

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

***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***

Gustavo Peretti Rodini

João Sabino L. da Cunha-Filho

Dissertação de Mestrado

2010

Contato: grodini@terra.com.br

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO	4
INTRODUÇÃO	6
REVISÃO DA LITERATURA.....	8
Aspectos hormonais na endometriose.....	8
Endometriose e reprodução assistida	9
Hormônio Folículo Estimulante.....	10
Polimorfismos do gene do receptor do FSH	12
JUSTIFICATIVA.....	16
HIPÓTESE NULA.....	17
OBJETIVO.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
ARTIGO.....	24
CONSIDERAÇÕES GERAIS	44
PERSPECTIVAS	45
ANEXOS.....	46

AGRADECIMENTOS

Ao inestimável apoio do laboratório do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre Terapia Gênica e do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

RESUMO

A endometriose atinge 10-15% das mulheres. Portadoras dessa patologia têm 20 vezes mais chances de serem inférteis e 30-60% das pacientes com endometriose apresentam infertilidade associada. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que mulheres com endometriose e infertilidade apresentam diversas anormalidades hormonais tais como hiperprolactinemia, insuficiência lútea, diminuição de fatores de crescimento intra-folicular e, mais recentemente, a coorte folicular ovariana heterogênea com uma redução da reserva folicular.

Portanto, estudaremos a prevalência do polimorfismo do gene do receptor do hormônio folículo estimulante (FSH) em pacientes com endometriose e infertilidade. Acreditamos que polimorfismos no gene que sintetiza o receptor do FSH são mais prevalentes nesse grupo de pacientes. Tal polimorfismo, que altera a transdução do sinal do receptor, pode ser o responsável por uma resposta ovariana inadequada ao FSH.

Conduzimos, ao longo dessa dissertação, um estudo caso-controle. Os casos compreendem 50 pacientes com infertilidade e endometriose. Os controles, 51 pacientes férteis sem endometriose. Determinaremos a prevalência alélica da substituição da asparagina (N) pela serina (S) no códon 680 (N680S) e da treonina (T) pela alanina (A) no códon 307 (T307A), localizados no éxon 10, em ambos os alelos do gene que sintetiza o receptor do FSH. Para tal, utilizaremos técnicas de reação em cadeia da polimerase em ambos os alelos.

Os dois grupos não diferiram em sua avaliação demográfica. No grupo de pacientes com endometriose e infertilidade foram encontradas 10 pacientes homocigotas S/S e 10 pacientes A/A, 23 pacientes heterocigotas N/S e 17 T/A. Além de 17 pacientes genotipicamente N/N e 23 T/T. No grupo controle, houve 9 pacientes com homocigose S/S e 15 A/A, 25 heterocigotas N/S e 22 T/A. Finalmente, 17 pacientes com genótipo N/N e 14 T/T. Não obtivemos diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Esse estudo pioneiro rejeita a hipotética associação entre endometriose e os polimorfismos N680S e T307A no gene que sintetiza o receptor do FSH.

Palavras-chave: Endometriose, Infertilidade, Polimorfismo, FSH, Receptor FSH.

INTRODUÇÃO

A infertilidade, definida pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) como a falta de gestação detectada clínica ou hormonalmente após 12 meses de relações sexuais regulares sem contracepção, pode associar-se a endometriose por diferentes mecanismos: alterações imunológicas, anatômicas, uterinas, endometriais, entre outras (1).

A endometriose, definida como a presença de tecido glandular e estroma endometrial fora da cavidade uterina, foi descrita pela primeira vez em 1860 por Rokitansky (1, 7, 8). Em 1927, Sampson foi o primeiro a caracterizar a endometriose como uma patologia responsável por alterações na pelve feminina (1). Leyendecker, 1998, discute a endometriose como doença da unidade endometrial-subendometrial (9). A etiopatogenia da endometriose, ainda enigmática, está baseada nas teorias mais conhecidas: a metaplasia celômica, os implantes ectópicos e a indução de células multipotentes (1).

Estima-se que 10% a 15% da população feminina apresentem endometriose (1, 10, 11). A endometriose pode ser assintomática, ocorrendo diagnóstico, muitas vezes, somente por ocasião da incapacidade de gestar ou na presença de desconforto pélvico severo (9). A associação entre endometriose e infertilidade é bem estabelecida, mulheres com endometriose têm 20 vezes mais chances de serem inférteis (7, 10, 12). Trinta a sessenta por cento das pacientes com endometriose apresentam infertilidade associada (1, 7, 11, 13). Em 1993, Wardle & Hull apontaram a endometriose como fator de infertilidade em 80% dos casos (14).

O nosso grupo de pesquisa, o qual pertence a um diretório de pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, tem como linha de pesquisa o estudo das alterações ovulatórias nas pacientes com endometriose e infertilidade.

Já foi demonstrado que pacientes com endometriose e infertilidade têm secreção e controle da prolactina alterados (2, 3), assim como anormalidades da fase lútea (4) evidenciada pela disfunção na secreção de estrogênio e progesterona ovarianos e concentração folicular de fatores de crescimento modulada de forma anômala (5). Recentemente, foi demonstrado 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 (6).

Entretanto os estudos genéticos tentando avaliar a ligação de polimorfismos ou mesmo expressões gênicas nesta população são escassos e com resultados conflitantes. Considerando o gene do receptor do FSH a literatura não possui dados em relação a pacientes com endometriose, embora a importância e ação deste gene já seja bastante estudada em outros grupos populacionais.

É justamente com este objetivo, de estudar o polimorfismo do gene do receptor do FSH que descrevemos a revisão e o trabalho científico a seguir.

REVISÃO DA LITERATURA

Aspectos hormonais na endometriose

Alterações hormonais foram descritas por vários autores em diferentes estudos, tentando relacionar as alterações existentes à incapacidade de gestar das pacientes com endometriose. A endometriose foi associada com anovulação em 17% das pacientes mediante um escore obtido de sua anamnese (15). O estigma ovulatório foi observado em 33% das pacientes inférteis com endometriose e estes autores acreditam haver alteração hormonal em pacientes com endometriose, provavelmente, não associada a síndrome de folículo não roto (16). A disfunção ovulatória em pacientes com endometriose é descrita em vários estudos (17). Comparando pacientes com esta disfunção e com e sem endometriose observou-se uma prevalência superior de folículo não roto entre pacientes com endometriose (18).

Em estudo experimental, com ratas, sugere-se a associação de endometriose e infertilidade com foliculogênese alterada (19). Destaca-se a associação de endometriose com anovulação, galactorrêia, síndrome de folículo não roto, secreção anômala de prolactina e insuficiência lútea (10, 20). Pacientes com endometriose teriam secreção anômala de LH (21) e a insuficiência lútea é mais prevalente em pacientes inférteis com endometriose que com causa desconhecida (22), enquanto outros autores não verificaram diferença significativa na prevalência de insuficiência lútea e endometriose (23). A disfunção da fase lútea também foi descrita em estudos posteriores (24-26). Há diminuição da secreção e concentração no líquido peritoneal de progesterona em pacientes com endometriose (27, 28). A alteração na secreção de estradiol e progesterona pode ser alguma das alterações hormonais de pacientes com endometriose mínima (29). Uma diversidade de anormalidades endócrinas vem sendo relacionadas a etiologia da endometriose; disfunção do eixo hipófise-ovário, luteinização e folículo não roto em ciclos observados e baixa concentração de progesterona na fase lútea (30).

Alguns autores relacionam aspectos hormonais das pacientes com endometriose a segunda fase de seu ciclo que foi menor em relação ao grupo controle e a secreção de

progesterona ocorreu apenas dois dias após a secreção máxima do hormônio luteinizante (LH). Quando da realização da biópsia de endométrio, nestas pacientes, cerca de 25% das pacientes com endometriose apresentaram endométrio fora de fase e em apenas 21% a identificação característica de ovulação foi feita por ocasião da laparoscopia, contra 94% do grupo controle. Os autores concluíram que as pacientes com endometriose apresentam alterações da secreção de progesterona com provável anormalidade ovulatória. Contudo, as medidas de progesterona total, estradiol e LH não foram diferentes entre os grupos (31).

A presença da associação entre endometriose, hiperprolactinemia e insuficiência lútea recentemente foi descrita como possível causa de infertilidade no grupo de paciente sem dano tubário, por uma disfunção ovulatória (2). Estes autores observaram que pacientes com endometriose mínima e leve apresentam alterações na fase folicular precoce caracterizada pela diminuição dos níveis séricos de estradiol bem como pela prevalência de hiperprolactinemia e insuficiência lútea. Os níveis séricos de estradiol foram menores e de prolactina foram maiores em pacientes com endometriose. Pacientes com endometriose mínima e leve têm alteração na secreção de prolactina após estímulo com hormônio tireotrófico (TRH), com deficiência da fase lútea (3). Também foi demonstrado 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 (6).

Endometriose e reprodução assistida

Em revisão, relacionando a endometriose e técnicas de reprodução assistida, discutem-se as diferenças de resposta às técnicas nos diferentes estágios de endometriose. Concluiu-se que o sucesso de tratamento dependendo da severidade da endometriose e das alterações tubárias por ela propiciadas (32). Analisando estudos de pacientes com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida não foi encontradas diferenças nas taxas de gestação nos diferentes estágios de endometriose, sem diferença na resposta a ciclos de fertilização *in vitro*. O prognóstico reprodutivo das pacientes inférteis com endometriose não é relacionado ao grau de endometriose, e sim a características da patologia ainda pouco

conhecidas (33).

Avaliando ciclos estimulados em mulheres com endometriose com o nível de esteróides e qualidade de embrião, a taxa de implantação de embrião foi menor em pacientes com endometriose, diminuindo a taxa de fertilização, levantando a controvérsia das possíveis causas, a qualidade do embrião ou o seu ambiente. Analisando o embrião de pacientes submetidas a fertilização *in vitro* com e sem endometriose, ocorreu uma diferença significativa no número de blastômeros, que foi menor nas pacientes com endometriose quando comparadas aos seus controles, o que pode sugerir alterações oocitárias, resultando em embriões com menor habilidade de divisão celular (34).

Em estudo de caso-controle, analisando a resposta ovariana a repetidos ciclos estimulados para fertilização *in vitro* em pacientes com endometriose, observa-se que a fertilização *in vitro* é tratamento efetivo para este grupo de mulheres, mas são necessários ciclos repetidos de tratamento para o sucesso de gestação. Estes autores concluíram que o grupo com endometriose exigiu mais ampolas de FSH por ciclo, com uma diferença ainda maior quando realizados ciclos subseqüentes. Entretanto, a taxa cumulativa de gestação foi de 63.3% e 62.6% por 5 ciclos e a taxa de nascimentos de 46.8 e 50.9%, respectivamente, entre as pacientes com endometriose ovariana e obstrução tubária, similar em ambos os grupos. Concluindo, portanto, que a diminuição da resposta ovariana ao FSH não diminui as chances do tratamento com fertilização *in vitro* (35). Entretanto, recentemente, uma meta-análise demonstrou que pacientes com endometriose têm uma diminuição de 50% na chance de ficarem grávidas após fertilização *in vitro* se comparadas ao grupo de mulheres sem esta doença. Os autores concluem que esta diminuição é em decorrência de alterações oocitárias e de desenvolvimento embrionário. Se entendêssemos melhor estas alterações do ponto de vista fisiológico, poderíamos propor esquemas de indução da ovulação mais racionais e buscar otimizar os resultados nestas pacientes inférteis com endometriose (36).

Hormônio Folículo Estimulante

O hormônio folículo-estimulante (FSH) é um hormônio primordial para a reprodução

humana. Ele é produzido pela adenohipófise sendo classificado, de acordo com sua constituição química, como um hormônio glicoprotéico em conjunto com o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio estimulante da tireóide (TSH). Esses são constituídos por duas subunidades polipeptídicas denominadas alfa e beta, sendo a primeira comum aos três hormônios sendo, inclusive, super-expressa. A subunidade beta é finamente controlada por mecanismos de retroalimentação e fornece a especificidade biológica a cada um deles (37).

O FSH é uma glicoproteína de 33 KDa produzido nos gonadotrofos, os quais constituem 10% das células adenohipofisárias. Ele é secretado de forma cíclica, na dependência de vários mecanismos de retroalimentação reguladores da sua secreção. A elevação dos seus níveis na transição lúteo-folicular é responsável pelo processo de recrutamento folicular, ou seja, a transformação dos folículos primordiais em folículos antrais. O FSH induz o crescimento e a diferenciação das células da granulosa, estimula a atividade da aromatase, a síntese de estradiol e a formação de receptores de LH. A sua secreção pituitária é inibida pelos produtos foliculares estradiol e inibina B (37).

O gene que sintetiza o receptor do FSH está localizado no cromossomo 2p21-16. O receptor do FSH é da família dos receptores acoplados a uma proteína G, que é a unidade regulada pela proteína adenilato ciclase. Esta unidade fica inativa até a ligação do hormônio com o receptor. A ligação do FSH com o seu receptor ocorre através de ambas as subunidades, o que induz alterações conformacionais na forma espacial do hormônio. Isso produz um sinal de transdução através da ativação da proteína adenilato ciclase intracelular e a formação do segundo mensageiro AMP cíclico. O AMP cíclico por sua vez se liga a receptores protéicos citoplasmáticos específicos, e este complexo AMP cíclico e proteína receptora ativa a proteína quinase. A proteína quinase é uma proteína citoplasmática que existe na forma tetramérica, com duas unidades reguladoras e duas unidades catalíticas. A ativação da proteína quinase pelo AMP cíclico libera as unidades catalíticas, que fosforilam resíduos de serina e treonina de proteínas celulares. As proteínas fosforiladas contêm elementos que se ligam ao DNA, levando à ativação da transcrição gênica (38).

A proteína G é essencial, portanto, como sinal de transdução transmembrana, e o que

vai ativar a série de eventos que culminam na síntese protéica. As proteínas G são formadas por subunidades β e γ , que têm seletividade por ligantes específicos na membrana celular (38). O receptor do FSH contém um extenso domínio extracelular, onde o hormônio se acopla, e uma região transmembrana, a qual é ligada à proteína G. O domínio extracelular tem a forma levemente curva, sendo que as subunidades α e β do FSH se ligam a face interna desta parte côncava, através de ligações específicas de aminoácidos de ambas as estruturas (39).

A literatura não possui dados sobre os polimorfismos do receptor do FSH em mulheres com endometriose, assim como na associação destes polimorfismos com a reserva ovariana ou coorte folicular.

Polimorfismos do gene do receptor do FSH

Polimorfismos genéticos são pequenas variações que ocorrem no genoma e que garantem as diferenças individuais. Acontecem quando sua frequência alélica acomete pelo menos 1% da população. Suscetibilidade a doenças e características individuais, por exemplo, podem ser devido a pequenas alterações no genoma (40).

A forma mais comum desta variação gênica se dá através da substituição de um único nucleotídeo por outro (*single nucleotide polymorphism* – SNP), que ocorrem com uma frequência aproximada de 1 a cada 1000 bases de base (41). Especula-se que os polimorfismos modifiquem e regulem os sistemas de feedback endócrinos e a ação hormonal, resultando em leves alterações inter-individuais (40). Os polimorfismos no gene do receptor do FSH podem alterar a sua função através da alteração de propriedades bioquímicas do produto do gene ou alterando a atividade do promotor, a nível transcripcional (42).

No banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), estão descritos mais de 700 polimorfismos no gene do receptor do FSH, sendo que apenas 5 deles são nas regiões codificadoras do gene (éxon) (43). Um polimorfismo bastante comum na população caucasiana ocorre no éxon 10 do gene do receptor do FSH, nos códons 307 e 680 do domínio intracelular do receptor, e correspondem à substituição do nucleotídeo treonina pela alanina e do nucleotídeo asparagina pela serina, respectivamente (43). Até este momento os polimorfismos

destes dois códons são descritos como sendo completamente ligados: treonina na posição 307 com serina na posição 680 e alanina com asparagina. Portanto, na maioria das pesquisas atualmente tem se estudado apenas a posição 680 do éxon 10 (43-45).

O éxon 10 é fundamental para a transdução do sinal do receptor, porém, por corresponder a uma porção do domínio intracelular do mesmo, não é necessário para o acoplamento do hormônio ao receptor. Embora tal polimorfismo *a priori* não altere o prognóstico reprodutivo, uma vez que é transmitido através das gerações, algumas diferenças funcionais têm sido relatadas, dependendo do genótipo apresentado. A hipótese geral é de que cada o receptor possa apresentar diferente expressão na superfície celular, determinando diferente interação com o hormônio e diferentes mecanismos de down-regulation (43-45).

Também já foram reportados polimorfismos na região do promotor do gene do receptor do FSH, porém não foram encontradas associações entre os polimorfismos nesta região e níveis de FSH ou resposta ovariana à estimulação (46).

Diferentes estudos buscam estimar as freqüências dos polimorfismos do gene do FSH, especialmente na população infértil (43, 47-49). No entanto, as freqüências gênicas são bastante variadas conforme o local e o estudo realizado (tabela 1).

Tabela 1: Freqüências gênicas dos polimorfismos na posição 680 do éxon 10 do gene do receptor do FSH encontradas em diferentes estudos retrospectivos, em população feminina.

Autor	Número de pacientes	Serina / Serina	Serina / Asparagin a	Asparagina / Asparagina
Mayorga, Alemanha	2000, 161	26	45	29
Sudo, 2002, Japão	522	12	47	41

De Castro, 2003, Espanha	102	19	50	31
Falconer, 2005,	68	41	24	35
Suécia				

Em 1999, Conway et al., não encontraram diferenças na frequência gênica do polimorfismo na posição 680 do éxon 10 em mulheres com diferenças patologias ovarianas, como síndrome dos ovários policísticos, resistência ovariana ou falência ovariana precoce, sendo que a frequência do genótipo homozigoto afetado S/S ficou em torno de 40% (50).

Greb et al, em 2005, verificaram que mulheres que apresentavam esse mesmo polimorfismo, S/S apresentaram níveis mais elevados de FSH na transição lúteo-folicular e na fase folicular inicial que as com o genótipo homozigoto não alterado N/N. Cabe ressaltar, entretanto, que o nível máximo de FSH foi observado no mesmo dia em relação ao dia do pico do LH. A dinâmica hormonal durante a luteólise foi semelhante nos dois grupos, o que sugere que a duração maior do ciclo nas pacientes do grupo S/S é devido a uma fase folicular mais arrastada. Os níveis máximos de estradiol foram semelhantes entre os dois grupos, sugerindo que níveis mais elevados de FSH são necessários para adquirir os mesmos níveis de estradiol e atingir a ovulação nas pacientes com genótipo S/S. Estes autores não encontram explicação para os níveis mais elevados de FSH neste grupo, supondo que exista uma resistência aumentada dos folículos ovarianos destas pacientes ao FSH. As pacientes do grupo S/S apresentaram um número de folículos antrais no início da fase folicular aproximadamente 20% maior. Estes autores encontraram níveis semelhantes de fator anti-mulleriano nos dois grupos, conotando uma reserva folicular semelhante entre eles (51).

A associação dos níveis basais de FSH com o genótipo não está bem estabelecida. Quando medido no terceiro dia do ciclo, alguns autores não encontraram diferenças entre os níveis de FSH entre as paciente com genótipo S/S e N/N (49, 51, 52), enquanto outros as encontraram (43, 47).

Estudos retrospectivos em mulheres que se submetem a procedimentos de reprodução assistida demonstraram uma sensibilidade diferenciada à gonadotrofina exógena dependendo do

genótipo apresentado. Perez Mayorga et al, 2000, encontraram que as pacientes homozigóticas para o aminoácido serina (S/S) na posição 680 do gene que sintetiza o receptor do FSH necessitaram de dose maiores de FSH que as homozigóticas para asparagina (N/N) ou que as heterozigóticas (N/S). Embora todos os grupos apresentassem níveis basais de FSH dentro da faixa considerada normal, as pacientes do grupo S/S apresentaram níveis basais mais altos que os outros grupos, indicando uma sensibilidade diminuída deste grupo ao FSH (47).

De Castro et al, 2003, encontraram uma frequência aumentada do alelo S/S entre as pacientes com má resposta à indução da ovulação, que também apresentaram uma maior tendência maior de cancelamento do ciclo por ausência de resposta (48). Sudo et al, 2002, encontraram que as pacientes com genótipo S/S necessitaram de doses maiores de gonadotrofina de mulher menopausada (HMG) e o nível máximo de estradiol foi menor que nos outros grupos (43). Daelemans et al, 2004, em pacientes submetidas a estimulação ovariana por FIV, encontraram dados conflitantes em relação à associação de hiperestímulo ovariano iatrogênico. Estes autores encontraram uma frequência alélica maior do aminoácido serina na posição 680 nas pacientes que desenvolveram hiperestímulo em relação aos controles, porém encontraram um aumento da frequência alélica de asparagina nas pacientes com sintomas mais severos (45).

Em estudo prospectivo, Behre et al, 2005, demonstraram que as pacientes com genótipo S/S quando estimuladas com as mesmas doses de FSH que as pacientes com genótipo N/N apresentavam pico de estradiol menor, mas que este desfecho se tornava igual se a dose de FSH era aumentada, embora o estudo não tivesse poder para detectar diferenças nos desfechos reprodutivos (número de oócitos, gestação, etc) (52).

JUSTIFICATIVA

A literatura não possui dados sobre os polimorfismos do receptor do FSH em mulheres com endometriose. Fica evidente a associação da endometriose com infertilidade e uma relação desta doença com anormalidades ovulatórias, entretanto nada se sabe sobre o polimorfismo genético dos receptores do FSH em mulheres com endometriose e, conseqüentemente, seus efeitos na reserva ovariana.

O conhecimento destas alterações pode sugerir um manejo mais racional e barato das mulheres com endometriose e infertilidade. A causa da infertilidade em mulheres com endometriose estimula grande número de pesquisa, especialmente, em um grupo de pacientes como os dessa dissertação onde não há um substrato anatômico evidente para a explicação da causa da infertilidade.

Como existe um razoável corpo de evidências relacionando as alterações do receptor do FSH com o prognóstico reprodutivo e função ovulatória em mulheres e, sabendo que a endometriose pode associar-se com anormalidades ovulatórias, propomos esta pesquisa a seguir descrita.

Esse estudo é pioneiro na avaliação genotípica dessa população. Sabendo que 14% da população feminina brasileira é infértil e necessitaríamos de aproximadamente 140 mil ciclos de fertilização *in vitro* para tratar esta população (dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) o custo para o sistema de saúde com o tratamento de mulheres com endometriose, que acomete 30% dos 140 mil ciclos é muito elevado. Contudo, se soubermos manejá-las de forma mais racional e menos onerosa com os mesmos resultados, o sistema de saúde teria um benefício direto muito significativo.

HIPÓTESE NULA

Pacientes com endometriose e infertilidade têm a mesma prevalência de homozigotos afetados nos códons 680 e 307 no gene que sintetiza o receptor do FSH quando comparadas com pacientes férteis.

OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo é o de determinar a frequência gênica dos polimorfismos nas posições 307 e 680 do éxon 10 do gene que sintetiza o receptor do FSH na população de mulheres inférteis com endometriose. Avaliaremos a troca de uma asparagina (N) por uma serina (S) no códon 680 (N680S). Também será objeto de estudo a troca de uma treonina (T) pela alanina (A) na posição 307 (T307A).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis. *N Engl J Med*. 1993 Jun 17;328(24):1759-69.
2. Cunha-Filho JSLG, J.L.; Lemos, N.A.; Brandelli, A.; Castillos, M.; Passos, E.P. . Hyperprolactinemia And Luteal Insufficiency In Infertile Patientnts With Mild And Minimal Endometriosis. *Horm Metab Res*. 2001;33:216-20.
3. 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.
4. 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.
5. Cunha-Filho JS, Lemos NA, Freitas FM, Kiefer K, Faller M, Passos EP. Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis. *Hum Reprod*. 2003 Feb;18(2):423-8.
6. 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.
7. Koninckx PR. Is mild endometriosis a condition occurring intermittently in all women? *Hum Reprod*. 1994 Dec;9(12):2202-5.
8. 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.
9. Leyendecker G, Kunz G, Noe M, Herbertz M, Mall G. Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. *Hum Reprod Update*. 1998 Sep-Oct;4(5):752-62.
10. Muse KN, Wilson EA. How does mild endometriosis cause infertility? *Fertil Steril*.

1982 Aug;38(2):145-52.

11. Bancroft K, Vaughan Williams CA, Elstein M. Minimal/mild endometriosis and infertility. A review. *Br J Obstet Gynaecol.* 1989 Apr;96(4):454-60.
12. Baracat ECL, G.R. *Ginecologia Endócrina.* Atheneu; 1995.
13. Kistner RW. Management of endometriosis in the infertile patient. *Fertil Steril.* 1975 Dec;26(12):1151-66.
14. Wardle PG, Mitchell JD, McLaughlin EA, Ray BD, McDermott A, Hull MG. Endometriosis and ovulatory disorder: reduced fertilisation in vitro compared with tubal and unexplained infertility. *Lancet.* 1985 Aug 3;2(8449):236-9.
15. 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.
16. Dmowski WP, Rao R, Scommegna A. The luteinized unruptured follicle syndrome and endometriosis. *Fertil Steril.* 1980 Jan;33(1):30-4.
17. Dmowski WP, Radwanska E, Binor Z, Rana N. Mild endometriosis and ovulatory dysfunction: effect of danazol treatment on success of ovulation induction. *Fertil Steril.* 1986 Nov;46(5):784-9.
18. 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.
19. 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.
20. Haney AF. Endometriosis-associated infertility. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1993 Dec;7(4):791-812.
21. Cheesman KL, Ben N, Chatterton RT, Jr., Cohen MR. Relationship of luteinizing hormone, pregnanediol-3-glucuronide, and estriol-16-glucuronide in urine of infertile women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1982 Nov;38(5):542-8.
22. Cheesman KL, Cheesman SD, Chatterton RT, Jr., Cohen MR. Alterations in

progesterone metabolism and luteal function in infertile women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1983 Nov;40(5):590-5.

23. Matorras R, Rodriguez F, Perez C, Pijoan JI, Neyro JL, Rodriguez-Escudero FJ. Infertile women with and without endometriosis: a case control study of luteal phase and other infertility conditions. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1996 Oct;75(9):826-31.

24. 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.

25. Ronnberg L, Kauppila A, Rajaniemi H. Luteinizing hormone receptor disorder in endometriosis. *Fertil Steril*. 1984 Jul;42(1):64-8.

26. 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.

27. Barry-Kinsella C, Byrne P. Clinical dilemmas in the management of minimal and mild endometriosis. *Ir Med J*. 1996 Mar-Apr;89(2):52-3.

28. Williams DL, Runyan JW, Jr., Hagen AA. Progesterone-induced alterations of oogenesis in the Chinese hamster. *J Lab Clin Med*. 1972 Jun;79(6):972-7.

29. Tummon IS, Maclin VM, Radwanska E, Binor Z, Dmowski WP. Occult ovulatory dysfunction in women with minimal endometriosis or unexplained infertility. *Fertil Steril*. 1988 Nov;50(5):716-20.

30. Bancroft K, Vaughan Williams CA, Elstein M. Pituitary-ovarian function in women with minimal or mild endometriosis and otherwise unexplained infertility. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1992 Feb;36(2):177-81.

31. Brosens IA, Koninckx PR, Corveleyn PA. A study of plasma progesterone, oestradiol-17beta, prolactin and LH levels, and of the luteal phase appearance of the ovaries in patients with endometriosis and infertility. *Br J Obstet Gynaecol*. 1978 Apr;85(4):246-50.

32. Dokras A, Olive DL. Endometriosis and assisted reproductive technologies. *Clin Obstet Gynecol*. 1999 Sep;42(3):687-98.

33. Cahill DJ, Hull MG. Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. *Hum Reprod*

Update. 2000 Jan-Feb;6(1):56-66.

34. Pellicer A, Valbuena D, Bauset C, Albert C, Bonilla-Musoles F, Remohi J, et al. The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality. *Fertil Steril*. 1998 Jun;69(6):1135-41.
35. Al-Azemi M, Bernal AL, Steele J, Gramsbergen I, Barlow D, Kennedy S. Ovarian response to repeated controlled stimulation in in-vitro fertilization cycles in patients with ovarian endometriosis. *Hum Reprod*. 2000 Jan;15(1):72-5.
36. Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2002 Jun;77(6):1148-55.
37. Aires MdM. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
38. Leon Speroff RHG, Nathan G. Kase. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 7th ed.: LIPPINCOTT WILLIAMS; 2005.
39. Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*. 2005 Jan 20;433(7023):269-77.
40. Robert L. Nussbaum RRM, Huntington F. Willard. *Genética Médica - Thompson & Thompson*. 7a ed.: Elsevier; 2008.
41. Shastry BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet*. 2002;47(11):561-6.
42. Gromoll J, Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab*. 2005 Oct;16(8):368-73.
43. Sudo S, Kudo M, Wada S, Sato O, Hsueh AJ, Fujimoto S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Mol Hum Reprod*. 2002 Oct;8(10):893-9.
44. Simoni M, Gromoll J, Hoppner W, Kamischke A, Krafft T, Stahle D, et al. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Feb;84(2):751-5.
45. Daelemans C, Smits G, de Maertelaer V, Costagliola S, Englert Y, Vassart G, et al.

Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Dec;89(12):6310-5.

46. Wunsch A, Ahda Y, Banaz-Yasar F, Sonntag B, Nieschlag E, Simoni M, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region influence the expression of the human follicle-stimulating hormone receptor. *Fertil Steril.* 2005 Aug;84(2):446-53.

47. Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Sep;85(9):3365-9.

48. de Castro F, Ruiz R, Montoro L, Perez-Hernandez D, Sanchez-Casas Padilla E, Real LM, et al. Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril.* 2003 Sep;80(3):571-6.

49. Falconer H, Andersson E, Aanesen A, Fried G. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in a population of infertile women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005 Aug;84(8):806-11.

50. Conway GS, Conway E, Walker C, Hoppner W, Gromoll J, Simoni M. Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1999 Jul;51(1):97-9.

51. Greb RR, Grieshaber K, Gromoll J, Sonntag B, Nieschlag E, Kiesel L, et al. A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Aug;90(8):4866-72.

52. Behre HM, Greb RR, Mempel A, Sonntag B, Kiesel L, Kaltwasser P, et al. Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: a pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation. *Pharmacogenet Genomics.* 2005 Jul;15(7):451-6.

ARTIGO

FOLLICLE-STIMULATING HORMONE RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS N680S AND T307A IN PATIENTS WITH INFERTILITY AND ENDOMETRIOSIS

G.P. Rodini, MD^{1,5,*}, U. Matte, PhD^{2,*}, F.S. Pereira, MD^{2,*}, J.P. Bilibio, MD^{1,*}, V. Genro, MD^{1,*}, A.C. Martins, MD^{4,*}, C.A.B. Souza, PhD^{3,*}, J.S.L. Cunha-Filho, PhD^{3,*}

¹ *Postgraduate Program in Medical Clinics of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

² *Terapia Genica Research Unit. Research Center of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil*

³ *Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

⁴ *Postgraduate Student in Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

* *present address: Department of Obstetrics and Gynecology 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*

⁵ *Corresponding author: G.P. Rodini. Rua Professor Fitzgerald, 177/901. CEP: 90470-160, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*

Tel. +55-51-3332-9661; FAX: +55-51-2101-8117; e-mail: grodini@terra.com.br

Abbreviated title: FSH Receptor Gene Polymorphisms

Financial support: This study was supported by a grant from the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Edital Universal 2006, process number 479226/2006-7).

The homozygotic polymorphic genotypes A307T and N680S are not more frequent in infertile patients with endometriosis compared to fertile women.

ARTIGO SUBMETIDO A REPRODUCTIVE BIOMEDICINE ONLINE

PUBLICADO PARCIALMENTE NO JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

**VENCEDOR DO PREMIO LATINO-AMERICANO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA
2008**

Abstract

Objective: Our hypothesis was that polymorphisms in the FSH-R gene are more prevalent in infertile endometriotic women.

Design: Case-control study.

Setting: University Hospital.

Patients: Patients were divided into two groups: 50 infertile women with endometriosis and 51 controls fertile patients without endometriosis.

Interventions: PCR analysis was performed to study the prevalence, in both alleles, of the substitution of an asparagine (N) for a serine (S) at codon 680 and the substitution of a threonine (T) for an alanine (A) at codon 307 in the FSH receptor gene.

Main Outcome Measure: N680S and T307A polymorphisms.

Results: Among infertile endometriotic women, we found 10 homozygotic S/S and 10 homozygotic A/A. In the heterozygotic group, there were 23 N/S and 17 T/A. There were 17 patients genotypically normal N/N and 23 T/T. In the fertile control group, we found 9 homozygotic S/S and 15 A/A. In the heterozygotic, there were 25 N/S and 22 T/A. There were 17 patients with normal genotype N/N and 14 T/T. There was no statistical difference between these groups when comparing the genotypically normal and heterozygotic groups to those homozygotic for the polymorphism ($P>0.05$).

Conclusions: This pioneer study rejects the hypothetical association between endometriosis and these genetic abnormalities of the FSH receptor gene.

Keywords: Endometriosis, Infertility, FSH receptor gene, Polymorphism

Introduction

Endometriosis, endometrium-like tissue in sites outside the uterine cavity, affects between 10 and 15% of women of reproductive age (1-4). These patients have a 20% greater chance of being infertile, and 30-60% are actually infertile (2, 3, 5, 6). In 1995, some investigators reported that endometriosis was associated with infertility in almost 80% of cases (7).

The mechanism through which endometriosis causes infertility is still a matter of debate. Immunological factors and anatomical and uterine alterations have been reported as links between endometriosis and infertility (3, 6, 8). We have previously demonstrated that infertile patients with endometriosis had altered prolactin secretion (9, 10), luteal phase defect (11) and, recently, a decreased anti-Mullerian hormone level on the third menstrual day, with a heterogeneous follicular cohort (12). In other studies, endometriosis has been associated with ovulatory dysfunction, prolactin-level abnormalities and luteal-phase insufficiency (1, 13-15). Functional genetic polymorphisms in patients with endometriosis were the subject of a recent systematic review, and no single polymorphism was linked to the endometriotic patient (16).

The reproductive prognosis for infertile women with endometriosis is related to characteristics of endometriosis other than its stage (17). Al-Azemi et al. concluded that the endometriotic group required levels of higher follicle-stimulating hormone (FSH) per artificial cycle, and they required even higher levels in subsequent cycles (18). A meta-analysis indicated that endometriotic patients have a 20% lower chance of pregnancy compared to women without endometriosis, during an *in-vitro* fertilization procedure. The authors concluded that this lower chance of pregnancy was due to changes in oocyte and embryo development (19).

In addition, polymorphisms in the follicle-stimulating hormone receptor (FSH-R) gene, which modifies the signal receptor transduction, could probably be responsible for the poor ovarian response to FSH stimulation, causing infertility in women with endometriosis. Better understanding of the molecular basis in these cases could contribute to a more rational use of gonadotrophin doses and better results in the endometriotic infertile patient (19).

The gene that synthesizes FSH-R is located in chromosome 2, specifically in the region

2p21-16. This receptor belongs to the protein G group receptors (20). Polymorphisms in the FSH receptor gene can alter its functional status without interfering with FSH binding. Some polymorphisms cause a conformational intracellular change that causes biochemical alterations, while others interfere with the correct transcriptional procedures. More than 700 polymorphisms in the FSH receptor gene are described in the National Center for Biotechnology Information data center; however, only five of them are located in codifier regions (21).

FSH receptor gene polymorphisms have been related to abnormal ovarian response (22). In exon 10, there are two frequent polymorphisms in the Caucasian population: the switch of an aminoacid threonine (T) for an alanine (A) at codon 307 (T307A), and an amino acid asparagine (N) for a serine (S) at codon 680 (N680S). These polymorphisms were described as completely linked (23-25). They were studied in infertile women without endometriosis, and the authors concluded that patients who are homozygotic at both codons (alanine / alanine at 307 and serine / serine at 680) have higher FSH levels during the menstrual cycle and require increased gonadotrophin administration to induce ovulation (24, 26).

Assuming that the signal receptor transduction might be responsible for the poor ovarian response to FSH stimulation, causing infertility in women with endometriosis, the definition of the polymorphisms T307A and N580S is of ultimate importance. We conducted a case-control study to evaluate the prevalence of the follicle-stimulating hormone (FSH) gene receptor polymorphisms T307A and N580S in infertile patients with endometriosis.

Materials and Methods

Patients

For this study, peripheral blood samples were collected from infertile women with endometriosis (case) and fertile women without endometriosis (control). All patients signed an informed consent, as required by the protocol approved by the Research Ethics Committee of the University Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

The cases were 50 infertile southern-Brazilian women with laparoscopically confirmed

endometriosis, who showed no signs of pelvic inflammatory disease or anatomical abnormalities. Infertility was defined, according to the American Society of Reproductive Medicine, as the absence of pregnancy after one year of regular sexual intercourse without any contraception method. The cases also did not have any male factor, according to 1992 criteria of the World Health Organization, as a cause of their infertility. They had both ovaries, body mass indexes of 18-35 kg/m², regular menstrual cycles of 25-35 days and were up to 40 years old. Day 3 serum FSH level, thyrotropin-stimulating hormone (TSH) and prolactin were collected for cases and controls in order to exclude any endocrinological disease. Hormones were analyzed using chemiluminescence kits (Immulite Ltd, Los Angeles, CA, USA). Endometriosis was classified in 4 stages, according to the laparoscopic criteria defined and revised by the American Fertility Society (27).

Fifty-one fertile southern-Brazilian women who had undergone tubal ligation for sterilization comprised the control group. All the patients had regular menstrual cycles of 25-35 days, body mass indexes of 18-35 kg/m², no evidence of endocrinological disease and were up to 40 years old.

DNA Isolation and Detection of the Polymorphisms T307A and N680S

A volume of 5 ml was drawn from each subject, with EDTA added as an anticoagulant. Genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes with the DNAeasy® kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions.

The general conditions, described by Sudo et al., used for both polymorphisms were: 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 1X KCl buffer, 1U Taq DNA Polymerase, 20 pmols of each primer and 100 ng of DNA, in a final volume of 50 µL (24). All reagents were purchased from Invitrogen (Invitrogen, USA). All the polymerase chain reaction (PCR) reactions were performed in an Eppendorf Personal Cycler Thermocycler (Eppendorf, Germany).

RFLP analysis of the T307A variant

The T307A variant, in exon 10 of the FSH receptor gene, was detected by the nested

PCR–RFLP (PCR–restriction fragment length polymorphism) method. First, a 657 bp fragment of the FSH receptor gene was amplified by PCR, using a set of primers (5'-TCTGAGCTTCATCCAATTTGCA-3' and 5'-GGGAAAGAGGGCA GCTGCAA-3') at 58°C. This PCR product (1 µL) was further amplified by a second PCR, using another set of primers (5'-CAAATCTATTTTAAGGCAAGAAGTTGATTATATGCCTCAG-3' and 5'-GTAGATTCCAATGCAGAGATCA-3'), also at 58°C. The amplified fragment of 364 bp was digested with *Bsu36I* (New England Biolabs, USA) restriction enzyme. A mismatch nucleotide was introduced in the second PCR. This mismatch and the A to G transition create a *Bsu36I* restriction site, so that the second PCR fragment following *Bsu36I* digestion and 2.5% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide reveals three different patterns. Based on this RFLP analysis, patients were classified into three groups: *TT* (307Thr/Thr), *TA* (307Thr/Ala) and *AA* (307Ala/Ala) (Figure 1).

RFLP analysis of the N680S variant

The FSH receptor gene was amplified by PCR using genomic DNA as the template and a set of primers (5'-TTTGTGGTCATCTGTGGCTGC-3' and 5'-CAAAGGCAAGGACTGAATTATCATT-3'), which amplified a DNA fragment of 520 bp at an annealing temperature of 60°C. Since the A to G transition creates an endonuclease *BsrI* recognition site, the PCR fragment following *BsrI* digestion and 2.5% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide reveals three different patterns. Based on this RFLP analysis, patients were classified into three groups, *NN* (680Asn/Asn), *NS* (680Asn/Ser) and *SS* (680Ser/Ser) (Figure 1).

Statistical Analysis

The number of patients in each group was calculated prior to the study. There must be a total study population of 94 patients (at least 47 in each group), to attain a study power of 90%, a confidence interval of 95%, and a genetic frequency of 12% for serine / serine polymorphism at codon 680 in the general population and 41% in the case group (considering the frequency of

polymorphisms frequency reported by other authors). The Winpepi statistical package, version 1.44 was used to determine the sample size.

Descriptive statistics (mean, median and standard deviation – SD) were calculated for each quantitative variable. Statistical comparisons between the groups were performed by the chi-square test and Yates correction for 2x2 tables in qualitative variables. Student's *t* test was performed for quantitative variables. $P < 0.05$ was considered significant. The statistical tests were carried out using SPSS 14 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., USA).

Results

A total of 101 patients were enrolled in this study. There were 50 patients infertile with endometriosis, and 51 fertile women.

The demographic data evaluated for both groups, age and body-mass index (BMI), are presented in Table 1. In the infertility group, 21 (42%) patients had endometriosis stage I, 18 (36%) stage II, 4 (8%) stage III and 7 (24%) stage IV. The mean infertility time was 5.04 years (SD ± 3.25 years) with a median of 4.5 years. FSH, TSH and prolactin were within the normal range for the case and control groups.

The polymorphism A307T at exon 10 of the FSH receptor gene for the case and control groups is shown in Table 2. There was no statistically significant difference between the groups ($P = 0.80$).

The same statistical analysis was conducted for codon 680. The results for homozygotic, heterozygotic and homozygotic patients for the polymorphism N680S are shown in Table 2. We anticipated more homozygotic patients for the polymorphism in both alleles (serine / serine) in the infertile endometriotic group. Once again, the result was not statistically significant ($P = 0.96$).

Discussion

The aim of the present study was to determine if infertile patients with endometriosis had a higher prevalence of the homozygotic polymorphic genotype at codon 307 and at 680 than

control fertile women. Therefore, the current data failed to demonstrate this association.

In addition, infertile patients with endometriosis had a lower body-mass index compared to the control group. A similar proportion was reported for Korean women with severe endometriosis, stages III and IV, when compared to stage I and II, even when the result was adjusted for age, parity and menstrual factors (30). In another study, the authors concluded that women with endometriosis had lower BMI and are less-frequently obese than control groups. However, the physiopathological basis of decreased BMI in women with endometriosis is still a matter for investigation (31).

Serum FSH, serum TSH and prolactin levels were in normal ranges for both the cases and controls (data not shown). With respect to normal menstrual cycle duration, our study group was homogeneous and had no endocrinological pathology.

Functional genetic polymorphisms have been studied in endometriotic patients. A recent systematic review of these studies found no consistent evidence linking endometriosis with specific polymorphisms in genes encoding inflammatory mediators, proteins involved in sex steroid metabolism, vascular function or tissue remodeling. Although a number of polymorphisms have been associated with endometriosis in selected populations, the associations have not been independently confirmed. This occurred either because only single studies were carried out on these markers/genes, or because other studies reported no association.

The most solid evidence linking specific polymorphisms to endometriosis came from studies investigating glutathione-S-transferase (GSTT1), a detoxification enzyme. Carriage of the GSTT1 null deletion variant showed a consistent association with endometriosis, with a 29% greater risk. The authors concluded that, to date, the evidence of an association between genetic polymorphisms and endometriosis is weak. However, the carriage of the GSTT1 null deletion may moderately increase the risk of this disease (16). In this important study, nothing was said about endometriotic infertile women.

Some previous studies have estimated the frequency of the FSH receptor gene polymorphism, especially in infertile women. Conway et al. demonstrated no difference in the

frequency of the FSH receptor gene polymorphism at codon 680 in women with polycystic ovarian syndrome, ovarian FSH resistance or premature ovarian failure. The homozygotic genotype S/S was found in 40% of these patients (32).

In a recent study, a heterogenic group of infertile patients, who were S/S for the FSH receptor gene polymorphism, had higher FSH levels at the follicular-luteal transition. They also had a longer follicular phase, probably because of ovarian resistance to FSH (33). The polymorphisms at codon 680 were also studied in infertile women without endometriosis. The authors concluded that the homozygotic patients at this codon (S/S) required a higher gonadotrophin dosage to induce ovulation (24, 26, 28). These homozygotic patients had higher, but not statistically significant, FSH levels during the menstrual cycle. These data suggested a FSH resistance in the S/S group (26). However, a higher gonadotrophin dosage stimulated the same estradiol peak in homozygotic patients compared to heterozygotic (N/S) or genotypically normal patients (N/N) (21).

Patients included in this study had no anatomical or hormonal abnormalities or any other explanation for their infertility, except endometriosis itself. The association between endometriosis and infertility is unequivocal. In our group of endometriotic patients, their infertility could be explained by a polymorphic FSH receptor gene. The polymorphism could affect signal transduction and contribute to the patients' infertility by interfering with ovulation.

This study included a homogeneous group of patients, in contrast to other studies that investigated these polymorphisms in a heterogeneous group of patients who had many causes for their infertility. In these previous studies, there were only a few endometriotic infertile patients, and they were under-powered to draw any conclusions for this group of patients. We utilized these articles to calculate a proper number of patients who needed to be studied, in order to try to demonstrate the association of endometriosis and infertility with these polymorphisms. Therefore, our study provided robust evidence that the A307T and N680S polymorphisms are not associated with endometriotic infertile patients.

We have previously demonstrated that decreased serum estradiol levels and altered prolactin secretion after administration of thyrotrophin-releasing hormone to infertile women

with endometriosis are related to ovulatory dysfunction and infertility (10). Also, we studied the physiopathology of luteal-phase defect in infertile patients with mild/minimal endometriosis, and demonstrated that it is associated with a dysfunction of small and large luteal cells, characterized by abnormal follicular phase (lower estradiol serum levels) and lower progesterone luteal hormone-dependent secretion (34).

Moreover, studying infertile patients with moderate to severe endometriosis, we concluded that they are associated with ovulatory dysfunction, as indicated by lower levels of insulin growth factor binding protein-1 in the follicular fluid when undergoing artificial fertilization (11). Infertile patients with endometriosis were also associated with increased prolactin and luteal phase insufficiency. These alterations could partially explain their infertility (9). Furthermore, we also showed that patients with endometriosis showed lower levels of anti-Mullerian hormone and an altered follicular cohort, compared to patients without endometriosis (12).

Genetic alterations must play an important role in infertility of endometriotic women. We are carrying on studies to investigate the presence of pathological polymorphisms of other important pathways that regulate human reproduction. We are investigating the polymorphism of the luteal-hormone gene receptor and the polymorphism of the dopamine receptor. We are also focusing on the presence of an excessive inflammatory response in patients with endometriosis and infertility. Therefore, we are studying different ways to assist this group of patients with a prevalent problem, in order to develop a more rational and cost-effective way to treat women with endometriosis and infertility.

The most important problem concerning our study is the heterogeneity of clinical and laboratory findings in endometriotic patients. Even excluding some hormonal, inflammatory or anatomic cause for infertility; patients with endometriosis could present several immunologic abnormalities. Our results are robust and believable; however, we are now studying different forms of endometriosis presentation (ovarian, peritoneal, deep) to look for different SNP.

In conclusion, we have shown convincingly, in a pioneer study, that in infertile patient

with endometriosis, the polymorphisms at codon 307 and at 680 of the FSH receptor gene synthesizer are not the cause of their infertility.

References

1. Muse KN, Wilson EA. How does mild endometriosis cause infertility? *Fertil Steril* 1982;38:145-52.
2. Bancroft K, Vaughan Williams CA, Elstein M. Minimal/mild endometriosis and infertility. A review. *Br J Obstet Gynaecol* 1989;96:454-60.
3. Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis. *N Engl J Med* 1993;328:1759-69.
4. Leyendecker G, Kunz G, Noe M, Herbertz M, Mall G. Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. *Hum Reprod Update* 1998;4:752-62.
5. Kistner RW. Management of endometriosis in the infertile patient. *Fertil Steril* 1975;26:1151-66.
6. Koninckx PR. Is mild endometriosis a condition occurring intermittently in all women? *Hum Reprod* 1994;9:2202-5.
7. 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;10:3142-46.
8. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997;68:585-96.
9. Cunha-Filho JSLG, J.L.; Lemos, N.A.; Brandelli, A.; Castillos, M.; Passos, E.P. . Hyperprolactinemia And Luteal Insufficiency In Infertile Patientnts With Mild And Minimal Endometriosis. *Horm Metab Res* 2001;33:216-20.
10. 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.

11. Cunha-Filho JS, Lemos NA, Freitas FM, Kiefer K, Faller M, Passos EP. Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2003;18:423-8.
12. 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;89:1064-8.
13. Dmowski WP, Radwanska E, Binor Z, Rana N. Mild endometriosis and ovulatory dysfunction: effect of danazol treatment on success of ovulation induction. *Fertil Steril* 1986;46:784-9.
14. 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;169:676-82.
15. Haney AF. Endometriosis-associated infertility. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1993;7:791-812.
16. Tempfer CB, Simoni M, Destenaves B, Fauser BC. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part II--endometriosis. *Hum Reprod Update* 2009;15:97-118.
17. Cahill DJ, Hull MG. Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. *Hum Reprod Update* 2000;6:56-66.
18. Al-Azemi M, Bernal AL, Steele J, Gramsbergen I, Barlow D, Kennedy S. Ovarian response to repeated controlled stimulation in in-vitro fertilization cycles in patients with ovarian endometriosis. *Hum Reprod* 2000;15:72-5.
19. Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002;77:1148-55.
20. Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature* 2005;433:269-77.
21. Behre HM, Greb RR, Mempel A, Sonntag B, Kiesel L, Kaltwasser P *et al.* Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: a pharmacogenetic approach to controlled

ovarian hyperstimulation. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:451-6.

22. Gromoll J, Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:368-73.

23. Simoni M, Gromoll J, Hoppner W, Kamischke A, Krafft T, Stahle D *et al.* Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:751-5.

24. Sudo S, Kudo M, Wada S, Sato O, Hsueh AJ, Fujimoto S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Mol Hum Reprod* 2002;8:893-9.

25. Daelemans C, Smits G, de Maertelaer V, Costagliola S, Englert Y, Vassart G *et al.* Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6310-5.

26. Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3365-9.

27. . Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67:817-21.

28. de Castro F, Ruiz R, Montoro L, Perez-Hernandez D, Sanchez-Casas Padilla E, Real LM *et al.* Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 2003;80:571-6.

29. Falconer H, Andersson E, Aanesen A, Fried G. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in a population of infertile women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84:806-11.

30. Yi KW, Shin JH, Park MS, Kim T, Kim SH, Hur JY. Association of body mass index with severity of endometriosis in Korean women. *Int J Gynaecol Obstet* 2008.

31. Ferrero S, Anserini P, Remorgida V, Ragni N. Body mass index in endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;121:94-8.

32. Conway GS, Conway E, Walker C, Hoppner W, Gromoll J, Simoni M. Mutation

screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;51:97-9.

33. Greb RR, Grieshaber K, Gromoll J, Sonntag B, Nieschlag E, Kiesel L *et al.* A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4866-72.

34. 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;20:117-21.

Figure 1: The 307 and 680 polymorphisms PCR.

Two PCR reactions for polymorphism at codon 307 and one at codon 680 were carried out.

Table 1: Demographic data

Table 2: Genotypic Frequencies of the T307A Polymorphism

Table 3: Genotypic Frequencies of the N680S Polymorphism

Figure 1, Rodini et al.

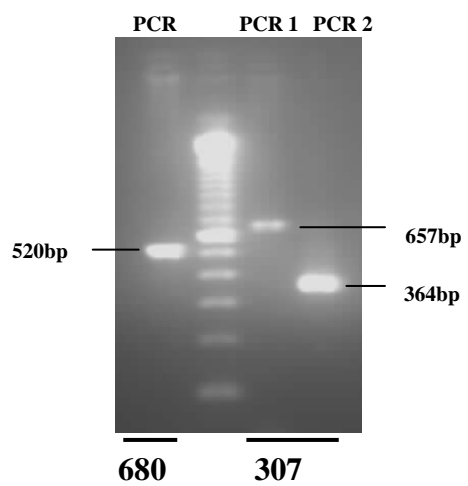


Table 1, Rodini et al.

	Cases	Controls	
	n= 50	n = 51	
	Mean (SD)	Mean (SD)	P
Age (years)	32.62 (\pm 4.37)	33.57 (\pm 5.19)	0.32
BMI (Kg /m ²)	23.14 (\pm 4.22)	25.94 (\pm 3.98)	0.001

Table 2, Rodini et al.

Polymorphism	Cases N (%)	Controls n (%)
TT	23 (46%)	14 (27%)
TA	17 (34%)	22 (43%)
AA	10 (20%)	15 (30%)

Table 3, Rodini et al.

Polymorphism	Cases N (%)	Controls n (%)
NN	17 (34%)	17 (33%)
NS	23 (45%)	25 (49%)
SS	10 (20%)	9 (18%)

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Conforme demonstrado por essa dissertação, a troca de uma asparagina por uma serina no códon 680 do éxon 10 do gene que sintetiza o receptor do FSH não é mais prevalente em pacientes inférteis com endometriose em comparação com pacientes férteis sem endometriose.

Da mesma maneira, foi avaliada a troca de uma treonina por uma alanina no éxon 10 do gene sintetizador do receptor do FSH. Através dessa criteriosa dissertação, mais uma vez a diferença entre os grupos estudados não foi estatisticamente demonstrada.

Dessa maneira, a infertilidade em pacientes com endometriose e sem alterações anatômicas que expliquem sua dificuldade de gestar não deve ser atribuída pelos polimorfismos N680S e T307A estudados ao longo dessa dissertação.

PERSPECTIVAS

Acredita-se que o prognóstico reprodutivo reservado de pacientes com endometriose estaria na dependência de alterações gênicas pobremente estudadas nesse grupo de pacientes. Assim, continuaremos procurando polimorfismos em genes ligados a reprodução humana que poderiam explicar tal dificuldade em gestar. Para isso, estaremos conduzindo pesquisas avaliando o impacto do polimorfismo da dopamina, do hormônio luteinizante e do gene que sintetiza o hormônio anti-mulleriano no prognóstico reprodutivo das pacientes com endometriose. Da mesma forma, avaliaremos o impacto do polimorfismos em fatores de crescimento, como o GDF-9 e do BMP-15 nesse grupo de pacientes.

Existem relatos da literatura correlação nos polimorfismos nos códons 370 e 680, sendo descrita a completa correlação entre heterozigose, homozigose recessiva ou dominante desses códons. Proporemos avaliação da correlação dos polimorfismos N680S e T370A em pacientes com endometriose e infertilidade, sendo essa uma avaliação pioneira na literatura mundial. Avaliando esse grupo de pacientes, proporemos também a correlação dessa associação com níveis séricos de hormônio anti-mulleriano, já que o mesmo está comprovadamente vinculado a mensuração de reserva ovariana (6).

ANEXOS

Folha de Coleta de Dados

Data __/__/__

COD _____

PROTOCOLO DE COLETA DE SANGUE EM PACIENTES EM INVESTIGAÇÃO:

GRUPO: _____

NOME: _____

IDADE: _____

PRONTUÁRIO: _____

PESO: _____ ALTURA: _____

DUM: _____

PARIDADE: G__P__C__A__E__

INFERTILIDADE (se tentativa de gestar por mais de um ano sem sucesso)

sim não

Tempo de infertilidade:

MAC:

CICLOS MENSTRUAIS: regulares irregulares Intervalo (dias): ____

HORMONAIAS: PRL _____

LH _____ FSH _____ T _____ 17 _____ DHEA _____

ACHADOS:

endometriose I II III IV

aderências pélvicas

pelve normal

cromotubagem D + - E + -

outros

COLETADO POR: _____

CENTRIFUGADO POR: _____

Dosagens	Sangue

Protocolo de Isolamento de DNA e Detecção dos Polimorfismos T307A e N680S

Coletado 5 ml de sangue periférico em tubo contendo anticoagulante EDTA. O DNA genômico foi obtido de leucócitos com Kit DNAeasy® (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

As condições usadas em ambos os polimorfismos foram: 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 1X de tampão de KCl, 1U de Taq DNA Polimerase, 20 pmols de cada primer e 100 ng de DNA, em um volume final de 50 µL. Todos os reagentes foram comprados da Invitrogen (Invitrogen, EUA). Todas as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em Eppendorf Personal Cycler Thermocycler (Eppendorf, Germany).

Análise RFLP da variante T307A

A variante T307A, no exon 10 do gene que sintetiza o receptor de FSH, foi detectada pelo método de PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism).

Primeiramente, um fragmento de 657 bp do gene que sintetiza o receptor de FSH foi amplificado por PCR, usando um jogo de primers (5'-TCTGAGCTTCATCCAATTTGCA-3' e 5'-GGGAAAGAGGGCA GCTGCAA-3') a 58°C.

Este produto de PCR (1 µL) foi posteriormente amplificado por um segundo PCR, usando outro jogo de primers (5'-CAAATCTATTTAAGGCAAGAAGTTGATTATATGCCTCAG-3' e 5'-GTAGATTCCAATGCAGAGATCA-3'), também a 58°C. O fragmento amplificado do 364 bp foi digerido por uma enzima de restrição *Bsu36I* (New England Biolabs, USA). Um nucleotídeo marcador foi introduzido no segundo PCR. Este marcador e a transição A para G criaram um local de restrição para a *Bsu36I*.

Um segundo fragmento de PCR, seguindo a digestão da *Bsu36I*, foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2,5% com bromídeo de etídio revelaram três diferentes padrões. Baseado nesta análise RFLP, os pacientes foram classificados em três grupos: *TT* (307Thr/Thr), *TA* (307Thr/Ala) e *AA* (307Ala/Ala).

Análise RFLP da variante N680S

O gene que sintetiza o receptor do FSH foi amplificado por PCR usando DNA genômico e um jogo de primers (5_-TTTGTGGTCATCTGTGGCTGC-3_ e 5_-CAAAGGCAAGGACTGAATTATCATT-3_), os quais amplificaram um fragmento de DNA de 520 pb em uma temperatura de anelamento de 60°C. A transição A para G cria uma site de reconhecimento para a endonuclease *BsrI* (New England Biolabs, USA). O fragmento resultante da digestão da *BsrI* foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2,5% com bromídeo de etídio revelando três diferentes padrões. Baseado na análise do RFLP, pacientes foram classificados em três grupos: *NN* (680Asn/Asn), *NS* (680Asn/Ser) and *SS* (680Ser/Ser).