UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Cirurgia e Oftalmologia

Karla Zanolla Dias de Souza

PEPTÍDEO INSL3 COMO MARCADOR DE ATIVIDADE DAS CÉLULAS DA TECA OVARIANA EM CICLOS DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

Belo Horizonte
2025

Karla Zanolla Dias de Souza

PEPTÍDEO INSL-3 COMO MARCADOR DE ATIVIDADE DAS CÉLULAS DA TECA OVARIANA EM CICLOS DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia.

Orientador: Prof. Fernando Marcos dos Reis.

Coorientador: Prof. Fábio Vasconcellos Comim

Belo Horizonte

2025

Souza, Karla Zanolla Dias de.
SO729p Peptídeo INSL3 como marcador de atividade das células da teca ovariana em ciclos de fertilização in vitro [recurso eletrônico]. / Karla Zanolla Dias de Souza. - - Belo Horizonte: 2025.
72f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Fernando Marcos dos Reis.
Coorientador (a): Fábio Vasconcellos Comim.
Área de concentração: Resposta Inflamatória à Agressão Tecidual.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Proteína 3 de Ligação a Fator de Crescimento Semelhante à Insulina. 2. Fertilização in vitro. 3. Tumor da Célula Tecal. 4. Ovário. 5. Dissertação Acadêmica. I. Reis, Fernando Marcos dos. II. Comim, Fábio Vasconcellos. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WP 320

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA - CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que **KARLA ZANOLLA DIAS DE SOUZA**, número de registro 2021658095, cumpriu os requisitos regulamentares para obtenção do grau de doutora no Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, tendo defendido sua tese intitulada: PEPTÍDEO INSL3 COMO MARCADOR DE ATIVIDADE DAS CÉLULAS DA TECA OVARIANA EM CICLOS DE FERTILIZAÇÃO IN VITRO, realizada em 11/07/2025.

Belo Horizonte, 11 de julho de 2025.

VIVIAN RESENDE

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia

Documento assinado eletronicamente por **Vivian Resende**, **Coordenador(a)**, em 15/07/2025, às 14:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4301659** e o código CRC **B10B3557**.

A toda a minha família, fonte de inspiração, força, amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Fernando Marcos dos Reis, pela oportunidade que me foi concedida e por acreditar que é possível estimular a ciência mesmo em situações adversas e entre colegas do interior, que muitas vezes não têm tantas oportunidades de se dedicar à pesquisa. Sua dedicação e empenho, por me ensinar e instigar a curiosidade, contribuiu muito para minha formação como médica, professora e pesquisadora;

Ao meu co-orientador, Fabio Vasconcellos Comim, por toda a dedicação e apoio ao longo da minha jornada de doutorado. Sua orientação foi fundamental, não só pelo conhecimento que compartilhou, mas também pelo incentivo constante e pela paciência com que me ensinou a cada etapa do processo. Suas contribuições foram essenciais para o desenvolvimento do meu trabalho e para o meu crescimento como pesquisador, e sua confiança em meu potencial me motivou a seguir em frente mesmo nos momentos mais desafiadores. Sou muito grato pela oportunidade de ter aprendido com alguém tão comprometido e generoso.

A toda a equipe do LRH, que me recebeu com o carinho costumeiro, e aos residentes e toda a equipe que não poupou esforços em me ajudar;

As pacientes que aceitaram contribuir para o projeto mesmo sabendo que os resultados não as iriam beneficiar diretamente naquele momento, porém, foram capazes de compreender e se solidarizar com futuras pessoas que enfrentarão todo esse difícil processo do tratamento de Reprodução Assistida;

Às colegas Monique Ellen Gervásio Nunes e Maíra Casalechi, que me acompanharam e estiveram sempre disponíveis para ajudar em todas as dificuldades durante o processo;

Às alunas de iniciação científica que me ensinaram e foram essenciais durante essa caminhada, em especial Tays Guedes, Izabela Flueti que se dedicaram com maestria para que tudo funcionasse;

A Raissa Lima Pereira, que sempre esteve aberta a ajudar durante a leitura dos ensaios, e por vezes após o seu horário;

Aos meus colegas da Universidade Federal de Lavras que de alguma forma contribuíram para que esse momento se tornasse realidade, em especial Dra. Lívia Aguiar; Dr. Lucas Giarolla e Dra. Pollyana Cardoso.

Ao meu colega da pós-graduação Dr. Helio Haddad que dividiu comigo momentos de ansiedade, medo, dúvidas, mas também alegrias e superação.

Aos meus pais Silvio Dias de Souza (*in memoriam*) e Elaine Maria do Carmo Zanolla Dias de Souza, que sempre acreditaram em mim e nunca mediram esforços para me ajudar, em todos os momentos durante a minha vida; pai sei que você está sempre comigo!

A toda minha família que torce por mim e respeita minhas escolhas e minhas ausências, em especial meu marido Ednaldo Bougleux pelo apoio e meus filhos Maria Clara e Eduardo que fazem meu coração transbordar de alegria e me estimulam a ser uma pessoa melhor a cada dia.

A Marcia Ribeiro de Almeida que cuidou do meu lar e das crianças na minha ausência para que eu pudesse me dedicar aos estudos e ao trabalho de forma simultânea.

A todos os meus amigos que sempre me ajudaram com presteza, carinho, apoio e conforto sempre que precisei.

A Deus, que sempre está presente na minha vida e me ampara em todos os momentos e me dá força quando tudo parece não ter solução e então Ele me mostra o caminho.

“O importante é não parar de questionar; a curiosidade tem sua própria razão de existir “.

Albert Einstein

RESUMO

O peptídeo Insulina-like 3 (INSL3) é membro da família de peptídeos semelhantes à insulina, que inclui, além da própria insulina, os fatores de crescimento IGF1 e IGF2 e a relaxina. A síntese de INSL3 foi identificada na camada mais interna da teca de folículos antrais bovinos e humanos. Avaliar a relação entre os níveis plasmáticos do peptídeo INSL3 e a resposta ovariana à estimulação com gonadotrofinas em ciclos de FIV. Foram incluídas prospectivamente 91 mulheres com indicação de tratamento de fertilização *in vitro* (FIV) no Hospital das Clínicas da UFMG. Amostras de sangue foram coletadas antes do início da estimulação ovariana com gonadotrofinas e no dia da coleta ovular, quando também foi coletada uma amostra de líquido folicular. As concentrações de INSL3 foram dosadas nas amostras biológicas por meio de um ensaio imunoenzimático. Observou-se que os níveis plasmáticos de INSL3 aumentaram significativamente após a estimulação ovariana controlada. No entanto, os níveis plasmáticos foram consistentemente mais elevados do que os níveis detectados no líquido folicular, sugerindo a possível existência de fontes extragonadais do peptídeo. As participantes com níveis de INSL3 acima da mediana apresentaram maior contagem de folículos antrais, melhor resposta à estimulação ovariana e maior número de oócitos captados, maior número de oócitos maduros por unidade de gonadotrofina utilizada. Por outro lado, a dosagem de INSL3 plasmático antes da estimulação demonstrou baixa acurácia preditiva para o número de oócitos recuperados (AUC: 0,555), sendo superada por marcadores tradicionais como a contagem de folículos antrais (AUC: 0,851) e a idade (AUC: 0,759). Embora os níveis plasmáticos de INSL3 após a estimulação ovariana estejam associados a uma melhor resposta ovariana, seu valor preditivo pré-estímulo é limitado. Os achados sugerem que o INSL3 pode refletir a atividade funcional das células da teca durante a estimulação, mas não se configura como um biomarcador confiável para a predição isolada da resposta ovariana antes do início do tratamento. A maior concentração sistêmica em relação ao líquido folicular também levanta a hipótese de produção extragonadal de INSL3, o que deve ser investigado em estudos futuros.

Palavras-chave: INSL3; células da teca; ovulação; infertilidade.

ABSTRACT

Insulin-like peptide 3 (INSL3) is a member of the insulin-like peptide family that includes, insulin itself, the growth factors IGF1 and IGF2 and relaxin. INSL3 synthesis has been identified within the innermost layer of bovine and human theca cells in antral follicles. The aim of this study was to evaluate serum levels of the INSL3 peptide as a biomarker of theca cell function and as a predictor of ovarian response to gonadotropin stimulation in IVF cycles. Ninety-one women with indication for *in vitro* fertilization (IVF) treatment at the Hospital das Clínicas of UFMG were prospectively included. Blood samples were collected before the start of ovarian stimulation with gonadotropins and on the day of egg retrieval, when a follicular fluid sample was also collected. INSL3 concentrations were measured in the biological samples using an enzyme-linked immunosorbent assay. Plasma INSL3 levels were significantly increased after controlled ovarian stimulation. However, plasma levels were consistently higher than levels detected in follicular fluid, suggesting the possible existence of extragonadal sources of the peptide. Participants with INSL3 levels above the median had higher antral follicle counts, better response to ovarian stimulation, and a higher number of mature oocytes retrieved per unit of gonadotropin used. On the other hand, plasma INSL3 measurement before stimulation demonstrated low predictive accuracy for the number of oocytes retrieved (AUC: 0.555), being surpassed by traditional markers such as antral follicle count (AUC: 0.851) and age (AUC: 0.759). Although plasma INSL3 levels after ovarian stimulation are associated with a better ovarian response, its pre-stimulation predictive value is limited. The findings suggest that INSL3 may reflect the functional activity of theca cells during stimulation, but it is not a reliable biomarker for the isolated prediction of ovarian response before treatment initiation. The higher systemic concentration compared to follicular fluid also raises the hypothesis of extragonadal production of INSL3, which should be investigated in future studies.

Keywords: INSL3;theca cells; ovulation; infertility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Atuação conjunta das células da teca e da granulosa ovariana na produção intrafolicular de estradiol 19
Figura 2 - Desenho esquemático do folículo antral e a demonstração da presença do peptídeo INSL3 através das técnicas de PCR e imunohistoquímica 22
Figura 3 - (A) Sequência do ligante RXFP2 de 25 resíduos de espécies de mamíferos comparado com o ligante RXFP1 humano, que tem 32 resíduos de comprimento. (B) Estrutura putativa de RXFP2 22
Figura 4 - Modelo de ativação de ligação INSL3/RXFP2 e mecanismos de sinalização 23
Figura 5 - Esquema representativo da origem (células da teca), alvo (oócitos) e efeitos do INSL3 no folículo ovariano Reproduzido de Xue *et al.* (2014). 26
Figura 6 - Critérios POSEIDON de pacientes de baixo prognóstico em TRA .. 28
Figura 7 - Arquivo pessoal para a demonstração do exame realizado para a contagem dos folículos antrais 33
Figura 8 - Desenho esquemático do protocolo longo com uso de análogo do GnRH 34
Figura 9 - Desenho esquemático do protocolo curto com uso de antagonista do GnRH 36
Figura 10 - Desenho esquemático do protocolo curto com uso de progesterona 37
Figura 11 - Fluxograma sobre a seleção e análise dos grupos 41
Figura 12 - Concentrações de INSL3 (A) e de Testosterona (B) no plasma e no líquido folicular (LF) em amostras obtidas contemporaneamente no dia da coleta ovular 43
Figura 13 - Análise de correlação linear entre os níveis plasmáticos e no líquido folicular (LF) de INSL3 e testosterona 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das participantes do estudo (n = 80)..... 42

Tabela 2 - Características clínicas e desfechos da estimulação ovariana de acordo com os níveis plasmáticos de INSL3 no dia da coleta oocitária. 45

Tabela 3- Área sob a curva ROC para predição da resposta ovariana à estimulação com gonadotrofinas, considerando como desfecho positivo a obtenção de >6 oócitos. 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Hormônio anti-mülleriano
AUC	Área sob a curva
CFA	Contagem dos folículos antrais
CV	Coeficientes de variação
ESHRE	Sociedade Européia de Reproduçao Humana e Embriologia
FIV	Fertilização in Vitro
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GnRHa	Análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas
HCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HOC	Hiperestimulação ovariana controlada
IC	Intervalo de confiança
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóide
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IMC	Índice de massa corporal
INSL3	Peptídeo Insulina-like 3
Kg/m^2	Quilograma por metro quadrado
LDLa	Lipoproteína de baixa densidade
LF	Líquido folicular
LH	Hormônio Luteinizante
LR	Superfície interna da região rica em leucina
LRR	Domínios de repetição ricos em leucina
mg/ML	Miligramas por mililitros
ng/mL	Nanogramas por mililitros
nmol/L	Nanomoles por litro
pg/mL -	Picogramas por mililitros
ROC	Receiver operating characteristic
RR	Risco relativo
RXFP2	Receptor para INSL3
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
SUS	Sistema único de saúde
TM	Domínios helicoidais trasmembrana

TMD	Domínio trasmembranar
TRA	Técnicas de reprodução assistida
UI	Unidades internacionais
UI/L	Unidades internacionais por litro
USTV	Ultrassonografia transvaginal
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 Infertilidade 16
1.2 Foliculogênese 17
1.3 Síndrome do hiperestímulo ovariano 19
1.4 Peptídeo Insulina-like 3 20
1.5 O papel da testosterona nos ciclos de FIV 26
2 JUSTIFICATIVA 29
3 OBJETIVOS 30
3.1 Objetivo geral 30
3.2 Objetivos específicos 30
4 MATERIAS E MÉTODOS 31
4.1 Seleção dos participantes 31
4.1.1 Cálculo amostral 31
4.1.2 Critérios de inclusão 31
4.1.3 Critérios de exclusão 32
4.1.4 Avaliação inicial 32
4.2 Contagem dos folículos antrais, protocolos de indução, captação de oócitos, fertilização dos oócitos maduros e transferência embrionária 32
4.2.1 Contagem dos foículos antrais 33
4.2.2 Protocolo longo com agonista do GnRH (GnRHa) 34
4.2.3 Protocolo curto com antagonista do GnRH 35
4.2.4 Protocolo com uso de Progesterona 36
4.2.5 Captação de oócitos e a fertilização dos oócitos maduros 37
4.2.6 Transferência embrionária 38
4.3 Coleta do plasma e do líquido folicular 38
4.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para medida de INSL3 no plasma e no liquido folicular 38
4.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para medida de Testosterona no plasma e no líquido folicular 39
4.6 Análise Estatística 40
5 RESULTADOS 41
5.1 Fluxo do estudo e características das participantes 41
5.2 Níveis plasmáticos e intrafoliculares de INSL3 e testosterona 43
5.3 Níveis plasmáticos de INSL3 pós-estimulação e a resposta ovariana 44
5.4 Nível plasmático de INSL3 pré-estimulação como possível biomarcador preditivo da resposta ovariana 46

6 DISCUSSÃO 47
7 CONCLUSÕES 54
REFERÊNCIAS 55
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) 659
ANEXO B - Parecer 70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infertilidade

A infertilidade pode ser definida como a incapacidade de se obter uma gravidez bem-sucedida após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares e desprotegidas em pacientes com idade inferior a 35 anos, ou após 6 meses em mulheres com idade superior a 35 anos (Lindsay; Vitrikas, 2015). Aproximadamente 80% dos casais obtêm sucesso nos 6 primeiros meses de tentativas. Trata-se de uma condição clínica muito frequente em todo mundo, sendo estimado que, em 2007, cerca de 72.4 milhões de casais foram diagnosticados com infertilidade (Gurunath *et al.*, 2011). Já em outro estudo, realizado em 2010, estimou 48.5 milhões de casais afetados, incluindo casos de infertilidade primária e secundária (Mascarenhas *et al*., 2012).

Avaliando a realidade da população em relação a infertilidade de casais em idade reprodutiva, esta condição afeta de 8 a 12% dessa população, sendo mais prevalente em algumas regiões do mundo como no Sul da Ásia, Oriente Médio, norte da África, Europa central e oriental e Ásia central, podendo chegar a 30% de toda a população (Inhorn; Patrizio, 2015).

A idade é um fator importante no declínio da fertilidade tanto feminina quanto masculina. Contudo, nas mulheres, esse declínio é mais acentuado, com queda significativa na chance de gravidez espontânea após os 35 anos. Nos homens, esse fenômeno ocorre de forma mais expressiva a partir dos 50 anos (American Society for Reproductive Medicine - ASRM, 2017).

O número de oócitos nos ovários está em constante diminuição através do processo de atresia, sendo que do nascimento até aproximadamente 37 anos, o número de oócitos cai de 300.000 – 500.000 para 25.000 (American College of Obstetricians and Gynecologists Committee - ACOG, 2014).

A infertilidade pode apresentar diversas causas, e a avaliação simultânea do casal é fundamental para determinar o fator causal e indicar o tratamento mais adequado. Aproximadamente 15% dos casais inférteis apresentam disfunções ovulatórias, manifestadas por irregularidade menstrual, menstruação infrequente ou amenorreia (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine - Practice Committee of the ASRM, 2015a).

A Organização Mundial de Saúde divide as causas ovulatórias em três grupos:

a) Grupo I- consiste nas pacientes portadoras de insuficiência hipotalâmica-hipofisária (10%)
b) Grupo II- pacientes que apresentam disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (85%)
c) Grupo III- pacientes com insuficiência ou falência ovariana (Lindsay; Vitrikas, 2015).

Outras causas não relacionadas à ovulação incluem alterações uterinas, como as sinéquias, pólipos endometriais, miomas submucosos ou até malformações müllerianas (Practice Committee of the ASRM, 2015a).

A obstrução tubária é outra importante causa de infertilidade e deve ser investigada, uma vez que a formação inicial do embrião acontece na ampola das trompas (Practice Committee of the ASRM, 2015a).

Já o fator masculino é responsável por aproximadamente 20% dos casos de infertilidade, sendo necessário realizar uma anamnese completa, exame físico e análise seminal, que é um exame imprescindível para seu diagnóstico (Practice Committee of the ASRM, 2015b).

Ainda assim, após a avaliação da função ovulatória, da permeabilidade tubária, da morfologia uterina e dos parâmetros seminais, 10 a 30 % dos casais inférteis não terão etiologia definida, sendo classificados como infertilidade sem causa aparente (Gunn; Bates, 2016).

O tratamento recomendado para fatores femininos de infertilidade, isoladamente, pode incluir diversas intervenções como mudanças no estilo de vida, cirurgia, indução de ovulação, monitorização da ovulação, inseminação intrauterina e fertilização *in vitro* (FIV). Já os fatores masculinos necessitam mais comumente de tratamento por FIV com injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) (Lindsay; Vitrikas, 2015).

1.2 Foliculogênese

O desenvolvimento folicular inicia-se na vida intrauterina logo quando os folículos primordiais são formados e permanecem inalterados em fase de prófase I da meiose I até a puberdade (Lew, 2019).

Logo após o recrutamento inicial, o hormônio folículo-estimulante (FSH) assume o controle da diferenciação e crescimento folicular (Filatov *et al.*, 2017; McGee; Raj, 2015). O início do crescimento folicular é caracterizado pela transformação das células da granulosa que passam de achatadas para cubóides, e a camada única de células vai proliferando e se organizando em múltiplas camadas, dando início à formação da zona pelúcida. Já as células de tecido conjuntivo que circundam o folículo iniciam a diferenciação em células da teca produtoras de esteroides. À medida que o crescimento folicular avança, o líquido folicular começa a ser produzido e armazenado em um espaço denominado antro (McGee; Raj, 2015; Lew, 2019).

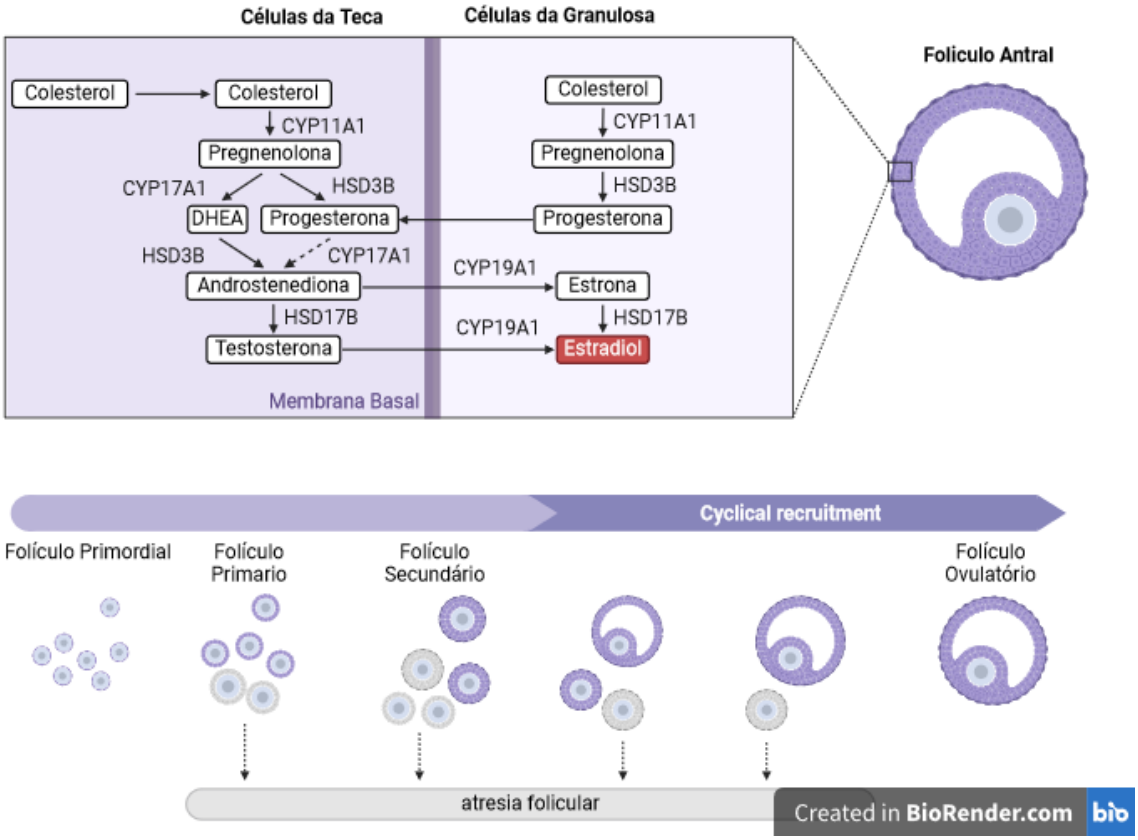
As células da teca, cada vez mais diferenciadas, se dividem em duas camadas: a teca interna que passam a secretar os hormônios esteroides, que atingem a corrente sanguínea e a teca externa (Lew, 2019).

O FSH estimula as células da granulosa a realizar a esteroidogênese, porém são necessários androgênios como substrato para a aromatização. Estes, contudo, são produzidos pelas células da teca em decorrência da estimulação do hormônio luteinizante (LH) e são transferidos para as células da granulosa para a aromatização. Este microambiente no folículo dominante é favorável ao crescimento e desenvolvimento folicular e, ao mesmo tempo, com o aumento dos níveis de androgênios, os receptores de FSH nas células da granulosa dos outros folículos remanescentes são inibidos e assim entram em atresia. Simultaneamente, com a elevação dos níveis de estrogênio, há um feedback negativo na hipófise para reduzir os níveis circulantes de FSH dificultando ainda mais o desenvolvimento de outros folículos (Lew, 2019).

Nos tratamentos de reprodução assistida, o FSH exógeno atua no desenvolvimento de folículos antrais precoces e no recrutamento desses, que em um ciclo natural tenderiam a um processo de atresia. Como o aumento rápido dos estrogênios produzidos pelos folículos antrais promove um feedback positivo na hipófise, desencadeando o pico pré-ovulatório de LH, torna-se necessário utilizar medicações que bloqueiem essa liberação. Para isso, empregam-se agonistas do GnRH, que após um breve efeito estimulatório inicial (flare-up), passam a inibir os receptores hipofisários de GnRH endógeno, ou antagonistas do GnRH, que podem ser iniciados mais tardiamente, pois atuam de forma imediata para prevenir o pico de LH (Lambalk *et al*., 2017).

Durante a fase folicular, a progesterona das células da granulosa é transportada para as células da teca para ser convertida em andrógenos pelo CYP17A1. Os andrógenos são então devolvidos às células da granulosa para serem convertidos em estrogênios pelo CYP19A1. O aumento da biossíntese local de estrogênio no ovário contribui para o recrutamento cíclico do folículo dominante para a ovulação (Figura 1). Enquanto isso, folículos menores (que produzem menos estradiol) sofrem ondas de atresia (Cui; Shen; Li, 2013).

Figura 1 - Atuação conjunta das células da teca e da granulosa ovariana na produção intrafolicular de estradiol



Fonte: elaboração própria.

1.3 Síndrome do hiperestímulo ovariano

A síndrome do hiperestímulo ovariano é uma complicação iatrogênica e potencialmente grave, que usualmente é descrita em pacientes submetidas a tratamento de fertilização *in vitro* (FIV) em que utiliza-se indução ovariana controlada com gonadotrofina exógena (Zheng *et al*., 2019).

É causada por um aumento na permeabilidade capilar e extravasamento de plasma para o espaço extravascular, causado pelos níveis excessivamente elevados de estradiol produzidos pelos folículos e pela presença do hCG exógeno (gonadotrofina coriônica humana) que levam ao aumento do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e de fatores inflamatórios.

Suas manifestações clínicas podem apresentar-se de diversas formas e através desse conjunto de sinais e sintomas à síndrome do hiperestímulo ovariano é classificado em quatro categorias (Namavar Jahromi *et al*., 2018).

Categoria 1: Síndrome de hiperestimulação ovariana leve: é descrita por crescimento ovariano bilateralmente com múltiplos cistos e corpos lúteos, medindo até 8 cm e acompanhado de distensão abdominal e dor leve.

Categoria 2: Síndrome de hiperestimulação ovariana moderada: é definida pelo aumento dos ovários até 12 cm, acompanhado de distensão abdominal associado a sintomas gastrointestinais como: náuseas/vômitos e diarréia e presença de ascite.

Categoria 3: Síndrome de hiperestimulação ovariana grave: é caracterizada por presença de cistos ovarianos grandes (>12x12cm), ascite clínica com ou sem hidrotórax, hipercalemia, hiponatremia, hipoosmolaridade, hipoalbuminemia, oligúria, creatinina entre 1,1 e 1,5mg/dL, choque hipovolêmico, hemoconcentração, disfunção hepática, aumento da viscosidade do sangue e até eventos tromboembólicos.

Categoria 4: Síndrome de hiperestimulação ovariana crítica: é diagnosticada quando existe ascite grave ou hidrotórax, hemoconcentração, oligúria ou anúria, creatinina acima de 1,6mg/dL, clearance de creatinina <50mL/min, tromboembolismo e até síndrome da angústia respiratória.

A incidência de casos moderados a grave varia ente 3-10% de todos os ciclos, podendo chegar a 20% em pacientes com fatores de risco como: pacientes jovens, com índice de massa corporal baixa, portadoras de síndrome dos ovários policísticos e pacientes com história prévia de hiperestímulo (Zheng *et al.,* 2019).

1.4 Peptídeo Insulina-like 3

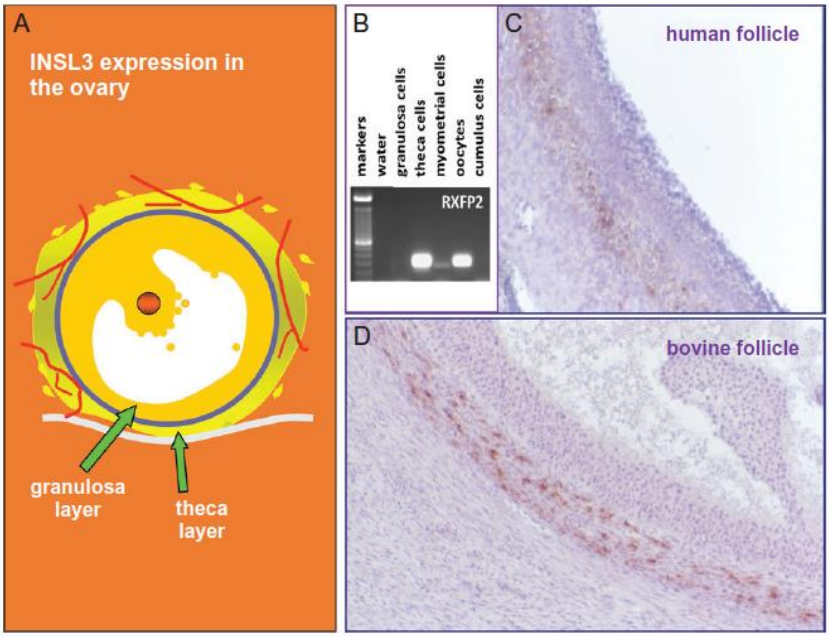
O peptídeo Insulina-like 3 (INSL-3) (Yetim *et al.*, 2016) faz parte de um grupo de hormônios que, em humanos apresentam uma forma intracelular que é convertida a partir de um precursor, o Pro-INSL-3 (Ivell; Anand-Ivell, 2018).

Em termos da função do INSL3 no ovário, existem diversas evidências apontando para um papel importante na seleção folicular e diferenciação. Kawamura em 2004 relatou que o INSL3 foi capaz de induzir uma resposta ao cálcio em oócitos isolados de camundongos. Já em 2002 um estudo imuno-histoquímico no ovário bovino destacou uma associação muito interessante entre a expressão do INSL3 na camada de células da teca dos folículos e o destino desses folículos. Nos casos em que os folículos apresentaram qualquer indicação de início de atresia, o gene INSL3 pareceu não ser expresso nas respectivas células da teca. Finalmente, uma análise detalhada dos ovários de camundongos com deficiência de INSL3 mostrou que havia menos folículos progredindo e menos corpos lúteos resultantes, implicando taxas muito mais altas de atresia folicular, menos ovulações e, portanto, ninhadas menores (Ivell; Anand-Ivell 2009).

A síntese de INSL-3 foi identificada dentro da camada mais interna da teca de folículos antrais em crescimento próximo à membrana basal (Figura 2), tanto pela hibridização de RNA in situ quanto pela imunohistoquímica em vacas, macacos e humanos (Bamberger *et al.,* 1999; Bathgate *et al*., 1999).

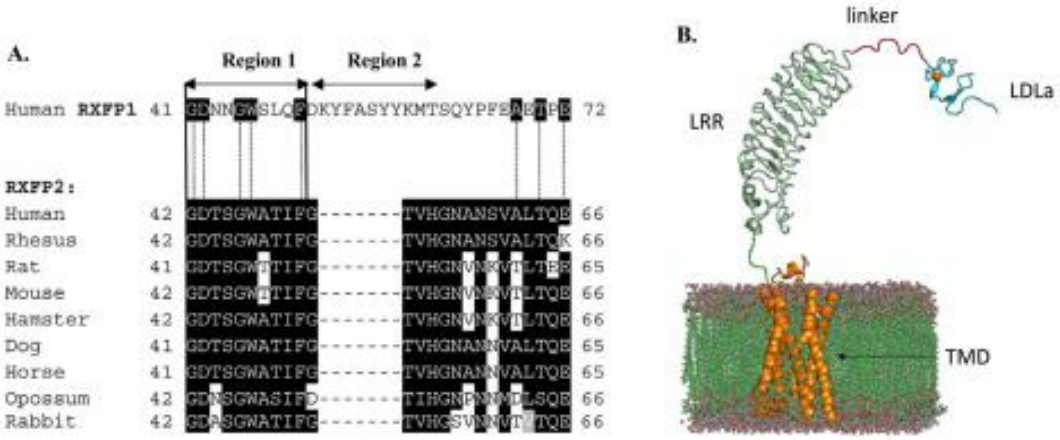
A Figura 2A descreve um diagrama esquemático de um folículo antral em crescimento, indicando as principais características anatômicas. Já na Figura 2B, é possível identificar produtos de RT-PCR para expressão de RNAm do receptor RXFP2 em células de folículo bovino e útero (Dai *et al.,* 2017). Já nas Figuras 2 C e D através da coloração imuno-histoquímica (cor marrom) para INSL3, o peptídio é identificado em folículos antrais saudáveis de humanos (C) e bovinos (D) (Ivell; Anand-Ivell, 2018).

Figura 2 - Desenho esquemático do folículo antral e a demonstração da presença do peptídeo INSL3 através das técnicas de PCR e imunohistoquímica



Fonte: Ivell e Anand-Ivell (2018).

Figura 3 - (A) Sequência do ligante RXFP2 de 25 resíduos de espécies de mamíferos comparado com o ligante RXFP1 humano, que tem 32 resíduos de comprimento. (B) Estrutura putativa de RXFP2

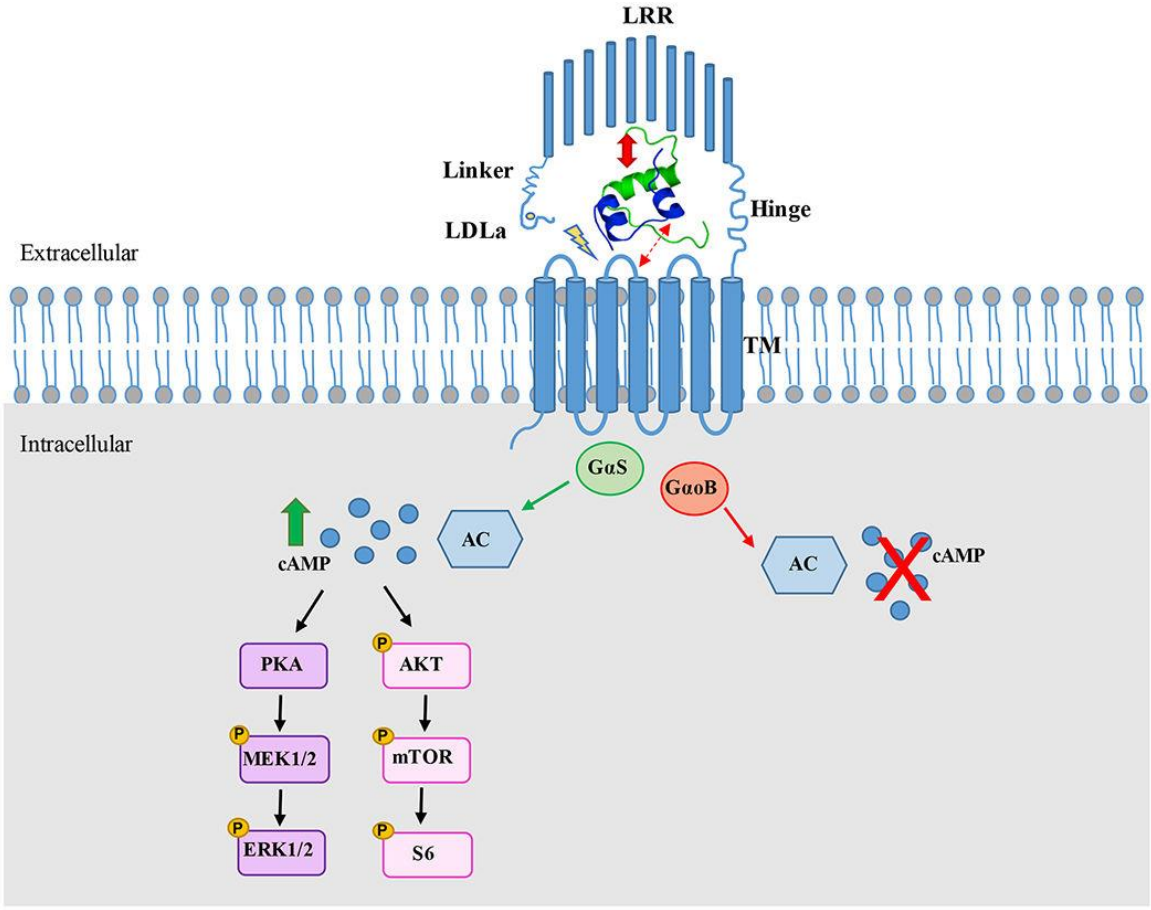


Fonte: Bruell *et al.* (2017).

O sequenciamento do ligante RXFP2 de 25 resíduos de diferentes espécies de mamíferos comparados com o ligante RXFP1 em humanos que tem 32 resíduos de comprimento. (Figura 3A) Os resíduos GDxxGWxxxF compreendem a região 1, considerada importante para a ativação, e a região 2 é o sítio proposto de ligação à relaxina. A estrutura do RXFP2 mostrando os domínios distintos da proteína, o

domínio transmembranar (TMD) em laranja, rico em cálcio, em leucina repetida (LRR) em verde, apresentando linker em roxo e módulo LDLa em azul (Figura3B) (Bruell *et al.,* 2017).

Figura 4 - Modelo de ativação de ligação INSL3/RXFP2 e mecanismos de sinalização



Fonte: Esteban-Lopez e Agoulnik (2020).

O receptor para INSL-3 é um receptor de sete domínios transmembrana acoplado à proteína G, relacionado aos receptores de gonadotrofinas (Figura 4). É caracterizado por um grande domínio extracelular com repetições ricas em leucina e cisteína (Bathgate *et al.*, 2006). A análise molecular detalhada evidenciou que INSL-3 interage primeiramente e muito especificamente com aminoácidos na superfície interna da região rica em leucina (LR) (Bruell *et al.*, 2017) e essa interação é suficientemente específica e de alta afinidade (Shabanpoor *et al.*, 2011). O receptor RXFP2 consiste em uma lipoproteína de baixa densidade (LDLa), 10 domínios de repetição ricos em leucina (LRR) e 7 domínios helicoidais transmembrana (TM). O

hormônio INSL3 maduro é formado por uma cadeia B e uma cadeia A unidas por ligações dissulfeto. O modelo de ligação INSL3/RXFP2 previsto mostra um sítio de ligação de alta afinidade da cadeia B no LRR (seta em negrito), bem como um sítio de ligação de baixa afinidade da cadeia A nas alças extracelulares da TM (seta pontilhada). Após a ligação, a região Linker ajuda a direcionar o módulo LDLa em direção às alças extracelulares da TM para ativar o receptor, juntamente com a região N-terminal da cadeia A do INSL3 (símbolo do relâmpago). INSL3 ativa o receptor RXFP2 causando acoplamento à subunidade Gαs, que ativa a adenilil ciclase e aumenta os níveis de AMPc. Este mecanismo de sinalização foi comprovado em células Leydig e C2C12 de camundongo, células gubernaculares de rato, células MG63 e osteoblastos humanos primários. A sinalização downstream de cAMP através da fosforilação de AKT, mTOR e S6 foi encontrada em células C2C12, bem como a ativação da via MAPK/ERK em osteoblastos humanos primários. Em células germinativas femininas e masculinas de ratos, foi demonstrado que a ativação de RXFP2 por INSL3 causa acoplamento ao GαoB subunidade, que inibe a adenilil ciclase e diminui os níveis de AMPc. A estrutura INSL3 é do PDBe (Esteban-Lopez; Agoulnik, 2020).

Em homens, o INSL-3 foi facilmente detectado na circulação sanguínea utilizando imunoensaios comerciais, atingindo uma concentração em homens saudáveis geralmente entre 0,5 e 2,0 ng/mL (Anand-Ivell *et al.*, 2006, 2009) entretanto, em mulheres, as dosagens desse peptídeo demandaram uso de ensaios de imunofluorescência mais sensíveis, determinando níveis de 10 pg/mL (Anand-Ivell; Dai; Ivell, 2013). Já em meninas pré-puberes, o peptídeo INSL-3 não foi detectado (Hagen *et al.,* 2015) e mulheres na pós-menopausa apresentam níveis muito baixos ou até indetectáveis na circulação (Anand-Ivell; Dai; Ivell, 2013).

Um estudo avaliou a variabilidade da concentração nos níveis de INSL-3 durante o ciclo menstrual e mostrou que a quantidade de INSL-3 durante a menstruação é mínima e que ele aumenta durante a fase folicular das mulheres, assim como acontece com o crescimento dos folículos antrais quando observados via ultrassonografia (Anand-Ivell *et al.,* 2013). Em mulheres menopausadas, o nível circulante de INSL-3 torna-se indetectável (Ivell; Anand-Ivell, 2009).

Esses achados também ressaltam que a ciclicidade do ovário é a fonte principal de INSL-3 na circulação de mulheres. Sendo assim, o INSL-3 circulante parece refletir a função das células da teca em mulheres jovens saudáveis. Entretanto, mulheres

portadoras de síndrome dos ovários policísticos apresentaram níveis mais elevados de INSL-3 conforme outros estudos realizados (Anand-Ivell *et al*., 2013; Gambineri *et al*., 2007). Já pacientes com baixa reserva ovariana, número reduzido de folículos antrais e baixos níveis de Hormônio Anti-Mulleriano (AMH) também apresentaram níveis reduzidos de INSL-3 (Anand-Ivell *et al.*, 2013).

Todavia, um estudo realizado em 53 adolescentes portadoras de síndrome dos ovários policísticos, com idades entre 14 e 20 anos evidenciou que não houve diferença estatística na concentração de INSL-3 entre os grupos estudados (Yetim *et al.*, 2016). Outro estudo avaliou 40 adolescentes com idade entre 16-19 anos e a relação entre AMH (marcador da atividade das células da granulosa) e INSL-3 (marcador da atividade das células da teca) mostrou que nesse grupo selecionado, pacientes que apresentavam ciclos anovulatórios esporádicos apresentaram maiores níveis de AMH e INSL-3 (Pelusi *et al*., 2013).

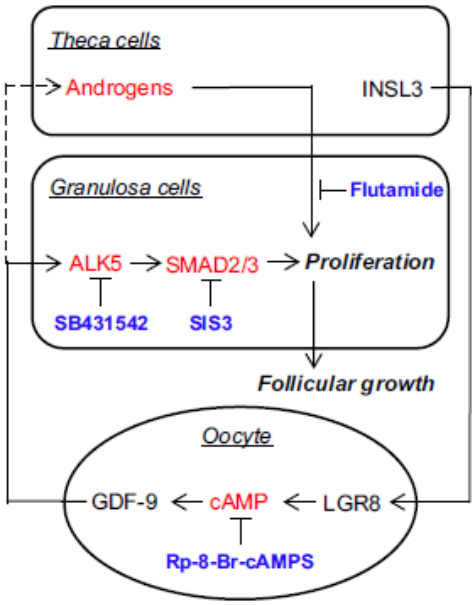
Diferentemente do AMH, que pode ser mensurado em qualquer fase do ciclo, uma vez que reflete o conjunto de folículos antrais e pré-antrais, em sua maioria secundários e pequenos, não sujeitos à influência direta de gonadotrofinas e, portanto, relativamente independente do ciclo, o INSL-3 é característico do crescimento de folículos antrais e, portanto, sujeito a alterações nas concentrações de gonadotrofinas (Ivell; Anand-Ivell, 2018).

Estudos desenvolvidos em folículos pré-antrais de ratos mostraram que o receptor RXFP2 parece expressar-se unicamente em oócitos e não em células somáticas, e que o efeito do INSL3 seria induzir o crescimento do folículo pré-antral e, ao mesmo tempo, regulação do oócito cAMP/GDF9 e das vias de sinalização das células da granulosa e da ação androgênica tecal no crescimento folicular pré-antral de ratos induzido por INSL3 (Xue *et al.,* 2014) (Figura 5).

Já em bovinos, as células da teca dos folículos antrais em fase intermediária expressam o receptor RXFP2 e respondem ao INSL3 com o aumento de AMP cíclico (Dai *et al.* 2017). Não há, até o momento, estudos sobre a expressão de RXFP2 no ovário humano, e a função do INSL3 ovariano permanece desconhecida, mas em macacas Rhesus o mRNA do RXFP2 foi localizado na camada da teca de folículos antrais (Hanna *et al.*, 2010).

Outro estudo sugere que o sistema INSL3-RXFP2 atuaria estimulando a produção de andrógenos tecais, direcionando a enzima 17a-hidroxilase e, posteriormente, impulsionando a produção de estradiol (Zhu *et al.*, 2021).

Figura 5 - Esquema representativo da origem (células da teca), alvo (oócitos) e efeitos do INSL3 no folículo ovariano Reproduzido de Xue *et al.* (2014).



Fonte: Xue *et al.* (2014).

1.5 O papel da testosterona nos ciclos de FIV

Receptores androgênicos são expressos nas células da teca, da granulosa e no oócito, sendo que a expressão desses receptores é essencial durante a foliculogênese e a ovulação, destacando assim a atividade da testosterona e da dehidroepiandrosterona (DHEA) (Blumenfeld, 2020).

Apesar de na síndrome dos ovários policísticos o aumento das concentrações de androgênios em fases iniciais da foliculogênese ser prejudicial, levando a uma parada no desenvolvimento folicular e inibindo a formação de um folículo maduro, alguns estudos vêm mostrando um papel importante dos androgênios durante a fase final da estimulação ovariana, com possível benefício do uso suplementar da testosterona por más-respondedoras (Katsika *et al.*, 2023; Noventa *et al*., 2019).

Embora não exista um consenso sobre qual classificação utilizar para a definição de uma paciente má respondedora, a classificação de Bologna as define por:

a) Idade materna igual ou superior a 40 anos ou outros fatores de risco para resposta ovariana deficiente (como excisão de endometriomas ovarianos);

b) Resposta ovariana deficiente em ciclos de fertilização *in vitro* anteriores (recuperação de três ou menos oócitos em uma fertilização *in vitro* de estimulação convencional protocolo);
c) Baixa contagem de folículos antrais (CFA) (menos de 5–7 folículos) ou baixa dosagem do hormônio anti-Mülleriano (AMH) abaixo de 0,5–1,1 ng/ml (3,5–8 pmol/L) (Ferraretti *et al*., 2011).

Uma outra classificação para má respondedoras em ciclos de FIV foi proposta pelo grupo POSEIDON (Esteves *et al*., 2019; Humaidan *et al*., 2016).

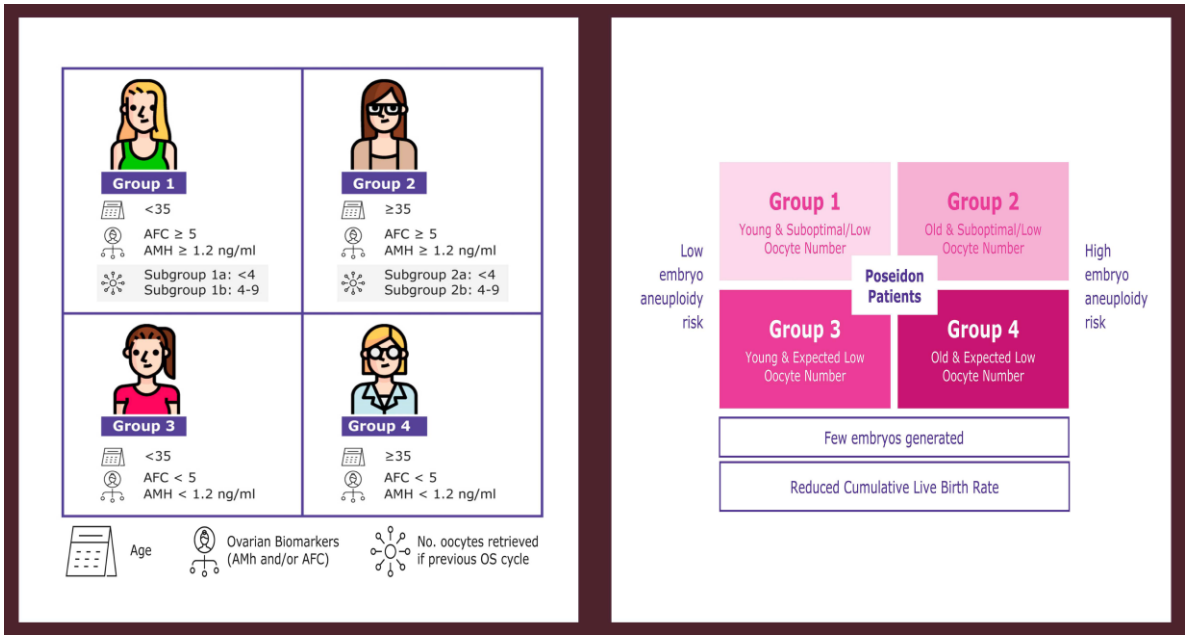
Os quatro grupos de classificação POSEIDON são:

a) POSEIDON I: Pacientes com menos de 35 anos, com marcadores normais de reserva ovariana (AMH>1,2 ng/mL, AFC>5), porém com resposta ovariana deficiente e inesperada.
   - Subgrupo 1a: <4 oócitos recuperados em HOC convencional em Ciclo de TRA/FIV.
   - Subgrupo 1b: 4–9 oócitos recuperados em HOC convencional em Ciclo de TRA/FIV.
b) POSEIDON II: Pacientes com mais de 35 anos, com marcadores normais de reserva ovariana: AMH>1,2 ng/mL, AFC>5, porém com resposta ovariana deficiente e inesperada.
   - Subgrupo 2a: <4 oócitos recuperados em HOC convencional em Ciclo de TRA/FIV.
   - Subgrupo 2b: 4–9 oócitos recuperados em HOC convencional em Ciclo de ART/FIV.
c) POSEIDON III: Pacientes com menos de 35 anos, com baixa reserva ovariana: AMH<1,2 ng/mL, AFC<5.
d) POSEIDON IV: Pacientes com mais de 35 anos, comreserva ovariana deficiente: AMH<1,2 ng/mL, AFC<5.

O novo sistema baseia-se na idade feminina, marcadores de reserva ovariana, sensibilidade ovariana a gonadotrofina e o número de oócitos recuperados, o que identificará as pacientes com pior prognóstico e estratificará essas pacientes em um dos quatro grupos (Figura 6). De acordo com esses critérios, quatro grupos distintos de pacientes podem ser estabelecidos (esquerda). Devido ao baixo número de oócitos

e menos embriões produzidos, os pacientes com POSEIDON apresentam taxas cumulativas de nascidos vivos mais baixas por ciclo iniciado. No entanto, o prognóstico é diferentemente afetado pela quantidade de oócitos e pela idade da mulher, já que esta última está relacionada ao risco de aneuploidia (direita) (Esteves *et al.*, 2019).

Figura 6 - Critérios POSEIDON de pacientes de baixo prognóstico em TRA



Fonte: Esteves *et al*. (2019).

Já um estudo realizado por Zhu *et al*. (2021), demostrou que a deficiência de INSL3 pode estar ligada a uma condição de hipoandrogenemia, que é comum em mulheres com falência ovariana prematura. Assim, a queda dos níveis de testosterona observada nessas pacientes poderia estar relacionada à incapacidade das células da teca de produzir andrógenos adequadamente, exacerbada pela redução de INSL3, sugerindo que a falta de INSL3 poderia afetar negativamente a biossíntese de andrógenos nas células ovarianas.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que a infertilidade é uma condição clínica muito prevalente e que a fertilização *in vitro* (FIV) é o tratamento mais indicado para grande parte dos casais afetados, torna-se de grande importância o estudo da regulação dos hormônios proteicos ovarianos durante a estimulação com gonadotrofinas nos ciclos de FIV, no intuito de diminuir o risco de complicações iatrogênicas e aumentar a taxa de sucesso no tratamento proposto. Com exceção da síntese de esteroides, pouco se sabe sobre o papel das células da teca na foliculogênese em ciclos estimulados artificialmente e sua importância na resposta ovariana ao estímulo exógeno de gonadotrofinas. Já foi demonstrado que INSL3 é liberado por células da teca de folículos em crescimento e que o aumento na concentração sérica desse peptídeo acompanha o desenvolvimento folicular em ciclos fisiológicos em humanos.

A importância deste estudo será avaliar funcionalmente as células da teca *in vivo* por meio da dosagem sérica de INSL3 durante a foliculogênese ovariana em ciclos de FIV, assim como investigar a relação dos níveis séricos de INSL3 com a resposta ovariana das mulheres durante a estimulação ovariana controlada que precede a FIV. Esses dados poderão ajudar a compreender melhor, para além da esteroidogênese, a sinalização endócrina e parácrina das células da teca durante a estimulação ovariana para FIV em humanos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a relação entre os níveis plasmáticos e intrafoliculares do peptídeo INSL3 e a resposta ovariana à estimulação com gonadotrofinas em ciclos de FIV.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar a relação entre os níveis plasmáticos e os níveis intra-foliculares de INSL3 após a estimulação ovariana;
b) Descrever a relação entre os níveis de INSL3 e os de outro hormônio produzido pelas células da teca, a testosterona;
c) Investigar se os níveis plasmáticos de INSL3 após a estimulação com gonadotrofinas associam-se com a intensidade da resposta ovariana, medida em número de folículos crescidos e de oócitos captados;
d) Avaliar se os níveis plasmáticos de INSL3 medidos antes do início da estimulação ovariana têm valor preditivo para a resposta ao tratamento.

4 MATERIAS E MÉTODOS

O delineamento do estudo foi uma coorte prospectiva. As pacientes foram selecionadas no setor de Reprodução Humana da Universidade Federal de Minas Gerais. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo A) e todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes da inclusão no estudo (Anexo B).

Para ser admitida no programa de fertilização in vitro, inicialmente, a paciente já foi previamente avaliada e apresenta diagnóstico clínico de infertilidade primária ou secundária ou alguma condição que torne mais difícil a gravidez espontânea ou através de tratamentos de baixa complexidade, com indicação de tratamento por FIV convencional ou ICSI.

4.1 **Seleção dos** participantes

4.1.1 Cálculo amostral

Com base em estudo anterior do nosso laboratório (Cavallo *et al.*, 2017), foi calculado através do programa Piface (Universidade Iowa, Estados Unidos), que seria necessário o número mínimo de 20 participantes por grupo para conferir poder estatístico de 80% (1-β = 0,20) na detecção de diferenças de no mínimo 20% entre os grupos, com 95% de confiança (α=0,05) na principal variável de desfecho, que é a proporção de oócitos maduros coletados durante a punção ovariana.

4.1.2 Critérios de inclusão

a) Mulheres com idade variando de 20 a 42 anos;
b) Mulheres portadoras de infertilidade (definida por coitos desprotegidos durante 1 ano, em pacientes <35 anos e 6 meses >35 anos e que não culminaram em gravidez);
c) Com indicação de tratamento de fertilização *in vitro*;
d) Sem doença sistêmica.

4.1.3 Critérios de exclusão

a) Gravidez;
b) História de ooforectomia;
c) Tabagismo (mais de 10 cigarros ao dia);
d) Neoplasias;
e) Tromboflebite ativa ou distúrbios tromboembólicos recentes.

4.1.4 Avaliação inicial

Características clínicas das pacientes (idade, estado civil, escolaridade, naturalidade e procedência, profissão, antecedentes ginecológicos) e do parceiro (idade, escolaridade e profissão), tempo de infertilidade, determinar se a infertilidade é primária ou secundária; número de ciclos de FIV realizados previamente, valores de FSH, protocolo de estimulação ovariana proposto e fornecimento do consentimento livre e esclarecido sobre o trabalho.

Após a avaliação inicial e determinação do tipo de protocolo de estimulação ovariana, eram realizados exames para a realização da FIV. A coleta das amostras para a dosagem do pepitídeo INSL-3 foi realizada na fase folicular do ciclo menstrual anterior à estimulação ovariana, juntamente com a contagem dos folículos antrais. As pacientes foram acompanhadas para avaliar a dose total de gonadotrofina necessária em cada um dos ciclos, antes do trigger de hCG, ou agonista, ou antagonista dependendo do protocolo de indução proposto.

No dia da coleta ovular, foram coletadas nova amostra de sangue e também amostra do líquido folicular aspirado, para posterior dosagem de INSL3 e Testosterona.

4.2 Contagem dos folículos antrais, protocolos de indução, captação de oócitos, fertilização dos oócitos maduros e transferência embrionária

As pacientes selecionadas para o estudo foram submetidas a estimulação ovariana conforme a indicação médica individualizada após avaliação da idade, indicação da FIV, contagem dos folículos antrais, níveis de FSH e protocolo do serviço.

4.2.1Contagem dos foículos antrais

A contagem dos folículos antrais (CFA) tem sido um método amplamente utilizado para avaliar a reserva ovariana em protocolos de fertilização *in vitro* (FIV) e para a avaliação do potencial reprodutivo feminino. Este procedimento foi realizado por meio de ultrassonografia transvaginal (USTV) de alta resolução, preferencialmente entre o segundo e o terceiro dia do ciclo menstrual, para garantir uma avaliação precisa e livre de influência dos hormônios do ciclo ovulatório.

A técnica de contagem de folículos antrais envolveu a identificação e quantificação dos folículos de pequeno diâmetro (normalmente < 10 mm) visíveis no ovário durante a varredura ultrassonográfica. Para garantir a precisão do exame, o procedimento foi realizado por um operador experiente, em geral, em conjunto com o residente do serviço. Durante a avaliação, os folículos antrais foram contados em ambos os ovários, e a somatória foi registrada.

Figura 7 - Arquivo pessoal para a demonstração do exame realizado para a contagem dos folículos antrais

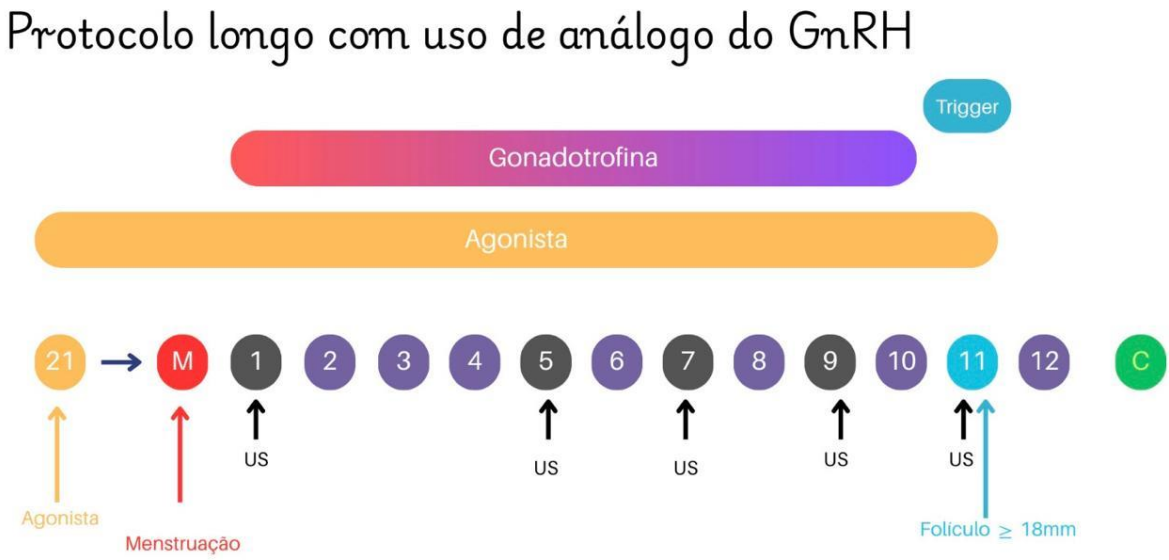
Arquivo pessoal

Fonte: elaboração própria.

4.2.2Protocolo longo com agonista do GnRH (GnRHa)

O bloqueio hipofisário realizado com agonistas das gonadotrofinas do GnRH (GnRHa), é administrado em dose única de depósito no 21º dia do ciclo anterior à indução ovariana. A finalidade desse bloqueio consiste em impedir o pico de LH, que poderia desencadear uma ovulação inesperada antes do momento programado para a captação dos oócitos. Após a ocorrência da menstruação, por volta do 3º dia do ciclo menstrual, realizou-se nova ultrassonografia. Caso o endométrio apresentasse espessura fina, em torno de 3 mm, e os ovários não exibissem folículos remanescentes com diâmetro superior a 10 mm, procedia-se à iniciação da estimulação ovariana.

Figura 8 - Desenho esquemático do protocolo longo com uso de análogo do GnRH



Fonte: elaboração própria.

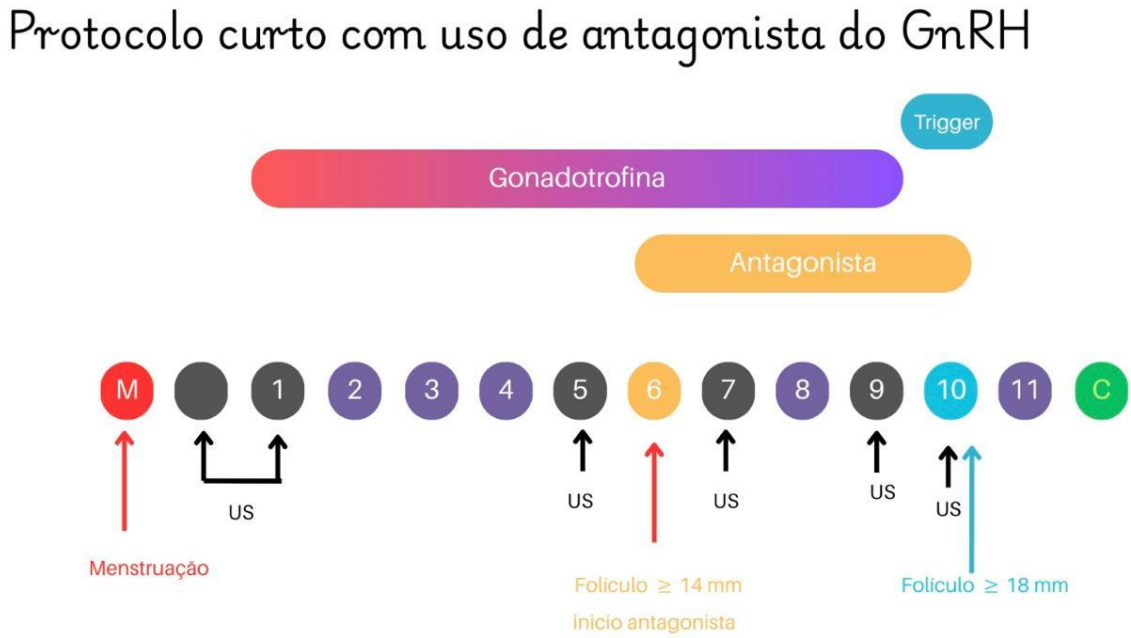
O monitoramento do crescimento e desenvolvimento folicular foi efetuado por meio de ultrassonografias transvaginais seriadas, concomitantemente ao uso de gonadotrofinas, cuja administração era ajustada conforme a evolução folicular observada. O desencadeamento da maturação final dos oócitos ("trigger") foi realizado com hCG recombinante ou com agonista do GnRH, quando, na ultrassonografia, identificava-se ao menos um folículo com diâmetro médio superior a

18 mm. Após um intervalo de 34 a 36 horas, as pacientes eram submetidas ao procedimento de captação dos oócitos.

4.2.3Protocolo curto com antagonista do GnRH

No protocolo curto, a supressão da hipófise foi promovida pelo antagonista do GnRH. Este apresentou a mesma função do agonista do GnRH, contudo, com a vantagem de induzir um bloqueio hipofisário imediato, sem provocar o efeito flare-up inicial. Dessa forma, pôde ser administrado após o início da estimulação ovariana, sendo atualmente preferido em relação ao protocolo longo, especialmente em mulheres com baixa reserva ovariana, idade avançada ou risco aumentado de desenvolvimento da síndrome de hiperestimulação ovariana. Tal como no protocolo anterior, realizou-se ultrassonografia entre o segundo e o terceiro dia do ciclo, com o objetivo de confirmar a ausência de cistos ovarianos e a presença de endométrio fino. Posteriormente, iniciou-se a administração das gonadotrofinas, com monitorização ultrassonográfica seriada. Quando o maior folículo atingiu a dimensão de 14 mm, procedeu-se à introdução do antagonista. O trigger foi realizado com hCG recombinante ou agonista do GnRH quando detectado via USTV pelo menos um folículo maior que 18mm de diâmetro médio e após 34 a 36h, estas pacientes eram submetidas a captação dos oócitos.

Figura 9 - Desenho esquemático do protocolo curto com uso de antagonista do GnRH



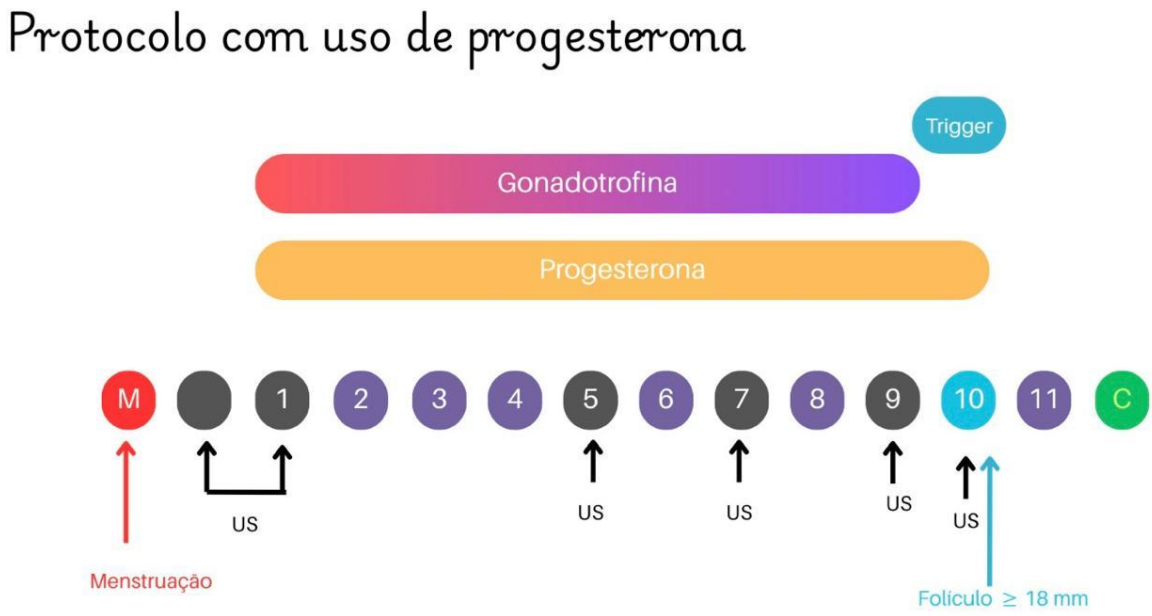
Fonte: elaboração própria.

4.2.4Protocolo com uso de Progesterona

Nos ciclos em que se utilizou a progesterona, a administração de 10 mg de didrogesterona a cada 12 horas foi iniciada no primeiro dia da indução ovariana. Assim como nos demais protocolos, realizou-se ultrassonografia transvaginal entre o segundo e o terceiro dia do ciclo, com o objetivo de confirmar a ausência de cistos ovarianos e a presença de um endométrio fino. Posteriormente, iniciou-se a administração das gonadotrofinas associada à manutenção da didrogesterona, na mesma posologia de 10 mg a cada 12 horas, com monitorização ultrassonográfica seriada até o dia da administração do trigger.

O trigger da maturação final dos oócitos foi realizado com hCG recombinante ou com agonista do GnRH, conforme indicação do médico assistente, quando, à ultrassonografia transvaginal, foi identificado pelo menos um folículo com diâmetro médio igual ou superior a 18 mm. Após um intervalo de 34 a 36 horas, as pacientes foram submetidas ao procedimento de captação dos oócitos.

Figura 10 - Desenho esquemático do protocolo curto com uso de progesterona



Fonte: elaboração própria.

4.2.5Captação de oócitos e a fertilização dos oócitos maduros

A aspiração folicular foi realizada sob orientação de ultrassonografia transvaginal (USTV), utilizando uma agulha de parede simples acoplada a um sistema de aspiração com pressão negativa artificial constante, mantida entre 100 e 200 mmHg. O líquido folicular aspirado foi imediatamente transferido para tubos de ensaio estéreis mantidos a 37°C. Os oócitos foram imediatamente identificados com o auxílio de lupa estereoscópica, em capela de fluxo laminar, sob atmosfera controlada e ambiente estéril. O número total de oócitos recuperados e o número de oocitos maduros foi devidamente registrado. O processamento seminal foi realizado pela técnica de "swim-up", utilizando meio de cultura apropriado e incubado a 37°C. Após o período de incubação de aproximadamente 45 minutos, a camada superior contendo os espermatozoides móveis foi cuidadosamente coletada. A inseminação dos oócitos maduros foi realizada por meio da fertilização *in vitro* (FIV) convencional, com adição de 50.000 a 100.000 espermatozoides móveis por oócito, ou por injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), de acordo com critérios previamente estabelecidos.

4.2.6 Transferência embrionária

Os embriões resultantes da fertilização *in vitro* foram transferidos entre o segundo e o sexto dia pós-fertilização, conforme a indicação clínica e os critérios de desenvolvimento embrionário. A transferência embrionária foi realizada em conformidade com os protocolos do serviço, levando-se em consideração a qualidade embrionária e o estágio de desenvolvimento. Após a transferência, foi instituído um protocolo de suporte à fase lútea, com a administração de progesterona por via vaginal, na dosagem mínima de 600 mg/dia, mantida até, no mínimo, a data da realização do exame de gravidez (β-hCG quantitativo), agendado para 14 dias após a coleta dos oócitos.

4.3 Coleta do plasma e do líquido folicular

Foram coletados 5 ml de sangue em tubo próprio a vácuo, usando EDTA ou heparina como anticoagulante e centrifugadas por 15 minutos aproximadamente a 1000 x g entre 2 a 8ºC dentro de 30 minutos após a coleta. Removido o plasma, as amostras eram armazenadas a -80ºC para uso posterior.

Já a coleta do líquido folicular foi realizada durante a captura de óvulos para o tratamento. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 1000 × g para a precipitação das partículas sólidas e o sobrenadante foi armazenado em alíquotas a -80ºC para análise posterior.

4.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para medida de INSL3 no plasma e no liquido folicular

Para a avaliação de INSL3 utilizamos o Kit de ensaio imunoenzimático ligado à proteína 3 semelhantes à insulina - INSL3; MyBioSource Inc (San Diego- EUA) – MBS7238484 específico para humanos e foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

Esse ensaio é um kit de ELISA competitivo, projetado para a determinação quantitativa de INSL3 em humanos. Este método de ensaio utiliza anticorpos policlonais e um conjugado de INSL3-HRP, no qual a competição entre o INSL3 presente na amostra e o conjugado INSL3-HRP pelo sítio de ligação do anticorpo anti-

INSL3 permite a quantificação da proteína. A intensidade da cor obtida é inversamente proporcional à concentração de INSL3 na amostra, sendo quantificada por meio de uma curva padrão.

A faixa de leitura do ensaio situa-se em uma concentração mínima detectável de 0,1 ng/mL. Os coeficientes de variação (CV) intraensaio e interensaio são de <10% e <12%, respectivamente, indicando boa precisão e repetibilidade do método para ensaios laboratoriais. A especificidade do ensaio é alta, sem reatividade cruzada significativa com análogos do INSL3. Esse controle rigoroso sobre a variação intra e interensaio é essencial para garantir resultados consistentes e confiáveis na quantificação do INSL3 em diferentes tipos de amostras biológicas.

4.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para medida de Testosterona no plasma e no líquido folicular

Para a avaliação da Testosterona utilizamos o Kit de ensaio imunoenzimático Elabscience T (Houston – EUA) – nº E-EL-0155 não sendo específico para humanos, já foi utilizado em amostras de ratas, camundongas, galinhas, porcas, ovelhas e bovino. Todas as etapas foram criteriosamente realizadas de acordo com as instruções do kit.

O kit ELISA de testosterona utilizado é um ensaio de ELISA competitivo, projetado para a quantificação de testosterona em amostras de soro, plasma e outros fluidos biológicos.

O ensaio utiliza um anticorpo biotinilado específico para testosterona que compete com a testosterona nas amostras pelos sítios de ligação, e a reação colorimétrica é medida em um leitor de microplacas a 450 nm. A intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de Testosterona na amostra, e a quantificação é realizada por meio de uma curva padrão.

A faixa de detecção para o ensaio é de 0,31 a 20 ng/mL, com uma sensibilidade de 0,17 ng/mL, oferecendo precisão e especificidade para a testosterona com pouca interferência de análogos. A precisão do ensaio é demonstrada por um coeficiente de variação (CV) intraensaio inferior a 10%, enquanto o CV interensaio também se mantém abaixo desse valor, indicando alta reprodutibilidade e consistência entre testes diferentes.

4.6 **Análise Estatística**

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio dos programas SPSS (versão 22.0, IBM Corp., Armonk, NY, EUA) e GraphPad Prism (versão 6.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Inicialmente, foi realizada a avaliação da distribuição dos dados por meio de testes de normalidade, o que orientou a escolha dos testes estatísticos não paramétricos.

A amostra do estudo foi dividida em um grupo com valores de INSL3 plasmático pós-estímulo acima da mediana (n = 40) e abaixo da mediana (n = 40, Figura 12). Para a comparação das medianas entre os dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney, adequado para dados que não seguem distribuição normal. A comparação de frequências entre os grupos foi realizada por meio do teste do qui-quadrado (χ^2), visando identificar possíveis associações entre variáveis categóricas.

As correlações entre variáveis quantitativas foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Spearman, apropriado para dados não paramétricos ou ordinais, permitindo avaliar a intensidade e a direção das associações monotônicas entre as variáveis. Para a análise de medidas pareadas, como as concentrações hormonais no plasma e no líquido folicular dos mesmos indivíduos, foi empregado o teste de Wilcoxon para amostras dependentes.

A capacidade do nível plasmático de INSL3 de predizer a resposta ovariana foi avaliada pelo cálculo da área sob a curva *receiver operating characteristic* (ROC) com intervalo de confiança de 95%. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

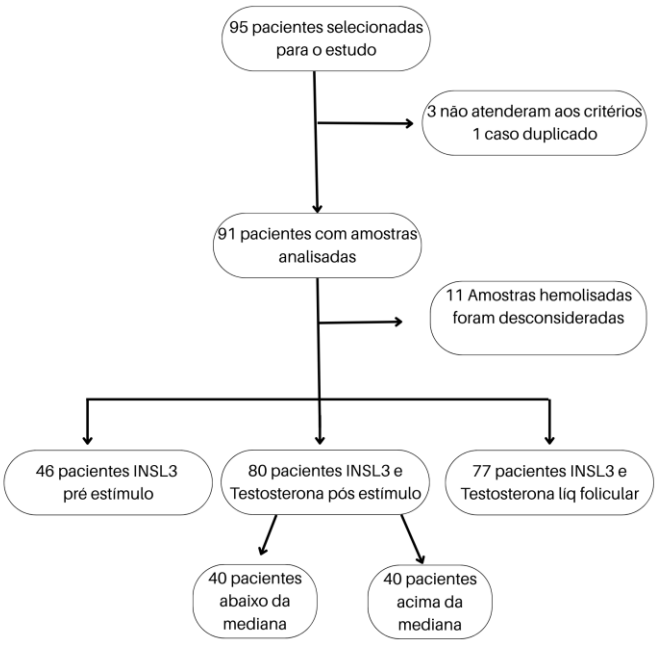
5.1 Fluxo do estudo e características das participantes

Foram inicialmente recrutadas 95 pacientes para participação no estudo (Figura 12). No entanto, três participantes foram excluídas por não atenderem aos critérios de inclusão e exclusão previamente definidos, e um caso duplicado foi identificado, resultando em uma amostra final composta por 91 mulheres.

Após o processo de coleta e posterior descongelamento das amostras biológicas, onze foram descartadas devido à ocorrência de hemólise, e três amostras de líquido folicular foram perdidas durante o manuseio. Adicionalmente, a análise das amostras de plasma coletadas no período pré-estímulo foi limitada, uma vez que o foco principal do estudo era a avaliação das concentrações hormonais no período pós-estímulo e no líquido folicular.

Dessa forma, foram analisadas 46 amostras de plasma coletadas no período pré-estímulo, 80 amostras de plasma no período pós-estímulo e 77 amostras de líquido folicular para dosagem de INSL3. Para a dosagem de testosterona, foram incluídas 80 amostras de plasma pós-estímulo e 77 amostras de líquido folicular.

Figura 11 - Fluxograma sobre a seleção e análise dos grupos



Fonte: elaboração própria.

As características das participantes incluídas no estudo são resumidas na Tabela 1. A idade mediana foi 39 anos e o tempo de infertilidade mediano foi de 10 anos, refletindo a dificuldade de acesso a serviços públicos de reprodução assistida no Brasil.

Entre as causas de infertilidade, o fator masculino foi a principal causa (61,0%), seguido por fator anatômico feminino (16,9%), infertilidade sem causa aparente (13,0%) e endometriose (9,1%). Predominaram os ciclos utilizando antagonista de GnRH para o bloqueio hipofisário (82,5%) e houve uso tanto de gonadotrofina recombinante (52,5%) como urinária (43,8%). Das 80 participantes incluídas, 54 tiveram transferência de embrião a fresco e, dessas, 12 (22%) resultaram em gestação, com βhCG positivo (Tabela 1).

Tabela 1 - Características das participantes do estudo (n = 80)

Idade (anos)	39 (36 – 42)
IMC (Kg/m^2)	25,3 (23,4 – 27,8)
Tempo de infertilidade (anos)	10 (8 – 12)
Contagem de folículos antrais	10 (7 – 16)
FSH sérico (UI/L)	6,7 (5,3 – 8,6)
Estradiol sérico (pg/mL)	39 (30 – 52)
Principal fator de infertilidade	
Fator masculino	47/77 (61,0%)
Fator feminino anatômico	13/77 (16,9%)
Endometriose	7/77 (9,1%)
Sem causa aparente	10/77 (13,0%)
Bloqueio hipofisário	
GnRHant	66/80 (82,5%)
GnRHa (longo)	12/80 (15,0%)
Progesterona	2/80 (2,5%)
Gonadotrofina	
Recombinante	42/80 (52,5%)
Urinária	35/80 (43,8%)
Ambas	3/80 (3,8%)
Total de gonadotrofinas (UI)	2175 (1800 – 2550)
Folículos ≥ 16mm	4 (2 – 8)
Oócitos captados	6 (3 – 12)
Oócitos/1000 UI de gonadotrofinas	2,67 (1,18 – 5,22)
Oócitos em metáfase II	4 (2 – 9)
Proporção de oócitos em metáfase II (%)	80 (57-100)
Embriões em clivagem	2 (2 – 5)
Blastocistos	0 (0 –2)
βhCG positivo / ciclo com embrião transferido a fresco	12/54 (22%)
Síndrome de hiperestimulação	0/78 (0%)

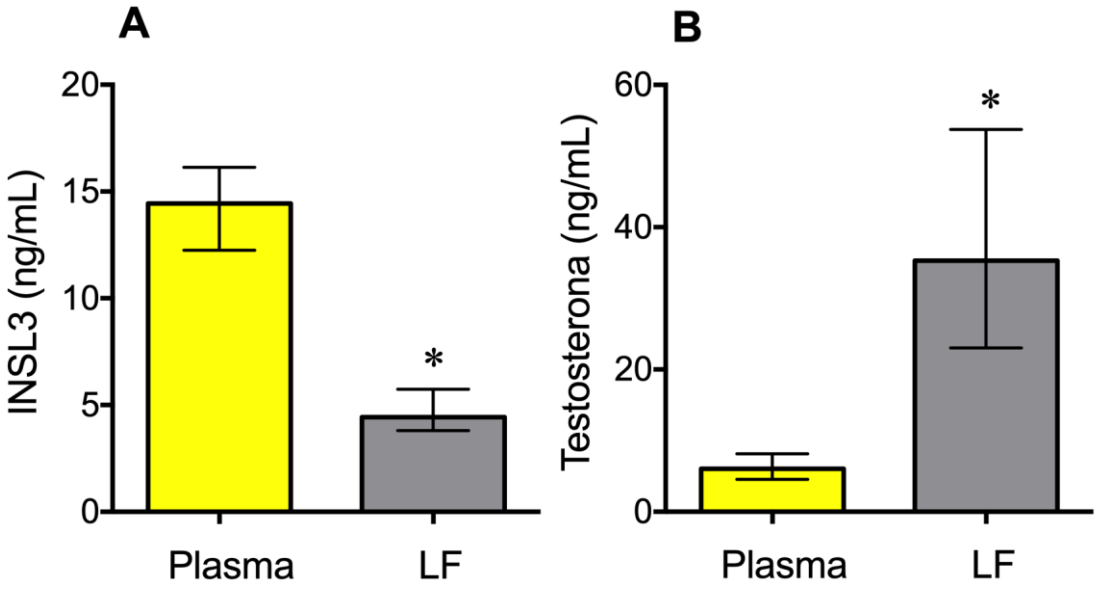
Dados expressos como mediana (intervalo interquartil) ou frequência.

Fonte: elaboração própria.

5.2 Níveis plasmáticos e intrafoliculares de INSL3 e testosterona

Houve uma maior concentração de testosterona no líquido folicular quando comparada à concentração plasmática, sugerindo que a testosterona produzida nas células da teca é transportada em grande parte por via parácrina até a cavidade antral. Diferentemente, a concentração de INSL3 foi maior no plasma que no líquido folicular (Figura 13).

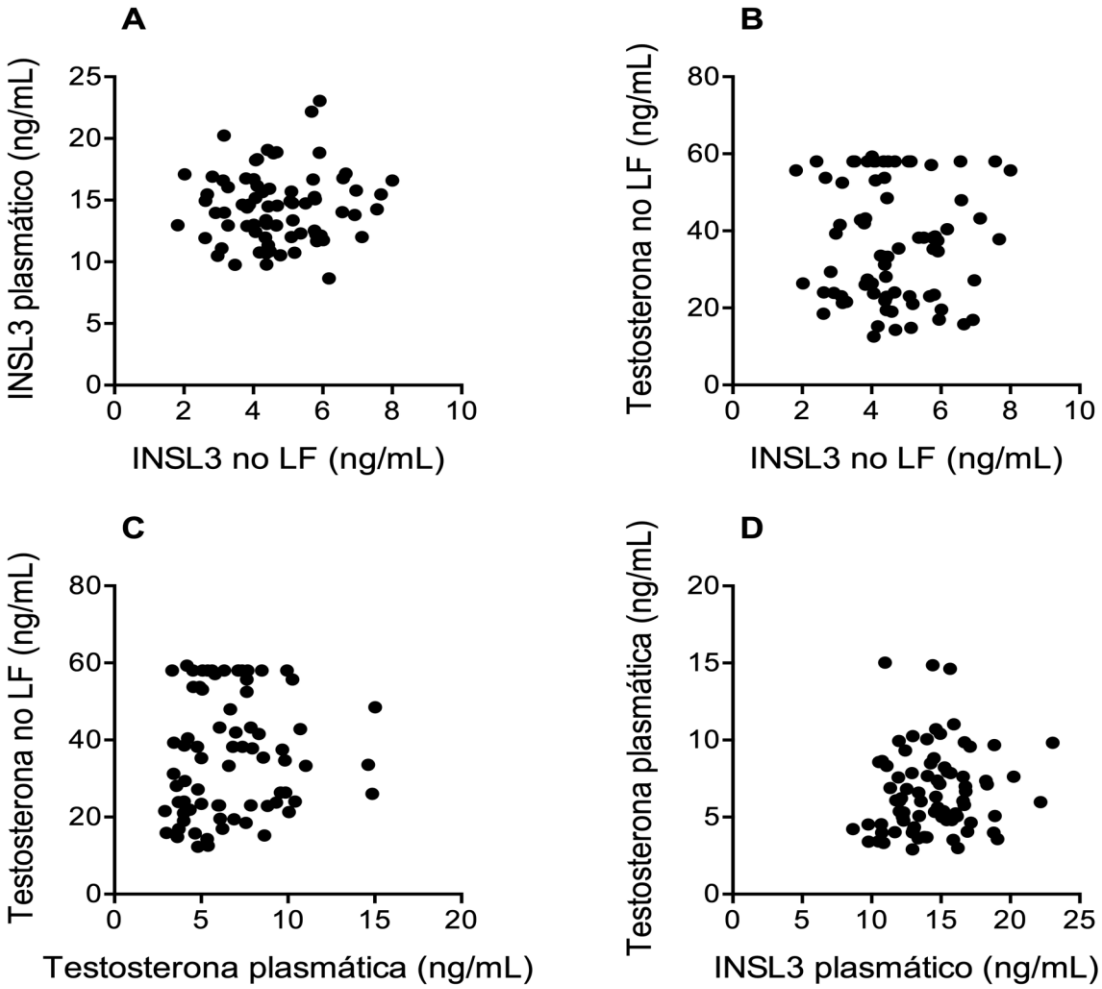
Figura 12 - Concentrações de INSL3 (A) e de Testosterona (B) no plasma e no líquido folicular (LF) em amostras obtidas contemporaneamente no dia da coleta ovular



Nota: *P<0,05 (teste de Wilcoxon para amostras pareadas).
Fonte: elaboração própria.

A análise das concentrações entre INSL3 e testosterona pós estimulação ovariana no plasma e no líquido folicular não revelou qualquer correlação direta entre os dois hormônios, nem entre as concentrações de cada hormônio nos dois compartimentos avaliados simultaneamente (Figura 14).

Figura 13 - Análise de correlação linear entre os níveis plasmáticos e no líquido folicular (LF) de INSL3 e testosterona



Nota: Não houve correlação estatisticamente significativa (coeficiente de correlação linear não paramétrico de Spearmann).
Fonte: elaboração própria.

5.3 Níveis plasmáticos de INSL3 pós-estimulação e a resposta ovariana

A tabela 2 compara os dois grupos de participantes classificadas de acordo com os níveis plasmáticos de INSL3 pós-estímulo. Os grupos são semelhantes quanto à idade, índice de massa corporal (IMC) e tempo de infertilidade, assim como na frequência dos principais fatores de infertilidade e no tipo de gonadotrofina usada para estimulação ovariana. Entretanto, as participantes com níveis de INSL3 acima da mediana tiveram maior contagem de folículos antrais pré-estimulação (13 vs. 8, p = 0,003) e requereram menores doses de gonadotrofinas para chegar a um maior número de folículos pré-ovulatórios com diâmetro ≥ 16mm (6 vs 3, p = 0,002), total de

oócitos captados (7 vs. 3, p = 0,035) e oócitos maduros em metáfase II (6 vs. 4, p = 0,005). Assim, enquanto no grupo com INSL3 acima da mediana foram obtidos 3,33 oócitos para cada 1000 IU de gonadotrofina injetada, no grupo abaixo da mediana foram 1,84 oócitos por 1000 IU de gonadotrofina (p = 0,017, Tabela 2).

Tabela 2 - Características clínicas e desfechos da estimulação ovariana de acordo com os níveis plasmáticos de INSL3 no dia da coleta oocitária

	INSL3 **abaixo** da mediana (n = 40)	INSL3 **acima** da mediana (n = 40)	Valor de P
Idade (anos)	39 (36 – 42)	38 (36 – 41)	0,198
IMC (Kg/m^2)	25,8 (23,7 – 27,5)	25,0 (23,3 – 29,2)	0,810
Tempo de infertilidade (anos)	10 (8 – 13)	10 (8 – 12)	0,682
Contagem de folículos antrais	8 (6 – 13)	13 (9 – 23)	**0,003**
FSH sérico (UI/L)	7,5 (5,9 – 9,3)	6,3 (4,8 – 8,5)	0,084
Estradiol sérico (pg/mL)	42 (28 – 53)	37 (33 – 48)	0,421
Principal fator de infertilidade			
Fator masculino	24/38 (63,2%)	23/39 (59,0%)	0,621
Fator feminino anatômico	6/38 (15,8%)	7/39 (17,9%)	
Endometriose	2/38 (5,3%)	5/39 (12,8%)	
Sem causa aparente	6/38 (15,8%)	4/39 (10,3%)	
Bloqueio hipofisário			
GnRHant	28/40 (70%)	38/40 (95%)	**0,006**
GnRHa (longo)	10/40 (25%)	2/40 (5%)	
Progesterona	2/40 (5%)	0/40 (0%)	
Gonadotrofina			
Recombinante	22/40 (55%)	20/40 (50%)	0,707
Urinária	16/40 (40%)	19/40 (48%)	
Ambas	2/40 (5%)	1/40 (3%)	
Total de gonadotrofinas (UI)	2250 (1950 – 2625)	2063 (1725 – 2307)	**0,002**
Folículos ≥ 16mm	3 (2 – 7)	6 (3 – 9)	**0,028**
Oócitos captados	4 (2 – 8)	7 (3 – 14)	**0,035**
Oócitos/1000 UI de gonadotrofinas	1,84 (0,81 – 3,81)	3,33 (1,40 – 7,87)	**0,017**
Oócitos em metáfase II	4 (1 – 7)	6 (3 – 15)	**0,005**
Proporção de oócitos MII (%)	73 (47-100)	85 (62-100)	0,123
Embriões em clivagem	2 (2 – 4)	3 (2 – 8)	0,164
Blastocistos	0 (0 – 1)	0 (0 – 4)	0,082
βhCG positivo / ciclo com embrião transferido a fresco	5/29 (17%)	7/25 (28%)	0,535
Síndrome de hiperestimulação	0/39 (0%)	0/39 (0%)	1,000

Dados expressos como mediana (intervalo interquartil) ou frequência. Os valores de P values referem-se à comparação entre os grupos (teste de Mann-Whitney, qui-quadrado ou teste exato de Fisher). IMC: índice de massa corporal; GnRHant: antagonista do hormônio liberador de gonadotrofinas; GnRHa: agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas.

Fonte: elaboração própria.

5.4 Nível plasmático de INSL3 pré-estimulação como possível biomarcador preditivo da resposta ovariana

Considerando a mediana de 6 oócitos captados na amostra total do estudo (Tabela 1), avaliamos por meio de curvas ROC a acurácia da dosagem de INSL3 plasmática pré-estímulo para predizer a captação de > 6 oócitos naquele ciclo de tratamento. Como mostra a Tabela 3, a área sob a curva ROC para o INSL3 plasmático pré-estímulo foi 0,555 (intervalo de confiança 0,386 – 0,723), caracterizando este marcador como de baixa acurácia e sem utilidade prognóstica. Como esperado, o marcador mais acurado foi a contagem de folículos antrais (área sob a curva 0,851) seguido pela idade (0,759) e FSH sérico (0,602).

Tabela 3- Área sob a curva ROC para predição da resposta ovariana à estimulação com gonadotrofinas, considerando como desfecho positivo a obtenção de >6 oócitos

Variável	Número de casos	Área sob a curva	IC de 95%
Idade	95	0,759	0,662 – 0,856
FSH sérico	91	0,602	0,485 – 0,718
CFA	93	0,851	0,773 – 0,930
INSL3 plasmático	46	0,555	0,386 – 0,723

CFA: contagem de folículos antrais; IC: intervalo de confiança. ROC: *receiver operating characteristic*.
Fonte: elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

A estimulação ovariana controlada, realizada nos ciclos de reprodução assistida, reveste-se de fundamental importância para a determinação da viabilidade do tratamento como um todo. Seu principal objetivo consiste em promover o crescimento folicular da maneira mais uniforme possível, possibilitando a captação do maior número viável de oócitos maduros, a fim de produzir embriões de boa qualidade, capazes de resultar em gravidez e, consequentemente, no nascimento de um bebê saudável. Entretanto, nem todas as pacientes respondem de forma satisfatória aos protocolos de indução ovariana. Assim, a identificação dos fatores associados à baixa resposta torna-se essencial para a individualização dos protocolos terapêuticos, contribuindo de maneira decisiva para o êxito do tratamento.

No presente estudo, a população analisada apresentou mediana de idade de 39 anos, valor considerado elevado para a prática das técnicas de reprodução assistida (TRA), além de apresentar um longo período de infertilidade, com média de duração aproximada de dez anos.

A idade materna configura-se como um dos principais fatores associados às falhas nos ciclos de fertilização *in vitro* (FIV) e de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), conduzindo a resultados negativos nesses tratamentos (Gao *et al*., 2023). Sharma, Allgar e Rajkhowa (2002) demonstraram uma taxa global de gravidez de 33% no primeiro ciclo de tratamento, enquanto em pacientes com idade superior a 35 anos essa taxa foi reduzida para 22%, evidenciando de forma expressiva o impacto da idade sobre os desfechos reprodutivos (Sharma; Allgar; Rajkhowa, 2002). De maneira semelhante, Leijdekkers *et al.* (2018) observaram uma diminuição significativa na taxa de nascidos vivos no primeiro ciclo de tratamento: uma mulher de 30 anos, após dois anos de infertilidade, apresentou uma taxa de nascimento vivo de 40%, enquanto em mulheres de 40 anos essa taxa caiu para 15%, confirmando o efeito negativo da idade avançada sobre os resultados das técnicas de reprodução assistida. No nosso estudo, encontramos uma taxa de apenas 22% de βhCG positivo por ciclo com embrião transferido a fresco. Como a média de idade das nossas pacientes foi elevada, esse pode ser um fator que colaborou com a baixa taxa de gravidez na amostra analisada.

O tempo de infertilidade também se configura como um fator relevante na taxa de sucesso dos tratamentos de baixa complexidade, sendo observada uma

diminuição significativa nas taxas de sucesso quando o período de infertilidade ultrapassa três anos (Vargas-Tominaga *et al.*, 2020). No presente estudo, a média do tempo de infertilidade das pacientes avaliadas foi consideravelmente elevada, atingindo a mediana de 10 anos. Tal fato pode ser explicado pelo prolongado tempo de espera necessário para o acesso aos tratamentos de fertilização *in vitro* (FIV) em nosso serviço, que atende exclusivamente pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) e constitui um dos poucos centros no país que oferecem procedimentos de alta complexidade à população dependente da rede pública. É possível que esse longo período de infertilidade não tratada tenha contribuído de maneira negativa para os resultados relativos à taxa de gravidez.

Nosso estudo não mostrou associação entre o IMC e os níveis de INSL3. Entretanto, um estudo publicado em 2023 realizou uma análise retrospectiva de 14.213 mulheres submetidas ao primeiro ciclo de fertilização *in vitro* (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) com óvulos próprios evidenciou que mulheres com sobrepeso (25.0-29.9 kg/m^2) ou obesidade (≥30.0 kg/m^2) apresentaram taxa cumulativa de nascidos vivos mais baixas em comparação com aquelas com peso normal (Rafael *et al*., 2023). Já uma meta-análise publicada em 2019 também associou sobrepeso e obesidade com desfechos ruins, e redução significativa na chance de nascidos vivos após FIV comparadas às mulheres de peso normal RR = 0.85 (IC 95%: 0.82–0.87) para obesidade e RR = 0.94 (IC 95%: 0.91–0.97) para sobrepeso; uma vez que a obesidade tem influência negativa na foliculogênese, na qualidade oocitária, no desenvolvimento embrionário e na receptividade endometrial através de mecanismos que incluem disfunções hormonais, alterações na composição do líquido folicular e aumento do estresse oxidativo (Sermondade *et al.*, 2019).

Em 2019, a Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) publicou, em sua diretriz sobre estimulação ovariana, a análise de dois estudos que abordaram a correlação entre a contagem de folículos antrais (CFA) e a resposta ao estímulo com gonadotrofinas. Apesar da heterogeneidade observada quanto aos protocolos utilizados para a realização da estimulação ovariana e às doses de gonadotrofinas administradas, foram destacadas duas metanálises que apresentaram resultados semelhantes, demonstrando a capacidade de correlação entre a quantidade de folículos antrais e a resposta ao tratamento (Bosch *et al*., 2020). Essas metanálises evidenciaram elevado poder preditivo da CFA para a previsão

tanto de baixa resposta (ROC-AUC de 0,73; IC 95%: 0,69–0,77) quanto de alta resposta (ROC-AUC de 0,76; IC 95%: 0,70–0,82) (Broer *et al*., 2013a, 2013b).

Nos demais estudos analisados, a correlação entre CFA e resposta à estimulação também foi identificada; entretanto, observou-se que, na maioria dos trabalhos, os critérios estabelecidos para classificação da resposta foram CFA > 15 para alta resposta e CFA < 4 para baixa resposta (Bosch *et al.*, 2020). No presente estudo, a média da CFA observada foi de 10 em ambos os grupos analisados, valor que não se enquadra nas categorias de alta ou baixa resposta estabelecidas nos estudos anteriores. Entretanto, nas pacientes com níveis de INSL3 acima da mediana, observamos uma média superior de CFA (n= 13) quando comparada a pacientes com níveis abaixo da mediana (n= 8), sugerindo que essas pacientes estariam mais suscetíveis a resultados mais favoráveis em relação à resposta ovariana.

Ao analisar a curva ROC para determinar a acurácia de diferentes biomarcadores na predição da resposta ovariana à estimulação com gonadotrofinas, adotando-se como desfecho clínico positivo a obtenção de mais de seis oócitos, entre os parâmetros avaliados, a contagem de folículos antrais (CFA) demonstrou o melhor desempenho, com área sob a curva (AUC) de 0,851 e intervalo de confiança de 95% entre 0,773 e 0,930. Esses dados conferem à CFA uma acurácia excelente, refletindo seu papel consolidado como um dos principais indicadores da reserva ovariana e preditores da resposta à estimulação hormonal. Uma metanálise realizada com 15 estudos corrobora esses achados, destacando a CFA como um preditor significativo da resposta ovariana em ciclos de fertilização *in vitro* (FIV) (Broekmans *et al.*, 2006). A idade materna apresentou AUC de 0,759 (IC 95%: 0,662–0,856), também com boa capacidade discriminativa, embora inferior à da CFA. A relação inversa entre idade e resposta ovariana está bem documentada na literatura, com declínio progressivo na quantidade e qualidade dos oócitos com o avanço da idade reprodutiva, confirmando nossos achados (Te Velde; Pearson, 2002).

No nosso estudo foi possível verificar que pacientes que apresentavam níveis de INSL3 acima da mediana também demostraram melhor desempenho durante o ciclo de FIV, apresentando maior quantidade de folículos ≥ 16 mm, maior quantidade de oócitos captados e maior quantidade de oócitos maduros, ou seja, em metáfase II, todos esses dados com significância estatística. Um estudo publicado em 2025, cujo objetivo também foi avaliar o peptídeo INSL3 como biomarcador nos ciclos de fertilização *in vitro* (FIV), comparando pacientes com infertilidade sem causa aparente,

más respondedoras e um grupo controle com reserva ovariana considerada normal, revelou importantes achados. Observou-se que os níveis médios de FSH foram, respectivamente, 6,49 UI/L, 11,46 UI/L e 7,14 UI/L nos três grupos, enquanto as contagens de folículos antrais (CFA) foram 10,7; 3,4 e 11,19, respectivamente. Houve uma associação positiva entre a CFA e os níveis séricos de INSL3, cujos valores médios foram 1775,52 pg/mL, 1512,92 pg/mL e 1745,54 pg/mL, enquanto no líquido folicular as concentrações médias foram de 1193,91 pg/mL, 958,67 pg/mL e 1043,53 pg/mL, respectivamente (Ozcan *et al.*, 2025).

Embora este estudo tenha encontrado concentrações absolutas mais baixas de INSL3 em comparação ao nosso trabalho, observou-se, de forma semelhante, que os níveis do peptídeo no líquido folicular foram consistentemente inferiores aos níveis circulantes. Tal achado pode sugerir a existência de outra fonte produtora de INSL3 além do ambiente ovariano. Outro fator importante foi a associação positiva entre o INSL3 e a CFA, assim como no nosso estudo.

O fator masculino é responsável por aproximadamente 30% dos casos de infertilidade de forma isolada, podendo ainda configurar-se como um fator adicional em cerca de 20% dos casais inférteis (Mazzilli *et al*., 2023). Entretanto, no nosso estudo consideramos o fator mais relevante para o comprometimento da infertilidade como o fator determinante da causa, sendo o fator masculino o mais prevalente entre as causas avaliadas, seguido pelo fator anatômico feminino e a infertilidade de causa indeterminada.

Um estudo realizado com 9439 pacientes e 172.341 oócitos captados revelou que foram captados 1–5 oócitos em 42.574 ciclos (24,7%); 6–15 oócitos em 91.797 ciclos (53,3%); 16–25 oócitos em 23.794 ciclos (13,8%); 26–49 oócitos em 3970 ciclos (2,3%); ≥50 oócitos em 58 ciclos (0,033%). Porém a taxa de nascidos vivos foi maior no grupo intermediário (6–15 oocitos) 32.4% e as taxas de gravidez foram piores quando recuperados um número maior que 16 oocitos (Bahadur *et al*., 2023). Quando comparamos esses dados com o nosso trabalho, apesar do número de oócitos captados no grupo com concentração de INSL3 acima da mediana estar entre o grupo definido como intermediário, a quantidade coletada encontra-se no limite inferior, ($n<6$), e talvez esse seja um fator a ser considerado ao verificar uma taxa de gravidez menor (28%) em comparação a este estudo em questão (53,3%).

No presente estudo, pacientes com INSL3 abaixo da mediana apresentaram número menor de oócitos maduros recuperados ($n=4$) e também apresentaram

menores taxas de gravidez (17%) quando comparadas ao grupo com INSL3 acima da mediana, com 6 oócitos recuperados e taxa de gravidez de 28% (Bahadur *et al.,* 2023). Entretanto, nem sempre um grande número de oócitos está relacionado a altas taxas de gravidez. Outros estudos anteriormente também já haviam demonstrado que apesar de existir uma correlação positiva entre as taxas de gravidez e o número de oócitos captados, pode haver diminuição dessas taxas quando coletados mais de 15 oócitos (McAvey *et al*., 2011; Sharma; Allgar; Rajkhowa, 2002; Sunkara *et al*., 2011).

No que se refere à escolha dos protocolos a serem utilizados em pacientes submetidas a ciclos de reprodução assistida, o guideline da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) evidenciou uma forte recomendação para a utilização de protocolos com antagonistas do GnRH em pacientes com síndrome dos ovários policísticos (SOP) e em pacientes consideradas normorespondedoras, destacando-se pela superioridade em termos de segurança e eficácia. Entretanto, para pacientes classificadas como más respondedoras, tanto os protocolos com agonistas quanto aqueles com antagonistas do GnRH foram recomendados de forma equivalente. Dessa maneira, é possível afirmar que o protocolo com antagonista do GnRH abrange uma gama mais ampla de condições clínicas, sendo, portanto, preferencialmente utilizado, conforme evidenciado em nosso estudo, no qual essa escolha foi a mais frequente (Bosch *et al.*, 2020).

Um estudo realizado em 2020 que comparava mulheres portadoras de SOP com um grupo controle mostrou que o nível sérico médio de Testosterona no grupo controle foi de 1.34 nmol/L ou seja, 0.3865 ng/mL (Yang *et al.,* 2021).

Já outro estudo que também avaliou pacientes com SOP discutiu sobre o aumento de LH e que talvez ele seja responsável, pelo menos em parte, pelo aumento da secreção de androgênios dos tecidos ovarianos por meio da ação reguladora do INSL3, reforçando o conceito de que existe uma heterogeneidade fisiopatológica nos fatores responsáveis pelo excesso de androgênios em mulheres com SOP, de acordo com seu fenótipo. Sendo assim, níveis elevados de LH seriam um achado comum na SOP, particularmente em indivíduos com peso normal. Por outro lado, a secreção pulsátil de LH estaria marcadamente alterada pela presença de obesidade. Portanto, mulheres com SOP e excesso de peso corporal apresentam concentrações de LH significativamente menores do que as de peso normal, frequentemente se assemelhando à faixa normal. Provavelmente porque, com o aumento do peso

corporal, a amplitude do pulso de LH tende a diminuir, assim como a resposta de LH ao GnRH (Gambineri *et al.,* 2007).

Entretanto, contraditoriamente, os níveis de INSL3 não estão aumentados em pacientes portadoras de SOP mas estão reduzidos em portadoras de insuficiência ovariana prematura. Um estudo publicado em 2021 mostrou que quando comparou três grupos de pacientes com: reserva ovariana normal (FSH <10 UI/L), insuficiência ovariana bioquímica (FSH entre 10 e 25 UI/L e irregularidade menstrual) e insuficiência ovariana prematura (FSH >25 UI/L e irregularidade menstrual) e mostrou uma concentração de INSL-3 significativamente menor nessas pacientes com ($p<0.001$) (Zhu *et al.*, 2021) Este mesmo estudo também sugere que a sinalização mediada pelo eixo INSL3-RXFP2 parece estar envolvida na regulação do crescimento e da função dos folículos antrais, integrando-se ao modelo clássico de duas células duas gonadotrofinas durante a fase folicular. Esse sistema promove a produção de andrógenos pelas células da teca, direcionando a atividade da enzima 17α-hidroxilase e favorecendo, subsequentemente, a biossíntese de estradiol. Entretanto, no nosso estudo, não foi possível encontrar uma correlação entre os níveis de INSL3 e Testosterona, seja no plasma ou no líquido folicular, contradizendo esses dados, pelo menos no contexto da estimulação ovariana controlada para FIV (Figura 14).

Nosso estudo observou que as concentrações de testosterona no líquido folicular foram significativamente superiores às encontradas no plasma periférico, sugerindo um padrão de produção predominantemente local pelas células da teca e transporte parácrino até a cavidade antral. Este gradiente intra-folicular de testosterona reforça a importância do microambiente ovariano na regulação da maturação oocitária e da resposta à estimulação. Em contraste, o comportamento do INSL3 foi oposto, com níveis plasmáticos mais elevados do que os encontrados no líquido folicular, hipótese que pode indicar origem extragonadal ou mecanismos distintos de secreção e distribuição deste peptídeo.

Esses achados são compatíveis com os resultados apresentados por von Wolff *et al.* (2017), que, ao avaliarem ciclos naturais e de fertilização in vitro, demonstraram que não há correlação significativa entre os níveis de testosterona no soro e no líquido folicular. Tal evidência reforça que o compartimento folicular possui regulação endócrina própria, dissociada da circulação sistêmica, e que os níveis séricos de testosterona não necessariamente refletem a atividade hormonal dentro do folículo. Portanto, a interpretação de marcadores hormonais para fins diagnósticos ou

terapêuticos em reprodução assistida deve considerar as particularidades do ambiente folicular, especialmente no que diz respeito aos esteroides sexuais.

Em suma, este estudo é um dos poucos que avalia o peptídeo INSL3 ao longo do ciclo de FIV/ICSI. Os achados demonstraram que a elevação da concentração sérica de INSL3 está significativamente correlacionada com o número de folículos antrais de maior diâmetro, não apresentando associação relevante com a quantidade de folículos primordiais ou primários. Tal evidência reforça que o INSL3 reflete predominantemente a atividade folicular funcional durante as fases mais avançadas da estimulação ovariana, não devendo, portanto, ser utilizado de forma isolada como preditor da reserva ovariana basal.

Embora o INSL3 esteja envolvido nos processos de funcionamento das células da teca, não foi possível estabelecer uma correlação significativa entre suas concentrações e os níveis de testosterona. Esse achado sugere que, apesar da origem celular comum, os mecanismos regulatórios da síntese e secreção desses dois hormônios podem ser distintos, ou ainda que suas dinâmicas de liberação e difusão no compartimento folicular e na circulação sistêmica sejam moduladas por diferentes fatores.

Os dados obtidos neste estudo permitem afirmar que, em pacientes submetidas à estimulação ovariana controlada para fertilização *in vitro* (FIV), os níveis plasmáticos de INSL3 acima da mediana após o estímulo hormonal apresentaram associação positiva com desfechos favoráveis do ciclo. Esses achados sugerem que o INSL3 plasmático pode atuar como um potencial marcador de resposta ovariana funcional durante a estimulação para FIV.

7 CONCLUSÕES

a) Os achados deste estudo, ao demonstrarem níveis mais elevados de INSL3 na circulação periférica em comparação ao líquido folicular, sugerem a hipótese de que possam existir fontes extragonadais envolvidas na secreção deste peptídeo, abrindo novas perspectivas para a compreensão de sua origem e papel fisiológico na função reprodutiva feminina;
b) Nossos dados não encontraram correlação entre as dosagens de INSL3 e Testosterona;
c) É possível afirmar que níveis plasmáticos pós-estimulo ovariano controlado para FIV em pacientes com níveis de INSL3 acima da mediana associam-se a melhores resultados da FIV em relação a: CFA, menor necessidade de gonadotrofina utilizada no ciclo, maior quantidade de folículos > 16 mm, maior quantidade de oócitos captados, maior quantidade de oócitos em metáfase II;
d) O INSL3, apesar de estar envolvido nos processos de funcionamento das células da teca, quando medido antes da estimulação ovariana não apresenta valor preditivo para a resposta ao tratamento de FIV.

REFERÊNCIAS

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS COMMITTEE. Female age-related fertility decline. **Fertility and Sterility**, New York, v. 101, n. 3, p. 633-634, Mar. 2014.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Optimizing natural fertility: a committee opinion. **Fertility and Sterility**, New York, v. 107, n. 1, p. 52-58, Jan. 2017.

ANAND-IVELL, R.; DAI, Y.; IVELL, R. Neohormones as biomarkers of reproductive health. **Fertility and Sterility**, New York, v. 99, n. 4, p. 1153-1160, 2013.

ANAND-IVELL, R.; HENG, K.; HAFEN, B.; SETCHELL, B.; IVELL, R. Dynamics of INSL3 peptide expression in the rodent testis. **Biology of Reproducton**, Oxford, v. 81, n. 3, p. 480-487, 2009.

ANAND-IVELL, R.; TREMELLEN, K.; DAI, Y.; HENG, K.; YOSHIDA, M.; KNIGHT, P. G.; HALE, G. E.; IVELL, R. Circulating insulin-like factor 3 (INSL3) in healthy and infertile women. **Human Reproducton**, Oxford, v. 28, n. 11, p. 3093-3102, 2013.

ANAND-IVELL, R.; WOHLGEMUTH, J.; HAREN, M. T.; HOPE, P. J.; HATZINIKOLAS, G.; WITTERT, G.; IVELL, R. Peripheral INSL3 concentrations decline with age in a large population of Australian men. **International Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 29, n. 6, p. 618-626, 2006.

BAHADUR, G.; HOMBURG, R.; JAYAPRAKASAN, K.; RAPERPORT, C. J.; HUIRNE, K. A. F.; ACHARYA, S.; RACICH, P.; AHMED, A.; GUDI, A.; GOVIND, A.; JAUNIAUX, E. Correlation of IVF outcomes and number of oocytes retrieved: a UK retrospective longitudinal observational study of 172 341 non-donor cycles. **BMJ Open**, London, v. 13, n. 1, 2023. DOI: 10.1136/bmjopen-2022-064711.

BAMBERGER, A. M.; IVELL, R.; BALVERS, M.; KELP, B.; BAMBERGER, C. M.; RIETHDORF, L.; LÖNING, T. Relaxin-like factor (RLF): a new specific marker for

Leydig cells in the ovary. **International Journal of Gynecological Pathology**, New York, v. 18, n. 2, p. 163-168, 1999.

BATHGATE, R.; MONIAC, N.; BARTLICK, B.; SCHUMACHER, M.; FIELDS, M.; IVELL, R. Expression and regulation of relaxin-like factor gene transcripts in the bovine ovary: differentiation-dependent expression in theca cell cultures. **Biology of Reproducton**, Oxford, v. 61, n. 4, p. 1090-1098, 1999.

BATHGATE, R. A.; IVELL, R.; SANBORN, B. M.; SHERWOOD, O. D.; SUMMERS, R. J. International Union of Pharmacology LVII: recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 58, n. 1, p. 7-31, 2006.

BLUMENFELD, Z. What is the best regimen for ovarian stimulation of poor responders in ART/IVF? **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 11, p. 192, 2020.

BOSCH, E.; BROER, S.; GRIESINGER, G.; GRYNBERG, M.; HUMAIDAN, P.; KOLIBIANAKIS, E.; KUNICKI, M.; MARCA, L. A.; LAINAS, G.; CLEF, L. N.; MASSIN, N.; MASTENBROEK, S.; POLYZOS, N.; SUNKARA, K. S.; TIMEVA, T.; TÖYLI, M.; URBANCSEK, J.; VERMEULEN, N.; BROEKMANS, F. ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI†. **Human Reproduction Open**, Oxford, v. 2020, n. 2, May 2020. DOI: 10.1093/hropen/hoaa009.

BROEKMANS, F. J.; HENDRIKS, D. J.; MOL, B. W.; LAMBALK, C. B. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 685-718, 2006.

BROER, L. S.; DISSELDORP, V. J.; BROEZE, A. K.; DOLLEMAN, M.; OPMEER, C. B.; BOSSUYT, P.; EIJKEMANS, J. C. M.; MOL, J. B. W.; BROEKMANS, J. M. F.; BROER, S. L.; DISSELDORP, V. J.; BROEZE, K. A.; DOLLEMAN, M.; OPMEER, B. C.; ANDERSON, R. A.; ASHRAFI, M.; BANCSI, L.; CAROPPO, E. L.; COPPERMAN, A.; EBNER, T.; GEVA, E. M.; ERDEM, M.; GREENBLATT, E. M.; JAYAPRAKASAN, K.; FENNING, R.; KLINKERT, E. R.; KWEE, J.; LAMBALK, C. B.; MARCA, L. A.;

MCILVEEN, M.; MERCE, L. T.; MUTTUKRISHNA, S.; NELSON, S. M.; NG, H. Y.; POPOVIC-TODOROVIC, B.; SMEENK, J. M. J.; TOMÁS, C.; LINDEN, D. V. P. J. Q.; ROOIJ, V. I. A.; VLADIMIROV, I. K.; BOSSUYT, P. B.; EIJKEMANS, M. J. C.; MOL, B. W.; FRANK, B. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 26-36, 2013a.

BROER, L. S.; DÓLLEMAN, M.; DISSELDORP, V. J.; BROEZE, A. K.; OPMEER, C. B.; BOSSUYT, M. M. P.; EIJKEMANS, J. C. M.; MOL, W. B.; BROEKMANS, J. M. F.; BROER, S. L.; DÓLLEMAN, M.; DISSELDORP, V. J.; BROEZE, K. A.; OPMEER, B. C.; BOSSUYT, P. M. M.; EIJKEMANS, M. J. C.; MOL, B. W.; BROEKMANS, F. J. M.; AFLATOONIAN, A.; ANDERSON, R. A.; ASHRAFI, M.; BANCSI, L.; CAROPPO, E.; COPPERMAN, A. B.; EBNER, T.; ELDAR-GEVA, T.; ERDEM, M.; FREOUR, T.; GNOTH, C.; GREENBLATT, E. M.; JAYAPRAKASAN, K.; RAINE-FENNING, N.; KLINKERT, E.; KWEE, J.; MARCA, L. A.; LAMBALK, C. B.; MCILVEEN, M.; MOHIYIDDEEN, L.; MERCE, L. T.; MUTTUKRISHNA, S.; NARDO, L. G.; NELSON, S. M.; NG, H. Y.; POPOVIC-TODOROVIC, B.; SMEENK, J. M. J.; TOMÁS, C.; LINDEN, D. V. P. J. Q.; ROOIJ, V. I. A.; VLADIMIROV, I. K. Prediction of an excessive response in *in vitro* fertilization from patient characteristics and ovarian reserve tests and comparison in subgroups: an individual patient data meta-analysis. **Fertility and Sterility**, New York, v. 100, n. 2, p. 420-429, 2013b.

BRUELL, S.; SETHI, A.; SMITH, N.; SCOTT, D. J.; HOSSAIN, M. A.; WU, Q. P.; GUO, Z. Y.; PETRIE, E. J.; GOOLEY, P. R.; BATHGATE, R. A. D. Distinct activation modes of the Relaxin Family Peptide Receptor 2 in response to insulin-like peptide 3 and relaxin. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 3294, 2017.

CAVALLO, I. K.; DELA CRUZ, C.; OLIVEIRA, M. L.; DEL PUERTO, H. L.; DIAS, J. A.; LOBACH, V. N.; CASALECHI, M.; CAMARGOS, M. G.; REIS, A. M.; SANTOS, R. A.; REIS, F. M. Angiotensin-(1-7) in human follicular fluid correlates with oocyte maturation. **Human Reproduction**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 1318-1324, June 2017. DOI: 10.1093/humrep/dex072.

CUI, J.; SHEN, Y.; LI, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. **Trends in Molecular Medicine**, Cambridge, v. 19, n. 3, p. 197-209, 2013.

DAI, Y.; IVELL, R.; LIU, X.; JANOWSKI, D.; ANAND-IVELL, R. Relaxin-family peptide receptors 1 and 2 are fully functional in the bovine. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 8, p. 359, 2017.

ESTEBAN-LOPEZ, M.; AGOULNIK, A. I. Diverse functions of insulin-like 3 peptide. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 247, n. 1, p. R1-R12, 2020.

ESTEVES, S. C.; ALVIGGI, C.; HUMAIDAN, P.; FISCHER, R.; ANDERSEN, C. Y.; CONFORTI, A.; BÜHLER, K.; SUNKARA, S. K.; POLYZOS, N. P.; GALLIANO, D.; GRYNBERG, M.; YARALI, H.; ÖZBEK, I. Y.; ROQUE, M.; VUONG, L. N.; BANKER, M.; RIENZI, L.; VAIARELLI, A.; CIMADOMO, D.; UBALDI, F. M. The POSEIDON criteria and its measure of success through the eyes of clinicians and embryologists. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 10, p. 814, 2019.

FERRARETTI, A. P.; LA MARCA, A.; FAUSER, B. C.; TARLATZIS, B.; NARGUND, G.; GIANAROLI, L. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for *in vitro* fertilization: the Bologna criteria. **Human Reproducton**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 1616-1624, 2011.

FILATOV, M.; KHRAMOVA, Y.; PARSHINA, E.; BAGAEVA, T.; SEMENOVA, M. Influence of gonadotropins on ovarian follicle growth and development in vivo and in vitro. **Zygote**, Cambridge, v. 25, n. 3, p. 235-243, 2017.

GAMBINERI, A.; PATTON, L.; IASIO, R. de; PALLADORO, F.; PAGOTTO, U.; PASQUALI, R. Insulin-like factor 3: a new circulating hormone related to luteinizing hormone-dependent ovarian hyperandrogenism in the polycystic ovary syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Oxford, v. 92, n. 6, p. 2066-2073, 2007.

GAO, J.; LIU, Z.; ZHONG, Y.; LI, N.; TANG, T. Factors influencing clinical pregnancy outcome of *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection in older women. **African Health Sciences**, Kampala, v. 23, n. 2, p. 632-639, 2023.

GUNN, D. D.; BATES, G. W. Evidence-based approach to unexplained infertility: a systematic review. **Fertility and Sterility**, New York, v. 105, n. 6, p. 1566-1574, 2016.

GURUNATH, S.; PANDIAN, Z.; ANDERSON, R. A.; BHATTACHARYA, S. Defining infertility: a systematic review of prevalence studies. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 575-588, 2011.

HAGEN, C. P.; MIERITZ, M. G.; NIELSEN, J. E.; ANAND-IVELL, R.; IVELL, R.; JUUL, A. Longitudinal assessment of circulating insulin-like peptide 3 levels in healthy peripubertal girls. **Fertility and Sterility**, New York, v. 103, n. 3, p. 780-786, 2015.

HANNA, C. B.; YAO, S.; PATTA, M. C.; JENSEN, J. T.; WU, X. Expression of insulin-like 3 (INSL3) and differential splicing of its receptor in the ovary of rhesus macaques. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 8, p. 150, 2010.

HUMAIDAN, P.; ALVIGGI, C.; FISCHER, R.; ESTEVES, S. C. The novel POSEIDON stratification of 'Low prognosis patients in Assisted Reproductive Technology' and its proposed marker of successful outcome. **F1000 Faculty Reviews**, London, v. 5, p. 2911, Dec. 2016.

INHORN, M. C.; PATRIZIO, P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 411-426, 2015.

IVELL, R.; ANAND-IVELL, R. Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 463-476, 2009.

IVELL, R.; ANAND-IVELL, R. Insulin-like peptide 3 (INSL3) is a major regulator of female reproductive physiology. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 639-651, Nov. 2018.

KATSIKA, E. T.; BOSDOU, J. K.; GOULIS, D. G.; GRIMBIZIS, G. F.; KOLIBIANAKIS, E. M. Higher live birth rate following transdermal testosterone pretreatment in poor responders: a systematic review and meta-analysis. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 46, n. 1, p. 81-91, 2023.

LAMBALK, C. B.; BANGA, F. R.; HUIRNE, J. A.; TOFTAGER, M.; PINBORG, A.; HOMBURG, R.; VAN DER VEEN, F.; VAN WELY, M. GnRH antagonist versus long agonist protocols in IVF: a systematic review and meta-analysis accounting for patient type. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 560-579, 2017.

LEIJDEKKERS, J. A.; EIJKEMANS, M. J. C.; VAN TILBORG, T. C.; OUDSHOORN, S. C.; MCLERNON, D. J.; BHATTACHARYA, S.; MOL, B. W. J.; BROEKMANS, F. J. M.; TORRANCE, H. L. Predicting the cumulative chance of live birth over multiple complete cycles of *in vitro* fertilization: an external validation study. **Human Reproducton**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 1684-1695, 2018.

LEW, R. Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, Amsterdam, v. 55, p. 2-13, 2019.

LINDSAY, T. J.; VITRIKAS, K. R. Evaluation and treatment of infertility. **American Family Physician**, Kansas, v. 91, n. 5, p. 308-314, 2015.

MASCARENHAS, M. N.; FLAXMAN, S. R.; BOERMA, T.; VANDERPOEL, S.; STEVENS, G. A. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. **PLoS Medicine**, Cambridge, v. 9, n. 12, p. e1001356, 2012.

MAZZILLI, R.; RUCCI, C.; VAIARELLI, A.; CIMADOMO, D.; UBALDI, F. M.; FORESTA, C. FERLIN, A. Male factor infertility and assisted reproductive

technologies: indications, minimum access criteria and outcomes. **Journal of Endocrinological Investigation**, Milano, v. 46, n. 6, p. 1079-1085, 2023.

MCAVEY, B.; ZAPANTIS, A.; JINDAL, S. K.; LIEMAN, H. J.; POLOTSKY, A. J. How many eggs are needed to produce an assisted reproductive technology baby: is more always better? **Fertility and Sterility**, New York, v. 96, n. 2, p. 332-335, 2011.

MCGEE, E. A.; RAJ, R. S. Regulators of ovarian preantral follicle development. **Seminars in Reproductive Medicine**, New York, v. 33, n. 3, p. 179-184, 2015.

NAMAVAR JAHROMI, B.; PARSANEZHAD, M. E.; SHOMALI, Z.; BAKHSHAI, P.; ALBORZI, M.; MOIN VAZIRI, N.; ANVAR, Z. Ovarian hyperstimulation syndrome: a narrative review of its pathophysiology, risk factors, prevention, classification, and management. **Iranian Journal of Medical Sciences**, Shiraz, v. 43, n. 3, p. 248-260, 2018.

NOVENTA, M.; VITAGLIANO, A.; ANDRISANI, A.; BLAGANJE, A.; VIGANÒ, P.; PAPAELO, E.; SCIOSCIA, M.; CAVALLIN, F.; AMBROSINI, G.; COZZOLINO, M. Testosterone therapy for women with poor ovarian response undergoing IVF: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 36, n. 4, p. 673-683, 2019.

OZCAN, P.; SEZER, F.; ALTUN, A.; YILDIZ, C.; TIMUR, T. H.; KELES, C. E.; DURAL, O.; TAHA, S. H.; SARIDOGAN, E. Potential ability of circulating INSL3 level for the prediction of ovarian reserve and IVF success as a novel theca cell–specific biomarker in women with unexplained infertility and diminished ovarian reserve. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 23, n. 1, p. 40, Mar. 2025. DOI: 10.1186/s12958-025-01367-2.

PELUSI, C.; FANELLI, F.; PARIALI, M.; ZANOTTI, L.; GAMBINERI, A.; PASQUALI, R. Parallel variations of insulin-like peptide 3 (INSL3) and antimüllerian hormone (AMH) in women with the polycystic ovary syndrome according to menstrual cycle pattern. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Stanford, v. 98, n. 10, p. E1575-1582, 2013.

PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. **Fertility and Sterility**, New York, v. 103, n. 6, p. e44-50, June 2015a.

PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. **Fertility and Sterility**, New York, v. 103, n. 3, p. e18-25, Mar. 2015b.

RAFAEL, F.; RODRIGUES, M. D.; BELLVER, J.; CANELAS-PAIS, M.; GARRIDO, N.; GARCIA-VELASCO, J. A.; SOARES, S. R.; SANTOS-RIBEIRO, S. The combined effect of BMI and age on ART outcomes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 886-894, 2023.

SERMONDADE, N.; HUBERLANT, S.; BOURHIS-LEFEBVRE, V.; ARBO, E.; GALLOT, V.; COLOMBANI, M.; FRÉOUR, T. Female obesity is negatively associated with live birth rate following IVF: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 439-451, 2019.

SHABANPOOR, F.; ZHANG, S.; HUGHES, R. A.; HOSSAIN, M. A.; LAYFIELD, S.; FERRARO, T.; BATHGATE, R. A.; SEPAROVIC, F.; WADE, J. D. Design and development of analogues of dimers of insulin-like peptide 3 B-chain as high-affinity antagonists of the RXFP2 receptor. **Biopolymers**, New York, v. 96, n. 1, p. 81-87, 2011.

SHARMA, V.; ALLGAR, V.; RAJKHOWA, M. Factors influencing the cumulative conception rate and discontinuation of *in vitro* fertilization treatment for infertility. **Fertility and Sterility**, New York, v. 78, n. 1, p. 40-46, 2002.

SUNKARA, S. K.; RITTENBERG, V.; RAINE-FENNING, N.; BHATTACHARYA, S.; ZAMORA, J.; COOMARASAMY, A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. **Human Reproducton**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 1768-1774, 2011.

TE VELDE, E. R.; PEARSON, P. L. The variability of female reproductive ageing. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 141-154, Mar./Apr. 2002.

VARGAS-TOMINAGA, L.; ALARCÓN, F.; VARGAS, A.; BERNAL, G.; MEDINA, A.; POLO, Z. Associated factors to pregnancy in intrauterine insemination. **JBRA Assisted Reproducton**, Brasília, DF, v. 24, n. 1, p. 66-69, 2020.

VON WOLFF, M. S. P.; EISENHUT, M.; MARTI, U.; BITTERLICH, N.; BERSINGER, N. A. Serum and follicular fluid testosterone concentrations do not correlate, questioning the impact of androgen supplementation on the follicular endocrine milieu. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 35, p. 616-623, 2017.

XUE, K.; KIM, Y. J.; LIU, J.-Y.; TSANG, K. B. Insulin-like 3-induced rat preantral follicular growth is mediated by growth differentiation factor 9. **Endocrinology**, Baltimore, v. 155, n. 1, p. 156-167, 2014.

YANG, Z.; ZHOU, W.; ZHOU, C.; ZHOU, Y.; LIU, X.; DING, G.; HU, Y.; PAN, J.; SHENG, J.; JIN, L.; HUANG, H. Steroid metabolome profiling of follicular fluid in normo- and hyperandrogenic women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 206, Feb. 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105806.

YETIM, A.; YETIM, Ç.; BAŞ, F.; EROL, O. B.; ÇIĞ, G.; UÇAR, A.; DARENDELILER, F. Anti-Müllerian hormone and Inhibin-A, but not Inhibin-B or Insulin-Like Peptide-3, may be used as surrogates in the diagnosis of polycystic ovary syndrome in adolescents: preliminary results. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**, Istanbul, v. 8, n. 3, p. 288-297, 2016.

ZHENG, M.; ZUO, G.; TONG, J.; CHEN, Z. J.; LI, W. P.; ZHANG, C. Intrafollicular melatonin concentration is elevated in patients with ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) and can serve as an important predictor of OHSS. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, Berlin, v. 299, n. 4, p. 1151-1158, Apr. 2019.

ZHU, C.; LUO, W.; LI, Z.; ZHANG, X.; HU, J.; ZHAO, S.; JIAO, X.; QIN, Y. New theca-cell marker insulin-like factor 3 is associated with premature ovarian insufficiency. **Fertility and Sterility**, New York, v. 115, n. 2, p. 455-462, 2021.

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título da Pesquisa: Peptídeo INSL3 como marcador de atividade das células da teca ovariana em ciclos de fertilização in vitro

Registro: CAAE:

Prezada Senhora,

Gostaria de convidá-la a participar de um estudo científico que tem a finalidade de gerar novos conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos na *Fertilização in vitro* e o papel das células da Teca neste processo através da dosagem do peptídeo INSL3.

1. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

1.1. O que pretendemos com esta pesquisa?

Esta pesquisa irá estudar o comportamento das células da Teca no ovário através da dosagem do peptídeo INSL3 no sangue e no líquido folicular durante o seu processo de estímulo ovariano para a *Fertilização in Vitro.*

1.2 Em que consiste a sua participação?

Sabe-se que a Sra. será submetida ao tratamento de Reprodução Assistida por outros motivos além do estudo, e que, as possíveis complicações referentes ao tratamento foram anteriormente elucidadas.

Sua participação consistirá no seguinte: Após o diagnóstico de infertilidade e determinação do tipo de protocolo de estimulação ovariana, serão realizados exames para a realização da FIV e a dosagem do peptídeo INSL-3 na fase inicial do ciclo menstrual anterior à estimulação ovariana.

No dia da coleta ovular, será coletada nova amostra de sangue e também uma amostra do líquido folicular aspirado, para posterior dosagem de INSL3.

Isso ocorrerá somente depois que seus óvulos tiverem sido separados do líquido ovariano aspirado, etapa em que o líquido, já sem os óvulos, é normalmente jogado fora. A coleta da amostra para pesquisa não acarretará nenhuma mudança no seu tratamento de FIV, que seguirá normalmente.

1.3. O que faremos com a sua amostra de líquido ovariano nesta pesquisa?

Vamos pesquisar a dosagem de INSL3 presente no seu líquido ovariano e/ou em células que normalmente vêem misturadas a ele. Esse teste será feito após o tratamento de FIV e o resultado dele não influenciará as decisões sobre o seu tratamento.

2. SIGILO DOS DADOS

Suas amostras serão etiquetadas com um código numérico e armazenadas durante o período da pesquisa sob responsabilidade da UFMG, sendo acessadas apenas pelos pesquisadores.

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a essas informações, que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

3. BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Embora não traga benefício imediato para você, este estudo irá contribuir para o conhecimento mais detalhado sobre a presença e/ou efeitos do peptídeo INSL3 durante o desenvolvimento dos folículos ovarianos de um ciclo estimulado artificialmente para o tratamento de FIV e sua relação com resultados decorrentes desse tratamento. Esse conhecimento poderá ajudar no desenvolvimento novos protocolos de indução e melhora dos resultados da FIV.

4. RISCOS

Será feito um exame de sangue obtida com uma pequena agulhada no braço, o que pode causar alguma dor ou incômodo passageiro assim como qualquer exame laboratorial. Os demais materiais utilizados na pesquisa serão obtidos sem qualquer risco, pois serão amostras de material que normalmente seria descartado.

5. DESPESAS

A sua participação no estudo é voluntária e não está prevista qualquer forma de remuneração para os participantes, nem ressarcimento de despesas. Entretanto, as despesas específicas relacionadas com o estudo são de responsabilidade dos pesquisadores / patrocinador, isto é, o participante da pesquisa e seu acompanhante não arcarão com nenhum custo referente a procedimentos e/ou exames do estudo.

6. RECUSA EM PARTICIPAR

Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se justificar. A aceitação ou não da participação neste estudo não influenciará no seu tratamento.

7. ARMAZENAMENTO E DESCARTE DE AMOSTRAS

As amostras ficarão armazenadas por um período de até 5 anos em um biorrepositório, sob a responsabilidade dos pesquisadores, sendo 2 anos previstos para a conclusão da pesquisa e mais 3 anos para a eventualidade de serem

necessários novos testes. Após o término do período de armazenamento, as amostras serão descartadas em lixo hospitalar obedecendo às normas nacionais e locais de biossegurança e gestão de resíduos.

Caso você decida retirar seu consentimento para a guarda das suas amostras armazenadas para pesquisa, poderá fazê-lo a qualquer tempo, sem sofrer qualquer prejuízo. A retirada do consentimento terá validade a partir da data da comunicação da sua decisão por escrito e assinada.

8. GARANTIAS

Caso necessário, será garantido o direito à assistência integral e gratuita ao participante, devido a danos decorrentes da participação na pesquisa e pelo tempo que for necessário.

Você também direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.h)

9. ACESSO A RESULTADOS

O pesquisador responsável dará acesso aos resultados de exames e de tratamento ao médico do participante ou ao próprio participante sempre que solicitado e/ou indicado (Resolução CNS nº 251 de 1997, item III.2.i).

10. ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Para isso você poderá contatar os pesquisadores no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFMG, à Av. Prof. Alfredo Balena, nº 110, 9º andar, ala norte, Santa Efigênia, Belo Horizonte/MG, Telefone (31) 3307-9484, e-mail lrh.hc.ufmg@gmail.com

Você também poderá obter esclarecimentos sobre esta pesquisa contatando os órgãos encarregados de autorizar e acompanhar as pesquisas envolvendo seres humanos, zelando pela segurança, proteção e garantia dos direitos dos participantes de pesquisa. Esses órgãos reguladores são:

Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antonio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II, 2º Andar, sala 2005 - Pampulha, Belo Horizonte - MG. Fone: (31) 3409-4592. coep@prpq.ufmg.br

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – Conep
SRTV 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar – Asa Norte CEP: 70719-040, Brasília/DF, Telefone (61) 3315-2150. http://conselho.saude.gov.br

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este termo de consentimento é elaborado em duas vias, que deverão ser assinadas ao final pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s).

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____

voluntariamente, concordo em participar desta pesquisa no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo à minha saúde.

Belo Horizonte,.....de.....de.....

_____ _____

Assinatura da voluntária Assinatura do pesquisador

ANEXO B - Parecer

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: : Peptídeo INSL3 como marcador de atividade das células da teca ovariana em ciclos de fertilização in vitro

Pesquisador: Fernando Marcos dos Reis

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 47099021.1.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.952.225

Apresentação do Projeto:

Conforme os autores:

O peptídeo Insulina-like 3 (INSL3) é membro da família de peptídeos semelhantes à insulina que inclui, além da própria insulina, os fatores de crescimento IGF1 e IGF2 e a relaxina. A síntese de INSL3 foi identificada dentro da camada mais interna da teca de folículos antrais bovinos e humanos. O INSL3 circulante parece refletir a função das células da teca em mulheres jovens saudáveis, e mulheres portadoras de síndrome dos ovários policísticos apresentaram níveis mais elevados de INSL3. Diferentemente do hormônio anti-mülleriano (AMH), o INSL3 é característico do crescimento de folículos antrais maiores e, portanto, sujeito a alterações em função das variações cíclicas dos níveis de gonadotrofinas. Estudos em roedores mostraram que o receptor do INSL3 (RXFP2) parece expressar-se unicamente em oócitos e não em células somáticas, e que o efeito do INSL3 seria induzir o crescimento do folículo e ao mesmo tempo estimular a produção androgênica, por intermédio do fator de crescimento GDF-9 secretado pelo oócito. Em humanos, a função do INSL3 ovariano permanece desconhecida. O objetivo do presente estudo é avaliar os

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Continuação do Parecer: 4.952.225

Infraestrutura	ParecerGEP.pdf	20/05/2021 16:51:18	Fernando Marcos dos Reis	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCompleto.pdf	20/05/2021 16:50:11	Fernando Marcos dos Reis	Aceito
Folha de Rosto	FR_assinada.pdf	20/05/2021 16:49:54	Fernando Marcos dos Reis	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

BELO HORIZONTE, 03 de Setembro de 2021

Assinado por:
Crissia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 ¿ 2º. Andar ¿ Sala 2005 ¿ Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br