no endométrio e ovários de mulheres com endometriose e com câncer de ovário e endométrio. Outro estudo²⁰ pesquisou os níveis séricos de vitamina D no sangue periférico em 87 mulheres portadoras de endometriose e 53 mulheres saudáveis por

radioimunoensaio. Os resultados demonstraram diferença significativa entre os valores de vitamina D nas mulheres com endometriose em relação aos Controles, especialmente nas mulheres com doença avançada. Os autores concluíram que a doença estava associada a altos níveis de vitamina D.

Recentemente, foram identificadas diferenças na expressão de proteínas no soro, que poderiam estar envolvidas na fisiopatologia da endometriose²¹. Os autores encontraram 25 proteínas com uma diferença significativa na quantidade entre as mulheres com endometriose e Controles, incluindo proteínas de fase aguda e do sistema complemento. A quantidade de proteínas associadas à vitamina D foi maior nas mulheres com endometriose em comparação ao Grupo Controle. Concluiu-se que a incapacidade de induzir a atividade fagocitária dos macrófagos em mulheres com endometriose poderia permitir que as lesões endometrióticas se implantassem na cavidade peritoneal.

Além disso, encontrou-se associação entre polimorfismos do gene VDR e diversos tipos de câncer, como o de mama²² e ovário²³, e também com o risco de metástases²². Embora a endometriose seja considerada uma doença benigna, foram demonstradas importantes similaridades clínicopatológicas a um processo neoplásico²⁴. A endometriose pode sofrer transformação maligna, como o carcinoma de ovário. A doença também compartilha da predisposição e similaridade molecular com o câncer²⁵. A angiogênese, a invasão do tecido e a metástase são encontradas em pacientes com endometriose. Similarmente, as lesões endometrióticas também têm expressão aumentada de genes antiapoptóticos e expressão diminuída de genes proapoptóticos²⁶.

Em conclusão, o estudo mostrou que o polimorfismo Fok1 do gene VDR não está associado ao risco de desenvolvimento de endometriose associada à infertilidade na população brasileira estudada. Seria de grande interesse caracterizar a relação existente entre esse polimorfismo e a endometriose e/ou infertilidade em um grande número de casos. A endometriose é observada em cerca de 20-50% das mulheres inférteis²⁷, e o motivo pelo qual estas têm sua fertilidade prejudicada é incerta, permanecendo uma área de investigação.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de iniciação científica à aluna Tatiana Goberstein Lerner (Nº. 2010/01104-6) e verba de auxílio à pesquisa (Nº. 2010/00459-5).

Referências

1. Barbosa CP, Souza AM, Bianco B, Christofolini D, Bach FA, Lima GR. Frequency of endometriotic lesions in peritoneum samples

from asymptomatic fertile women and correlation with CA125 values. Sao Paulo Med J. 2009;127(6):342-5.

2. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004;364(9447):1789-99.
3. Ammendola M, Bottini N, Pietropolli A, Saccucci P, Gloria-Bottini F. Association between PTPN22 and endometriosis. *Fertil Steril*. 2008;89(4):993-4.
4. Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229(11):1136-42.
5. Viganò P, Lattuada D, Mangioni S, Ermellino L, Vignali M, Caporizzo E, et al. Cycling and early pregnant endometrium as a site of regulated expression of the vitamin D system. *J Mol Endocrinol*. 2006;36(3):415-24.
6. Froicu M, Weaver V, Wynn TA, McDowell MA, Welsh JE, Cantorna MT. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. *Mol Endocrinol*. 2003;17(12):2386-92.
7. Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys*. 2000;374(2):334-8.
8. Mahon BD, Wittke A, Weaver V, Cantorna MT. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem*. 2003;89(5):922-32.
9. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997;67(5):817-21.
10. Lahiri DK, Nurnberger JJ Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(19):5444.
11. Horst-Sikorska W, Kalak R, Wawrzyniak A, Marcinkowska M, Celczynska-Bajew L, Slomski R. Association analysis of the polymorphisms of the VDR gene with bone mineral density and the occurrence of fractures. *J Bone Miner Metab*. 2007;25(5):310-9.
12. Bottini N, Bottini E, Gloria-Bottini F, Mustelin T. Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase and human disease: in search of biochemical mechanisms. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2002;50(2):95-104.
13. Mory DB, Rocco ER, Miranda WL, Kasamatsu T, Crispim F, Dib SA. Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms Fok1 and Bsm1 in Brazilian individuals with type 1 diabetes and their relation to beta-cell autoimmunity and to remaining beta-cell function. *Hum Immunol*. 2009;70(6):447-51.
14. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev*. 2008;29(6):726-76.
15. Moreno Lima R, Silva de Abreu B, Gentil P, Cesar de Lima Lins T, Grattapaglia D, Pereira RW, et al. Lack of association between vitamin D receptor genotypes and haplotypes with fat-free mass in postmenopausal Brazilian women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007;62(9):966-72.
16. Maistro S, Snitcovsky I, Sarkis AS, da Silva IA, Brentani MM. Vitamin D receptor polymorphisms and prostate cancer risk in Brazilian men. *Int J Biol Markers*. 2004;19(3):245-9.
17. Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2002;35(1):126-31.
18. Neale BM, Sham PC. The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet*. 2004;75(3):353-62.
19. Agic A, Xu H, Altgassen C, Noack F, Wollfer MM, Diedrich K, et al. Relative expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor, vitamin D 1 alpha-hydroxylase, vitamin D 24-hydroxylase, and vitamin D 25-hydroxylase in endometriosis and gynecologic cancers. *Reprod Sci*. 2007;14(5):486-97.
20. Somigliana E, Panina-Bordignon P, Murone S, Di Lucia P, Vercellini P, Viganò P. Vitamin D reserve is higher in women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2007;22(8):2273-8.
21. Faserl K, Golderer G, Kremser L, Lindner H, Sarg B, Wildt L, et al. Polymorphism in vitamin D-binding protein as a genetic risk factor in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):E233-41.
22. Trabert B, Malone KE, Daling JR, Doody DR, Bernstein L, Ursin G, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and breast cancer risk in a large population-based case-control study of Caucasian and African-American women. *Breast Cancer Res*. 2007;9(6):R84.
23. Clendenen TV, Arslan AA, Koenig KL, Enquist K, Wirgin I, Agren A, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett*. 2008;260(1-2):209-15.
24. Schöndorf T, Eisberg C, Wassmer G, Warm M, Becker M, Rein DT, et al. Association of the vitamin D receptor genotype with bone metastases in breast cancer patients. *Oncology*. 2003;64(2):154-9.
25. Varma R, Rollason T, Gupta JK, Maher ER. Endometriosis and the neoplastic process. *Reproduction*. 2004;127(3):293-304.
26. Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2000;74(4):760-6.
27. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2009;360(3):268-79.