

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas

ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DO GENE DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH) EM  
MULHERES COM ENDOMETRIOSE E INFERTILIDADE – ANÁLISE DA PREVALÊNCIA  
GÊNICA

Aluna: Carla Regina Schmitz

Orientador: João Sabino L. da Cunha-Filho

Dissertação de Mestrado

2011

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	3
<b>RESUMO</b> .....	4
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	6
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	8
<b>Aspectos gerais</b> .....	8
<b>Endometriose -Aspectos Hormonais</b> .....	10
<b>Endometriose e Insuficiência Lútea</b> .....	11
<b>Endometriose e Polimorfismos</b> .....	12
<b>Polimorfismos do LH</b> .....	13
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	16
<b>HIPÓTESE NULA</b> .....	17
<b>OBJETIVO</b> .....	18
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	19
<b>ARTIGO</b> .....	24
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	39
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

- LH: hormônio luteinizante
- Trp8Arg - Ile15Thr: troca de triptofano por arginina no códon 8 e de isoleucina por tironina no códon 15
- V-LH: hormônio luteinizante com polimorfismo Trp8Arg - Ile15Thr
- NK: células natural killer
- VLP: videolaparoscopia
- IL: interleucina
- TNF: fator de necrose tumoral
- ROS: reactive oxygen species
- HLA: *human leukocyte antigens*
- VEGF: *vascular endothelial growth factor*
- hCG: gonadotrofina coriônica humana
- FSH: hormônio folículo-estimulante
- TSH: hormônio estimulante da tireóide
- NND: *number needed to diagnosis*

## RESUMO

Endometriose é uma patologia que vem recebendo cada vez mais atenção da comunidade científica devido à importância de suas manifestações clínicas e à sua alta prevalência. Suas principais manifestações clínicas incluem dismenorréia, dispareunia, infertilidade e dor pélvica crônica. Entre mulheres inférteis, 30-60% apresentam diagnóstico de endometriose. Entre os mecanismos que envolvem a patogênese da endometriose e infertilidade, encontram-se alterações na foliculogênese, anovulação, síndrome do folículo não roto, diminuição da reserva ovariana e anormalidades de fase lútea.

Sabe-se que endometriose apresenta componente hereditário, por isso tem se buscado polimorfismos envolvidos. Como a doença está associada com defeitos na fase lútea, resolvemos estudar um polimorfismo do hormônio luteinizante (LH) nessas pacientes. O V-LH (hormônio luteinizante com polimorfismo Trp8Arg - Ile15Thr) ocorre devido à troca polimórfica de triptofano por arginina no códon 8 e de isoleucina por treonina no códon 15 (Trp8Arg e Ile15Thr) no exon 2 da subunidade  $\beta$  do LH. Esse polimorfismo acarreta aumento da bioatividade do hormônio *in vitro*, mas possui metade da meia vida do LH selvagem.

Realizamos um estudo prospectivo transversal. O grupo em estudo foi constituído por 50 mulheres inférteis com endometriose e o grupo controle por 50 mulheres férteis sem a doença. Realizou-se o diagnóstico de endometriose no grupo em estudo e excluiu-se seu diagnóstico no grupo controle durante a laparoscopia, momento no qual foi coletado sangue periférico. As mutações nos códons 8 e 15 foram analisadas por PCR. Sete (14%) pacientes no grupo de estudo e 6 pacientes no grupo controle apresentavam o polimorfismo V-LH. Essa diferença não foi estatisticamente significativa OR 1,19 (CI 95% 0,31-4,67).

Assim, apesar de endometriose e infertilidade apresentarem um componente de insuficiência lútea, o V-LH não parece fazer parte desta patogênese.

## **INTRODUÇÃO**

A associação de endometriose e infertilidade tem sido amplamente estudada (Mahutte and Arici, 2002, ASRM, 2006). Esse interesse se dá principalmente devido à alta prevalência de infertilidade, aproximadamente 9% da população (Boivin et al., 2007), à alta taxa de endometriose que as pacientes inférteis apresentam, ao redor de 30-60% (Gao et al., 2006, Moghissi, 1999), e ao alto custo psicológico (Van den Broeck et al., 2010) e financeiro do seu tratamento (Katz et al., 2011).

O nosso grupo de pesquisa, que faz parte do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, tem como uma de suas linhas de pesquisa os aspectos envolvidos na patogênese da endometriose em suas diferentes formas de manifestação clínica, como infertilidade e dor.

Sabe-se que fatores hereditários (Simpson et al., 1980, Bischoff and Simpson, 2004, Vigano et al., 2007), imunológicos (Lebovic et al., 2001, Dmowski et al., 1994, Gupta et al., 2008) e hormonais (Gupta et al., 2008, ASRM, 2006, Cahill et al., 1997, Cahill et al., 1995) estão envolvidos na patogênese da associação de endometriose e infertilidade. Em relação aos aspectos hormonais, nosso grupo já demonstrou que pacientes inférteis com endometriose apresentam hiperprolactinemia, diminuição da reserva ovariana. Além disso, nosso grupo já demonstrou que pacientes com endometriose apresentam insuficiência lútea com secreção alterada de progesterona na segunda fase do ciclo (Cunha-Filho et al., 2001, Cunha-Filho et al., 2003, Lemos et al., 2008).

O hormônio luteinizante (LH) possui papel essencial na reprodução humana (Bliss et al., 2010). Ele atua participando da foliculogênese, maturação oocitária, ovulação e luteinização (Hillier et al., 1994, Filicori, 1999, Filicori et al., 2003). Durante a fase lútea, é o LH que mantém a secreção adequada de progesterona, o que o torna fundamental para uma segunda fase adequada.

Uma variação genética comum do LH (variante V-LH) ocorre devido à troca polimórfica de duas bases na subunidade  $\beta$ , alterando a seqüência de aminoácido no exon 2. Esse polimorfismo acarreta aumento da bioatividade do hormônio in vitro, mas possui metade da meia vida do LH selvagem (Haavisto et al., 1995). Ele já foi associado a algumas patologias, entre elas a infertilidade (Takahashi et al., 1998).

O papel da hereditariedade na etiologia da endometriose fez com que se iniciasse uma busca por polimorfismos possivelmente envolvidos. Ainda que o papel genético esteja bem estabelecido, poucos polimorfismos associados foram encontrados (Montgomery et al., 2008, Tempfer et al., 2009).

Assim, sabe-se que o LH desempenha importante papel na fase lútea, e que endometriose está associada com fase lútea inadequada. Como fatores genéticos participam da patogênese da doença, buscamos um polimorfismo relacionado à alteração da função do LH para pesquisar um possível papel na associação de endometriose com infertilidade. Nosso principal objetivo é um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na infertilidade das mulheres com endometriose e a busca por tratamentos de melhor qualidade e menor custo.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Aspectos gerais

Endometriose é definida como a presença de estroma ou glândulas endometriais fora da cavidade ou musculatura uterinas. Sua prevalência gira em torno de 10-15% em pacientes na menacme (Moghissi, 1999, Gao et al., 2006), no entanto, em mulheres inférteis está presente 30-60% dos casos (Moghissi, 1999, Gao et al., 2006). Já em pacientes submetidas à ligadura tubária, apenas 5% apresentam diagnóstico de endometriose (Strathy et al., 1982). É causa de aproximadamente 1% de todas as indicações cirúrgicas ginecológicas. Estima-se que 12-32% das mulheres em idade reprodutiva e 50% das adolescentes com dor pélvica crônica que vão à laparoscopia têm endometriose (Chatman and Ward, 1982, Missmer et al., 2004a, Missmer et al., 2004b).

Como a endometriose é dependente de esteróides ovarianos, ela acomete principalmente mulheres com idade entre 25-35 anos (Olive and Schwartz, 1993). A patogênese da endometriose ainda não é completamente compreendida, mas existem algumas teorias em relação à sua etiologia. A teoria clássica de Sampson (Sampson, 1927), que atribui a etiologia da doença à menstruação retrograda, não explica por que a maior parte das mulheres que apresentam menstruação retrógrada não tem endometriose. Além disso, essa teoria explica apenas os focos peritoneais. A teoria que envolve a metaplasia celômica ajuda a explicar, por exemplo, a origem dos endometriomas e da endometriose profunda intestinal, vesical, vaginal e ureteral (Rizner, 2009). Já a disseminação vascular e linfática elucidaria a origem de focos de endometriose fora da pelve (Rizner, 2009).



Atualmente já se sabe que existem diversos fatores que contribuem com o desenvolvimento da doença como, por exemplo, a imunidade alterada. Atividade diminuída das células *Natural Killer* (NK), concentração aumentada de leucócitos e macrófagos na cavidade peritoneal, os quais secretam citocinas e fatores de crescimento vascular, doenças auto-imune, além de predisposição genética, contribuem com o desenvolvimento da doença (Oosterlynck et al., 1991, Dmowski et al., 1994, Lebovic et al., 2001, Sinaii et al., 2002, Simpson et al., 1980).

Os principais sintomas causados pela doença são dor pélvica crônica, infertilidade, dispareunia e dismenorréia. Existem outros sintomas que se apresentam conforme a localização dos focos de endometriose.

O diagnóstico pode ser sugerido pelo quadro clínico, por exames de imagem (ultrassom e ressonância nuclear magnética) ou por exames laboratoriais (CA-125 e prolactina), mas o padrão ouro ainda consiste na videolaparoscopia diagnóstica (Nacul and Spritzer, 2010, ASRM, 2006).

Como endometriose é uma doença muito heterogênia, já foram propostos diversos tipos de classificações. Hoje em dia, a classificação mais aceita foi proposta pelo ASRM (American Society for Reproductive Medicine) em uma revisão de 1996 (ASRM, 1997). A endometriose é dividida em estágios I (mínima), II (leve), III (moderada) e IV (se severa), de acordo com suas características anatômicas (visualizadas na VLP diagnóstica). Apesar de ser a classificação mais amplamente utilizada, o grau de endometriose não se correlaciona com resposta a tratamento de pacientes inférteis (ASRM, 2006, Harkki et al., 2010), nem com o grau de dor que as pacientes apresentam (Vercellini et al., 2007, Lukanova et al., 2006).

## **Endometriose -Aspectos Hormonais**

O mecanismo através do qual endometriose causa infertilidade ainda é não é completamente conhecido, mas vários aspectos dessa associação já foram estudados.

Pacientes com endometriose possuem distorção da anatomia pélvica, especialmente em estágios mais avançados (ASRM, 1997). Alterações no fluido peritoneal como aumento de volume, maior número de macrófagos ativados, maiores concentrações de Interleucina-1 (IL-1), prostaglandinas, Fator de Necrose Tumoral (TNF) e proteases causam alteração em oócito, espermatozóide, embrião e função tubária (Lebovic et al., 2001, ASRM, 2006). Alterações imunológicas no fluido folicular como aumento na concentração de linfócitos B, macrófagos, células NK e interleucinas inflamatórias, também foram estudadas (Lachapelle et al., 1996, Pellicer et al., 1998, Garrido et al., 2000, Wunder et al., 2006).

Produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species - ROS) foi evidenciada em pacientes com endometriose e infertilidade (Zeller et al., 1987). ROS aumentam o número de aderências peritoneais (Alpay et al., 2006), causam danos ao DNA celular e mitocondrial, e possivelmente alteram foliculogênese e qualidade oocitária (Gupta et al., 2008). Além disso, ROS podem causar danos estruturais aos espermatozoides e prejudicar a reação acrossômica (Baker and Aitken, 2004). As células da granulosa dessas pacientes parecem estar com sua função alterada, o que também acarreta prejuízo à fertilidade (Saito et al., 2002, Toya et al., 2000).

Além das alterações imunológicas envolvidas na patogênese da infertilidade relacionada com endometriose, sabe-se que anormalidades ovulatórias e endócrinas estão envolvidas nesse

processo. A foliculogênese dessas pacientes é alterada, pois apresentam crescimento folicular mais lento e folículo dominante de menor tamanho (Doody et al., 1988, Tummon et al., 1988, Cahill et al., 1997). Um estudo com 350 pacientes e outro com 96, relacionaram endometriose com taxas aumentadas de anovulação (Soules et al., 1976, Arumugam et al., 1989). A síndrome do folículo não roto foi evidenciada em trabalhos experimentais em macacos (Schenken et al., 1984) e em ratos (Moon et al., 1993) com endometriose, bem como em um estudo com 47 pacientes com endometriose e infertilidade (Mio et al., 1992).

As pacientes com endometriose apresentam diminuição da reserva ovariana, mas não se sabe o quanto disso deve ser atribuído a seqüela iatrogênica de cirurgias prévias (Mahutte and Arici, 2002) . Anormalidades de fase lútea (Grant, 1966, Cheesman et al., 1983, Brosens et al., 1978), diminuição nas concentrações de LH durante seu pico (Cahill et al., 1995) e de progesterona na segunda fase (Cahill and Hull, 2000) também foram encontradas nessas pacientes.

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que essa doença está associada com diminuição da reserva ovariana, hiperprolactinemia e insuficiência lútea, com subsequente alteração no padrão de secreção de progesterona na segunda fase do ciclo menstrual (Lemos et al., 2008, Cunha-Filho et al., 2001, Cunha-Filho et al., 2003).

## **Endometriose e Insuficiência Lútea**

A relação de endometriose e infertilidade com alterações de fase lútea foi verificada em diversos estudos. Brosens et al realizou um dos primeiros trabalhos envolvendo essa associação com 34 pacientes em 1978 (Brosens et al., 1978). Um dos achados deste trabalho foi que no primeiro dia após o pico de LH não houve o aumento esperado de progesterona em pacientes com

endometriose. Em 1986 Williams et al também mostrou que pacientes com endometriose possuem alteração no padrão de secreção de progesterona na segunda fase do ciclo menstrual (Williams et al., 1986). Em um estudo com 22 pacientes com pacientes inférteis apresentando endometriose mínima e leve, 82% apresentaram alteração na fase lútea e alterações na secreção de progesterona (Bancroft et al., 1992). Outro estudo realizado com pacientes inférteis com endometriose mostrou alteração no padrão de secreção de progesterona e endométrio fora de fase (com atraso) na fase lútea dessas pacientes (Cheesman et al., 1983).

Matorras et al e Kusuhara não encontraram associação de anormalidades da fase lútea e endometriose, mas ambos os trabalhos utilizaram pacientes inférteis como controle (Matorras et al., 1996, Kusuhara, 1992). Pacientes inférteis podem apresentar disfunções ovarianas intrínsecas e podem não ser um controle adequado para este tipo de estudo.

Nosso grupo estudou associação de anormalidades de fase lútea em pacientes inférteis com endometriose mínima e leve em 2002. Foi encontrada disfunção lútea evidenciada por baixos níveis séricos de estradiol na fase folicular precoce e secreção diminuída de progesterona na fase lútea tardia (Cunha-Filho et al., 2003).

## **Endometriose e Polimorfismos**

Hoje em dia, a busca por associações entre genética e patologias é cada vez mais comum. Essas associações podem ajudar na identificação e caracterização de fatores de risco ou proteção, e conseqüentemente melhorar o entendimento da etiologia e da patogênese de doenças (Little et al., 2009).

O papel da hereditariedade no desenvolvimento da endometriose foi evidenciado em diversos trabalhos (Bischoff and Simpson, 2004, Zondervan et al., 2004, Simpson et al., 1980, Treloar et al., 2002, Vigano et al., 2007). Em decorrência disto, a endometriose se tornou foco de diversos estudos buscando associação da doença com polimorfismos (Montgomery et al., 2008, Tempfer et al., 2009).

Os polimorfismos mais estudados foram aqueles relacionados com aspectos conhecidos da patogênese da endometriose, como, por exemplo, polimorfismos relacionados a inflamação (Montgomery et al., 2008).

Recentemente, Tempfer et al (Tempfer et al., 2009) revisou 114 estudos envolvendo polimorfismos e endometriose. Foram revisados polimorfismos envolvendo mediadores inflamatórios (citocinas, óxido nítrico e HLA), atividade dos hormônios sexuais (receptor de estrogênio, progesterona e androgênio), enzimas metabólicas (enzimas envolvidas em detoxificação), regulação da função vascular e remodelamento tecidual (VEGF, angiotensina, metaloproteinase), entre outros. O único achado considerado significativo foi a deleção de GSTTI, envolvida com as enzimas da fase II de detoxificação.

Existem outros polimorfismos que também apresentaram associação com endometriose, mas apenas em populações selecionadas (Tempfer et al., 2009).

## **Polimorfismos do LH**

O LH é um membro da família de hormônios glicoprotéicos que inclui hCG, FSH e TSH. Esses hormônios são todos  $\alpha/\beta$  heterodímeros com uma subunidade-alfa em comum e uma subunidade-beta única, produzidos na hipófise anterior. A subunidade- $\beta$  confere especificidade biológica.

O LH tem papel essencial na reprodução humana (Bliss et al., 2010), participando da foliculogênese, maturação oocitária, ovulação e luteinização (Hillier et al., 1994, Filicori, 1999, Filicori et al., 2003). Durante a fase lútea, é o LH que mantém a secreção adequada de progesterona, o que o torna fundamental para uma segunda fase adequada.

Polimorfismos que afetam a função hormonal das gonadotropinas têm sido amplamente estudados (Nagirnaja et al., 2010). A variação mais estudada do LH (V-LH) ocorre devido à troca polimórfica de duas bases no exon 2 da subunidade  $\beta$ . Essas trocas ocorrem nos códons 8 e 15. No códon 8 há uma troca de triptofano por arginina e no códon 15 de uma isoleucina por uma tironina (Trp8Arg e Ile15Thr). Esse polimorfismo acarreta aumento da bioatividade do hormônio in vitro, mas possui metade da meia vida do LH selvagem (Haavisto et al., 1995).

A frequência de V-LH varia de acordo com a população estudada (Nilsson et al., 1997). Na Finlândia, 27,7% da população possui o polimorfismo (somando-se heterozigotos e homozigotos). Em regiões próximas da Finlândia foi encontrada frequência ao redor de 20%, e em outras regiões da Europa 14%. Nos Estados Unidos a frequência encontrada foi de 14,7%.

Takahashi et al estudou 97 pacientes inférteis e encontrou correlação entre a variante V-LH e distúrbios ovulatórios, hiperprolactinemia e insuficiência lútea (Takahashi et al., 1998). Outro estudo também mostrou relação com falência ovariana precoce (Takahashi et al., 1999). Um estudo recente com 60 pacientes submetidas a tratamento com FIV apontou um possível papel do V-LH na resistência ovariana ao FSH recombinante (Alviggi et al., 2009). Ainda é controversa a relação entre o polimorfismo e síndrome dos ovários policísticos (Elter et al., 1999, Rajkhowa et al., 1995, Tapanainen et al., 1999). Lamminen et al sugeriu que a variante V-LH estimularia menor produção de estrogênio pelo ovário, uma vez que o diagnóstico de câncer de mama nessas

pacientes costuma ser em média 4 anos mais tarde do que aquelas com LH selvagem (Lamminen and Huhtaniemi, 2001). Em um estudo com 49 meninos saudáveis, o polimorfismo se correlacionou com maior tempo necessário para desenvolvimento puberal (Raivio et al., 1996). Em um estudo com 85 pacientes com endometriose não foi encontrada correlação entre endometriose e V-LH (Gazvani et al., 2002). Nesse estudo, as pacientes foram recrutadas quando submetidas à videolaparoscopia para investigação de infertilidade. No entanto, o critério para considerar as pacientes inférteis, outras causas para infertilidade, estágios de endometriose e status hormonal das pacientes não foi elucidado no artigo.

Outra variante comum do gene LH $\beta$  é o polimorfismo G1502A, localizado no exon 3, que resulta na substituição de serina por glicina na posição 102. Esse polimorfismo também parece estar relacionado com infertilidade masculina (Ramanujam et al., 2000) além de estar envolvido com infertilidade associada com endometriose (Mafra et al., 2010).

## **JUSTIFICATIVA**

A prevalência de infertilidade, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, gira ao redor de 9%, sendo que destes, 56% buscam tratamento médico (Boivin et al., 2007). Entre as mulheres inférteis 30-60%, apresentam diagnóstico de endometriose (Moghissi, 1999, Gao et al., 2006). Um estudo recente realizado nos Estados Unidos mostrou que o tratamento de casais inférteis com desfecho gravidez/nascimento custa algo ao redor de 61.000 dólares (Katz et al., 2011). Levando-se então em consideração estes dados, o melhor entendimento da associação endometrioses/infertilidade é importante, e pode fazer com que surja um tratamento de melhor qualidade e menor custo.



## **HIPÓTESE NULA**

Pacientes com endometriose e infertilidade não apresentam prevalência maior dos polimorfismos Trp8Arg e Ile15Thr da subunidade  $\beta$  do gene do LH, em comparação com pacientes férteis sem endometriose.

## **OBJETIVO**

Comparar a frequência dos polimorfismos do gene do LH (Trp8Arg e Ile15Thr) da subunidade  $\beta$  em mulheres inférteis com endometriose com mulheres férteis sem endometriose.

## BIBLIOGRAFIA

- ALPAY, Z., SAED, G. M. & DIAMOND, M. P. 2006. Female infertility and free radicals: potential role in adhesions and endometriosis. *J Soc Gynecol Investig*, 13, 390-8.
- ALVIGGI, C., CLARIZIA, R., PETERSSON, K., MOLLO, A., HUMAIDAN, P., STRINA, I., COPPOLA, M., RANIERI, A., D'UVA, M. & DE PLACIDO, G. 2009. Suboptimal response to GnRHa long protocol is associated with a common LH polymorphism. *Reprod Biomed Online*, 18, 9-14.
- ARUMUGAM, K., MAHMOOD, T. A. & KONG, Y. F. 1989. The association of anovulation and endometriosis in the infertile female. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 29, 350-1.
- ASRM 1997. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*, 67, 817-21.
- ASRM 2006. Endometriosis and infertility. *Fertil Steril*, 86, S156-60.
- ASRM 2008. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*, 90, S60.
- BAKER, M. A. & AITKEN, R. J. 2004. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol*, 216, 47-54.
- BANCROFT, K., VAUGHAN WILLIAMS, C. A. & ELSTEIN, M. 1992. Pituitary-ovarian function in women with minimal or mild endometriosis and otherwise unexplained infertility. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 36, 177-81.
- BARNHART, K., DUNSMOOR-SU, R. & COUTIFARIS, C. 2002. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 77, 1148-55.
- BISCHOFF, F. & SIMPSON, J. L. 2004. Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 18, 219-32.
- BLISS, S. P., NAVRATIL, A. M., XIE, J. & ROBERSON, M. S. 2010. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol*, 31, 322-40.
- BOIVIN, J., BUNTING, L., COLLINS, J. A. & NYGREN, K. G. 2007. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, 22, 1506-12.
- BROSENS, I. A., KONINCKX, P. R. & CORVELEYN, P. A. 1978. 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*, 85, 246-50.
- CAHILL, D. J. & HULL, M. G. 2000. Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. *Hum Reprod Update*, 6, 56-66.
- CAHILL, D. J., WARDLE, P. G., MAILE, L. A., HARLOW, C. R. & HULL, M. G. 1995. Pituitary-ovarian dysfunction as a cause for endometriosis-associated and unexplained infertility. *Hum Reprod*, 10, 3142-46.
- CAHILL, D. J., WARDLE, P. G., MAILE, L. A., HARLOW, C. R. & HULL, M. G. 1997. Ovarian dysfunction in endometriosis-associated and unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet*, 14, 554-7.
- CHATMAN, D. L. & WARD, A. B. 1982. Endometriosis in adolescents. *J Reprod Med*, 27, 156-60.
- CHEESMAN, K. L., CHEESMAN, S. D., CHATTERTON, R. T., JR. & COHEN, M. R. 1983. Alterations in progesterone metabolism and luteal function in infertile women with endometriosis. *Fertil Steril*, 40, 590-5.
- CUNHA-FILHO, J. S., GROSS, J. L., BASTOS DE SOUZA, C. A., LEMOS, N. A., GIUGLIANI, C., FREITAS, F. & PASSOS, E. P. 2003. Physiopathological aspects of corpus luteum defect in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *J Assist Reprod Genet*, 20, 117-21.

- CUNHA-FILHO, J. S., GROSS, J. L., LEMOS, N. A., BRANDELLI, A., CASTILLOS, M. & PASSOS, E. P. 2001. Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis. *Horm Metab Res*, 33, 216-20.
- DMOWSKI, W. P., GEBEL, H. M. & BRAUN, D. P. 1994. The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl*, 159, 7-14.
- DOODY, M. C., GIBBONS, W. E. & BUTTRAM, V. C., JR. 1988. Linear regression analysis of ultrasound follicular growth series: evidence for an abnormality of follicular growth in endometriosis patients. *Fertil Steril*, 49, 47-51.
- ELTER, K., EREL, C. T., CINE, N., OZBEK, U., HACIHANEFIOGLU, B. & ERTUNGEALP, E. 1999. Role of the mutations Trp8 => Arg and Ile15 => Thr of the human luteinizing hormone beta-subunit in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 71, 425-30.
- FERRERO, S., ANSERINI, P., REMORGIDA, V. & RAGNI, N. 2005. Body mass index in endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 121, 94-8.
- FILICORI, M. 1999. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril*, 71, 405-14.
- FILICORI, M., COGNIGNI, G. E., POCOGNOLI, P., CIAMPAGLIA, W. & BERNARDI, S. 2003. Current concepts and novel applications of LH activity in ovarian stimulation. *Trends Endocrinol Metab*, 14, 267-73.
- GAO, X., OUTLEY, J., BOTTEMAN, M., SPALDING, J., SIMON, J. A. & PASHOS, C. L. 2006. Economic burden of endometriosis. *Fertil Steril*, 86, 1561-72.
- GARRIDO, N., NAVARRO, J., REMOHI, J., SIMON, C. & PELLICER, A. 2000. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update*, 6, 67-74.
- GAZVANI, R., PAKARINEN, P., FOWLER, P., LOGAN, S. & HUHTANIEMI, I. 2002. Lack of association of the common immunologically anomalous LH with endometriosis. *Hum Reprod*, 17, 1532-4.
- GRANT, A. 1966. Additional sterility factors in endometriosis. *Fertil Steril*, 17, 514-9.
- GUPTA, S., GOLDBERG, J. M., AZIZ, N., GOLDBERG, E., KRAJCIR, N. & AGARWAL, A. 2008. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril*, 90, 247-57.
- HAAVISTO, A. M., PETTERSSON, K., BERGENDAHL, M., VIRKAMAKI, A. & HUHTANIEMI, I. 1995. Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 80, 1257-63.
- HARKKI, P., TIITINEN, A. & YLIKORKALA, O. 2010. Endometriosis and assisted reproduction techniques. *Ann N Y Acad Sci*, 1205, 207-13.
- HEDIGER, M. L., HARTNETT, H. J. & LOUIS, G. M. 2005. Association of endometriosis with body size and figure. *Fertil Steril*, 84, 1366-74.
- HILLIER, S. G., WHITELAW, P. F. & SMYTH, C. D. 1994. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol*, 100, 51-4.
- KATZ, P., SHOWSTACK, J., SMITH, J. F., NACHTIGALL, R. D., MILLSTEIN, S. G., WING, H., EISENBERG, M. L., PASCH, L. A., CROUGHAN, M. S. & ADLER, N. 2011. Costs of infertility treatment: results from an 18-month prospective cohort study. *Fertil Steril*, 95, 915-21.
- KUSUHARA, K. 1992. Luteal function in infertile patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 167, 274-7.
- LACHAPELLE, M. H., HEMMINGS, R., ROY, D. C., FALCONE, T. & MIRON, P. 1996. Flow cytometric evaluation of leukocyte subpopulations in the follicular fluids of infertile patients. *Fertil Steril*, 65, 1135-40.
- LAMMINEN, T. & HUHTANIEMI, I. 2001. A common genetic variant of luteinizing hormone; relation to normal and aberrant pituitary-gonadal function. *Eur J Pharmacol*, 414, 1-7.

- LEBOVIC, D. I., MUELLER, M. D. & TAYLOR, R. N. 2001. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*, 75, 1-10.
- LEMOS, N. A., ARBO, E., SCALCO, R., WEILER, E., ROSA, V. & CUNHA-FILHO, J. S. 2008. Decreased anti-Mullerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril*, 89, 1064-8.
- LITTLE, J., HIGGINS, J. P., IOANNIDIS, J. P., MOHER, D., GAGNON, F., VON ELM, E., KHOURY, M. J., COHEN, B., DAVEY-SMITH, G., GRIMSHAW, J., SCHEET, P., GWINN, M., WILLIAMSON, R. E., ZOU, G. Y., HUTCHINGS, K., JOHNSON, C. Y., TAIT, V., WIENS, M., GOLDING, J., VAN DUIJN, C., MCLAUGHLIN, J., PATERSON, A., WELLS, G., FORTIER, I., FREEDMAN, M., ZECEVIC, M., KING, R., INFANTE-RIVARD, C., STEWART, A. F. & BIRKETT, N. 2009. Strengthening the reporting of genetic association studies (STREGA): an extension of the strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement. *J Clin Epidemiol*, 62, 597-608 e4.
- LUKANOVA, M., POPOV, I. & VELKOVA, A. 2006. [Pain profile of women with endometriosis and chronic pelvic pain-determining factors and significance]. *Akush Ginekol (Sofiia)*, 45, 14-21.
- MAFRA, F. A., BIANCO, B., CHRISTOFOLINI, D. M., SOUZA, A. M., ZULLI, K. & BARBOSA, C. P. 2010. Luteinizing hormone beta-subunit gene (LHbeta) polymorphism in infertility and endometriosis-associated infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 151, 66-9.
- MAHUTTE, N. G. & ARICI, A. 2002. New advances in the understanding of endometriosis related infertility. *J Reprod Immunol*, 55, 73-83.
- MAIORANA, A., CICERONE, C., NICETA, M. & ALIO, L. 2007. Evaluation of serum CA 125 levels in patients with pelvic pain related to endometriosis. *Int J Biol Markers*, 22, 200-2.
- MATORRAS, R., RODRIGUEZ, F., PEREZ, C., PIJOAN, J. I., NEYRO, J. L. & RODRIGUEZ-ESCUADERO, F. J. 1996. Infertile women with and without endometriosis: a case control study of luteal phase and other infertility conditions. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 75, 826-31.
- MIO, Y., TODA, T., HARADA, T. & TERAOKAWA, N. 1992. Luteinized unruptured follicle in the early stages of endometriosis as a cause of unexplained infertility. *Am J Obstet Gynecol*, 167, 271-3.
- MISSMER, S. A., HANKINSON, S. E., SPIEGELMAN, D., BARBIERI, R. L., MALSPEIS, S., WILLETT, W. C. & HUNTER, D. J. 2004a. Reproductive history and endometriosis among premenopausal women. *Obstet Gynecol*, 104, 965-74.
- MISSMER, S. A., HANKINSON, S. E., SPIEGELMAN, D., BARBIERI, R. L., MARSHALL, L. M. & HUNTER, D. J. 2004b. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am J Epidemiol*, 160, 784-96.
- MOGHISSI, K. S. 1999. Medical treatment of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol*, 42, 620-32.
- MONTGOMERY, G. W., NYHOLT, D. R., ZHAO, Z. Z., TRELOAR, S. A., PAINTER, J. N., MISSMER, S. A., KENNEDY, S. H. & ZONDERVAN, K. T. 2008. The search for genes contributing to endometriosis risk. *Hum Reprod Update*, 14, 447-57.
- MOON, C. E., BERTERO, M. C., CURRY, T. E., LONDON, S. N., MUSE, K. N., SHARPE, K. L. & VERNON, M. W. 1993. The presence of luteinized unruptured follicle syndrome and altered folliculogenesis in rats with surgically induced endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 169, 676-82.
- NACUL, A. P. & SPRITZER, P. M. 2010. [Current aspects on diagnosis and treatment of endometriosis]. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 32, 298-307.
- NAGIRNAJA, L., RULL, K., UUSKULA, L., HALLAST, P., GRIGOROVA, M. & LAAN, M. 2010. Genomics and genetics of gonadotropin beta-subunit genes: Unique FSHB and duplicated LHB/CGB loci. *Mol Cell Endocrinol*, 329, 4-16.
- NILSSON, C., PETTERSSON, K., MILLAR, R. P., COERVER, K. A., MATZUK, M. M. & HUHTANIEMI, I. T. 1997. Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research. International Collaborative Research Group. *Fertil Steril*, 67, 998-1004.

- OLIVE, D. L. & SCHWARTZ, L. B. 1993. Endometriosis. *N Engl J Med*, 328, 1759-69.
- OOSTERLYNCK, D. J., CORNILLIE, F. J., WAER, M., VANDEPUTTE, M. & KONINCKX, P. R. 1991. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril*, 56, 45-51.
- PELLICER, A., ALBERT, C., MERCADER, A., BONILLA-MUSOLES, F., REMOHI, J. & SIMON, C. 1998. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril*, 70, 425-31.
- RAIVIO, T., HUHTANIEMI, I., ANTTILA, R., SIIMES, M. A., HAGENAS, L., NILSSON, C., PETERSSON, K. & DUNKEL, L. 1996. The role of luteinizing hormone-beta gene polymorphism in the onset and progression of puberty in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 3278-82.
- RAJKHOWA, M., TALBOT, J. A., JONES, P. W., PETERSSON, K., HAAVISTO, A. M., HUHTANIEMI, I. & CLAYTON, R. N. 1995. Prevalence of an immunological LH beta-subunit variant in a UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 43, 297-303.
- RAMANUJAM, L. N., LIAO, W. X., ROY, A. C. & NG, S. C. 2000. Association of molecular variants of luteinizing hormone with male infertility. *Hum Reprod*, 15, 925-8.
- RIZNER, T. L. 2009. Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Mol Cell Endocrinol*, 307, 8-18.
- SAITO, H., SEINO, T., KANEKO, T., NAKAHARA, K., TOYA, M. & KURACHI, H. 2002. Endometriosis and oocyte quality. *Gynecol Obstet Invest*, 53 Suppl 1, 46-51.
- SAMPSON, J. A. 1927. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol*, 3, 93-110 43.
- SCHENKEN, R. S., ASCH, R. H., WILLIAMS, R. F. & HODGEN, G. D. 1984. Etiology of infertility in monkeys with endometriosis: luteinized unruptured follicles, luteal phase defects, pelvic adhesions, and spontaneous abortions. *Fertil Steril*, 41, 122-30.
- SIMPSON, J. L., ELIAS, S., MALINAK, L. R. & BUTTRAM, V. C., JR. 1980. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol*, 137, 327-31.
- SINAI, N., CLEARY, S. D., BALLWEG, M. L., NIEMAN, L. K. & STRATTON, P. 2002. High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis. *Hum Reprod*, 17, 2715-24.
- SOULES, M. R., MAKINAK, L. R., BURY, R. & POINDEXTER, A. 1976. Endometriosis and anovulation: a coexisting problem in the infertile female. *Am J Obstet Gynecol*, 125, 412-7.
- STRATHY, J. H., MOLGAARD, C. A., COULAM, C. B. & MELTON, L. J., 3RD 1982. Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. *Fertil Steril*, 38, 667-72.
- TAKAHASHI, K., KURIOKA, H., OZAKI, T., KANASAKI, H., KOHSAKA, M., MIYAZAKI, K. & KARINO, K. 1998. Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in Japanese infertility patients. *Hum Reprod*, 13, 3338-44.
- TAKAHASHI, K., OZAKI, T., OKADA, M., KURIOKA, H., KANASAKI, H. & MIYAZAKI, K. 1999. Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 71, 96-101.
- TAPANAINEN, J. S., KOIVUNEN, R., FAUSER, B. C., TAYLOR, A. E., CLAYTON, R. N., RAJKOWA, M., WHITE, D., FRANKS, S., ANTTILA, L., PETERSSON, K. S. & HUHTANIEMI, I. T. 1999. A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: the genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 1711-5.
- TEMPFER, C. B., SIMONI, M., DESTENAVES, B. & FAUSER, B. C. 2009. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part II--endometriosis. *Hum Reprod Update*, 15, 97-118.

- TOYA, M., SAITO, H., OHTA, N., SAITO, T., KANEKO, T. & HIROI, M. 2000. Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*, 73, 344-50.
- TRELOAR, S., HADFIELD, R., MONTGOMERY, G., LAMBERT, A., WICKS, J., BARLOW, D. H., O'CONNOR, D. T. & KENNEDY, S. 2002. The International Endogene Study: a collection of families for genetic research in endometriosis. *Fertil Steril*, 78, 679-85.
- TUMMON, I. S., MACLIN, V. M., RADWANSKA, E., BINOR, Z. & DMOWSKI, W. P. 1988. Occult ovulatory dysfunction in women with minimal endometriosis or unexplained infertility. *Fertil Steril*, 50, 716-20.
- VAN DEN BROECK, U., D'HOOGE, T., ENZLIN, P. & DEMYTTENAERE, K. 2010. Predictors of psychological distress in patients starting IVF treatment: infertility-specific versus general psychological characteristics. *Hum Reprod*, 25, 1471-80.
- VERCELLINI, P., FEDELE, L., AIMI, G., PIETROPAOLO, G., CONSONNI, D. & CROSIGNANI, P. G. 2007. Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients. *Hum Reprod*, 22, 266-71.
- VIGANO, P., SOMIGLIANA, E., VIGNALI, M., BUSACCA, M. & BLASIO, A. M. 2007. Genetics of endometriosis: current status and prospects. *Front Biosci*, 12, 3247-55.
- WILLIAMS, C. A., OAK, M. K. & ELSTEIN, M. 1986. Cyclical gonadotrophin and progesterone secretion in women with minimal endometriosis. *Clin Reprod Fertil*, 4, 259-68.
- WUNDER, D. M., MUELLER, M. D., BIRKHAUSER, M. H. & BERSINGER, N. A. 2006. Increased ENA-78 in the follicular fluid of patients with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 85, 336-42.
- ZELLER, J. M., HENIG, I., RADWANSKA, E. & DMOWSKI, W. P. 1987. Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 13, 78-82.
- ZONDERVAN, K. T., WEEKS, D. E., COLMAN, R., CARDON, L. R., HADFIELD, R., SCHLEFFLER, J., TRAINOR, A. G., COE, C. L., KEMNITZ, J. W. & KENNEDY, S. H. 2004. Familial aggregation of endometriosis in a large pedigree of rhesus macaques. *Hum Reprod*, 19, 448-55.

## **ARTIGO**

O artigo está formatado para submissão na revista Reproductive BioMedicine Online

Os resultados foram apresentados como tema livre oral no 4th SGI International Summit meeting on PCOS • Endometriosis • Menopause realizado em Belo Horizonte, Brasil, 17-18 de maio de 2011



## **A common luteinizing hormone $\beta$ subunit polymorphism is not associated to endometriosis and infertility**

CR Schmitz<sup>a,\*</sup>, CAB de Souza<sup>b</sup>, VK Genro<sup>b</sup>, U Matte<sup>c</sup>, E de Conto<sup>c</sup>, JS Cunha-Filho<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Medical Clinics of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>b</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>c</sup>Terapia Genica Research Unit, Research Center of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil;

\* Corresponding author. E-mail address: crschmitz@gmail.com (CR Schmitz).

### **Abstract**

This study evaluated whether luteinizing hormone (LH)  $\beta$  subunit polymorphism (Trp8Arg and Ile15Thr) prevalence was higher in patients with endometriosis and infertility than in healthy fertile patients. We designed a cross-sectional prospective study of 50 patients with endometriosis and infertility (study group) and 50 healthy fertile patients (control group). All patients were submitted to laparoscopic surgery, study group for infertility investigation and control group for tubal ligation. FSH and LH were not different, however CA-125 was higher in the study group. Nucleotide mutations within codons 8 and 15 in the LH  $\beta$  gene (Trp8Arg and Ile15Thr) were analyzed with PCR. Seven (14%) patients in study group and 6 (12%) patients in control group had V-LH. This difference was not statistically significant, OR 1.19 (CI 95% 0.31-4.67). There is an association between endometriosis and infertility, and corpus luteum defect, however, V-LH apparently does not participate in this process.

**Key words:** endometriosis, infertility, V-LH polymorphism, luteal phase defect.

## **Introduction**

Endometriosis is a common disease that affects approximately 10-15% of premenopausal women (Gao et al., 2006, Moghissi, 1999). Among infertile patients the prevalence is about 30-60% (Moghissi, 1999, Gao et al., 2006). Clinical manifestations of endometriosis usually include dyspareunia, dysmenorrhea, chronic pelvic pain and infertility.

Endometriosis pathogenesis is not fully understood, but it is already known that it involves hormonal, genetics and immunologic factors. Altered immunology in peritoneal fluid such as increased activated pelvic macrophages and increased concentration of inflammatory cytokines, as well as altered follicular fluid had already been studied (Dmowski et al., 1994, Lebovic et al., 2001, Sinaii et al., 2002, Gupta et al., 2008).

Endocrine disorders like altered folliculogenesis, ovulatory disorders and luteal phase abnormalities had also been studied (Doody et al., 1988, Gupta et al., 2008, Cheesman et al., 1983). Our research group demonstrated that this disease is associated with hyperprolactinaemia, diminished ovarian reserve and luteal insufficiency with a subsequent altered pattern of progesterone secretion in menstrual cycle second phase (Cunha-Filho et al., 2003, Cunha-Filho et al., 2001, Lemos et al., 2008).

Luteinizing hormone (LH) has an important role in folliculogenesis, oocyte maturation, ovulation, and luteinization (Hillier et al., 1994, Filicori, 1999, Filicori et al., 2003), so that its dysfunction contributes to infertility (Bliss et al., 2010). During luteal phase, LH maintains adequate progesterone secretion, making it fundamental for an adequate second phase. LH is an  $\alpha/\beta$  heterodimer, and it's the  $\beta$  subunit that confers its biologic specificity. A common genetic

variant of LH (V-LH) is characterized by two point mutations in exon 2 of  $\beta$  subunit gene, with two amino acid replacements, Trp8Arg and Ile15Thr. It is a single nucleotide polymorphism (SNP), which has an increased *in vitro* bioactivity and a decreased half-time *in vivo* (Haavisto et al., 1995). V-LH has been associated with ovulatory disorders, hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients (Takahashi et al., 1998).

Heritability plays an important role in endometriosis development, which is supported by a number of different studies (Simpson et al., 1980, Bischoff and Simpson, 2004, Treloar et al., 2002, Vigano et al., 2007). Because of this, association of a large number of polymorphisms and endometriosis have been investigated, but only a few have shown a real linkage (Montgomery et al., 2008, Tempfer et al., 2009).

Therefore, LH has an important role in ovulatory function, especially in luteal phase. As infertility caused by endometriosis is related to luteal insufficiency, LH polymorphism could have a role in this pathogenesis. The aim of this study is to verify this possible relation between V-LH polymorphism, endometriosis and infertility.

## **Materials and Methods**

### *Design*

This is a prospective cross-sectional study performed in Gynecologic Department of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### *Subjects*

Fifty patients with endometriosis and infertility (study group) and fifty healthy fertile patients (control group) were recruited between July 2009 and November 2010 to take part in the study. Diagnosis of infertility was considered when the couple had not conceived after 12 months of contraceptive-free intercourse (ASRM, 2008). All study group patients were submitted to laparoscopic surgery for investigation of infertility and had endometriosis diagnosed. Endometriosis degree was classified according to revised American Society for Reproductive Medicine (ASRM, 1997). Control group was formed by patients submitted to laparoscopic tubal ligation. They had endometriosis diagnosis excluded (laparoscopy) and previous history of normal fertility.

All patients had regular menstrual cycles, presence of both ovaries and no endocrine disorder. The infertile couples had normal sperm analysis. This study was approved by the local ethics committee and a written informed consent was obtained prior to the blood sample collection (IRB equivalent).

### *Hormonal assays*

On the early follicular phase (cycle day 3), we collected a blood sample to measure FSH (Follicle Stimulating Hormone), LH, Ca-125 and prolactin levels (pool). All samples were centrifuged at 2500 rpm for separation of plasma, which was frozen for later analysis. Hormones were analyzed using chemiluminescence kits (Immulite). The largest inter and intra-kit variation was 6.1 and 6.5% for FSH; 6.5 and 5.3% for LH; 2.0 and 1.7% for Ca-125.

### *Detection of Trp8Arg e Ila15Thr mutations in LHβ gene*

Blood samples were collected in EDTA through venipuncture and DNA was extracted with commercial kit Easy DNA (Invitrogen). Exon 2 of LHB gene was amplified as described by Elter et al (Elter et al., 1999), using primers F1 (5 GAAGCAGTGTCCCTTGTCCTCA 3) and R1 (5 GAAGAGGAGGCCTGAGAGTT 3), and annealing temperature of 62°C. Amplification was confirmed by electrophoresis in 1.5% agarose gel. The amplified fragment was sequenced in ABI 3100 (Life Technologies) using BigDye Terminator v.3.0 (Life Technologies). The results were compared with the reference sequence from GenBank (NCBI) under accession number XXX.

### *Statistical Analysis*

The statistical analysis was carried out using the SPSS 12.0 software. The measure of central tendency used was the mean and the measure of variability was the standard deviation (SD). Medians and minimum-maximum values were used when normality of data distribution could not be ascertained. Categorical variables in the 2 groups were compared using the 2-sided Pearson Chi<sup>2</sup> test. Continuous variables were compared using the student t test. We considered P<5% to be significant. Sample size calculation was based on literature of LH polymorphisms (Nilsson et al., 1997). We have calculated 47 women for each group considering the significance level of 5% and the power calculation for this sample size of 80%., hoping a difference of 33% between groups (Cunha-Filho et al., 2001). Genotype distribution was tested for Hardy–Weinberg equilibrium, and the difference in genotype frequencies between the samples was tested using a Chi square-test for independence (Little et al., 2009).

## Results

A total of 50 patients with endometriosis and infertility composed the study group and 50 fertile patients with no endometriosis composed the control group. Demographic characteristics are shown in Table 1. Cases and controls were different for color pattern, weight, body mass index (BMI) and pregnancy history. The groups were not different regarding age, height and menstrual characteristics.

Serum hormonal values of both groups are shown in Table 2. There were no difference regarding serum LH and FSH levels. However, the study group had significantly higher CA-125 serum levels than controls.

LH genotype analysis was possible in all 100 patients (Little et al., 2009). Eighty seven patients have the wild-type LH and 13 have the V-LH. Both allelic distributions were in the Hardy-Weinberg Equilibrium (Little et al., 2009). Homozygous and heterozygous carriers for the polymorphisms were combined for statistical reasons, as done in previous papers (Takahashi et al., 1998, Nilsson et al., 1997). The frequency of V-LH was 14% in the study group and 12% in control group (Figure 1). This difference between groups was not significant, OR 1.19 (CI 95% 0.31-4.67).

To analyze the power and consistency of our results we calculated the number needed to reach a statistical significance using our data. Hypothetically, including 4438 patients in each arm group (total=8876) the calculated RR was 1.089 95%CI (1.027-1.154). Therefore, we would need to screen 22,817 endometriotic/infertile patients to find one case associated to this SNP.

In study group, we divided endometriosis in mild (stages I/II) and severe (stages III/IV) (ASRM, 1997). Twelve percent of patients with mild endometriosis and 18% of patients with severe endometriosis had V-LH, and this difference was not statistically significant. . In addition, the prevalence of chronic pelvic pain was 32%.

## **Discussion**

The results of this study showed no difference in prevalence of V-LH SNP between infertile patients with endometriosis and healthy fertile patients. We know that pathogenesis of endometriosis involving infertility could be associated to luteal insufficiency (Cunha-Filho et al., 2003). Furthermore, there is a strong body of evidence showing that the studied SNP was associated to an altered LH secretion and, consequently, a drop in progesterone during the luteal phase. However, this hypothesis was refuted after this research.

V-LH has an increased in vitro bioactivity and a decreased half-time in vivo (Haavisto et al., 1995), altering LH function. As this SNP is associated to LH dysfunction, many authors have looked for an association of this polymorphism with endocrine pathologies. V-LH has been related to infertility (Takahashi et al., 1998), premature ovarian failure (Takahashi et al., 1999), polycystic ovarian syndrome (controversial) (Elter et al., 1999, Rajkhowa et al., 1995, Tapanainen et al., 1999) and delayed tempo of pubertal progression in healthy boys (Raivio et al., 1996).

Takahashi et al studied 97 infertile Japanese females and found V-LH correlated with luteal insufficiency, hyperprolactinaemia and ovulatory disorders (Takahashi et al., 1998). In this study they found no association with endometriosis, but they had a small number of patients with

endometriosis and no fertile controls. In accordance with our results, Gazvani et al studied 85 patients with endometriosis and found no relationship between V-LH and endometriosis (Gazvani et al., 2002). Some aspects of this study are different to ours. Patients recruited were under infertility investigation, however, the authors did not specify which infertility definition was adopted and they did not mention if other causes of infertility were excluded. Moreover the hormonal status and endometriosis stage presented by the patients was not shown, as well as if Hardy-Weinberg equilibrium was considered, and finally they did not include fertile control group.

Infertile patients with endometriosis present diminished ovarian reserve (Lemos et al., 2008), and a consequence of this could be an alteration of these patients' response to treatment with gonadotropines. Furthermore, some authors have already shown a negative impact of this disease in patients submitted to IVF treatment (Barnhart et al., 2002, Harkki et al., 2010). Alviggi et al studied 60 IVF cycles retrospectively and found that V-LH is more frequent in women who needed higher doses of rhFSH (Alviggi et al., 2009). Although these patients had no endometriosis, V-LH is apparently associated with ovarian resistance.

Recently, Mafra et al studied another common LH $\beta$  polymorphism, which consists in amino acid substitution of serine for glycine at position 102, G1502A (Mafra et al., 2010). She studied 110 infertile patients with endometriosis and found that LH $\beta$  G1502A may be involved in the predisposition to infertility and minimal/mild endometriosis associated infertility.

We found differences in weight and BMI between cases and controls. This finding agrees with literature, once lower BMI is associated with endometriosis (Ferrero et al., 2005, Hediger et al.,



2005). High serum Ca-125 levels in endometriotic patients was also an expected result (Maiorana et al., 2007).

As we had an adequate number of included subjects, we calculated the number needed to diagnosis (NND). Since we would need 22,817 endometriotic/infertile patients to find only one case that would be related to our polymorphism, this possible association is clinically irrelevant.

Infertility has a high prevalence, approximately 9% (Boivin et al., 2007), and among infertile women endometriosis prevalence is around 30-60% (Gao et al., 2006, Moghissi, 1999). Infertile couples treatment is very expensive (Katz et al., 2011) and offers no guarantee of success.

Therefore, a better understanding of endometriosis/infertility association could improve quality and diminish costs of its treatment. In addition, it opened up a new perspective in terms of endometriosis ovulatory-dysfunction regarding LH polymorphisms, as LH $\beta$  G1502A (Mafra et al., 2010), or LH receptor polymorphisms.

### **Acknowledgments**

This study was supported by grants from the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and from the Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS – Brazil. We acknowledge the assistance of Gustavo Peretti Rodini, João Paulo Bilibio and Carolina Andreoli who helped as scientific advisors.

### **Bibliography**

ALVIGGI, C., CLARIZIA, R., PETTERSSON, K., MOLLO, A., HUMAIDAN, P., STRINA, I., COPPOLA, M., RANIERI, A., D'UVA, M. & DE PLACIDO, G. 2009. Suboptimal response to GnRH $\alpha$  long protocol is associated with a common LH polymorphism. *Reprod Biomed Online*, 18, 9-14.

- ASRM 1997. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*, 67, 817-21.
- ASRM 2008. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*, 90, S60.
- BARNHART, K., DUNSMOOR-SU, R. & COUTIFARIS, C. 2002. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 77, 1148-55.
- BISCHOFF, F. & SIMPSON, J. L. 2004. Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 18, 219-32.
- BLISS, S. P., NAVRATIL, A. M., XIE, J. & ROBERSON, M. S. 2010. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol*, 31, 322-40.
- BOIVIN, J., BUNTING, L., COLLINS, J. A. & NYGREN, K. G. 2007. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, 22, 1506-12.
- CHEESMAN, K. L., CHEESMAN, S. D., CHATTERTON, R. T., JR. & COHEN, M. R. 1983. Alterations in progesterone metabolism and luteal function in infertile women with endometriosis. *Fertil Steril*, 40, 590-5.
- CUNHA-FILHO, J. S., GROSS, J. L., BASTOS DE SOUZA, C. A., LEMOS, N. A., GIUGLIANI, C., FREITAS, F. & PASSOS, E. P. 2003. Physiopathological aspects of corpus luteum defect in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *J Assist Reprod Genet*, 20, 117-21.
- CUNHA-FILHO, J. S., GROSS, J. L., LEMOS, N. A., BRANDELLI, A., CASTILLOS, M. & PASSOS, E. P. 2001. Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis. *Horm Metab Res*, 33, 216-20.
- DMOWSKI, W. P., GEBEL, H. M. & BRAUN, D. P. 1994. The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl*, 159, 7-14.
- DOODY, M. C., GIBBONS, W. E. & BUTTRAM, V. C., JR. 1988. Linear regression analysis of ultrasound follicular growth series: evidence for an abnormality of follicular growth in endometriosis patients. *Fertil Steril*, 49, 47-51.
- ELTER, K., EREL, C. T., CINE, N., OZBEK, U., HACIHANEFIOGLU, B. & ERTUNGEALP, E. 1999. Role of the mutations Trp8 => Arg and Ile15 => Thr of the human luteinizing hormone beta-subunit in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 71, 425-30.
- FERRERO, S., ANSERINI, P., REMORGIDA, V. & RAGNI, N. 2005. Body mass index in endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 121, 94-8.
- FILICORI, M. 1999. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril*, 71, 405-14.
- FILICORI, M., COGNIGNI, G. E., POCOGNOLI, P., CIAMPAGLIA, W. & BERNARDI, S. 2003. Current concepts and novel applications of LH activity in ovarian stimulation. *Trends Endocrinol Metab*, 14, 267-73.
- GAO, X., OUTLEY, J., BOTTEMAN, M., SPALDING, J., SIMON, J. A. & PASHOS, C. L. 2006. Economic burden of endometriosis. *Fertil Steril*, 86, 1561-72.
- GAZVANI, R., PAKARINEN, P., FOWLER, P., LOGAN, S. & HUHTANIEMI, I. 2002. Lack of association of the common immunologically anomalous LH with endometriosis. *Hum Reprod*, 17, 1532-4.

- GUPTA, S., GOLDBERG, J. M., AZIZ, N., GOLDBERG, E., KRAJCIR, N. & AGARWAL, A. 2008. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril*, 90, 247-57.
- HAAVISTO, A. M., PETTERSSON, K., BERGENDAHL, M., VIRKAMAKI, A. & HUHTANIEMI, I. 1995. Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 80, 1257-63.
- HARKKI, P., TIITINEN, A. & YLIKORKALA, O. 2010. Endometriosis and assisted reproduction techniques. *Ann N Y Acad Sci*, 1205, 207-13.
- HEDIGER, M. L., HARTNETT, H. J. & LOUIS, G. M. 2005. Association of endometriosis with body size and figure. *Fertil Steril*, 84, 1366-74.
- HILLIER, S. G., WHITELOW, P. F. & SMYTH, C. D. 1994. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol*, 100, 51-4.
- KATZ, P., SHOWSTACK, J., SMITH, J. F., NACHTIGALL, R. D., MILLSTEIN, S. G., WING, H., EISENBERG, M. L., PASCH, L. A., CROUGHAN, M. S. & ADLER, N. 2011. Costs of infertility treatment: results from an 18-month prospective cohort study. *Fertil Steril*, 95, 915-21.
- LEBOVIC, D. I., MUELLER, M. D. & TAYLOR, R. N. 2001. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*, 75, 1-10.
- LEMONS, N. A., ARBO, E., SCALCO, R., WEILER, E., ROSA, V. & CUNHA-FILHO, J. S. 2008. Decreased anti-Mullerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril*, 89, 1064-8.
- LITTLE, J., HIGGINS, J. P., IOANNIDIS, J. P., MOHER, D., GAGNON, F., VON ELM, E., KHOURY, M. J., COHEN, B., DAVEY-SMITH, G., GRIMSHAW, J., SCHEET, P., GWINN, M., WILLIAMSON, R. E., ZOU, G. Y., HUTCHINGS, K., JOHNSON, C. Y., TAIT, V., WIENS, M., GOLDING, J., VAN DUJN, C., MCLAUGHLIN, J., PATERSON, A., WELLS, G., FORTIER, I., FREEDMAN, M., ZECEVIC, M., KING, R., INFANTE-RIVARD, C., STEWART, A. F. & BIRKETT, N. 2009. Strengthening the reporting of genetic association studies (STREGA): an extension of the strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement. *J Clin Epidemiol*, 62, 597-608 e4.
- MAFRA, F. A., BIANCO, B., CHRISTOFOLINI, D. M., SOUZA, A. M., ZULLI, K. & BARBOSA, C. P. 2010. Luteinizing hormone beta-subunit gene (LHbeta) polymorphism in infertility and endometriosis-associated infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 151, 66-9.
- MAIORANA, A., CICERONE, C., NICETA, M. & ALIO, L. 2007. Evaluation of serum CA 125 levels in patients with pelvic pain related to endometriosis. *Int J Biol Markers*, 22, 200-2.
- MOGHISSI, K. S. 1999. Medical treatment of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol*, 42, 620-32.
- MONTGOMERY, G. W., NYHOLT, D. R., ZHAO, Z. Z., TRELOAR, S. A., PAINTER, J. N., MISSMER, S. A., KENNEDY, S. H. & ZONDERVAN, K. T. 2008. The search for genes contributing to endometriosis risk. *Hum Reprod Update*, 14, 447-57.
- NILSSON, C., PETTERSSON, K., MILLAR, R. P., COERVER, K. A., MATZUK, M. M. & HUHTANIEMI, I. T. 1997. Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research. International Collaborative Research Group. *Fertil Steril*, 67, 998-1004.

- RAIVIO, T., HUHTANIEMI, I., ANTTILA, R., SIIMES, M. A., HAGENAS, L., NILSSON, C., PETTERSSON, K. & DUNKEL, L. 1996. The role of luteinizing hormone-beta gene polymorphism in the onset and progression of puberty in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 3278-82.
- RAJKHOWA, M., TALBOT, J. A., JONES, P. W., PETTERSSON, K., HAAVISTO, A. M., HUHTANIEMI, I. & CLAYTON, R. N. 1995. Prevalence of an immunological LH beta-subunit variant in a UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 43, 297-303.
- SIMPSON, J. L., ELIAS, S., MALINAK, L. R. & BUTTRAM, V. C., JR. 1980. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol*, 137, 327-31.
- SINAI, N., CLEARY, S. D., BALLWEG, M. L., NIEMAN, L. K. & STRATTON, P. 2002. High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis. *Hum Reprod*, 17, 2715-24.
- TAKAHASHI, K., KURIOKA, H., OZAKI, T., KANASAKI, H., KOHSAKA, M., MIYAZAKI, K. & KARINO, K. 1998. Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in Japanese infertility patients. *Hum Reprod*, 13, 3338-44.
- TAKAHASHI, K., OZAKI, T., OKADA, M., KURIOKA, H., KANASAKI, H. & MIYAZAKI, K. 1999. Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 71, 96-101.
- TAPANAINEN, J. S., KOIVUNEN, R., FAUSER, B. C., TAYLOR, A. E., CLAYTON, R. N., RAJKOWA, M., WHITE, D., FRANKS, S., ANTTILA, L., PETTERSSON, K. S. & HUHTANIEMI, I. T. 1999. A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: the genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 1711-5.
- TEMPFER, C. B., SIMONI, M., DESTENAVES, B. & FAUSER, B. C. 2009. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part II--endometriosis. *Hum Reprod Update*, 15, 97-118.
- TRELOAR, S., HADFIELD, R., MONTGOMERY, G., LAMBERT, A., WICKS, J., BARLOW, D. H., O'CONNOR, D. T. & KENNEDY, S. 2002. The International Endogene Study: a collection of families for genetic research in endometriosis. *Fertil Steril*, 78, 679-85.
- VIGANO, P., SOMIGLIANA, E., VIGNALI, M., BUSACCA, M. & BLASIO, A. M. 2007. Genetics of endometriosis: current status and prospects. *Front Biosci*, 12, 3247-55.

**Table 1.** Demographic characteristics for women with infertility and endometriosis (cases) and healthy fertile women (controls)

	Controls (n = 50)	Cases (n = 50)	<i>P</i> value
Age (years)	33.28 ± 5.02	31.9 ± 4.59	.156 <sup>a</sup>
Color			.04 <sup>b</sup>
White	33 (66%)	45 (90%)	
Black	17 (34%)	5 (10%)	
Weight (Kg)	70.11 ± 12.91	62.68 ± 11.93	.011 <sup>a</sup>
Height (meters)	1.61 ± 0.065	1.63 ± 0.054	.139 <sup>a</sup>
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	27.16 ± 4.61	23.67 ± 4.27	.001 <sup>a</sup>
Menarche (years)	12.38 ± 1.75	12.40 ± 1.94	.980 <sup>a</sup>
Pregnancy	3.72 ± 2.24	0.42 ± 0.78	.000 <sup>b</sup>
Para	2.66 ± 2.06	0.08 ± 0.27	.000
Abortion	0.44 ± 0.86	0.24 ± 0.55	.171

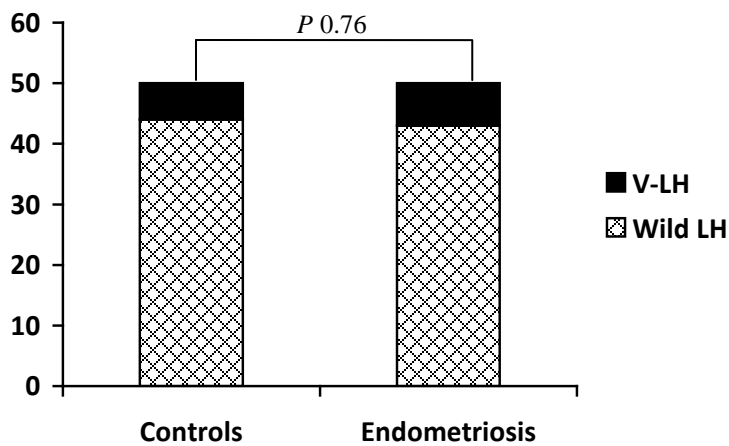
All values are means ± SD; BMI = body mass index; a = student t test; b = Chi2 test.

**Table 2.** Hormonal values of women with infertility and endometriosis (cases) and healthy fertile women (controls)

	Controls (n = 50)	Cases (n = 50)	<i>P</i> value <sup>a</sup>
CA-125 (U/ml)	15.09 ± 9.47	37.81 ± 36.99	.039
FSH (mIU/mL)	4.85 ± 3.01	5.60 ± 2.70	.295
LH (mIU/mL)	5.90 ± 4.32	6.63 ± 4.58	.376

All values are means ± SD; a = student t test; FSH = Follicle Stimulating Hormone; LH = luteinizing hormone

**Figure 1.** V-LH frequency in women with infertility and endometriosis (cases) and healthy fertile women (controls)



## **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Pacientes com endometriose e infertilidade não apresentam prevalência maior do polimorfismo V- LH, em comparação com pacientes férteis sem endometriose.

O NND de pacientes com endometriose e infertilidade para encontrar um caso relacionado ao polimorfismo estudado seria de 22.817, o que torna o polimorfismo clinicamente irrelevante.

## **PERSPECTIVAS**

Apesar de não ter sido encontrada correlação positiva entre o polimorfismo V-LH e endometriose/infertilidade, sabemos que a função do LH pode estar alterada nessas pacientes, uma vez que as mesmas apresentam alterações na fase lútea. Em decorrência disso, planejamos pesquisar um polimorfismo no receptor do LH que também altera sua função, e por isso pode estar associado com a doença. Este polimorfismo é presença de uma inserção que consiste em dois aminoácidos, leucina e glutamina, no códon 18 do exon 1 do receptor do LH.

Além disso, estudos com outros polimorfismos possivelmente envolvidos na patogênese da endometriose e infertilidade, como da dopamina, do GDF9 e do BMP15 já estão sendo desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa.