

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

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS 3420 E 3438 NO GENE DO RECEPTOR
DA DOPAMINA D2 EM MULHERES COM DIFERENTES DESFECHOS
REPRODUTIVOS: ENDOMETRIOSE E ABORTO DE REPETIÇÃO**

JOÃO PAULO BILIBIO

Porto Alegre
2012

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

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS 3420 E 3438 NO GENE DO RECEPTOR DA
DOPAMINA D2 EM MULHERES COM DIFERENTES DESFECHOS
REPRODUTIVOS: ENDOMETRIOSE E ABORTO DE REPETIÇÃO**

JOÃO PAOLO BILIBIO

Orientador:
Prof. Dr. João Sabino Cunha-filho

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

Porto Alegre
2012

DEDICATÓRIA

A família é a nossa base e todo o nosso suporte, por isso eu dedico esta tese a minha noiva Pânila Longhi Lorenzoni, meus pais Ivan Bilibio e Mirian Regina Tentler Bilibio e para minha irmã Lívia Bilibio.

AGRADECIMENTOS

A apresentação de uma tese não é o final de um trabalho de uma única pessoa, ele é baseado no trabalho e esforço de um grupo. Neste íterim gostaria de agradecer a muitas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram e tiveram um papel fundamental até a conclusão deste trabalho, em particular:

- Em primeiro lugar o meu orientador Professor João Sabino L. da Cunha-Filho não apenas pela sua orientação nesta tese de doutorado, mas por sua ajuda e aconselhamentos que me estimularam seja profissionalmente, seja na vida pessoal.

- Emily de Conto por sua dedicação e contribuição direta nesse trabalho.

- Laboratório do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre Terapia Gênica em especial para Úrsula Matte.

- A todo o nosso grupo de pesquisa: Carlos Augusto Bastos de Souza, Carolina Giordani Andreoli, Vanessa Krebs Genro, Carla Regina Schmitz, Juliana Zanrosso Caran, Tatiana Ferreira Michelin, Ana Cláudia Martins Magno, Camila Scheffel, Rita Chapon, Camila Greggianin.

- Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

- A equipe de Oncologia Genital do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelos ensinamentos e apoio sempre prestados.

“Minha vida é regida por objetivos, por isso
eles nunca se acabam, apenas se renovam,
só assim seguirei vivendo e tentando
sempre ser melhor.”

(João Paulo Bilibio)

RESUMO

Introdução: O aumento do nível sérico de prolactina tem sido associado com desfechos ginecológicos e obstétricos desfavoráveis, entre eles a endometriose e aborto recorrente. Sabendo que o polimorfismo do receptor da dopamina D2 (DRD2) está associado com hiperprolactinemia, realizamos este estudo para verificar sua associação com endometriose e com abortamento de repetição.

Objetivos: Verificar a prevalência dos polimorfismos de receptores de dopamina D2 em pacientes com endometriose peritoneal e em pacientes com abortamento de repetição comparando com mulheres saudáveis.

Métodos: Dois estudos de caso-controle foram realizados: um estudo com 107 mulheres com idade entre 18 e 35 anos que foram atendidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre devido à infertilidade causada pela endometriose peritoneal comparada com mulheres saudáveis. O outro estudo foi realizado com um total de 54 mulheres com idade entre 18 e 35 anos que tinham história de aborto de repetição comparada a mulheres férteis sem história de aborto. Foi realizada a extração de DNA de sangue periférico, seguido de reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento dos dois polimorfismos no exon 7 do gene receptor de dopamina D2 (DRD2). O polimorfismo 1 ocorre no nucleotídeo 3420 (Citosina para Timina, 313 Histidina), e o polimorfismo 2 ocorre no nucleotídeo 3438 (Citosina para Timina, 319 Prolina).

Resultados: A frequência do polimorfismo DRD2 está aumentada em pacientes com endometriose peritoneal moderada/grave. Análise dos genótipos DRD2 demonstra uma razão de chance de 2,98 (1,47 - 6,04; intervalo de confiança (IC) 95%) para o polimorfismo 2 na endometriose peritoneal moderada/grave. O mesmo polimorfismo

DRD2 tem uma frequência alélica aumentada nas pacientes com abortamento repetição com uma razão de chance de 2,37 (1,05 - 5,36; IC 95%).

Conclusão: Nossos resultados revelam um excesso do polimorfismo DRD2 em mulheres com endometriose peritoneal moderada-grave e em pacientes com abortamento de repetição. Podemos especular que a presença de polimorfismo 2 pode causar um defeito no mecanismo de pós-sinalização, resultando num ligeiro aumento dos níveis de prolactina sérica. Assim, devido ao possível potencial angiogênico, a prolactina pode desempenhar um papel importante na implantação dos focos de endometriose bem como dificuldades na implantação embrionária com consequente aborto.

Palavras-chave: Prolactina; endometriose; receptores dopamina D2; polimorfismo; infertilidade, aborto recorrente.

ABSTRACT

Introduction: The increase of serum prolactin levels has been associated with unfavourable gynaecological and obstetrical outcomes, including endometriosis and recurrent abortion. Knowing that the polymorphism of the dopamine D2 receptor is associated with hyperprolactinaemia, we conducted this study to verify its association with endometriosis and recurrent miscarriage.

Objective: To verify the prevalence of the polymorphism of the D2 dopamine receptor in patients with peritoneal endometriosis and recurrent abortion compared to healthy women.

Methods: Two case-control studies were conducted of women who were enrolled at the *Hospital de Clinicas de Porto Alegre*: 1) a study with 107 patients with infertility secondary to peritoneal endometriosis compared with healthy women and 2) a second study with 54 women with recurrent miscarriage compared with fertile women with no history of abortion. All of the women were aged between 18 and 35 years. We performed DNA extraction from peripheral blood followed by a polymerase chain reaction to confirm the single-strand polymorphisms and to sequence two polymorphisms in exon 7 of the dopamine receptor D2 (DRD2) gene. Polymorphism 1 occurred in nucleotide 3420 (cytosine to thymine, 313 histidine), and polymorphism 2 occurred in nucleotide 3438 (cytosine to thymine, 319 proline).

Results: The frequency of the DRD2 polymorphism 2 was increased in the subjects with peritoneal moderate/severe endometriosis. An analysis of the DRD2 genotypes demonstrated an odds ratio of 2.98 (1.47 - 6.04, 95% confidence interval (CI)) for polymorphism 2 in peritoneal moderate/severe endometriosis. This same

polymorphism was increased in the subjects with recurrent miscarriage with an OR ratio of 2.37 (1.05 – 5.36, 95% CI).

Conclusions: Our results revealed an excess of the DRD2 polymorphism 2 in exon 7 in women with peritoneal moderate/severe endometriosis and women with recurrent miscarriage. We could speculate that the presence of the polymorphism 2 causes a defect in a post-receptor signalling mechanism, which results in a mild increase in the serum prolactin levels. Thus, the potential angiogenic action of prolactin may play a role in implanting ectopic endometriosis tissue as well as in embryo implantation difficulties with subsequent abortions.

Key words: Endometriosis; prolactin; dopamine receptor D2; polymorphism; infertility, recurrent miscarriage

LISTA DE ABREVIATURAS

A - adenina

AMPC - Adenosina monofosfato cíclico

AR – Aborto de repetição

ASRM - *American Society for Reproductive Medicine* (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva)

C- Citosina

CA- 125 – Antígeno 125

D1- Receptor da dopamina 1

D2- Receptor da dopamina 2

D3 - Receptor da dopamina 3

D4- Receptor da dopamina 4

D5- Receptor da dopamina 5

DNA- *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DRD2 - Receptor da dopamina D2

EDT - Endometriose

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Teste de imunoabsorbância ligado à enzima)

E-PRL - Prolactina endometrial

FIV - Fertilização *in vitro*

FSH - *Follicle-stimulating hormone* (Hormônio folículo-estimulante)

G - Guanina

AMH - *Anti mullerian hormone* (Hormônio antimulleriano)

His – Histidina

IC – Intervalo de confiança

IIU - Inseminação intra-uterina

IL- Interleucina

IMC - Índice de massa corporal

LH- *Luteinizing hormone* (Hormônio luteinizante)

PCR - *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PRL - Prolactina

PRL-R - Receptor da prolactina

ROC - *Receiver operator characteristic*

SAAF - Síndrome anticorpo antifosfolípido

SNP - *Single-nucleotide polymorphism* (Polimorfismo de único nucleotídeo)

T- Timina

VEGF- *Vascular endothelial growth factor* (Fator de crescimento vascular endotelial)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Base de dados da revisão	16
2.2 Aspectos gerais da endometriose.....	17
2.2.1 Aspectos hormonais na endometriose	18
2.2.2 Coorte folicular e reserva ovariana na endometriose.....	20
2.2.3 Endometriose e reprodução assistida.....	21
2.2.4 Polimorfismos e endometriose	23
2.3 Aborto de repetição	24
2.3.1 Aborto e prolactina.....	26
2.3.2 Polimorfismos e aborto de repetição	28
2.4 Prolactina.....	29
2.4.1 Prolactina e reprodução.....	30
2.4.2 Prolactina e endometriose	31
2.5 Dopamina	33
2.6 Agonistas dopaminérgicos	33
2.6.1 Agonistas dopaminérgicos na endometriose e no abortamento de repetição	35
2.7 Polimorfismos.....	36
2.7.1 Polimorfismos do gene do receptor da dopamina D2	37
2.7.2 Polimorfismos do gene do receptor da dopamina D2 e desfechos reprodutivos.....	39
3. MARCO TEÓRICO	41

4. JUSTIFICATIVA.....	42
5. OBJETIVOS	43
6. HIPÓTESE NULA.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO	45
8. ARTIGO 1: THE DOPAMINE RECEPTOR D2 GENOTYPE (3438) IS ASSOCIATED WITH MODERATE/SEVERE ENDOMETRIOSIS IN INFERTILE WOMEN IN BRAZIL.....	54
9. ARTIGO 2: RECURRENT MISCARRIAGE IS ASSOCIATED TO DOPAMINE RECEPTOR (DRD2 3438) GENOTYPE	76
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS (CONCLUSÕES).....	98
11. PERSPECTIVAS	99

1. INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença que afeta cerca de 10% das mulheres na menacne. Seus sintomas prejudicam muito a qualidade de vida das mulheres por produzirem dismenorréia, dispareunia, dor pélvica crônica e infertilidade (1-3). A dificuldade de gestar é, talvez, o problema secundário à endometriose que mais afeta as mulheres por dificultar um dos seus desejos mais importantes: ter filhos. Além da alteração anatômica tubária que causa infertilidade em pacientes com endometriose (3), ela também atua por outros mecanismos dificultando a gestação. Isto é visto principalmente em mulheres em que a alteração anatômica causada pela endometriose é pequena ou inexistente. O real mecanismo pelo qual esta doença pode associar-se à infertilidade ainda é desconhecido devido às inúmeras alterações causadas por ela como: imunológicas, inflamatórias ou hormonais (4).

Já demonstramos que este grupo de mulheres inférteis com endometriose tem secreção e controle da prolactina alterada (5), assim como anormalidades da fase lútea evidenciada pela disfunção na secreção de esteroides ovarianos (estrogênio e progesterona) e concentração folicular de fatores de crescimento modulada de forma anômala (6-7). Além disso, demonstramos que mulheres com endometriose mínima e leve apresentam uma alteração da coorte folicular com uma diminuição da reserva ovariana medida pelos níveis séricos do hormônio anti-mulleriano no 3º dia do ciclo menstrual (8). Demonstramos também que a prolactina tem seu nível sérico aumentado de acordo com a classificação da endometriose e quando utilizada como marcador para esta doença ela é equivalente ao CA-125 tanto em sensibilidade quanto em especificidade (9).

Como a prolactina está sob controle inibitório da dopamina, as alterações genéticas nos receptores da dopamina nos lactotrofos podem resultar em um declínio do sinal de transdução, e como consequência, perder seu efeito inibitório sobre a secreção da prolactina, causando hiperprolactinemia (10-14). O polimorfismo do receptor da dopamina foi associado com alteração dos níveis de prolactina, seja secundária ao uso de certos medicamentos (12, 15), pacientes com prolactinomas (16-17) ou pacientes com hiperprolactinemia (14). Além disso, a prolactina é reconhecida como um sinal essencial para a iniciação e manutenção de decidualização (18), quando existe um nível alterado de prolactina, este está intimamente relacionado com o aborto espontâneo (19).

Sabendo que pacientes com endometriose apresentam um aumento do nível sérico da prolactina (5, 9, 20-23) e sendo que a causa deste aumento ainda não é conhecida, e que as alterações do nível de prolactina podem estar associadas com abortamento, resolvemos estudar se a presença do polimorfismo do receptor da dopamina poderia estar associada com endometriose e com pacientes com perdas gestacionais de repetição. A procura deste achado tem como principal objetivo o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no aumento da prolactina em mulheres inférteis com endometriose, bem como melhor entendimento das causas de abortamento e a proposição de tratamentos mais racionais e baratos, otimizando seus resultados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Base de dados da revisão

Foi realizada uma revisão da literatura nas bases de dados Lilacs, SciELO, Pubmed e Embase. Para esta pesquisa foram utilizadas as seguintes palavras chave: “*endometriosis and prolactin*”, “*endometriosis and polymorphism*”, “*DRD2 polymorphism*”, “*endometriosis and dopamine*”, “*recurrent miscarriage and endometriosis*”, “*miscarriage and prolactin*”, “*miscarriage and polymorphism*”, “*miscarriage and dopamine*” (Figura 1).

Palavras Chave			
<ol style="list-style-type: none"> 1. - Endometriosis + prolactin 2. - Endometriosis + polymorphism 3. - DRD2 polymorphism 4. - Endometriosis + dopamine 5. - Recurrent miscarriage and endometriosis 6. - Recurrent miscarriage + prolactin 7. - Recurrent miscarriage + polymorphism 8. - Recurrent miscarriage + dopamine 			
Lilacs	SciELO	Pubmed	Embase
1. 4	1. 1	1. 118	1. 205
2. 0	2. 0	2. 322	2. 479
3. 0	3. 0	3. 751	3. 945
4. 1	4. 1	4. 10	4. 137
5. 0	5. 0	5. 74	5. 58
6. 1	6. 0	6. 360	6. 421
7. 0	7. 0	7. 36	7. 316
8. 1	8. 2	8. 9	8. 28

Figura 1: Revisão da literatura: palavras chave

Após esta procura, foram selecionados os artigos que estavam relacionados com os polimorfismos da dopamina, uso de agonistas dopaminérgicos, hiperprolactinemia,

polimorfismo do receptor da dopamina D2 em pacientes com endometriose e em pacientes com aborto de repetição.

2.2 Aspectos gerais da endometriose

A endometriose é definida como a presença de tecido glandular e estroma endometrial fora da cavidade uterina (1, 3, 24) sendo descrita pela primeira vez em 1860 por Rokitansky (25) e em 1927, Sampson foi o primeiro a caracterizar a endometriose como uma patologia responsável por alterações na pelve feminina (26). A etiopatogenia da endometriose ainda é enigmática e está baseada em algumas teorias: metaplasia celômica, implantes ectópicos e a indução de células multipotenciais (27).

Estima-se que 10 a 15 % da população feminina apresentam endometriose (3, 28). A endometriose pode ser assintomática, ocorrendo diagnóstico, muitas vezes, somente por ocasião da incapacidade de gestar ou outras vezes sintomática com mulheres apresentando dismenorréia, dispareunia e dor pélvica crônica. Devido aos seus sintomas serem inespecíficos e semelhantes a outras doenças há um atraso médio no diagnóstico da endometriose de oito a doze anos (29-30). A associação entre endometriose e infertilidade é bem estabelecida, mulheres com endometriose têm vinte vezes mais chances de serem inférteis (31-32). Trinta a sessenta por cento das pacientes com endometriose apresentam infertilidade associadas a esta doença (3, 33-34).

A classificação de endometriose utilizada atualmente ainda é a da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) (35), entretanto é uma classificação muito contestada, pois ela não é capaz de associar adequadamente os sintomas com o estadiamento, seja no que diz respeito às pacientes com dor (36), à endometriose

profunda, (37) ou infertilidade. Outros pesquisadores preferem classificar a endometriose em profunda, ovariana e peritoneal por acreditarem que cada uma tem um comportamento e sintomatologia diferentes (24, 38). Outro dado intrigante da endometriose ainda não totalmente elucidado, é que as pacientes com endometriose moderada ou severa que tem infertilidade apresentam claramente um substrato anatômico para sua incapacidade de gestar, entretanto a etiologia da infertilidade das pacientes com endometriose mínima ou leve, em que o comprometimento tubário é mínimo ou inexistente, não é claramente entendido. Vários mecanismos desta possível etiologia são propostos, sem ter, até o momento, uma definição clara a respeito (3, 31, 39).

2.2.1 Aspectos hormonais na endometriose

A endometriose foi associada com anovulação, desenvolvimento anormal do folículo com comprometimento do seu crescimento, redução dos níveis circulantes de estradiol durante a fase pré-ovulatória, perturbação dos padrões de pico do hormônio luteinizante (LH), *spotting* pré-menstrual, síndrome do folículo não-roto luteinizado, galactorrêia e hiperprolactinemia (32, 34, 40-42). A endometriose também foi associada com anovulação em 17% das pacientes mediante um escore obtido de suas anamneses (43). A disfunção ovulatória em pacientes com endometriose foi descrita em vários estudos e foi observada uma prevalência superior de folículo não roto nas pacientes com endometriose, além da presença de insuficiência lútea (32, 40-42). Em um estudo experimental com animais foi sugerido a associação de endometriose com infertilidade devido à alteração na foliculogênese (44).

Pacientes com endometriose parecem ter uma secreção anômala de LH e insuficiência lútea mais prevalente (45-46). Além disso, foram encontradas alterações na concentração sérica e no líquido peritoneal bem como na secreção de progesterona em pacientes com endometriose (47-48). Esses achados nos levam a relacionar as anormalidades endócrinas presentes na endometriose entre elas à disfunção do eixo hipófise-ovário, as alterações da luteinização, a presença de folículo não roto, a baixa concentração de progesterona na fase lútea, como fatores responsáveis na fisiopatologia da endometriose (45-46).

A alteração da liberação bem como dos níveis séricos de prolactina estão presentes em pacientes com endometriose (5, 7). Sabemos que 30% das pacientes com endometriose tem hiperprolactinemia (5, 7), assim como anormalidades da fase lútea evidenciada pela disfunção na secreção de esteroides ovarianos (estrogênio e progesterona) e concentração folicular de fatores de crescimento modulada de forma anômala (6). Os níveis de prolactina aumentam conforme o grau de endometriose (9, 21) tal qual o CA-125 (9, 21, 39), sugerindo que o descontrole hormonal da prolactina parece aumentar quanto maior o grau de endometriose presente nas pacientes.

O papel da prolactina na endometriose pode ser um dos fatores importantes na fisiopatologia da implantação dos focos de endometriose. Devido ao seu potente papel como indutor angiogênico (49-50) a presença de níveis aumentados em pacientes com endometriose pode estar diretamente implicada na facilitação da implantação dos focos de endometriose. Essa possível hipótese torna-se mais plausível quando vimos que o uso de agonistas dopaminérgicos causa redução de implantes endometriais podendo ter sua ação por este mecanismo, ou seja, pela redução da prolactina sérica e consequente diminuição do seu efeito angiogênico com redução dos focos de endometriose (51-53).

A associação entre endometriose e hiperprolactinemia foi descrita como possível causa de infertilidade em pacientes com endometriose e sem dano tubário por causar disfunção ovulatória (5, 7) e anormalidades da fase lútea (6). Diante disto, podemos concluir que a disfunção da prolactina encontrada nas pacientes com endometriose, ainda por mecanismos não totalmente esclarecidos, parece atuar pelo menos como um facilitador na implantação dos focos de endometriose e ter uma possível atuação na infertilidade associada à endometriose principalmente naquelas pacientes com endometriose sem alterações anatômicas tubárias importantes (5, 9, 21, 23, 54).

2.2.2 Coorte folicular e reserva ovariana na endometriose

A avaliação da reserva ovariana se tornou muito importante com o surgimento das técnicas de reprodução assistida. O resultado da fertilização *in vitro* (FIV) depende diretamente da resposta ovariana à estimulação exógena e, devido a isso, as pesquisas de fatores prognósticos são muito importantes na reprodução assistida. Os principais fatores prognósticos são: idade cronológica (55-56), hormônio folículo estimulante (FSH) no terceiro dia do ciclo (57), estradiol no terceiro dia do ciclo (58-59), inibina B (60), hormônio antimulleriano (AMH) (61-63) e contagem de folículos antrais (64).

Em recente estudo de revisão sistemática encontrou-se que o AMH é o melhor marcador da resposta ovariana em ciclos estimulados, quando comparado ao FSH, estradiol, inibina B, idade e volume ovariano (65). O AMH é produzido pelas células da granulosa dos folículos pré-antrais e antrais pequenos. A presença do AMH nestes folículos mostrou-se ser independente do FSH, revelando a sua importância no processo de recrutamento folicular (66).

A possível diminuição da reserva ovariana nas pacientes com endometriose vem há muito tempo sendo discutida. Para responder esta questão já realizamos um estudo onde avaliamos os níveis de FSH, AMH e contagem de folículos antrais nas pacientes com endometriose. Demonstramos que pacientes com endometriose apresentam uma diminuição do AMH e coorte folicular heterogênea, mas com mesmos níveis séricos de FSH (8). Estes resultados sugerem que em pacientes com endometriose mínima-leve apresentam diminuição da reserva ovariana avaliadas pelo AMH. Esta alteração aparece antes da modificação dos níveis de FSH, confirmando dados que o AMH é um melhor preditor para reserva ovariana que o FSH (65, 67). Apesar deste achado, os níveis de AMH no fluido folicular não estão alterados nas pacientes com endometriose mínima-leve (68) fazendo com que ainda sejam necessários estudos funcionais para melhor entendimento do desenvolvimento folicular neste grupo de mulheres.

2.2.3 Endometriose e reprodução assistida

O uso de técnicas de reprodução assistida em pacientes inférteis com endometriose como inseminação intrauterina (IIU) e a FIV parece ser um tratamento efetivo para este grupo de mulheres. O tratamento com IIU melhora a fertilidade de pacientes com endometriose mínima-leve (39). A FIV é o tratamento adequado para pacientes com endometriose especialmente se a função tubária é comprometida. Além disso, quando há outro fator associado à infertilidade como um fator masculino, ou falha terapêutica anterior, a FIV está indicada para aumentar a chance de gravidez (39). Entretanto, em geral são necessários ciclos repetidos de tratamento em reprodução assistida para o sucesso da gestação nas pacientes com endometriose (39).

Pacientes com endometriose têm uma diminuição de 20% na chance de ficarem grávidas após FIV se comparada ao grupo de mulheres sem esta doença (69). As taxas de gravidez pós FIV são menores nas pacientes com endometriose quando comparadas a pacientes com obstrução tubária por outras causas (69-70). Dentre as prováveis justificativas do papel da endometriose nos desfecho de reprodução assistida encontram-se as alterações oocitárias e de desenvolvimento embrionário que ainda não estão totalmente esclarecidas (69, 71-72). Outro dado importante é que em pacientes que apresentam endometriose profunda tem uma menor taxa de gestação pós FIV (73).

Para avaliar os possíveis mecanismos da redução da taxa de gravidez em pacientes com endometriose, a análise de dados de FIV nos programas de ovodação entre pacientes com e sem endometriose podem nos ajudar a esclarecer a influência da endometriose sobre a implantação do embrião, qualidade oocitária e fatores uterinos. Alguns estudos demonstraram taxas semelhantes de implantação embrionária e gravidez nas mulheres com ou sem endometriose que participavam de programas de ovodação sugerindo que a endometriose não influenciaria a qualidade e a implantação oocitária (74). Em contraste, outros estudos em que pacientes com endometriose que participaram como doadoras deram origem a embriões com qualidade reduzida e estes embriões tiveram menores taxas de implantação (71-72), dados que parecem mais de acordo com o encontrado com a prática clínica.

Outro dado importante sobre pacientes com endometriose que realizam FIV é a presença de endometrioma. As pacientes que realizaram cistectomia do endometrioma ovariano antes da FIV tiveram uma pior resposta à estimulação ovariana quando comparadas as pacientes que não realizaram a cistectomia. Entretanto, apesar da menor resposta à indução não houve diferença de taxas de implantação e gravidez (75). De outro lado, ocorre uma pior resposta ao estímulo com gonadotrofinas no ovário que

apresenta endometrioma comparado com o ovário contralateral da mesma paciente, demonstrando que a presença do endometrioma, por si, reduz a resposta do ovário às gonadotrofinas (76). Estes resultados nos colocam em dúvida de quando indicar a retirada de endometrioma nas pacientes que irão realizar FIV.

Diante deste contexto, estudos recentes apimentam ainda mais a discussão se pacientes devem ou não retirar os endometriomas antes da FIV. O AMH, sabido marcador de reserva ovariana (61-63), foi avaliado em pacientes que foram submetidas à ressecção do endometrioma. Vem sendo demonstrado que ocorre uma diminuição do AMH após o procedimento cirúrgico sugerindo que a ressecção dos endometriomas influenciaria negativamente na reserva ovariana (77-79).

Percebe-se que ainda há algumas questões a serem respondidas sobre endometriose e seus efeitos em reprodução assistida, principalmente no que diz respeito à endometriose mínima e leve. Em suma, estudos ainda são necessários para fornecer evidências suficientes para o entendimento da subfertilidade em mulheres com endometriose.

2.2.4 Polimorfismos e endometriose

A endometriose tem um forte componente genético, e numerosos estudos genéticos sobre polimorfismos em pacientes com endometriose têm sido relatados (80).

Na endometriose, por ter uma influencia hormonal, vários polimorfismos nos hormônios e em seus receptores foram estudados (80). Já foram encontradas associações entre endometriose e vários polimorfismos, entre eles o polimorfismo do receptor do estrogênio (81-83) e o polimorfismo do receptor da progesterona (84-85). Outros

estudos, pensando na possível alteração inflamatória causada pela endometriose, avaliaram a presença de polimorfismos em citocinas e sua associação com endometriose (86-88).

Nosso grupo de pesquisa vem avaliando a presença de polimorfismos em pacientes com endometriose. Já encontramos a associação do polimorfismo do P53 em pacientes com endometriose (89), mas não encontramos associação dos polimorfismos do LH (90) e do gene do receptor do FSH (91) e endometriose.

Por ser uma doença de origem multifatorial, são muitas as linhas de pesquisa sobre a endometriose, dentre elas a procura por polimorfismos vem sendo muito estudada pois pode nos explicar melhor sobre a fisiopatologia desta doença.

2.3 Aborto de repetição

O abortamento de repetição (AR) é uma das mais frustrantes e difíceis áreas da medicina reprodutiva porque a etiologia frequentemente é desconhecida e há poucos diagnósticos e tratamentos baseados em evidências. Classicamente de aborto de repetição é definido como três ou mais perdas gestacionais consecutivas reconhecidas com idade gestacional menor que vinte semanas. Entretanto, alguns pesquisadores usam algumas variações desta definição, e a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva define AR como duas ou mais perdas gestacionais (documentadas por ultrassonografia ou exame histopatológico) (92).

Aproximadamente 15% das mulheres que engravidam terão abortos espontâneos esporádicos. Apenas 2% das mulheres apresentarão duas perdas gestacionais consecutivas e somente 0,4 a 1% terão três perdas consecutivas (93). A prevalência de

aborto é maior quanto maior a idade materna e quanto mais precoce é a idade gestacional. O risco de aborto é de 22 a 57% em pacientes com menos de 6 semanas de gestação, 15% em gestações entre 6 e 10 semanas e 2-3% após 10 semanas de gestação (94-95).

Casais que tiveram uma perda gestacional tem duas grandes preocupações: a causa da perda e qual o risco de recorrência. Infelizmente a causa do abortamento de repetição pode ser determinada em apenas 50% dos casos. As causas de abortamento recorrente estão classificadas como anatômicas, imunológicas, genéticas, endócrinas, infecciosas, trombofílicas e ambientais (96).

As anomalias congênitas uterinas estão presentes em cerca de 15% das mulheres com AR (97). Dentre estas, a mais comum e associada com pior sucesso reprodutivo é o útero septado (98). Dentre as anomalias anatômicas não congênitas o mioma submucoso pode impedir a implantação embrionária adequada devido a sua posição na cavidade uterina, diminuição da receptividade endometrial da decídua ou degeneração com aumento da produção de citoquinas (99). Outra anomalia adquirida associada com AR está a sinéquia uterina por causar insuficiência endometrial para suportar o crescimento feto-placentário adequado (100).

Muitas doenças autoimunes têm sido associadas com pobre desfecho obstétrico e aborto, dentre elas a síndrome do anticorpo antifosfolipídio (SAAF). A SAAF está presente nos protocolos de rastreio para aborto de repetição e é uma das poucas patologias causadoras de aborto que tem um protocolo de tratamento estabelecido. Cerca de 5 a 15% das pacientes com aborto de repetição apresentam SAAF (101).

As anormalidades cromossômicas estão entre as causas mais comuns abortos esporádicos sendo responsáveis por cerca de 50% destas perdas (102). Estas anormalidades cromossômicas também são responsáveis por uma significativa proporção

das pacientes com abortamento de repetição dentre as quais se destacam as aneuploidias, os mosaicismos, as translocações, as inversões e deleções (103).

Fatores endócrinos são responsáveis por 15 a 60% dos AR. A progesterona é essencial para o sucesso da implantação e manutenção da gravidez, por isso, os distúrbios relacionados com alterações da produção ou da ação da progesterona podem afetar o sucesso da gravidez (104). Diabetes mal controlada (105), síndrome dos ovários policísticos (106), doenças da tireóide mal controladas (107) e tireoidites (108) também podem estar associadas com AR. Também se sabe que os níveis normais circulantes de prolactina desempenham um papel importante na manutenção da gestação inicial (109).

2.3.1 Aborto e prolactina

A prolactina tem um importante papel na reprodução, entretanto seus reais mecanismos de ação ainda não estão claramente entendidos. Uma circulação sérica normal de prolactina parece ter um papel importante na manutenção da gravidez inicial. Esta hipótese é suportada por um estudo em que pacientes com hiperprolactinemia com abortamento de repetição foram randomizadas e receberam ou não terapia com bromocriptina (109). O tratamento para abaixar os níveis de prolactina sérica foi associado com uma taxa maior de sucesso de gravidez (86 versus 52%) (109). Outro estudo mostrou resultados semelhantes, nesta série cerca de 35% de pacientes com aborto espontâneo recente tinham hiperprolactinemia ou uma hiperprolactinemia oculta como possível causa de sua perda gestacional. Essas pacientes após serem tratadas com bromocriptina tiveram sucesso em manter a gestação numa gravidez subsequente a este esquema terapêutico, sugerindo que alterações da prolactina podem ser causa de perdas

gestacionais até então chamadas de inexplicadas (110). Além disso, foi demonstrada a associação entre hiperprolactinemia e SAAF, que é uma causa conhecida de aborto de repetição. Nestas pacientes com SAAF, a presença de hiperprolactinemia foi associada com falha reprodutiva e abortamento (111).

Prolactina é reconhecida como um sinal essencial para a iniciação e manutenção de decidualização (18), quando existe um nível alterado de prolactina, este está intimamente relacionado com o aborto espontâneo (19). No útero não grávido humano, o receptor de prolactina (PRL-R) foi localizado no compartimento estromal e glandular do endométrio na metade final da fase secretora (112). Além disso, o PRL-R presente nas células da granulosa pré-ovulatórias podem estar envolvido na coordenação entre as células da granulosa e macrófagos foliculares no processo de ovulação (113). Quando ocorre a gravidez a expressão endometrial do PRL-R é mantida e o PRL-R aparece também na decídua, citotrofoblasto corial, trofoblasto placentário e epitélio amniótico (113).

O endométrio é um dos primeiros locais extrapituitário que foram relatados que sintetizam e secretam prolactina (114-115). Alguns autores sugerem que a prolactina endometrial (E-PRL) tem um papel importante no processo de implantação do embrião (112, 116-117). Estes estudos demonstram que a PRL exerce um papel importante, mas ainda não totalmente claro na reprodução humana, demonstrando a necessidade de novos estudos à procura da fisiopatologia deste hormônio na reprodução.

2.3.2 Polimorfismos e aborto de repetição

O papel dos polimorfismos genéticos no AR ainda é incerto. As citocinas, mediadores angiogênicos, e os hormônios estão envolvidos em todas as fases da reprodução e resultado final da gravidez. Produção inadequada ou desequilibradas destes mediadores têm sido implicados na patogênese do aborto de repetição. Diante disto, por poder causar alterações nestes mediadores, como os receptores hormonais e inflamatórios, tem sido pesquisada a presença de polimorfismos genéticos nestes locais nas pacientes com AR (118).

Diferentes polimorfismos no gene que codifica o receptor da progesterona têm sido descritos e investigados em pacientes com AR. Dois estudos sugerem uma relação entre AR e polimorfismo do receptor da progesterona (119-120), entretanto outros estudos não confirmaram estes achados (121-122). Outros estudos avaliaram polimorfismos dos receptores do estrogênio em pacientes com aborto de repetição, mas ainda sem resultados conclusivos (122-124).

Múltiplos polimorfismos das citocinas foram associados com AR. No entanto, a maioria dos resultados não foram confirmados por outros investigadores (125). Além dos fatores hormonais e inflamatórios, a angiogênese e a vasculogênese tem um papel de destaque na implantação embrionária. Um dos mais importantes mediadores envolvidos neste processo é o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). A deficiência da expressão e a presença de polimorfismo no VEGF foram associados com abortamento espontâneo (126-127)

Como descrito acima, encontramos na literatura vários estudos que avaliaram a presença de polimorfismos nas citocinas, mediadores angiogênicos, e nos hormônios e seus receptores em pacientes com AR. Os resultados destes estudos são na maior parte

contraditórios, e poucas associações significativas foram identificadas. Diante disto avaliação rotineira da presença destes polimorfismo não está indicada em pacientes com AR, mas seu estudo tem um papel importante na procura e no maior entendimento da patogênese desta doença.

2.4 Prolactina

A prolactina, hormônio produzido pela hipófise anterior, apresenta a particularidade de que a sua liberação está sob o controle inibitório da dopamina, que atua por ação dos receptores do tipo D2 nos lactotrofos. A dopamina alcança a adeno-hipófise do hipotálamo pelo sistema porta-hipofisário, sendo assim, qualquer ruptura desta comunicação ou distúrbio deste sinal pode resultar em hiperprolactinemia (128).

Nas mulheres a prolactina está elevada ao nascimento e decresce a baixos níveis durante a primeira semana de vida. Retorna novamente a se elevar durante a puberdade juntamente com o FSH e LH, porém mais modestamente. O estrogênio estimula a secreção de prolactina, o que pode explicar o aumento da prolactina na puberdade. Além disso, ocorre aumento da prolactina devido a muitas situações como febre, exercícios, estresse, cirurgia e a alguns medicamentos. O maior estímulo para o aumento da prolactina ocorre na gestação e também durante a amamentação. No homem, a hiperprolactinemia gera impotência sexual, por prejudicar a produção de testosterona e, também, pode causar aumento das mamas (ginecomastia) (129-130).

A causa mais comum de hiperprolactinemia (aumento do nível sérico da prolactina fora da gravidez) não fisiológica é uso de medicamentos, em especial as drogas antipsicóticas. Vários são os mecanismos pelos quais o uso de drogas pode

aumentar a prolactina: aumento da transcrição do gene da dopamina (estrogênios), antagonismo ao receptor da dopamina (neurolépticos, metoclopramida, sulpirida), depleção de dopamina (reserpina, metildopa), inibição da produção central de dopamina (verapamil, heroína, morfina, análogos da encefalina), inibição da recaptação de dopamina (antidepressivos tricíclicos, cocaína, anfetamina, inibidores da monoaminoxidase). Dentre as causas patológicas, os prolactinomas, que representam o adenoma hipofisário funcionante, são a principal causa. Estes podem ser divididos em macroprolactinomas, maiores de 10 mm, e microprolactinomas e representam cerca de 40-60% dos casos de hiperprolactinemia (130).

Já foi visto que a prolactina é um potente indutor angiogênico devido ao seu efeito pró-angiogênico nos receptores em vasos sanguíneos (49-50). Como os focos de endometriose apresentam a expressão de receptores da prolactina (131) poderia a prolactina, devido ao seu efeito pró-angiogênico, desempenhar um papel na facilitação da implantação dos focos de endometriose. O uso de agonistas da dopamina, medicamentos que causam diminuição da prolactina, também causou uma redução dos focos de endometriose (51-53). Os reais mecanismos de como esses medicamentos agem na endometriose ainda são desconhecidos, mas poderia ser pela diminuição dos níveis de prolactina e conseqüentemente diminuição do efeito pró angiogênico da prolactina causando diminuição dos focos de endometriose.

2.4.1 Prolactina e reprodução

O papel da prolactina na reprodução ainda não está totalmente esclarecido. Foram constatados que baixos níveis de prolactina estimulam o ovário enquanto, altos

níveis inibem a produção de progesterona pelas células da granulosa (132-133). Além disso, um nível de prolactina elevado provoca anovulação devido à inibição da pulsatilidade do LH, interferindo na função hipotalâmica pelo bloqueio dos receptores estrogênicos (132-133). A sua ação no ovário pode ser devida à diminuição da afinidade do receptor do LH no corpo lúteo, causando uma diminuição da produção e secreção de progesterona resultando não somente em anovulação, mas também numa fase lútea curta com maturação folicular e do corpo lúteo inadequados (5).

A prolactina desempenha um papel importante na reprodução, pois ela age na iniciação e manutenção de decidualização (18), sabemos que a alteração dos seus níveis pode causar abortos espontâneos (19), e ela parece atuar no processo de implantação embrionária (112, 116-117), que pode estar também prejudicado por alteração da secreção da E-PRL (114-115). Entretanto, apesar destes conhecimentos sobre a sua atuação, seus mecanismos ainda não estão totalmente claros, pois vemos que a sensibilidade ovariana à prolactina parece ser extremamente variável, em que pequenos níveis de elevação podem causar sintomas como amenorreia; e, em contrapartida, níveis mais elevados em outro grupo de pacientes pode, simplesmente, não causar sintomas.

2.4.2 Prolactina e endometriose

Nosso grupo, em uma de suas linhas de pesquisa vem estudando as alterações da produção e secreção da prolactina em pacientes com endometriose. Já evidenciamos que cerca e 30% das pacientes com endometriose tem hiperprolactinemia (5, 7). Além disso, demonstramos que este grupo de mulheres com endometriose mínima-leve tem secreção e controle da prolactina alterada (5, 7), provavelmente com uma disfunção central da secreção da PRL que não envolve o sistema de receptores DRD2 (7), assim como

anormalidades da fase lútea evidenciada pela disfunção na secreção de esteroides ovarianos (estrogênio e progesterona) e concentração folicular de fatores de crescimento modulada de forma anômala (6).

Também demonstramos que a prolactina tem seus níveis séricos aumentados de acordo com o grau de endometriose (9), e que a prolactina apresenta uma sensibilidade e especificidade semelhante ao CA 125 como marcador de endometriose (9). Neste mesmo estudo encontramos que se utilizarmos a prolactina associada com o CA125 como marcadores de endometriose com um adequado *cutoff* (14,8 ng/mL para prolactina e U/I 19,8 para o CA-125), que foi calculado especialmente para detectar endometriose, temos uma sensibilidade de 77%, uma especificidade de 88% e um valor preditivo negativo de 0,97 (9).

Níveis séricos normais de prolactina estimulam o ovário, enquanto altos níveis produzem anovulação, devido a isto, a pulsatilidade do LH é alterada interferindo com a função hipotalâmica pelo bloqueio de receptores estrogênicos. As pacientes inférteis com endometriose exibem uma hiperprolactinemia latente sendo mais evidente em pacientes inférteis que não conseguem engravidar mesmo após vários esquemas terapêuticos (133).

Estudos *in-vitro* também evidenciaram alterações da prolactina, pois existe produção de prolactina pelos implantes endometriais e foi notada uma correlação significativa entre a secreção de prolactina destes implantes endometriais com o estágio de endometriose (134). Além disso, existe uma alteração na expressão nos receptores de prolactina nos implantes endometriais, sugerindo que há uma alteração na regulação e expressão destes receptores nos tecidos endometriais ectópicos dos tópicos (131).

2.5 Dopamina

A dopamina é um importante neurotransmissor no cérebro produzido por um grupo de células nervosas chamadas de neurônios pré-sinápticos. Dentre as principais doenças que estão relacionadas à disfunção de secreção e liberação da dopamina estão algumas patologias de desordens psíquicas como a esquizofrenia, devido ao desbalanceamento com excesso na via dopaminérgica mesolímbica e escassez na via mesocortical, e ao Mal de Parkinson, devido à escassez na via dopaminérgica nigro-estriatal (135-137).

A dopamina estimula os receptores adrenérgicos do sistema nervoso simpático e atua sobre os receptores dopaminérgicos nos leitos vasculares renais, mesentéricos, coronarianos e intracerebrais, produzindo vasodilatação. Além disso, a secreção de prolactina pela hipófise é regulada pela dopamina. A dopamina secretada pelo núcleo arcuado atua nos receptores D2 dos lactotrofos pela ativação destes receptores, resultando na diminuição da adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e inibindo a secreção de prolactina (10, 136, 138).

2.6 Agonistas dopaminérgicos

Agonistas dopaminérgicos são drogas que estimulam diretamente os receptores da dopamina. Técnicas de biologia molecular permitiram conhecer, até o presente momento, cinco tipos de receptores dopaminérgicos: D1, D2, D3, D4 e D5. Esses receptores estão organizados em dois grupos: o grupo D1 ou *D1-like* e o grupo D2 ou *D2-like*. O grupo D1 está representado pelos receptores D1 e D5; o grupo D2, pelos

receptores D2, D3 e D4. Os pertencentes ao grupo D1 estimulam a enzima adenilato ciclase e aumentam o nível intracelular de AMP cíclico, enquanto os do grupo D2 inibem essa enzima e diminuem o AMP cíclico intracelular (10, 136, 138-139).

Os receptores dopaminérgicos estão distribuídos anatomicamente em áreas ditas principais ou de alta densidade: D1 e D2 no núcleo caudado, putamen, accumbens e trato olfativo; D3 nas áreas límbicas, trato olfativo, accumbens, ilhas Calleja e hipotálamo; D4 no córtex frontal, hipocampo e accumbens; D5 no hipocampo e hipotálamo. Devido à localização principal de D1 e de D2 no núcleo caudado, no putamen e no núcleo accumbens, acredita-se que esses receptores exerçam um papel no comportamento motor. Assim, a regra geral é que, estimulando os receptores D1 e D2 (ação agonista) ocorra efeito antiparkinsoniano. A maioria dos agonistas dopaminérgicos, eficazes como antiparkinsonianos, atua no receptor D2 (139).

Os principais agonistas dopaminérgicos atualmente disponíveis são a apomorfina, a bromocriptina, o lisuride e o pergolide que apresentam algumas diferenças entre seus perfis de ação e efeitos colaterais. Pensa-se que estes diferentes perfis de afinidades possam se traduzir por diferentes perfis de ação clínica, que ainda não foram consubstanciados em ensaios clínicos. Os agonistas da dopamina podem ser classificados em ergolínicos e não ergolínicos (ropinirol, pramipexol). Os agonistas da dopamina estão indicados no tratamento sintomático da doença de Parkinson. A bromocriptina e a cabergolina estão indicadas no tratamento da hiperprolactinemia e na supressão da amamentação (10, 136, 138-139)

Os efeitos colaterais decorrem da estimulação dopaminérgica central ou periférica, sendo os mais frequentes as náuseas, tonteiras, sonolência, hipotensão ortostática, alucinações, delírios, confusão mental e discinesias. A bromocriptina e o pergolide, por serem ergolíneos, podem causar raros, porém sérios, efeitos adversos, tais

como, edema dos membros inferiores, fenômeno de Reynaud, eritromelalgia e fibroses pleuro- pulmonar e retroperitoneal (10, 136, 138-139).

2.6.1 Agonistas dopaminérgicos na endometriose e no abortamento de repetição

Em estudos recentes, foi visto que o uso de agonistas dopaminérgicos causou redução nos implantes endometriais em estudos experimentais (51-52). Além disso, em estudo com mulheres com endometriose também houve redução ou eliminação de focos de endometriose peritoneal após o uso de agonistas dopaminérgicos (53). Ainda não se sabe qual é o real mecanismo de ação deste medicamento na redução dos focos de endometriose, mas há algumas teorias: [1] a prolactina é um potente indutor angiogênico (49-50), fato imprescindível para a implantação dos focos de endometriose. Como existem receptores da prolactina tanto no endométrio tópico como ectópico (131) e sabendo que há um aumento da prolactina em pacientes com endometriose (5, 9, 20-23) o uso de agonistas dopaminérgicos causaria uma redução dos níveis séricos de prolactina e conseqüentemente uma redução do estímulo angiogênico e diminuição dos focos de endometriose; [2] atuação direta do agonista dopaminérgico no foco de endometriose, pois tanto o endométrio tópico como o ectópico possuem receptores da dopamina D2 (DRD2). Sabemos que a dopamina inibe seletivamente a permeabilidade vascular e atividade angiogênica do VEGF o que nos leva a uma ligação entre dopamina e angiogênese (140). Poderia ser então na atuação direta nos focos endometriais ectópicos por causar diminuição da angiogênese o mecanismo de ação dos agonistas dopaminérgicos na endometriose.

O tratamento com o uso de agonistas dopaminérgicos também foi usado em pacientes com abortos de repetição com sucesso. Após avaliação das possíveis causas de aborto de repetição, viu-se que 35% delas apresentavam hiperprolactinemia ou hiperprolactinemia oculta como possível causa de sua perda gestacional e tiveram sucesso gestacional após o tratamento com esta classe de medicamentos (110).

Apesar do real mecanismo destes achados ainda não serem totalmente conhecidos, abre-se uma nova perspectiva para o uso de agonistas da dopamina como uma alternativa de tratamento da endometriose e também para pacientes com AR.

2.7 Polimorfismos

Os polimorfismos genéticos são pequenas variações que ocorrem no genoma e que garantem as diferenças e características individuais bem como suscetibilidade a doenças. A forma mais comum desta variação gênica se dá pela substituição de um único nucleotídeo por outro (*single nucleotide polymorphism* – SNP), que ocorrem com uma frequência aproximada de 1 a cada 1000 pares de base (141). SNP é uma variação na sequência de DNA que afeta somente uma base: adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G); na sequência do genoma. Essas variações na sequência do DNA podem afetar a resposta dos indivíduos a doenças, bactérias, vírus, produtos químicos, fármacos pela modificação e regulação dos sistemas de *feedback* endócrinos, intracelular, resultando em leves alterações inter-individuais (141).

O sequenciamento do genoma humano e a busca de mutações em condições patológicas mostraram que SNPs são frequentes e também ocorrem nos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise assim como em seus receptores (142). Esses SNPs ocorrem frequentemente na população, estas variações devem ocorrer em no mínimo 1% de uma

determinada população para ser considerada como um SNP. Se for inferior a 1% será considerado como uma mutação (141).

Em relação ao sucesso reprodutivo, apesar da alta frequência dessas alterações genéticas (15-50%), elas não têm efeito deletério pronunciado sobre a função reprodutiva, pois se tivessem a evolução teria eliminado esses polimorfismos. A presença dos SNPs pode afetar ou diminuir a adequada função dos mecanismos endócrinos ou reprodutivos ou pela mudança das propriedades bioquímicas do produto do gene, ou atuando na transcrição gênica modificando a atividade do mesmo (141).

O resultado dessas pequenas alterações genéticas pode alterar o desempenho reprodutivo com um espectro que pode variar da funcionalidade completa à subfertilidade (142). O estudo dos polimorfismos genéticos na endocrinologia tem uma aplicação potencial na farmacogenética, visto que os estudos das variações genéticas podem levar a respostas individuais diferentes às drogas utilizadas (141).

2.7.1 Polimorfismos do gene do receptor da dopamina D2

O gene DRD2 está localizado no cromossomo 11 no q22-q23, estende-se por 270 quilobases e possui oito éxons (143-144). Vários polimorfismos já foram identificados no gene DRD2, sendo associado a várias doenças como esquizofrenia (145), depressão (146), hiperprolactinemia (14), entre outras (147). Além disso, o polimorfismo do DRD2 já foi associado com sucesso reprodutivo (148).

O polimorfismo DRD2 vem sendo associado ao descontrole da liberação da prolactina, seja em pacientes com adenomas de hipófise (16-17), secundário ao uso de medicamentos (12, 15), em pacientes com hiperprolactinemia (14). Dos vários

polimorfismos no DDR2 conhecidos, dois polimorfismos neste gene foram analisados por Hansen et al. em pacientes com hiperprolactinemia (14), ambos no éxon 7. O polimorfismo 1 que envolve o nucleotídeo 3420 (Citosina para Timina, 313 Histidina), e o polimorfismo 2 que envolve o nucleotídeo 3438 (Citosina para Timina, 319 Prolina). Neste estudo foi encontrado um aumento do polimorfismo 1 em pacientes com hiperprolactinemia, demonstrando uma razão de chance de 6,77 (2,39 - 19,14; intervalo de confiança de 95%) para presença do polimorfismo 1 na hiperprolactinemia.

Nenhum estudo até este momento avaliou a presença do polimorfismo DRD2 em mulheres com endometriose. Como a presença do polimorfismo DRD2 foi associada com alteração dos níveis de prolactina (12, 14-17), e como a prolactina pode estar relacionada com a implantação dos focos de endometriose (5, 9, 21, 23, 54) devido ao seu possível efeito angiogênico (49-50) fomos impulsionados a realizar o estudo do DRD2 em pacientes com endometriose na busca do melhor entendimento dos reais mecanismos envolvidos nestas alterações.

Outra possibilidade do possível papel do polimorfismo do DRD2 na endometriose seria o efeito direto sobre o endométrio eutópico e ectópico, pois sabemos que ambos expressam receptores DRD2 (149). Sabemos que o neurotransmissor dopamina inibe seletivamente a permeabilização vascular e atividade angiogênica do VEGF em níveis não tóxicos, revelando uma ligação entre o sistema nervoso e angiogênese (140). Isto levou à idéia do uso de agonistas dopaminérgicos para terapia anti-angiogênica (51-53, 150-151). Assim, um polimorfismo no receptor de dopamina poderia facilitar a implantação do foco de endometriose devido a falha da dopamina ao se ligar no seu receptor que está presente nas células endometriais (149) e à falta de resposta biológica de redução da angiogênese. Um fato que corrobora com esta teoria é que, tanto em estudos experimentais (51-52) como em mulheres com endometriose (53),

ocorreu uma redução dos focos de endometriose após a administração de agonistas da dopamina. Podemos concluir através destes resultados que a administração de doses elevadas de agonistas DRD2 pode ser necessária para a função adequada deste receptor que não responde adequadamente à dopamina.

2.7.2 Polimorfismos do gene do receptor da dopamina D2 e desfechos reprodutivos

Encontramos um único estudo que avaliou o polimorfismo no DRD2 no sucesso reprodutivo que concluiu que o gene do receptor da dopamina D2 pode estar associado com sucesso reprodutivo pela alteração da secreção das gonadotrofinas (148). Um dos alelos avaliados neste estudo foi associado com concentrações significativamente mais elevadas de hormônio luteinizante (LH) e de hormônio folículo-estimulante (FSH), e concentrações significativamente mais baixas de prolactina e menor taxas de aborto. Esses dados sugerem que o DRD2 pode realmente estar implicado em falhas reprodutivas atuando também no controle das gonadotrofinas e da prolactina (148).

Em nossa revisão encontramos outros dois estudos relacionados à reprodução que avaliaram o polimorfismo do receptor da dopamina D3 (DRD3) em mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP). Um destes demonstrou que o polimorfismo do DRD3 estava associado a mulheres com SOP e ao hiperandrogenismo (152), dado não confirmado em estudo posterior (153).

Diante da associação conhecida entre alterações dos níveis de prolactina e o polimorfismo do DRD2 (14, 148), da influência da prolactina como causa de abortamento (19), e do possível papel dos polimorfismos do DRD2 na reprodução (148), achamos importante realizar o estudo sobre a prevalência do polimorfismo do

DRD2 em mulheres com abortamento de repetição e em mulheres com endometriose para melhor entendimento dos seus possíveis mecanismos nestas doenças.

3. MARCO TEÓRICO

A associação entre o polimorfismo do DRD2 e sucesso reprodutivo é um marco teórico importante para nossa pesquisa. A presença deste polimorfismo e sua consequência fisiológica na angiogênese, nível sérico de prolactina ou até mesmo possível ação endometrial nos impulsionaram a pesquisá-lo em mulheres com endometriose e aborto de repetição.

4. JUSTIFICATIVA

O sucesso reprodutivo depende de inúmeras interações hormonais e imunológicas. Um dos hormônios intimamente ligados ao sucesso reprodutivo é a prolactina. Este hormônio parece desempenhar um papel crucial na implantação embrionária, visto que a alteração de seus níveis séricos pode causar infertilidade por anovulação, disfunção lútea ou abortamento. Como seu controle está ligado a um *feedback* negativo da dopamina, os defeitos do receptor DRD2 podem estar implicados na alteração dos níveis de secreção da prolactina. O receptor DRD2 já foi associado com sucesso reprodutivo e também com hiperprolactinemia, e parece ter um papel importante também na angiogênese, todos fatores importantes para uma implantação gestacional adequada, evitando abortos, bem como para formação de focos de endometriose. Diante de todo este contexto, o uso de agonistas da dopamina que atuam no receptor DRD2 causou redução dos focos de endometriose, e foi associado ao sucesso reprodutivo em pacientes com abortamento.

Como existe um razoável corpo de evidências relacionando as alterações do receptor da dopamina com hiperprolactinemia, realizamos esta pesquisa com o principal objetivo de um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na infertilidade das mulheres com endometriose e no abortamento para a proposição de tratamentos mais racionais e baratos, otimizando seus resultados.

5. OBJETIVOS

Pesquisar a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos 3420 e 3438 no gene do receptor da dopamina D2 em mulheres inférteis com endometriose comparando com grupo controle (mulheres férteis sem endometriose).

Pesquisar a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos 3420 e 3438 no gene receptor da dopamina D2 em mulheres com abortamento de repetição comparado com mulheres férteis com mais de dois filhos e sem história de aborto.

6. HIPÓTESE NULA

Os genes (3420 e 3438) do receptor da dopamina não são importantes na determinação de desfechos obstétricos ou ginecológicos desfavoráveis relacionados com endometriose ou aborto recorrente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

1. Koninckx PR. Is mild endometriosis a condition occurring intermittently in all women? *Hum Reprod.* 1994 Dec;9(12):2202-5.
2. Missmer SA, Cramer DW. The epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2003 Mar;30(1):1-19, vii.
3. Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis. *N Engl J Med.* 1993 Jun 17;328(24):1759-69.
4. May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2010 May 12.
5. 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.
6. Cunha-Filho JS, Gross JL, Bastos de Souza CA, Lemos NA, Giugliani C, Freitas F, et al. Physiopathological aspects of corpus luteum defect in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *J Assist Reprod Genet.* 2003 Mar;20(3):117-21.
7. Cunha-Filho JS, Gross JL, Lemos NA, Dias EC, Vettori D, Souza CA, et al. Prolactin and growth hormone secretion after thyrotrophin-releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis. *Hum Reprod.* 2002 Apr;17(4):960-5.
8. Lemos NA, Arbo E, Scalco R, Weiler E, Rosa V, Cunha-Filho JS. Decreased anti-Mullerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril.* 2008 May;89(5):1064-8.
9. Bilibio JP, Cunha-Filho JS. Avaliação do nível sérico de prolactina e CA 125 como marcadores diagnósticos de endometriose. [Dissertação]. 2010.
10. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998 Jan;78(1):189-225.
11. Caccavelli L, Cussac D, Pellegrini I, Audinot V, Jaquet P, Enjalbert A. D2 dopaminergic receptors: normal and abnormal transduction mechanisms. *Horm Res.* 1992;38(1-2):78-83.
12. Calarge CA, Ellingrod VL, Acion L, Miller DD, Moline J, Tansey MJ, et al. Variants of the dopamine D2 receptor gene and risperidone-induced hyperprolactinemia in children and adolescents. *Pharmacogenet Genomics.* 2009 May;19(5):373-82.
13. Mihara K, Suzuki A, Kondo T, Yasui-Furukori N, Ono S, Otani K, et al. Relationship between Taq1 A dopamine D2 receptor (DRD2) polymorphism and prolactin response to bromperidol. *Am J Med Genet.* 2001 Apr 8;105(3):271-4.
14. Hansen KA, Zhang Y, Colver R, Tho SP, Plouffe L, Jr., McDonough PG. The dopamine receptor D2 genotype is associated with hyperprolactinemia. *Fertil Steril.* 2005 Sep;84(3):711-8.
15. Houston J, Dharia S, Bishop JR, Ellingrod VL, Fijal B, Jacobson JG, et al. Association of DRD2 and ANKK1 polymorphisms with prolactin increase in olanzapine-treated women. *Psychiatry Res.* 2011 May 15;187(1-2):74-9.
16. Murphy G, Cross AJ, Sansbury LS, Bergen A, Laiyemo AO, Albert PS, et al. Dopamine D2 receptor polymorphisms and adenoma recurrence in the Polyp Prevention Trial. *Int J Cancer.* 2009 May 1;124(9):2148-51.
17. Filopanti M, Barbieri AM, Angioni AR, Colao A, Gasco V, Grottoli S, et al. Dopamine D2 receptor gene polymorphisms and response to cabergoline therapy in

patients with prolactin-secreting pituitary adenomas. *Pharmacogenomics J.* 2008 Oct;8(5):357-63.

18. Qiu X, Sun X, Christow A, Stabi B, Gemzell-Danielsson K. The effect of mifepristone on the expression of insulin-like growth factor binding protein-1, prolactin and progesterone receptor mRNA and protein during the implantation phase in human endometrium. *Mol Hum Reprod.* 2002 Nov;8(11):998-1004.

19. Li J. [Research advances in the relationship between prolactin and spontaneous abortion]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* 2012 Jan;10(1):7-12.

20. Acien P, Lloret M, Graells M. Prolactin and its response to the luteinizing hormone-releasing hormone thyrotropin-releasing hormone test in patients with endometriosis before, during, and after treatment with danazol. *Fertil Steril.* 1989 May;51(5):774-80.

21. Gregoriou G, Bakas P, Vitoratos N, Papadias K, Goumas K, Chryssicopoulos A, et al. Evaluation of serum prolactin levels in patients with endometriosis and infertility. *Gynecol Obstet Invest.* 1999;48(1):48-51.

22. He YE. [Prolactin secretion in patients with endometriosis and its relationship to luteal phase defect and infertility]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 1993 Jan;28(1):14-7, 59.

23. Lima AP, Moura MD, Rosa e Silva AA. Prolactin and cortisol levels in women with endometriosis. *Braz J Med Biol Res.* 2006 Aug;39(8):1121-7.

24. 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.

25. Von Rokitansky C. Ueber uterusdrusen-neubildung in uterus and ovarilsarcomen. *Z Ges Aerzte Wein.* 1860(37):577.

26. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927(14):442.

27. Robboy SJ, Bean SM. Pathogenesis of endometriosis. *Reprod Biomed Online.* 2010 Jul;21(1):4-5.

28. Bancroft K, Vaughan Williams CA, Elstein M. Minimal/mild endometriosis and infertility. A review. *Br J Obstet Gynaecol.* 1989 Apr;96(4):454-60.

29. Arruda MS, Petta CA, Abrao MS, Benetti-Pinto CL. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. *Hum Reprod.* 2003 Apr;18(4):756-9.

30. Hadfield R, Mardon H, Barlow D, Kennedy S. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. *Hum Reprod.* 1996 Apr;11(4):878-80.

31. Muse K. Clinical manifestations and classification of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol.* 1988 Dec;31(4):813-22.

32. Muse KN, Wilson EA. How does mild endometriosis cause infertility? *Fertil Steril.* 1982 Aug;38(2):145-52.

33. Kistner RW. Management of endometriosis in the infertile patient. *Fertil Steril.* 1975 Dec;26(12):1151-66.

34. Cahill DJ, Wardle PG, Maile LA, Harlow CR, Hull MG. Pituitary-ovarian dysfunction as a cause for endometriosis-associated and unexplained infertility. *Hum Reprod.* 1995 Dec;10(12):3142-46.

35. ASMR. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril.* 1997 May;67(5):817-21.

36. Roberts CP, Rock JA. The current staging system for endometriosis: does it help? *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2003 Mar;30(1):115-32.
37. Coccia ME, Rizzello F. Ultrasonographic staging: a new staging system for deep endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Mar;1221:61-9.
38. Anaf V, Chapron C, El Nakadi I, De Moor V, Simonart T, Noel JC. Pain, mast cells, and nerves in peritoneal, ovarian, and deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril.* 2006 Nov;86(5):1336-43.
39. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod.* 2005 Oct;20(10):2698-704.
40. Dmowski WP, Rao R, Scommegna A. The luteinized unruptured follicle syndrome and endometriosis. *Fertil Steril.* 1980 Jan;33(1):30-4.
41. Mio Y, Toda T, Harada T, Terakawa N. Luteinized unruptured follicle in the early stages of endometriosis as a cause of unexplained infertility. *Am J Obstet Gynecol.* 1992 Jul;167(1):271-3.
42. Haney AF. Endometriosis-associated infertility. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1993 Dec;7(4):791-812.
43. Soules MR, Makinak LR, Bury R, Poindexter A. Endometriosis and anovulation: a coexisting problem in the infertile female. *Am J Obstet Gynecol.* 1976 Jun 1;125(3):412-7.
44. Moon CE, Bertero MC, Curry TE, London SN, Muse KN, Sharpe KL, et al. The presence of luteinized unruptured follicle syndrome and altered folliculogenesis in rats with surgically induced endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1993 Sep;169(3):676-82.
45. Pittaway DE, Maxson W, Daniell J, Herbert C, Wentz AC. Luteal phase defects in infertility patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 1983 May;39(5):712-3.
46. Ayers JW, Birenbaum DL, Menon KM. Luteal phase dysfunction in endometriosis: elevated progesterone levels in peripheral and ovarian veins during the follicular phase. *Fertil Steril.* 1987 Jun;47(6):925-9.
47. Drudy L, Lewis SE, Barry-Kinsella C, Harrison RF, Thompson W. The influence of peritoneal fluid from patients with minimal stage or treated endometriosis on sperm motility parameters using computer-assisted semen analysis. *Hum Reprod.* 1994 Dec;9(12):2418-23.
48. Barry-Kinsella C, Sharma SC, Cottell E, Harrison RF. Mid to late luteal phase steroids in minimal stage endometriosis and unexplained infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1994 Apr;54(2):113-8.
49. Reese J, Binart N, Brown N, Ma WG, Paria BC, Das SK, et al. Implantation and decidualization defects in prolactin receptor (PRLR)-deficient mice are mediated by ovarian but not uterine PRLR. *Endocrinology.* 2000 May;141(5):1872-81.
50. Malaguarnera L, Imbesi RM, Scuto A, D'Amico F, Licata F, Messina A, et al. Prolactin increases HO-1 expression and induces VEGF production in human macrophages. *J Cell Biochem.* 2004 Sep 1;93(1):197-206.
51. Delgado-Rosas F, Gomez R, Ferrero H, Gaytan F, Garcia-Velasco J, Simon C, et al. The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis. *Reproduction.* 2011 Nov;142(5):745-55.
52. Novella-Maestre E, Carda C, Noguera I, Ruiz-Sauri A, Garcia-Velasco JA, Simon C, et al. Dopamine agonist administration causes a reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. *Hum Reprod.* 2009 May;24(5):1025-35.
53. Gomez R, Abad A, Delgado F, Tamarit S, Simon C, Pellicer A. Effects of hyperprolactinemia treatment with the dopamine agonist quinagolide on endometriotic

- lesions in patients with endometriosis-associated hyperprolactinemia. *Fertil Steril*. 2011 Mar 1;95(3):882-8 e1.
54. Muse K, Wilson EA, Jawad MJ. Prolactin hyperstimulation in response to thyrotropin-releasing hormone in patients with endometriosis. *Fertil Steril*. 1982 Oct;38(4):419-22.
55. Tietze C. Reproductive span and rate of reproduction among Hutterite women. *Fertil Steril*. 1957 Jan-Feb;8(1):89-97.
56. Padilla SL, Garcia JE. Effect of maternal age and number of in vitro fertilization procedures on pregnancy outcome. *Fertil Steril*. 1989 Aug;52(2):270-3.
57. Scott RT, Toner JP, Muasher SJ, Oehninger S, Robinson S, Rosenwaks Z. Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 1989 Apr;51(4):651-4.
58. Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1995 Nov;64(5):991-4.
59. Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA. Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1998 Jun;69(6):1010-4.
60. Seifer DB, Scott RT, Jr., Bergh PA, Abrogast LK, Friedman CI, Mack CK, et al. Women with declining ovarian reserve may demonstrate a decrease in day 3 serum inhibin B before a rise in day 3 follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril*. 1999 Jul;72(1):63-5.
61. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, et al. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2002 Dec;17(12):3065-71.
62. La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, et al. Anti-Mullerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod*. 2007 Mar;22(3):766-71.
63. La Marca A, Stabile G, Arsenio AC, Volpe A. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod*. 2006 Dec;21(12):3103-7.
64. Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW, te Velde ER, Broekmans FJ. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril*. 2007 Apr;87(4):764-75.
65. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Arsenio AC, et al. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update*. 2010 Mar-Apr;16(2):113-30.
66. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*. 2004 Feb;10(2):77-83.
67. Yoo JH, Cha SH, Park CW, Kim JY, Yang KM, Song IO, et al. Serum anti-Mullerian 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.
68. Campos CS, Vaamonde D, Andreoli C, Martins AC, Genro VK, Souza CA, et al. Follicular-fluid anti-Mullerian hormone concentration is similar in patients with endometriosis compared with non-endometriotic patients. *Reprod Biomed Online*. 2010 Oct;21(4):470-3.

69. Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2002 Jun;77(6):1148-55.
70. Kuivasaari P, Hippelainen M, Anttila M, Heinonen S. Effect of endometriosis on IVF/ICSI outcome: stage III/IV endometriosis worsens cumulative pregnancy and live-born rates. *Hum Reprod*. 2005 Nov;20(11):3130-5.
71. Simon C, Gutierrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarin JJ, Remohi J, et al. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod*. 1994 Apr;9(4):725-9.
72. Garrido N, Navarro J, Garcia-Velasco J, Remoh J, Pellice A, Simon C. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Hum Reprod Update*. 2002 Jan-Feb;8(1):95-103.
73. Ballester M, Oppenheimer A, d'Argent EM, Touboul C, Antoine JM, Coutant C, et al. Nomogram to predict pregnancy rate after ICSI-IVF cycle in patients with endometriosis. *Hum Reprod*. 2012 Feb;27(2):451-6.
74. Katsoff B, Check JH, Davies E, Wilson C. Evaluation of the effect of endometriosis on oocyte quality and endometrial environment by comparison of donor and recipient outcomes following embryo transfer in a shared oocyte program. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2006;33(4):201-2.
75. Demiroglu A, Guven S, Baykal C, Gurgan T. Effect of endometrioma cystectomy on IVF outcome: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2006 May;12(5):639-43.
76. Somigliana E, Vercellini P, Vigano P, Ragni G, Crosignani PG. Should endometriomas be treated before IVF-ICSI cycles? *Hum Reprod Update*. 2006 Jan-Feb;12(1):57-64.
77. Streuli I, de Ziegler D, Gayet V, Santulli P, Bijaoui G, de Mouzon J, et al. In women with endometriosis anti-Mullerian hormone levels are decreased only in those with previous endometrioma surgery. *Hum Reprod*. 2012 Nov;27(11):3294-303.
78. Celik HG, Dogan E, Okyay E, Ulukus C, Saatli B, Uysal S, et al. Effect of laparoscopic excision of endometriomas on ovarian reserve: serial changes in the serum antimullerian hormone levels. *Fertil Steril*. 2012 Jun;97(6):1472-8.
79. Lee DY, Young Kim N, Jae Kim M, Yoon BK, Choi D. Effects of laparoscopic surgery on serum anti-Mullerian hormone levels in reproductive-aged women with endometrioma. *Gynecol Endocrinol*. 2011 Oct;27(10):733-6.
80. Tempfer CB, Simoni M, Destenaves B, Fauser BC. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part II--endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2009 Jan-Feb;15(1):97-118.
81. Hsieh YY, Wang YK, Chang CC, Lin CS. Estrogen receptor alpha-351 XbaI*G and -397 PvuII*C-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibilities of endometriosis and leiomyoma. *Mol Hum Reprod*. 2007 Feb;13(2):117-22.
82. Xie J, Wang S, He B, Pan Y, Li Y, Zeng Q, et al. Association of estrogen receptor alpha and interleukin-10 gene polymorphisms with endometriosis in a Chinese population. *Fertil Steril*. 2009 Jul;92(1):54-60.
83. Georgiou I, Syrrou M, Bouba I, Dalkalitsis N, Paschopoulos M, Navrozoglou I, et al. Association of estrogen receptor gene polymorphisms with endometriosis. *Fertil Steril*. 1999 Jul;72(1):164-6.
84. Lattuada D, Somigliana E, Vigano P, Candiani M, Pardi G, Di Blasio AM. Genetics of endometriosis: a role for the progesterone receptor gene polymorphism PROGINS? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004 Aug;61(2):190-4.

85. De Carvalho CV, Nogueira-De-Souza NC, Costa AM, Baracat EC, Girao MJ, D'Amora P, et al. Genetic polymorphisms of cytochrome P450c17alpha (CYP17) and progesterone receptor genes (PROGINS) in the assessment of endometriosis risk. *Gynecol Endocrinol*. 2007 Jan;23(1):29-33.
86. Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Peng CT, Yeh LS, Lin CC. Polymorphism for transforming growth factor beta 1-509 (TGF-B1-509): association with endometriosis. *Biochem Genet*. 2005 Jun;43(5-6):203-10.
87. Chun S, Kim H, Ku SY, Suh CS, Kim SH, Kim JG. The association between endometriosis and polymorphisms in the interleukin-1 family genes in Korean women. *Am J Reprod Immunol*. 2012 Aug;68(2):154-63.
88. Wen J, Deng L, Zhang XM. [Research on relationship between gene polymorphisms of interleukin-1 family and endometriosis]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2006 Nov;35(6):653-7.
89. Paskulin DD, Cunha-Filho JS, Souza CA, Bortolini MC, Hainaut P, Ashton-Prolla P. TP53 PIN3 and PEX4 polymorphisms and infertility associated with endometriosis or with post-in vitro fertilization implantation failure. *Cell Death Dis*. 2012;3:e392.
90. Schmitz C, Cunha Filho, JS Estudo dos polimorfismos do gene do hormônio luteinizante (LH) em mulheres com endometriose e infertilidade - análise da prevalência gênica. Dissertação. 2011.
91. Rodini GP, Cunha-Filho, JS. Análise da prevalência dos polimorfismos N680S e T307A do gene que sintetiza o receptor do hormônio folículo estimulante (FSH) em mulheres com endometriose e infertilidade. 2010.
92. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2008 Jun;89(6):1603.
93. Salat-Baroux J. [Recurrent spontaneous abortions]. *Reprod Nutr Dev*. 1988;28(6B):1555-68.
94. Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF, Williamson E, Wood PJ. Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril*. 1982 Oct;38(4):447-53.
95. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med*. 1988 Jul 28;319(4):189-94.
96. Abramson J, Stagnaro-Green A. Thyroid antibodies and fetal loss: an evolving story. *Thyroid*. 2001 Jan;11(1):57-63.
97. Acien P, Acien M, Sanchez-Ferrer M. Complex malformations of the female genital tract. New types and revision of classification. *Hum Reprod*. 2004 Oct;19(10):2377-84.
98. Proctor JA, Haney AF. Recurrent first trimester pregnancy loss is associated with uterine septum but not with bicornuate uterus. *Fertil Steril*. 2003 Nov;80(5):1212-5.
99. Simpson JL. Causes of fetal wastage. *Clin Obstet Gynecol*. 2007 Mar;50(1):10-30.
100. Pabuccu R, Atay V, Orhon E, Urman B, Ergun A. Hysteroscopic treatment of intrauterine adhesions is safe and effective in the restoration of normal menstruation and fertility. *Fertil Steril*. 1997 Dec;68(6):1141-3.
101. Reindollar RH. Contemporary issues for spontaneous abortion. Does recurrent abortion exist? *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2000 Sep;27(3):541-54.
102. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod*. 2002 Feb;17(2):446-51.

103. Sierra S, Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 2006 Feb;24(1):17-24.
104. Daya S, Ward S, Burrows E. Progesterone profiles in luteal phase defect cycles and outcome of progesterone treatment in patients with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol.* 1988 Feb;158(2):225-32.
105. Greene MF, Hare JW, Cloherty JP, Benacerraf BR, Soeldner JS. First-trimester hemoglobin A1 and risk for major malformation and spontaneous abortion in diabetic pregnancy. *Teratology.* 1989 Mar;39(3):225-31.
106. Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage--a reappraisal. *Hum Reprod.* 2000 Mar;15(3):612-5.
107. Anselmo J, Cao D, Karrison T, Weiss RE, Refetoff S. Fetal loss associated with excess thyroid hormone exposure. *JAMA.* 2004 Aug 11;292(6):691-5.
108. Bellver J, Soares SR, Alvarez C, Munoz E, Ramirez A, Rubio C, et al. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod.* 2008 Feb;23(2):278-84.
109. Hirahara F, Andoh N, Sawai K, Hirabuki T, Uemura T, Minaguchi H. Hyperprolactinemic recurrent miscarriage and results of randomized bromocriptine treatment trials. *Fertil Steril.* 1998 Aug;70(2):246-52.
110. Ando N, Gorai I, Hirabuki T, Onose R, Hirahara F, Minaguchi H. [Prolactin disorders in patients with habitual abortion]. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 1992 Jun;44(6):650-6.
111. Praprotnik S, Agmon-Levin N, Porat-Katz BS, Blank M, Meroni PL, Cervera R, et al. Prolactin's role in the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2010 Nov;19(13):1515-9.
112. Jones RL, Critchley HO, Brooks J, Jabbour HN, McNeilly AS. Localization and temporal expression of prolactin receptor in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Jan;83(1):258-62.
113. Vlahos NP, Bugg EM, Shamblott MJ, Phelps JY, Gearhart JD, Zacur HA. Prolactin receptor gene expression and immunolocalization of the prolactin receptor in human luteinized granulosa cells. *Mol Hum Reprod.* 2001 Nov;7(11):1033-8.
114. Brosens JJ, Hayashi N, White JO. Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology.* 1999 Oct;140(10):4809-20.
115. Tseng L, Mazella J. Prolactin and its receptor in human endometrium. *Semin Reprod Endocrinol.* 1999;17(1):23-7.
116. Garzia E, Borgato S, Cozzi V, Doi P, Bulfamante G, Persani L, et al. Lack of expression of endometrial prolactin in early implantation failure: a pilot study. *Hum Reprod.* 2004 Aug;19(8):1911-6.
117. Jabbour HN, Critchley HO, Boddy SC. Expression of functional prolactin receptors in nonpregnant human endometrium: janus kinase-2, signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1), and STAT5 proteins are phosphorylated after stimulation with prolactin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Jul;83(7):2545-53.
118. Daher S, Mattar R, Gueuvoghlian-Silva BY, Torloni MR. Genetic polymorphisms and recurrent spontaneous abortions: an overview of current knowledge. *Am J Reprod Immunol.* 2012 Apr;67(4):341-7.
119. Schweikert A, Rau T, Berkholz A, Allera A, Daufeldt S, Wildt L. Association of progesterone receptor polymorphism with recurrent abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004 Mar 15;113(1):67-72.

120. Su MT, Lee IW, Chen YC, Kuo PL. Association of progesterone receptor polymorphism with idiopathic recurrent pregnancy loss in Taiwanese Han population. *J Assist Reprod Genet.* 2011 Mar;28(3):239-43.
121. Traina E, Daher S, Moron AF, Sun SY, Franchim CS, Mattar R. Polymorphisms in VEGF, progesterone receptor and IL-1 receptor genes in women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol.* 2011 Jan;88(1):53-7.
122. Su MT, Lin SH, Chen YC. Association of sex hormone receptor gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2011 Dec;96(6):1435-44 e1.
123. Alessio AM, Siqueira LH, de Carvalho EC, Barini R, Mansur Ade P, Hoehr NF, et al. Estrogen receptor alpha and beta gene polymorphisms are not risk factors for recurrent miscarriage in a Brazilian population. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2008 Apr;14(2):180-5.
124. Hanna CW, Bretherick KL, Liu CC, Stephenson MD, Robinson WP. Genetic variation within the hypothalamus-pituitary-ovarian axis in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2010 Oct;25(10):2664-71.
125. Choi YK, Kwak-Kim J. Cytokine gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions: a comprehensive review. *Am J Reprod Immunol.* 2008 Aug;60(2):91-110.
126. Su MT, Lin SH, Lee IW, Chen YC, Kuo PL. Association of polymorphisms/haplotypes of the genes encoding vascular endothelial growth factor and its KDR receptor with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.* 2011 Apr;26(4):758-64.
127. Coulam CB, Jeyendran RS. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 2008 Apr;59(4):301-5.
128. Imura H. *The Pituitary gland.* New York: Raven Press; 1985.
129. Tyson JE, Hwang P, Guyda H, Friesen HG. Studies of prolactin secretion in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1972 May 1;113(1):14-20.
130. Karasek M, Pawlikowski M, Lewinski A. [Hyperprolactinemia: causes, diagnosis, and treatment]. *Endokrynol Pol.* 2006 Nov-Dec;57(6):656-62.
131. Martinez LB, Leyva MZ, Romero IC. Prolactin receptor in human endometriotic tissues. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002 Jan;81(1):5-10.
132. McNatty KP, Sawers RS, McNeilly AS. A possible role for prolactin in control of steroid secretion by the human Graafian follicle. *Nature.* 1974 Aug 23;250(5468):653-5.
133. Wang H, Gorpudolo N, Behr B. The role of prolactin- and endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Surv.* 2009 Aug;64(8):542-7.
134. Mingyuan L, Yu X, Liying X, Hong L, Zhonghua J, Jiawan M, et al. Preparation of anti-idiotypic antibodies specific for anti-HEL and analysis of their functional mimicry. *Chin Med Sci J.* 2000 Jun;15(2):124-6.
135. Nomoto M, Jenner P, Marsden CD. The dopamine D2 agonist LY 141865, but not the D1 agonist SKF 38393, reverses parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the common marmoset. *Neurosci Lett.* 1985 Jun 4;57(1):37-41.
136. Seeman P, Van Tol HH. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 1994 Jul;15(7):264-70.
137. Shastry BS. Therapeutic options for Parkinson's disease. *Drugs Today (Barc).* 2002 Jun;38(6):445-51.

138. Nilsson C, Eriksson E. Partial dopamine D2 receptor agonists antagonize prolactin-regulating D2 receptors in a transfected clonal cell line (GH4ZR7). *Eur J Pharmacol.* 1992 Aug 6;218(2-3):205-11.
139. Watts RL. The role of dopamine agonists in early Parkinson's disease. *Neurology.* 1997 Jul;49(1 Suppl 1):S34-48.
140. Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, et al. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med.* 2001 May;7(5):569-74.
141. Shastry BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet.* 2002;47(11):561-6.
142. Gromoll J, Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab.* 2005 Oct;16(8):368-73.
143. Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni M, Makam H, et al. The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP. *Am J Hum Genet.* 1989 Nov;45(5):778-85.
144. Selbie LA, Hayes G, Shine J. The major dopamine D2 receptor: molecular analysis of the human D2A subtype. *DNA.* 1989 Nov;8(9):683-9.
145. Itokawa M, Arinami T, Toru M. Advanced research on dopamine signaling to develop drugs for the treatment of mental disorders: Ser311Cys polymorphisms of the dopamine D2-receptor gene and schizophrenia. *J Pharmacol Sci.* 2010;114(1):1-5.
146. Wang Y, Liu X, Yu Y, Han Y, Wei J, Collier D, et al. The role of single nucleotide polymorphism of D(2) dopamine receptor gene on major depressive disorder and response to antidepressant treatment. *Psychiatry Res.* 2012 Jul 13.
147. Wong AH, Buckle CE, Van Tol HH. Polymorphisms in dopamine receptors: what do they tell us? *Eur J Pharmacol.* 2000 Dec 27;410(2-3):183-203.
148. Legro RS, Dietz GW, Comings DE, Lobo RA, Kovacs BW. Association of dopamine D2 receptor gene haplotypes with anovulation and fecundity in female Hispanics. *Hum Reprod.* 1994 Jul;9(7):1271-5.
149. Novella-Maestre E, Carda C, Ruiz-Sauri A, Garcia-Velasco JA, Simon C, Pellicer A. Identification and quantification of dopamine receptor 2 in human eutopic and ectopic endometrium: a novel molecular target for endometriosis therapy. *Biol Reprod.* 2010 Nov;83(5):866-73.
150. Laschke MW, Menger MD. Anti-angiogenic treatment strategies for the therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update.* 2012 Jun 19.
151. Soares SR, Martinez-Varea A, Hidalgo-Mora JJ, Pellicer A. Pharmacologic therapies in endometriosis: a systematic review. *Fertil Steril.* 2012 Sep;98(3):529-55.
152. Legro RS, Muhleman DR, Comings DE, Lobo RA, Kovacs BW. A dopamine D3 receptor genotype is associated with hyperandrogenic chronic anovulation and resistant to ovulation induction with clomiphene citrate in female Hispanics. *Fertil Steril.* 1995 Apr;63(4):779-84.
153. Kahsar-Miller M, Boots LR, Azziz R. Dopamine D3 receptor polymorphism is not associated with the polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 1999 Mar;71(3):436-8.

8. ARTIGO 1: The dopamine receptor D2 genotype (3438) is associated with moderate/severe endometriosis in infertile women in Brazil

Aceito no periódico Fertility and Sterility

RUNNING TITLE

The dopamine receptor D2 genotype and endometriosis.

TITLE PAGE

The dopamine receptor D2 genotype (3438) is associated with moderate/severe endometriosis in infertile women in Brazil

João Paulo Bilibio^{1,3}, MSc.; Ursula Matte², PhD; Emily de Conto^{1,2}; Vanessa Krebs Genro¹, PhD; Carlos Augusto Souza¹, PhD; João Sabino Cunha-Filho¹, PhD

¹ *Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.*

² *Terapia Gênica Research Unit. Research Centre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.*

³ *Pharmacy Graduate Student, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.*

³Corresponding author: J.P. Bilibio:

Department of Obstetrics and Gynaecology of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital das Clínicas de Porto Alegre, 11º Andar, Sala 1124, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

E-mail: joaopaolobilibio@yahoo.com.br Tel. +55-51-3223-8308; FAX: +55-55-3322-4455

None of the authors have a conflict of interest related to this work.

We are grateful for the financial support provided by the Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

CAPSULE

The frequency of the DRD2 polymorphism 2 was increased in subjects with peritoneal moderate/severe endometriosis.

STRUCTURED ABSTRACT AND KEY WORDS

Objective: To compare the prevalence of dopamine receptor D2 polymorphisms in patients with peritoneal endometriosis and in healthy controls.

Design: Case-control study.

Setting: University hospital.

Patients: One hundred and seven women aged ≥ 18 years who were enrolled when seeking care for infertility caused by peritoneal endometriosis or for tubal ligation.

Interventions: We performed DNA extraction of peripheral blood, followed by polymerase chain reaction to confirm single-strand polymorphisms and to sequence two polymorphisms.

Main Outcome Measures: We sequenced two polymorphisms in exon 7 of the dopamine receptor D2 (DRD2) gene. Polymorphism 1 occurs in nucleotide 3420 (cytosine to thymine, 313 histidine), and polymorphism 2 occurs in nucleotide 3438 (cytosine to thymine, 319 proline).

Results: The frequency of the DRD2 polymorphism 2 was increased in subjects with peritoneal moderate/severe endometriosis. Analysis of the DRD2 genotypes demonstrates an odds ratio of 2.98 (1.47-6.04; 95% CI) for polymorphism 2 in peritoneal moderate/severe endometriosis.

Conclusions: Our results revealed that an excess of DRD2 polymorphism 2 was found in exon 7 in women with peritoneal moderate/severe endometriosis. The presence of polymorphism 2 could cause a defect in a post-receptor signalling mechanism, resulting in a mild increase in serum prolactin levels. Thus, the potential angiogenic role of prolactin may play a role in the implantation of ectopic endometriosis tissue.

Key words: Endometriosis; prolactin; dopamine receptor D2; polymorphism; infertility

MANUSCRIPT

Introduction

Endometriosis has been associated with a mild increase in prolactin levels (1-5). The reasons why patients with endometriosis have a mild hyperprolactinaemia remain uncertain; however, one of the mechanisms whereby prolactin could contribute to the pathogenesis of endometriosis is through its powerful induction of angiogenesis (6) by prolactin that may induce or maintain endometriotic lesions (7).

Pituitary prolactin secretion is regulated by endocrine neurons in the hypothalamus. The most important neurons in this process are the neurosecretory tuberoinfundibulum neurons of the arcuate nucleus, which secrete dopamine to act on the dopamine D2 receptors of lactotrophs, inhibiting prolactin secretion. There are two subfamilies of dopamine receptors, D1 and D2, which have differential effects on adenylyl cyclase. The dopamine D1 receptors (DRD1) stimulate adenylyl cyclase activity, whereas D2 receptors (DRD2) decrease adenylyl cyclase. In the adenohypophysis, the predominant dopamine receptor is the D2 receptor (8-9). Thus, the activation of the DRD2 gene results in a decrease in intracellular cAMP and inhibits prolactin secretion (10).

Any factor that disrupts the delivery of dopamine to the anterior pituitary and subsequently disturbs signal transduction may result in hyperprolactinaemia (8). For example, patients with prolactinomas that are resistant to dopamine have a decrease in DRD2 density on the lactotroph cell surface (11). In addition, variants of the DRD2 gene seem to influence the propensity for antipsychotic-induced hyperprolactinaemia (12-13). DRD2 is a G-protein coupled receptor with two alternate protein isoforms, and

one isoform contains 29 extra amino acids. These additional amino acids are present in the third intracytoplasmic loop, where the receptor interacts with G proteins (14). The two DRD2 isoforms might interact with different G proteins and thereby initiate distinct intracellular signals (15). Altered distribution of these isoforms may alter signal transduction and could result in decreased signal transduction, which could be caused by the presence of a polymorphism in the receptor and the subsequent increase in prolactin (10, 16).

Based on this association between hyperprolactinaemia and endometriosis, we have decided to evaluate two DRD2 polymorphisms that are associated with hyperprolactinaemia (16) to determine the frequency of these polymorphisms in infertile women with endometriosis and to compare the results with those of healthy patients (controls).

Materials and methods

Design

A case-control study was performed on 107 women aged ≥ 18 years seeking tubal ligation or treatment for infertility at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Subjects

Fifty-eight patients who underwent laparoscopy due to infertility and who presented with biopsy-confirmed peritoneal implants and met the criteria for minimal/mild (N=32) or moderate/severe (N=26) endometriosis according to the classification proposed by the American Society for Reproductive Medicine (17) were enrolled. Infertility was defined as the inability to achieve pregnancy after one year of

regular unprotected sexual intercourse (17). The control group consisted of 49 fertile patients who underwent laparoscopy for tubal ligation and were endometriosis-free. The same surgical staff performed all endoscopic procedures.

Exclusion criteria included the following: autoimmune disease, coexistence of other causes of infertility, deep or ovarian endometriosis, having used any hormonal medication in the 3 months before surgery, and clinical evidence of hypogonadism, amenorrhea or irregular cycles. Other causes of infertility were excluded by hysterosalpingography, semen analysis and measurements of serum follicle-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone levels on the third day of the menstrual cycle. Laparoscopy was performed during the first phase of the menstrual cycle in all patients.

Ethical approval

All participants signed an informed consent form. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Institutional Review Board equivalent).

Detection of polymorphisms in the DRD2 gene

Blood samples were collected in EDTA tubes through venepuncture, and DNA was extracted with a commercial kit (Easy DNA, Invitrogen, Paisley, UK). Exon 7 of the DRD2 gene was amplified as described by Hansen et al. (16) using the following primers: Forward (5' ATGGGTGGCTGATGCCTGGG 3') and Reverse (5' GGTCTTTGGCATGCCATTCT 3'). In brief, amplification was performed in a Veriti thermal cycler (Life Technologies) at an annealing temperature of 62°C, using 20 pmol of each primer, 0.5 U Taq DNA Polymerase, 2 mM dNTP and 1.5 mM MgCl₂ (all reagents from Invitrogen, Paisley, UK). Amplification was confirmed by the presence of a band on a 1.5% agarose gel.

PCR products were purified with Exo-Sap-IT (GE Healthcare) and subjected to automated sequencing in an ABI 3100 (Life Technologies) using BigDye Terminator v.3.0 (Life Technologies, California, USA). For sequencing, 4 μ l of purified PCR product, corresponding to 30-50 ng as estimated by visual inspection with a Low Mass Ladder (Invitrogen, Paisley, UK), were used with 3.2 pmol of the forward primer. The results were compared with the reference sequence from GenBank (NCBI) found under the accession number NM_000795.3.

Statistics

The necessary sample size in each group was calculated prior to the study based on the prevalence of the DRD2 polymorphism in healthy patients and in patients with hyperprolactinaemia (16). As we previously reported, approximately 30% of women with endometriosis have hyperprolactinaemia (1). Furthermore, we estimated that the largest difference in the prevalence of the DRD2 polymorphism between endometriosis and control groups should be 10%. This calculation was performed using the WinPepi statistical package 10.0 to attain a study power of 80% and a confidence interval of 95% (18).

The computation of sample sizes uses formula 22 in Sahai and Khurshid (19). The approximate *expected length of the confidence interval* L^* is computed by the following formula, which is an adaptation of the formula provided by Bristol (20): $L^* = 2z\sqrt{[Pa(1 - Pa) / Na + Pb(1 - Pb) / Nb] + 1 / Na + 1 / Nb}$ (where: z = is the normal standard deviation for the $alpha/2$ level of significance; Pa and Pb = the postulated proportions in groups A and B; and Na and Nb = the required sizes of samples A and B).

Data with a normal distribution, as determined by one-way analyses of variance (ANOVA), were used to compare means. If a significant overall difference was found,

the post-hoc Bonferroni test was used for multiple comparisons. The Kruskal-Wallis test was used for non-parametric data.

Statistical analyses to determine the association between the polymorphisms were performed using the Chi-Square test and the Monte Carlo method of performing multiple simulations assuming that the null hypothesis is correct with fixed marginal values. The marginal values were determined from experimental data. This method determines an empirical P value for the observed data. Observed numbers for each genotype were compared with expected values to test whether the sample was in the Hardy-Weinberg equilibrium using the Chi-Square test with one degree of freedom.

Statistical significance was set at $P < 0.05$. The statistical tests were performed with the Statistical Package for the Social Sciences 16 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

Demographic data are presented in TABLE 1. The mean ages and weights were similar among the three groups. As expected, the mean number of pregnancies were higher in the control group. In contrast, the mean prolactin and median CA-125 levels were higher in both endometriosis groups.

The polymorphisms in the dopamine receptor D2 (DRD2) gene are shown in TABLE 2. Testing for the Hardy-Weinberg equilibrium using the Chi-Square test demonstrated a $P=0.50$ for polymorphism 1 and $P=0.63$ for polymorphism 2.

The genotype and allele frequencies for DRD2 polymorphism 1 and polymorphism 2 are presented in TABLE 3. Analysis of the DRD2 genotypes demonstrates an odds ratio of 2.98 (1.47- 6.04; 95% confidence interval) for polymorphism 2 in peritoneal moderate/severe endometriosis.

Moreover, to ensure that our results were not due to chance, we recalculated the power of our sample based on our results and found the study to be adequately powered (power: 90.94%).

Discussion

Our results indicated an excess of the DRD2 polymorphism 2 in exon 7 in women with peritoneal moderate/severe endometriosis. To the best of our knowledge, our data demonstrate for the first time that a molecular defect in the DRD2 gene or in its secondary messengers that ultimately releases lactotrophs from tonic inhibition is an attractive hypothesis to explain the development of hyperprolactinaemia in women with endometriosis.

We evaluated whether dopamine receptor D2 polymorphisms 3420 and 3438 are associated with endometriosis because previous authors suggested that these variants of the DRD2 genotype might contribute to hyperprolactinaemia (12, 16) and because patients with endometriosis have mild hyperprolactinaemia (1-5). Other studies have shown that polymorphisms have been associated with endometriosis (21-23); however, none of these studies evaluated the dopamine receptors.”

DRD2 encodes the D2 subtype of the dopamine receptor. This G-protein coupled receptor inhibits adenylyl cyclase activity (8-9). The DRD2 polymorphisms have been associated with diseases including schizophrenia (24), hyperprolactinaemia (10, 16, 25) and major depressive disorder (26-27). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most common polymorphisms in the human genome, and the majority of these are silent. Silent SNPs may be associated with a disease or may cause a subtle molecular alteration in phenotype (28).

Based upon this finding, there are two potential explanations for the presence of the DRD2 polymorphism in patients with endometriosis. First, we know that prolactin is an angiogenic inducer (29), and we also know that there is mild hyperprolactinaemia in patients with endometriosis. The polymorphism of the dopamine receptor could decrease inhibition of prolactin production, ultimately resulting in the elevation of prolactin levels. This increase could facilitate the development of endometriosis due to its angiogenic effect, which may also act on the prolactin receptor in endometrial tissue (30). Thus, the mechanism by which occurred reduction of endometriosis after use of dopamine agonists (7, 31-32) could be through its action the inhibition of prolactin secretion and consequent reduction of its angiogenic action.

Another possibility is a direct effect on eutopic endometrium and endometriotic lesions because it has been demonstrated that both tissues express DRD2 receptors (33). We know that the neurotransmitter dopamine selectively inhibits the vascular permeabilizing and angiogenic activity of VEGF at non-toxic levels, revealing a new link between the nervous system and angiogenesis (34). This led to the idea to use dopamine agonists for anti-angiogenic therapy (7, 31-32, 35-36). Thus, a polymorphism in the dopamine receptor could facilitate the implantation of endometriosis due to the failure of dopamine to bind to its receptors present in endometrial cells (33) and the failure of the biological response to reduced angiogenesis. Indeed, we can speculate about a biological system in which this retroalimentation occurs. A fact that corroborates this theory is that both in experimentally induced endometriosis (7, 31) and in patients with endometriosis (32), there is a reduction in endometriosis after the administration of a dopamine agonist. Therefore, the administration of high doses of DRD2 agonists could be necessary to restore adequate function to those receptors which do not respond accordingly to dopamine.

These same DRD2 polymorphisms were studied in patients with hyperprolactinaemia; however, the polymorphism that we detected in the dopamine receptor (an excess homozygosity for polymorphism 2) were not the same as those found in patients with hyperprolactinaemia (an excess homozygosity for polymorphism 1), suggesting that the defect in the downstream target may not be the same in both diseases (16). However, this difference does suggest that these polymorphisms may be linked to changes in post-receptor signalling mechanisms, resulting in an altered function of lactotroph or endometrial cells (16, 33).

One possible bias of this study is the fact that SNPs have a very wide variation between different ethnic populations. The polymorphism found in our study suggests a possible pathophysiology for endometriosis by altering intracellular signal transduction mechanisms and neoangiogenesis; however, these polymorphisms do not behave the same way in different populations. Nevertheless, this potential mechanism should be explored further in relation to the treatment of endometriosis with dopamine agonists.

The described polymorphisms might somehow affect the interaction between the DRD2 and dopamine; in this context, the use of a dopamine agonist would not have any relevant effect for these groups of patients (moderate/severe endometriosis). However, the use of high doses of dopamine agonists may cause an increase in the number of receptors (33) that can properly make the post-receptor signalling mechanism work with this compensation, despite the presence of polymorphism. To better clarify the effects of our findings on this group of patients, in particular, to clarify if the described polymorphisms might affect the interaction between the DRD2 and dopamine or if there is some interaction between DRD2 and some related downstream molecules, we need perform a functional study.

Although our results show an increase in DRD2 polymorphisms in patients with moderate-severe endometriosis, we also found higher serum prolactin levels in patients with minimal-mild endometriosis. One explanation for this finding may be that there are other mechanisms associated with this increase. Furthermore, we previously showed that a central prolactin secretion dysfunction exists in patients with endometriosis that does not involve the DRD2 receptor system in patients with mild/minimal endometriosis (37). In fact, we included only mild/minimal endometriosis in the former paper. Therefore, this finding is confirmed here, as we have presented only those patients with moderate/severe endometriosis with a demonstrated association with DRD2 polymorphism. Another possibility is that there are other polymorphisms that have yet to be assessed. Differences in eutopic endometrium between different stages of endometriosis (mild versus severe) suggest that they have different functional capabilities (38). Furthermore, a recent study suggests that deep endometriosis is not a progressive disease (39-40). Thus, we question whether endometriosis is a progressive disease or a syndrome with different clinical and laboratory presentations, and, consequently, a variability of physiological (and genetic) backgrounds.

One of the main challenges in the management of endometriosis is that the disease presents different clinical manifestations with three distinct phenotypes: ovarian, peritoneal and deep (41-42). As a result, to homogenise our sample and to exercise caution in extrapolating data, we selected only infertile patients with peritoneal endometriosis and excluded patients with deep or ovarian endometriosis.

To conclude, we detected an excess of DRD2 polymorphisms in patients with peritoneal moderate/severe endometriosis, and our results may be related to pathophysiology for the potential use of dopamine agonists as an alternative treatment for endometriosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for the financial support provided by the Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

REFERENCES

1. 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; 33: 216-20.
2. Gregoriou G, Bakas P, Vitoratos N, Papadias K, Goumas K, Chryssicopoulos A, et al. Evaluation of serum prolactin levels in patients with endometriosis and infertility. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 48: 48-51.
3. Lima AP, Moura MD, Rosa e Silva AA. Prolactin and cortisol levels in women with endometriosis. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 1121-7.
4. Muse K, Wilson EA, Jawad MJ. Prolactin hyperstimulation in response to thyrotropin-releasing hormone in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1982; 38: 419-22.
5. Wang H, Gorpudolo N, Behr B. The role of prolactin- and endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Surv* 2009; 64: 542-7.
6. Reese J, Binart N, Brown N, Ma WG, Paria BC, Das SK, et al. Implantation and decidualization defects in prolactin receptor (PRLR)-deficient mice are mediated by ovarian but not uterine PRLR. *Endocrinology* 2000; 141: 1872-81.
7. Novella-Maestre E, Carda C, Noguera I, Ruiz-Sauri A, Garcia-Velasco JA, Simon C, et al. Dopamine agonist administration causes a reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. *Hum Reprod* 2009; 24: 1025-35.
8. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998; 78: 189-225.
9. Seeman P, Van Tol HH. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 264-70.
10. Nilsson C, Eriksson E. Partial dopamine D2 receptor agonists antagonize prolactin-regulating D2 receptors in a transfected clonal cell line (GH4ZR7). *Eur J Pharmacol* 1992; 218: 205-11.
11. Caccavelli L, Cussac D, Pellegrini I, Audinot V, Jaquet P, Enjalbert A. D2 dopaminergic receptors: normal and abnormal transduction mechanisms. *Horm Res* 1992; 38: 78-83.
12. Calarge CA, Ellingrod VL, Acion L, Miller DD, Moline J, Tansey MJ, et al. Variants of the dopamine D2 receptor gene and risperidone-induced hyperprolactinemia in children and adolescents. *Pharmacogenet Genomics* 2009; 19: 373-82.
13. Mihara K, Suzuki A, Kondo T, Yasui-Furukori N, Ono S, Otani K, et al. Relationship between Taq1 A dopamine D2 receptor (DRD2) polymorphism and prolactin response to bromperidol. *Am J Med Genet* 2001; 105: 271-4.
14. Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni M, Makam H, et al. The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 778-85.
15. Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC. Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 1989; 342: 923-6.
16. Hansen KA, Zhang Y, Colver R, Tho SP, Plouffe L, Jr., McDonough PG. The dopamine receptor D2 genotype is associated with hyperprolactinemia. *Fertil Steril* 2005; 84: 711-8.
17. ASMR. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67: 817-21.

18. Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov* 2004; 1: 6.
19. Sahai H, Khurshid A. Formulae and tables for the determination of sample sizes and power in clinical trials for testing differences in proportions for the two-sample design: a review. *Stat Med* 1996; 15: 1-21.
20. Bristol DR. Sample sizes for constructing confidence intervals and testing hypotheses. *Stat Med* 1989; 8: 803-11.
21. Near AM, Wu AH, Templeman C, Van Den Berg DJ, Doherty JA, Rossing MA, et al. Progesterone receptor gene polymorphisms and risk of endometriosis: results from an international collaborative effort. *Fertil Steril* 2010; 95: 40-5.
22. Cosin R, Gilabert-Estelles J, Ramon LA, Espana F, Gilabert J, Romeu A, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms (-460C/T, +405G/C, and 936C/T) and endometriosis: their influence on vascular endothelial growth factor expression. *Fertil Steril* 2009; 92: 1214-20.
23. Zhang QY, Guan Q, Wang Y, Feng X, Sun W, Kong FY, et al. BDNF Val66Met polymorphism is associated with Stage III-IV endometriosis and poor in vitro fertilization outcome. *Hum Reprod* 2012; 27: 1668-75.
24. Itokawa M, Arinami T, Toru M. Advanced research on dopamine signaling to develop drugs for the treatment of mental disorders: Ser311Cys polymorphisms of the dopamine D2-receptor gene and schizophrenia. *J Pharmacol Sci* 2010; 114: 1-5.
25. Houston J, Dharia S, Bishop JR, Ellingrod VL, Fijal B, Jacobson JG, et al. Association of DRD2 and ANKK1 polymorphisms with prolactin increase in olanzapine-treated women. *Psychiatry Res* 2011; 187: 74-9.
26. Wang Y, Liu X, Yu Y, Han Y, Wei J, Collier D, et al. The role of single nucleotide polymorphism of D(2) dopamine receptor gene on major depressive disorder and response to antidepressant treatment. *Psychiatry Res* 2012.
27. Wong AH, Buckle CE, Van Tol HH. Polymorphisms in dopamine receptors: what do they tell us? *Eur J Pharmacol* 2000; 410: 183-203.
28. Kreitman M. Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 1983; 304: 412-7.
29. Malaguarnera L, Imbesi RM, Scuto A, D'Amico F, Licata F, Messina A, et al. Prolactin increases HO-1 expression and induces VEGF production in human macrophages. *J Cell Biochem* 2004; 93: 197-206.
30. Jabbour HN, Critchley HO, Boddy SC. Expression of functional prolactin receptors in nonpregnant human endometrium: janus kinase-2, signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1), and STAT5 proteins are phosphorylated after stimulation with prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2545-53.
31. Delgado-Rosas F, Gomez R, Ferrero H, Gaytan F, Garcia-Velasco J, Simon C, et al. The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis. *Reproduction* 2011; 142: 745-55.
32. Gomez R, Abad A, Delgado F, Tamarit S, Simon C, Pellicer A. Effects of hyperprolactinemia treatment with the dopamine agonist quinagolide on endometriotic lesions in patients with endometriosis-associated hyperprolactinemia. *Fertil Steril* 2011; 95: 882-8 e1.
33. Novella-Maestre E, Carda C, Ruiz-Sauri A, Garcia-Velasco JA, Simon C, Pellicer A. Identification and quantification of dopamine receptor 2 in human eutopic and ectopic endometrium: a novel molecular target for endometriosis therapy. *Biol Reprod* 2010; 83: 866-73.

34. Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, et al. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2001; 7: 569-74.
35. Laschke MW, Menger MD. Anti-angiogenic treatment strategies for the therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2012.
36. Soares SR, Martinez-Varea A, Hidalgo-Mora JJ, Pellicer A. Pharmacologic therapies in endometriosis: a systematic review. *Fertil Steril* 2012; 98: 529-55.
37. Cunha-Filho JS, Gross JL, Lemos NA, Dias EC, Vettori D, Souza CA, et al. Prolactin and growth hormone secretion after thyrotrophin-releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis. *Hum Reprod* 2002; 17: 960-5.
38. Aghajanova L, Giudice LC. Molecular evidence for differences in endometrium in severe versus mild endometriosis. *Reprod Sci* 2011; 18: 229-51.
39. Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Wattiez A, Donnez J. Deep endometriosis: definition, diagnosis, and treatment. *Fertil Steril* 2012; 98: 564-71.
40. Fedele L, Bianchi S, Zanconato G, Raffaelli R, Berlanda N. Is rectovaginal endometriosis a progressive disease? *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1539-42.
41. Bazot M, Lafont C, Rouzier R, Roseau G, Thomassin-Naggara I, Darai E. Diagnostic accuracy of physical examination, transvaginal sonography, rectal endoscopic sonography, and magnetic resonance imaging to diagnose deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 2009; 92: 1825-33.
42. Goncalves MO, Podgaec S, Dias JA, Jr., Gonzalez M, Abrao MS. Transvaginal ultrasonography with bowel preparation is able to predict the number of lesions and rectosigmoid layers affected in cases of deep endometriosis, defining surgical strategy. *Hum Reprod* 2010; 25: 665-71.

TABLE 1
Demographic characteristics (mean±SD)

Parameter	Control group N = 49	Minimal/Mild endometriosis N = 32	Moderate/Severe endometriosis N=26	<i>P</i> value ^a	<i>P</i> value ^b
Age (years)	32.9±5.2	32.3±4.5	32.2±4.3	.79	
BMI ^f (kg/m ²)	26.0±4.6	24.0±5.0	24.3±4.1	.01	.02 ^c
Pregnancy (N)	4.02±1.78	0,44±1.31	0.68±1.37	<.01	<.01 ^c <.01 ^d
Weight (Kg)	68.3±14.0	63.0±12.7	65.8±11.3	.20	
Height (m)	1.59±0.06	1.62±0.05	1.63±0.05	<.01	<.01 ^d
CA-125 ^e	14.0±6.8	53.4±121.8	37.7±36.4	<.01 ^e	<.01 ^{ec} <.01 ^{ed}
Prolactin (ng/ml)	8.9±4.1	14.8±5.6	17.4±10.9	<.01	<.01 ^c <.01 ^d

^a ANOVA

^b Post Roc test: Bonferroni

^c Minimal/Mild endometriosis versus control group

^d Moderate/Severe endometriosis versus control group

^e Mann-Whitney test

^f BMI: Body Mass Index

TABLE 2
Polymorphisms in the Dopamine Receptor D2 gene

Polymorphism	Region	Nucleotide Position	Codon Position
1	Exon 7	CACCA(C/T)GGTCT (3420; C ^a to T ^b)	313, Histidine
2	Exon 7	ACTCC(C/T)GACAG (3438; C ^a to T ^b)	319, Proline

^aC: cytosine

^bT: thymine

TABLE 3
Genotype and allele frequencies of DRD2 polymorphisms

DRD2 Polymorphism	Population studied	N	Genotypes			<i>P</i> value ^a	Alleles		OR (95% CI)	<i>P</i> value		
			n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)				
1 (3420; C to T)	Minimal/Mild endometriosis	32	CC 15 (46.9)	CT 12 (37.5)	TT 5 (15.6)	.243	C ^d 42 (65.6)	T ^e 22 (34.4)		.238		
	Moderate/Severe endometriosis	26	13 (50.0)	13 (50.0)	0 (0.0)		39 (75.0)	13 (25.0)				
	Controls	49	20 (40.8)	20 (40.8)	9 (18.4)		60 (61.2)	38 (38.8)				
2 (3438; C to T)	Minimal/Mild endometriosis	32	CC 10 (31.3)	CT 14 (43.8)	TT 8 (25.0)	.048	C ^d 34 (53.1)	T ^e 30.0 (46.9)	2.33 (1.09-4.98)	.027 ^c		
	Moderate/Severe endometriosis	26	2 (7.7)	13 (50.0)	11 (42.3)		17 (32.7)	35 (67.3)			2.98 (1.47-6.04)	.002 ^b
	Controls	49	17 (34.7)	24 (49.0)	8 (16.3)		58 (59.2)	40 (40.8)				

^a Monte Carlo test

^b Moderate/Severe endometriosis versus control group

^c Moderate/Severe endometriosis versus Minimal/Mild endometriosis

^d C: cytosine

^e T: thymine

9. ARTIGO 2: Recurrent Miscarriage is associated to dopamine receptor (DRD2 3438) genotype

Submetido à Human Reproduction

**Recurrent miscarriage is associated with the dopamine receptor
(DRD2 3438) genotype**

Running title: Recurrent miscarriage and dopamine receptor D2 genotype

**J.P. BILIBIO^{1,3,4,*}, U. MATTE^{2,4}, E. DE CONTO^{1,2,4}, V.K. GENRO^{1,4}, C.A.B.
SOUZA^{1,4}, J.S.L. CUNHA-FILHO^{1,4}**

¹ *Department of Obstetrics and Gynaecology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul., Porto Alegre, Brazil.*

² *Terapia Gênica Research Unit. Research Centre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.*

³ *Pharmacy Graduate Student, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.*

³ *Corresponding author: J.P. Bilibio*

⁴ *Department of Obstetrics and Gynaecology of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital das Clínicas de Porto Alegre, 11º Andar, Sala 1124, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

Tel. +55-51-3223-8308; FAX: +55-55-3322-4455

*E-mail: joaopaolobilibio@yahoo.com.br

2. ABSTRACT

Study question: To evaluate patients with recurrent miscarriage for the presence of dopamine receptor D2 (DRD2) polymorphisms.

Summary answer: An excess homozygosity in exon 7 of the DRD2 polymorphism suggests a genetic predisposition to recurrent miscarriages. The presence of the DRD2 polymorphism could cause a defect in a postreceptor signalling mechanism, such as a somatic inactivating mutation in a G1 protein, which could result in a mild serum prolactin increase. Thus, because of the potential role of prolactin in reproductive regulation, this polymorphism could play an important role in early pregnancy implantation and pregnancy maintenance.

What is already known: Normal circulating levels of prolactin may play an important role in maintaining early pregnancy and the DRD2 polymorphism was associated with reproductive outcomes.

Study design, size, duration: Fifty-four women were enrolled in this case control study. They were divided into two groups: recurrent miscarriage and healthy women with two or more successful pregnancies and no abortions.

Participants/materials, setting, methods: We performed the DNA extraction from peripheral blood, followed by a polymerase chain reaction to confirm single-strand polymorphisms and to sequence two polymorphisms in exon 7 of the DRD2 gene. Polymorphism 1 occurs in nucleotide 3420 (cytosine to thymine, 313 Histidine) and polymorphism 2 occurs in nucleotide 3438 (cytosine to thymine, 319 Proline).

Main results and role of chance: The frequency of DRD2 polymorphism 2 was increased in the subjects with recurrent miscarriage. An analysis of the DRD2 genotypes demonstrated an odds ratio of 2.37 (1.05 - 5.36, 95% confidence interval) for

the polymorphism 2 in recurrent miscarriage. The mean of the serum prolactin level was higher in the patients with recurrent miscarriage (12.5 ng/ml) than in healthy women (8.1 ng/ml) $P=0.03$.

Limitations, reasons for caution: A potential bias of the study is the fact that SNPs have a wide variation between different ethnic populations.

Wider implications of the findings: Our results support the need for further functional research into the potential role of the DRD2 receptor in embryo implantation and successful pregnancies.

Study funding/ competing interest(s): We are grateful for the financial support provided by the *Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE)*, *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil. The authors report no conflicts of interest.

3. KEYWORDS

Abortion, recurrent miscarriage, prolactin, dopamine receptor D2, polymorphism

4. INTRODUCTION

Embryo implantation and successful pregnancy involve a series of physiological changes and highly co-ordinated chance interactions in the uterus and ovaries/corpus lutea of women (Egli et al., 2010). Recurrent miscarriage (RM) is one of the most frustrating and difficult areas in reproductive medicine because the aetiology is often unknown and there are few evidence-based diagnostic and treatment strategies.

Approximately 15% of pregnant women experience the sporadic loss of a clinically recognised pregnancy. Just 2% of pregnant women experience two consecutive pregnancy losses (Salat-Baroux, 1988). Although RM is an important problem in women's health, there are many unsolved questions regarding its aetiology, evaluation and management (Cook and Pridham, 1995). The general aetiological categories of RM include anatomic, immunological, genetic, endocrine, infection, thrombophilic and environmental factors (ASMR, 2008; Kallen and Arici, 2003; Lessey, 2011; Paulson, 2011).

Prolactin seems to play an important role in the implantation and subsequent placentation of the human endometrium (Jabbour and Critchley, 2001; Jabbour et al., 1998; Jones et al., 1998) and recurrent spontaneous miscarriage has been associated with abnormal serum prolactin values (Bussen et al., 1999; Hirahara et al., 1998). Moreover, prolactin is recognised as a crucial signal for the initiation and maintenance of decidualisation (Qiu et al., 2002). The activation of the dopamine receptor DDR2 in lactotrophs results in a decrease in intracellular cAMP and inhibits prolactin secretion (Nilsson and Eriksson, 1992). Genetically altered dopamine receptors in lactotrophs

could result in a decreased signal transduction with ensuing hyperprolactinaemia (Hansen et al., 2005; Nilsson and Eriksson, 1992).

The DRD2 polymorphism has been associated with numerous other diseases, such as schizophrenia, bipolar disease, alcoholism, mood disorders, hyperprolactinaemia and Parkinson's disease (Wong et al., 2000). Previous studies have suggested that variants of the DRD2 genotype may contribute to hyperprolactinaemia (Calarge et al., 2009; Hansen et al., 2005) and anovulation and were associated with reproductive success (Legro et al., 1994).

Based upon this association between altered prolactin and abortion, the purpose of this study was to evaluate the frequency of the DRD2 polymorphisms in women with recurrent miscarriages and to compare these results with those of healthy patients.

5. MATERIALS AND METHODS

Design/Patients

A case control study of 54 women who were enrolled at the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Porto Alegre, was performed. Only 51 of the 54 patients were admitted to the study. They were divided into two groups: recurrent miscarriage (RM, n= 20) and controls (C, n= 31).

The RM group was defined by a history of least two spontaneous miscarriages (ASMR, 2008) prior to the 20th week of gestation (ectopic, molar and biochemical pregnancies were not included). The inclusion criteria were as follows: aged between 18 and 35 years with two or more spontaneous miscarriages, normal anatomy of the genital tract as determined by ultrasonography, hysterosalpingography, hysteroscopy and

laparoscopy, a history of regular menstrual cycles ranging from 25 to 32 days, ovulatory cycles determined by serum progesterone in the late secretory phase and normal screening in days 3 - 5 of the cycle for FSH (<10 mIU/ml), LH, 17 β -estradiol, thyroid-stimulating hormone (TSH), serum PRL (<20 ng/mL) and progesterone. The exclusion criteria comprised known miscarriage causes, such as uterine pathologies, chromosomal anomalies and autoimmune diseases. Three women were excluded from the study. One patient from the RM group had previously delivered between abortions; one patient had irregular menstrual cycles and another had an endometrial polyp revealed by hysteroscopy.

The control group comprised 31 fertile patients aged between 18 and 35 years with two or more successful pregnancies and no previous abortions and a history of regular menstrual cycles ranging from 25 to 32 days. All patients in control group underwent laparoscopy for tubal ligation.

Ethical approval

All participants provided informed written consent. The study was approved by the Ethics Committee of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (Institutional Review Board equivalent).

Detection of polymorphisms in DRD2 gene

The blood samples were collected in EDTA tubes through venepuncture and DNA was extracted with a commercial kit (Easy DNA, Invitrogen, Paisley, UK). Exon 7 of the DRD2 gene was amplified as described by Hansen et al. (Hansen et al., 2005) using the following primers: Forward (5' ATGGGTGGCTGATGCCTGGG 3') and Reverse (5' GGTCTTTGGCATGCCCATCT 3'). In brief, amplification was performed in a Veriti thermal cycler (Life Technologies) at an annealing temperature of

62°C, using 20 pmol of each primer, 0.5 U Taq DNA Polymerase, 2 mM dNTP and 1.5 mM MgCl₂ (all reagents from Invitrogen, Paisley, UK). Amplification was confirmed by the presence of a band on a 1.5% agarose gel.

PCR products were purified with Exo-Sap-IT (GE Healthcare) and subjected to automated sequencing in an ABI 3100 (Life Technologies) using BigDye Terminator v.3.0 (Life Technologies, California, USA). For sequencing, 4 µl of purified PCR product, which corresponded to 30-50 ng as estimated by a visual inspection with a Low Mass Ladder (Invitrogen, Paisley, UK), were used with 3.2 pmol of the forward primer. The results were compared with the reference sequence from GenBank (NCBI) that were found under the accession number NM_000795.3.

Statistics

Based on a previous study of these polymorphisms in patients with hyperprolactinaemia (Hansen et al., 2005) and the presence of hyperprolactinaemia in patients with recurrent miscarriage (Perks et al., 2003), the sample size of each group was calculated prior to the study; using WinPepi statistical package 10.0 (Abramson, 2004), we required a minimum of twenty patients per group to attain a study power of 80% and a 95% confidence interval (CI). Data with normal distribution were analysed using Student's t-test for independent samples and Levene's test for equality of variances. Statistical analyses for the association between the polymorphism were performed using Chi-Squared tests and the Monte Carlo method to perform multiple simulations, assuming the null hypothesis was correct with fixed marginal values. The marginal values were determined from experimental data. This method determines an empirical *P* value for the observed data. The observed numbers of each genotype were

compared with those expected to test whether the sample was in Hardy-Weinberg equilibrium using the Chi-Squared test with one degree of freedom.

Statistical significance was set at $P < 0.05$. The statistical tests were performed using the Statistical Package for the Social Sciences 20 (SPSS Inc., Chicago, IL).

6. RESULTS

The demographic data are presented in TABLE I. The mean serum prolactin level was higher in the recurrent miscarriage group.

The polymorphisms in the dopamine receptor D2 (DRD2) gene are presented in TABLE II. The test the Hardy-Weinberg equilibrium using the Chi-Squared test, $P=0.40$ for polymorphism 1 and $P=0.33$ for polymorphism 2.

The genotype and allele frequencies for DRD2 polymorphism 1 and polymorphism 2 are presented in TABLE III. An analysis of the DRD2 genotypes demonstrated an odds ratio of 2.38 (1.05 - 5.35, 95% CI) for the polymorphism 2 in the recurrent miscarriage group.

7. DISCUSSION

Our results revealed an excess homozygosity in exon 7 the of DRD2 polymorphism 2 in women with recurrent miscarriage. An attractive hypothesis for the development of recurrent miscarriage would be a molecular defect in the DDR2 or in its secondary messengers that release the lactotrophs from tonic inhibition causing an

uncontrolled secretion of prolactin and damaging embryo implantation. We also found that the mean serum prolactin level was higher in patients with recurrent miscarriage than healthy women.

Although we have not conducted a functional study of the role of DRD2 polymorphism in patients with RM, we found that these patients have higher serum prolactin levels than healthy patients. This result implies that the presence of the DRD2 polymorphism could cause an uncontrolled secretion of prolactin, which could damage embryo implantation and consequently leads to miscarriage.

The role of prolactin in implantation and subsequent placentation in the human endometrium has been studied by several authors (Li, 2012; Perks et al., 2003; Qiu et al., 2002; Vlahos et al., 2001). Prolactin is recognised as a crucial signal for the initiation and maintenance of decidualisation (Qiu et al., 2002); unusual levels closely relate to spontaneous abortion (Li, 2012). Study has shown that 36.8% of patients with recurrent miscarriages had prolactin disorders (hyperprolactinaemia or occult hyperprolactinaemia). After being treated with a D2-dopamine agonist, these patients had maintained their pregnancies. Prolactin may also contribute to early corpus luteum formation and survival by acting as a potent antiapoptotic factor on the steroidogenesis of human luteal tissue (Perks et al., 2003).

In the non-pregnant human uterus, prolactin receptor (PRL-R) has been localised in the stromal and glandular compartments of the mid- to late secretory phase endometrium (Jones et al., 1998). Some studies have shown that PRL-R in preovulatory granulosa cells may be involved in the coordination between granulosa cells and follicular macrophages in the ovulation process (Vlahos et al., 2001). If pregnancy occurs, then PRL-R expression is maintained and localised to the decidua, chorionic cytotrophoblast, placental trophoblast and amniotic epithelium (Jones et al., 1998).

Moreover, the importance of prolactin and PRL-R in the process of implantation and maintenance of pregnancy can be seen a study that demonstrated that female mice with a homozygous null mutation of the PRL-R were infertile (Ormandy et al., 1997).

Prolactin also influences the immune system, potentiating T-cell growth in response to various stimuli (Athreya et al., 1994). These effects are thought to be mediated by PRL-R, which is present on lymphocytes (Athreya et al., 1994). Thus, prolactin could affect the immunological mechanisms that are involved in menstrual cycle, implantation and early pregnancy (Athreya et al., 1994; Egli et al., 2010; Gubbay et al., 2002).

After it has been demonstrated that the endometrium have DRD2 receptors (Novella-Maestre et al., 2010), another mechanism that could be explored is the direct effect of the DRD2 polymorphism in the endometrium and embryo implantation failure. The neurotransmitter dopamine selectively inhibits the vascular permeability and angiogenic activity of VEGF at non-toxic levels, revealing a link between the nervous system and angiogenesis (Basu et al., 2001). Therefore, the presence of the DRD2 polymorphism in endometrial cells could affect the adequate embryo implantation because of a decrease in intracellular cAMP and the resulting failure of intracellular signalling in these cells and inadequate angiogenic activity (Novella-Maestre et al., 2010).

A potential area of bias is the fact that SNPs have a wide variation between different ethnic populations. We know that the polymorphism that was found in our study may suggest a possible pathophysiology of abortion by altering the intracellular signal transduction mechanisms and neoangiogenesis and prolactin control. However, we also know that the polymorphisms do not behave the same way in different

populations. Nevertheless, this possible mechanism should be explored in the areas of prolactin production and secretion, angiogenesis and miscarriage.

In conclusion, we have described an excess of the DDR2 polymorphism and a mean serum prolactin level that is greater in women with recurrent miscarriages than in healthy women. These results provide an impetus for further functional research into the role of the DRD2 receptor in embryo implantation and the successful establishment of pregnancy.

8. AUTHORS' ROLES

João Paolo Bilibio: This author assisted with the conception, design, data acquisition, and data analysis and interpretation. Additionally, this author critically reviewed the article for important intellectual content. Finally, this author approved the version to be published.

Úrsula Matte: This author assisted with the data acquisition and approved the version to be published.

Emily de Conto: This author assisted with the data acquisition.

Vanessa Genro: This author assisted with the data acquisition and approved the version to be published.

Carlos Augusto Bastos de Souza: This author assisted with the data acquisition and approved the version to be published.

João Sabino L. Cunha-Filho: This author assisted with the conception, design and data acquisition, analysis and interpretation. Additionally, this author reviewed the article critically for important intellectual content and approved the version to be published.

9. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for the financial support provided by the Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

10. FUNDING

Financial support was provided by the *Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE)*, *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil.

11. CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

12. REFERENCES

- Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov* 2004;**1**:6.
- ASMR. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2008;**89**:1603.
- Athreya BA, Zulian F, Godillot AP, Weiner DB, Williams WV. Prolactin receptor levels on lymphocytes vary with menstrual cycle in women. *Pathobiology* 1994;**62**:34-42.
- Basu S, et al. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2001;**7**:569-574.
- Bussen S, Sutterlin M, Steck T. Endocrine abnormalities during the follicular phase in women with recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 1999;**14**:18-20.
- Calarge CA, et al. Variants of the dopamine D2 receptor gene and risperidone-induced hyperprolactinemia in children and adolescents. *Pharmacogenet Genomics* 2009;**19**:373-382.
- Cook CL, Pridham DD. Recurrent pregnancy loss. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1995;**7**:357-366.
- Egli M, Leeners B, Kruger TH. Prolactin secretion patterns: basic mechanisms and clinical implications for reproduction. *Reproduction* 2010;**140**:643-654.
- Gubbay O, Critchley HO, Bowen JM, King A, Jabbour HN. Prolactin induces ERK phosphorylation in epithelial and CD56(+) natural killer cells of the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**:2329-2335.
- Hansen KA, Zhang Y, Colver R, Tho SP, Plouffe L, Jr., McDonough PG. The dopamine receptor D2 genotype is associated with hyperprolactinemia. *Fertil Steril* 2005;**84**:711-718.
- Hirahara F, Andoh N, Sawai K, Hirabuki T, Uemura T, Minaguchi H. Hyperprolactinemic recurrent miscarriage and results of randomized bromocriptine treatment trials. *Fertil Steril* 1998;**70**:246-252.
- Jabbour HN, Critchley HO. Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction* 2001;**121**:197-205.
- Jabbour HN, Critchley HO, Boddy SC. Expression of functional prolactin receptors in nonpregnant human endometrium: janus kinase-2, signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1), and STAT5 proteins are phosphorylated after stimulation with prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:2545-2553.
- Jones RL, Critchley HO, Brooks J, Jabbour HN, McNeilly AS. Localization and temporal expression of prolactin receptor in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:258-262.
- Kallen CB, Arici A. Immune testing in fertility practice: truth or deception? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003;**15**:225-231.
- Legro RS, Dietz GW, Comings DE, Lobo RA, Kovacs BW. Association of dopamine D2 receptor gene haplotypes with anovulation and fecundity in female Hispanics. *Hum Reprod* 1994;**9**:1271-1275.
- Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2011;**96**:522-529.
- Li J. [Research advances in the relationship between prolactin and spontaneous abortion]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2012;**10**:7-12.

- Nilsson C, Eriksson E. Partial dopamine D2 receptor agonists antagonize prolactin-regulating D2 receptors in a transfected clonal cell line (GH4ZR7). *Eur J Pharmacol* 1992;**218**:205-211.
- Novella-Maestre E, Carda C, Ruiz-Sauri A, Garcia-Velasco JA, Simon C, Pellicer A. Identification and quantification of dopamine receptor 2 in human eutopic and ectopic endometrium: a novel molecular target for endometriosis therapy. *Biol Reprod* 2010;**83**:866-873.
- Ormandy CJ, et al. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* 1997;**11**:167-178.
- Paulson RJ. Hormonal induction of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2011;**96**:530-535.
- Perks CM, Newcomb PV, Grohmann M, Wright RJ, Mason HD, Holly JM. Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramide-induced apoptosis in human granulosa cells. *Hum Reprod* 2003;**18**:2672-2677.
- Qiu X, Sun X, Christow A, Stabi B, Gemzell-Danielsson K. The effect of mifepristone on the expression of insulin-like growth factor binding protein-1, prolactin and progesterone receptor mRNA and protein during the implantation phase in human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2002;**8**:998-1004.
- Salat-Baroux J. [Recurrent spontaneous abortions]. *Reprod Nutr Dev* 1988;**28**:1555-1568.
- Vlahos NP, Bugg EM, Shamblott MJ, Phelps JY, Gearhart JD, Zacur HA. Prolactin receptor gene expression and immunolocalization of the prolactin receptor in human luteinized granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 2001;**7**:1033-1038.
- Wong AH, Buckle CE, Van Tol HH. Polymorphisms in dopamine receptors: what do they tell us? *Eur J Pharmacol* 2000;**410**:183-203.

TABLE I
Demographic characteristics (mean±SD)

Parameter	Control group N = 31	Recurrent Miscarriage N=20	<i>P</i> value ^a
Age (years)	32.3±5.2	33.7±5.2	0.35
BMI ^b (kg/m ²)	28.2±4.8	24.8±4.2	0.01
Weight (Kg)	71.5±15.5	63.4±11.3	0.05
Height (m)	1.59±0.07	1.59±0.05	0.80
Prolactin (ng/ml)	8.1±3.8	12.4±8.7	0.03

^aStudent's t-test

^bBMI: Body mass index

TABLE II
Polymorphisms in the Dopamine Receptor D2 gene

Polymorphism	Region	Nucleotide Position	Codon Position
1	Exon 7	CACCA(C/T)GGTCT (3420; C ^a to T ^b)	313, Histidine
2	Exon 7	ACTCC(C/T)GACAG (3438; C ^a to T ^b)	319, Proline

^aC: cytosine

^bT: thymine

TABLE III

Genotype and allele frequencies of DRD2 polymorphisms

DRD2 Polymorphism	Population studied	N	Genotypes			<i>P</i> value ^a	Alleles			OR (95% CI)	<i>P</i> value
			n (%)	n (%)	n (%)		N	n (%)	n (%)		
1 (3420; C to T)	Recurrent Miscarriage	20	CC	CT	TT	.234	C ^b	T ^c	.315		
	Controls	31	12 (60.0)	5 (25.0)	3 (15.0)		40	29 (72.5)		11 (27.5)	
2 (3438; C to T)	Recurrent Miscarriage	20	CC	CT	TT	.036	C ^b	T ^c	2.38 (1.05-5.36)		
	Controls	31	5 (25.0)	6 (30.0)	9 (45.0)		40	16 (40.0)		24 (60.0)	

^aMonte Carlo test^bC: cytosine^cT: thymine

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS (CONCLUSÕES)

Nós refutamos a nossa hipótese nula de que os genes (3420 e 3438) do receptor da dopamina não são importantes na determinação de desfechos obstétricos ou ginecológicos desfavoráveis relacionados com endometriose ou aborto recorrente.

O nível sérico médio de prolactina está aumentado em pacientes com endometriose quando comparado com mulheres saudáveis sem endometriose.

A frequência genotípica e alélica do polimorfismo 3438 do gene do receptor da dopamina D2 está aumentada em mulheres com endometriose moderada-severa.

O nível sérico médio de prolactina é maior em pacientes com abortamento de repetição quando comparado com mulheres saudáveis sem endometriose.

A frequência genotípica e alélica do polimorfismo 3438 do gene do receptor da dopamina D2 está aumentada em mulheres com abortamento de repetição.

11. PERSPECTIVAS

A presença genotípica aumentada do polimorfismo do receptor da dopamina 2 (DRD2) em mulheres com endometriose e em mulheres com abortamento de repetição pode abrir nova uma perspectiva da fisiologia destas doenças.

Esses resultados estão de acordo com resultado de nosso estudo funcional anterior (Cunha-Filho, 2002) onde concluímos que as pacientes com endometriose mínima-leve teriam uma secreção anormal de prolactina não envolvendo o sistema dos receptores DRD2. De fato, não encontramos neste estudo uma frequência genotípica e alélica diferente no grupo de endometriose mínima-leve do grupo controle, apenas na endometriose moderada-severa. Este resultado demonstra mais uma vez que a endometriose é pleomórfica e heterogênea. Provavelmente no futuro iremos discutir endometriose como uma síndrome com diferentes apresentações clínicas e laboratoriais. Diante disso, o efeito do uso de agonistas de dopamina em pacientes com endometriose mínima-leve pode não ser o mesmo do que em pacientes com endometriose moderada-severa.

Como estudos anteriores demonstraram que houve diminuição dos focos de endometriose e que ocorreu sucesso gestacional em pacientes com abortamento de repetição com hiperprolactinemia presente ou oculta após a administração de agonistas da dopamina, a questão a ser respondida é qual o mecanismo de ação que estaria ocorrendo estes resultados. Nós temos duas hipóteses para este questionamento: [1] diminuição dos níveis séricos de prolactina, [2] atuação direta no endométrio ou nos focos de endometriose. Para essa resposta estudos da expressão de receptores da prolactina a diferentes concentrações de prolactina, e estudos da expressão de receptores

DRD2 a diferentes concentrações de agonistas da dopamina tanto no endométrio como nos focos de endometriose poderiam esclarecer esses mecanismos.

Nosso estudo precisa ser replicado em populações geneticamente distintas já que a frequência desses polimorfismos é extramente variável de acordo com a etnia. Outro dado a ser avaliado é que realizamos uma pesquisa com grupos específicos de pacientes: endometriose, aborto recorrente e mulheres férteis. São grupos específicos que não representam toda a população. De outro modo, a presença do polimorfismo por si só pode não ter nenhum significado clínico, pois mesmo com o uso de agonistas da dopamina para tratamento destas pacientes poderia não causar nenhum resultado, pois poderia não conseguir atuar num receptor defeituoso.

Diante destes questionamentos, fica claro que estudos funcionais como a pesquisa da expressão dos receptores da prolactina e do DRD2 no endométrio tópico e ectópico estimulados por níveis diferentes de prolactina e dopamina ou seus agonistas se torna necessário para analisarmos o real papel do polimorfismo do DRD2 nas pacientes com endometriose e aborto de repetição.

Por fim, a perspectiva do uso de agonistas da dopamina no tratamento da endometriose deve também levar em conta da heterogeneidade desta doença. O uso de agonistas da dopamina deve ser avaliado em diferentes populações com endometriose: profunda, ovariana, peritoneal, mínima-leve, moderada-severa para podermos assim compreender um pouco melhor esta doença ainda enigmática.

