

## ÍNDICE

	PÁG
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE UNIDADES DE MEDIDAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	<b>I</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1 HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO .....	<b>2</b>
1.1 Fisiologia do hormônio anti-mülleriano .....	<b>2</b>
1.2 Reserva ovariana.....	<b>3</b>
1.3 Associação entre AMH e reserva ovariana .....	<b>4</b>
2 CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS .....	<b>11</b>
3 RECEPTIVIDADE ENDOMETRIAL .....	<b>15</b>
4 UROCORTINA .....	<b>16</b>
4.1 Fisiologia da urocortina e sua atuação no sistema reprodutivo .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
1 OBJETIVO GERAL .....	<b>21</b>
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	<b>21</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
1 PACIENTES .....	<b>23</b>

2 COLETA E DOSAGEM DO AMH .....	24
3 CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS .....	26
4 LAVADO E BIÓPSIA ENDOMETRIAIS E DOSAGEM DA UROCORTINA ....	27
4.1 Realização do lavado endometrial .....	27
4.2 Dosagem da urocortina .....	28
4.3 Coleta da biópsia endometrial .....	29
4.4 Extração de RNA e PCR em tempo real para urocortina e seus receptores nas amostras de endométrio .....	29
4.4.1 Extração de RNA total .....	29
4.4.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) pela transcrição reversa (RT) .....	30
4.4.3 Oligonucleotídeos específicos .....	30
4.4.4 Realização da RT-PCR em tempo real .....	32
5 HIPERESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA .....	33
6 ASPIRAÇÃO DE FOLÍCULOS, FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> , TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA E ACOMPANHAMENTO DA PACIENTE .	34
7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
7.1 Análise Estatística Geral .....	36
7.2 Análise Estatística da PCR em tempo real .....	37
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
1 TAXA DE GESTAÇÃO .....	40
2 CARACTERÍSTICAS DESCRITIVAS DOS GRUPOS .....	41
3 VARIÁVEIS AVALIADAS NO ESTUDO .....	43
3.1 Idade (anos) .....	43

3.2 Tempo de infertilidade (anos) .....	44
3.3 FSH sérico dosado no terceiro dia do ciclo menstrual (mUI/ml) .....	45
3.4 Dose de gonadotrofinas utilizada (UI) .....	46
3.5 Número de oócitos .....	47
3.6 Número de embriões .....	48
3.7 Contagem de folículos antrais .....	49
3.8 Dosagem de AMH sérico no 3º dia do ciclo menstrual (ng/ml) .....	50
3.9 Dosagem de AMH sérico entre o 18º e 20º dias do ciclo menstrual (ng/ml) .....	51
<b>4 VARIÁVEIS MEDIDAS NO ESTUDO RELACIONADAS COM O ENDOMÉTRIO .....</b>	<b>52</b>
4.1 Espessura endometrial (mm) .....	53
4.2 Dosagem de urocortina no lavado endometrial .....	54
4.3 PCR em tempo real para UCN, CRH-R1 e CRH-R2 .....	55
<b>5 COMPARAÇÃO ENTRE AS DOSAGENS DE AMH NO 3º E ENTRE 18º E 20º DIAS DO CICLO MENSTRUAL .....</b>	<b>60</b>
<b>6 CORRELAÇÕES ENTRE AS DIVERSAS VARIÁVEIS ANALISADAS .....</b>	<b>61</b>
<b>7 PREDIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE GRAVIDEZ .....</b>	<b>63</b>
<b>8 IMPACTO DA ENDOMETRIOSE .....</b>	<b>67</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>82</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>84</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>93</b>
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (DO ESTUDO) .....	94
CONSENTIMENTO PARA TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA (FIV) .....	95

CONSENTIMENTO PARA TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA	
(ICSI) .....	<b>96</b>
PARECER DO COEP UFMG (07/03/2008) .....	<b>97</b>
PARECER CO COEP UFMG (12/08/2009) .....	<b>98</b>
ATA DE DEFESA .....	<b>99</b>
DECLARAÇÃO DE DEFESA .....	<b>100</b>

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>Figura 1</b> - Causas de infertilidade no grupo de pacientes não grávidas .....	<b>41</b>
<b>Figura 2</b> – Causas de infertilidade no grupo de pacientes grávidas .....	<b>42</b>
<b>Figura 3</b> – Distribuição da idade em anos nos dois grupos .....	<b>43</b>
<b>Figura 4</b> – Distribuição do tempo de infertilidade em anos nos dois grupos ...	<b>44</b>
<b>Figura 5</b> – Distribuição do FSH sérico em mUI/ml nos dois grupos .....	<b>45</b>
<b>Figura 6</b> – Distribuição da dose de gonadotrofinas utilizada em unidades internacionais nos dois grupos .....	<b>46</b>
<b>Figura 7</b> – Número de oócitos coletados nos dois grupos .....	<b>47</b>
<b>Figura 8</b> – Número de embriões obtidos nos dois grupos .....	<b>48</b>
<b>Figura 9</b> – Contagem de folículos antrais nos dois grupos .....	<b>49</b>
<b>Figura 10</b> – Dosagem de AMH no 3º dia do ciclo nos dois grupos .....	<b>50</b>
<b>Figura 11</b> – Dosagem de AMH entre 18º e 20º dias do ciclo nos dois grupos ..	<b>51</b>
<b>Figura 12</b> – Espessura endometrial nos dois grupos .....	<b>53</b>
<b>Figura 13</b> – Dosagem de urocortina no lavado endometrial nos dois grupos ...	<b>54</b>
<b>Figura 14</b> - <i>Amplification plot</i> , demonstrando homogeneidade na amplificação do S26 (gene de referência) .....	<b>55</b>
<b>Figura 15</b> – Curvas de <i>Melting</i> com picos únicos, comprovando a especificidade dos fragmentos amplificados .....	<b>56</b>
<b>Figura 16</b> – Expressão gênica da urocortina nos dois grupos .....	<b>57</b>
<b>Figura 17</b> – Expressão gênica do CRH-R1 nos dois grupos .....	<b>58</b>
<b>Figura 18</b> – Expressão gênica do CRH-R2 nos dois grupos .....	<b>59</b>
<b>Figura 19</b> – Curva ROC incluindo AFC, AMH D3 e AMH D18-20 .....	<b>63</b>
<b>Figura 20</b> – Curva ROC incluindo idade e FSH .....	<b>64</b>
<b>Figura 21</b> – Curva ROC incluindo urocortina e espessura endometrial .....	<b>65</b>

**Figura 22** – Curva ROC incluindo idade e FSH .....

**66**

<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR para a amplificação específica do cDNA da urocortina e receptores CRH-R1 e CRH-R2 .....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 2 - Correlações entre as diversas variáveis analisadas .....</b>	<b>61</b>
<b>Tabela 3 - Análise das diversas variáveis entre os dois grupos, excluindo-se as pacientes com endometriose (teste de Mann-Whitney) .....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABD – Água bidestilada

AFC – Contagem de folículos antrais

AMH – Hormônio anti-mülleriano

ASRM - *American Society for Reproductive Medicine*

BCF – Batimentos cardíaco-fetais

COEP – Comitê de ética em pesquisa

CRH – Hormônio liberador de corticotropina

CRH-BP – Proteína carreadora do hormônio liberador de corticotropina

CRH-R1 – Receptor do hormônio liberador de corticotropina tipo 1

CRH-R2 - Receptor do hormônio liberador de corticotropina tipo 2

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DEPC - Dietilpirocarbonato

FIV – Fertilização *in vitro*

FOP – Falência ovariana prematura

FSH – Hormônio folículo estimulante

G - Grávidas

GnRHa - Análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas

HC/UFMG – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas

### Gerais

hCG - Gonadotrofina coriônica humana

$\beta$ -hCG – Fração  $\beta$  da gonadotrofina coriônica humana

HCL – Ácido clorídrico



HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HOC – Hiperestimulação ovariana controlada

HRP - Streptavidina-peroxidase de rábano

IU – Inseminação intra-uterina

IL-4 – Interleucina 4

IMC – Índice de massa corporal

ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóides

LH – Hormônio luteinizante

LRH - Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando

Camargos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

NG – Não grávidas

NT - Nucleotídeos

OHS – Síndrome de hiperestímulo ovariano

PB – Pares de bases

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RNA – Ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub> – Ácido ribonucleico mensageiro

RPM – Rotações por minuto

RT – Transcrição reversa

SC - Subcutânea

TMB - Tetrametilbenzidina

TGF- $\beta$  - Fatores  $\beta$  de transformação do crescimento

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TSH - Hormônio tireoestimulante

UCN – Urocortina

UCN I – Urocortina I

UCN II – Urocortina II

UCN III – Urocortina III

UI – Unidades internacionais

USTV – Ultrassonografia transvaginal

## LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

Kda – Kilodáltons

mHz – Mili-hertz

mg - Miligramas

ml – Mililitro

µg - Microgramas

µl - Microlitro

mm – Milímetros

mM - Milimolar

mmHg – Milímetros de mercúrio

mUI/ml – Miliunidades internacionais por mililitro

ng - Nanogramas

ng/ml – Nanogramas por mililitro

nm – Nanômetros

pmols – Picomols

pmol/µl – Picomols por microlitro

°C – Graus Celsius

## RESUMO

**Objetivos:** Avaliar a acurácia de fatores prognósticos em terapia de reprodução assistida, analisando-se a reserva ovariana através da contagem de folículos antrais e dosagem sérica do hormônio anti-mülleriano e a receptividade endometrial pela dosagem de urocortina no lavado e biópsia endometriais, seguindo os seguintes objetivos específicos: (1) Investigar se a contagem de folículos antrais e se as concentrações de hormônio anti-mülleriano no soro e de urocortina no lavado e biópsia endometriais, medidas no mês anterior ao ciclo de reprodução assistida, são diferentes em pacientes que subseqüentemente obtiveram gestação comparadas às que não obtiveram gestação; (2) Avaliar a estabilidade da dosagem do hormônio anti-mülleriano durante o ciclo menstrual, comparando seus valores em dois momentos distintos do ciclo; (3) Avaliar a sensibilidade e a especificidade dos três testes (contagem de folículos antrais, hormônio anti-mülleriano e urocortina) na predição de gravidez em mulheres submetidas à terapia de reprodução assistida.

**Material e métodos:** Estudo prospectivo desenvolvido no Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da UFMG. *Pacientes:* Pacientes admitidas para realização de FIV/ICSI. *Métodos:* (1) Contagem de folículos antrais no 3º dia do ciclo menstrual por ultrassom endovaginal (135 pacientes); (2) Dosagens de hormônio anti-mülleriano no sangue periférico, colhido no 3º e entre 18º e 20º dias do ciclo, através de Kits de ELISA (135 pacientes); (3) Dosagem da urocortina no lavado endometrial, colhido entre o 18º e 20º dias do ciclo, através de Kits de ELISA (102 pacientes); (4) Quantificação da expressão gênica da urocortina e dos receptores CRH-R1 e CRH-R2, por PCR em tempo real, em amostras endometriais colhidas entre o 18º e 20º dias do ciclo (55 pacientes).

**Resultados:** (1) A taxa de gravidez global foi de 21,48% e de 25,89% quando consideradas apenas as pacientes que realizaram coleta ovariana. A taxa de abortamento espontâneo foi de 34,5%; (2) Houve um predomínio de infertilidade primária (74,5% entre não grávidas-NG- e 62,1% entre grávidas-G); (3) A principal causa de infertilidade foi fator masculino (45,3%-NG e 65,5%-G); (4) Não houve diferença significativa da idade ( $p = 0,122$ ), tempo de infertilidade ( $p = 0,289$ ), FSH dosado no 3º dia do ciclo ( $p = 0,522$ ), dose de gonadotrofinas utilizada ( $p = 0,119$ ), contagem de folículos antrais ( $p = 0,350$ ) e espessura endometrial ( $p = 0,498$ ) entre as pacientes que não engravidaram e as que engravidaram; (5) Houve diferença significativa do número de oócitos (5,0-NG X 7,0-G;  $p = 0,013$ ) e do número de embriões (3,42-NG X 4,0-G;  $p = 0,013$ ) entre as pacientes que não engravidaram e as que engravidaram; (6) As dosagens de AMH no 3º e entre 18º e 20º dias do ciclo foram significativamente maiores nas pacientes que engravidaram ( $p = 0,006$  e  $p = 0,001$ ). Não houve diferença significativa entre as duas dosagens de AMH de uma mesma paciente. A dosagem de AMH de 1,15 ng/ml, colhido entre 18º e 20º dias do ciclo, prediz a ocorrência de gravidez com especificidade de 70% e sensibilidade de 62,1%; (7) A expressão gênica

relativa da urocortina foi 20% maior nas amostras endometriais das pacientes que engravidaram, mas a dosagem da urocortina no lavado endometrial não apresentou diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,688$ ); (8) Não foi observada nenhuma alteração na expressão gênica de CRH-R1 e de CRH-R2 nas pacientes grávidas quando comparadas com as pacientes não grávidas ( $p = 0,1892$  e  $p = 0,1923$ ).

**Conclusões:** (1) A contagem de folículos antrais é bom preditor do número de óocitos e de embriões obtidos em tratamentos de FIV. Não é bom preditor da ocorrência de gestação, não podendo ser estabelecido um valor de corte para ser utilizado como exame de rastreamento pré-tratamento; (2) A dosagem de hormônio anti-mülleriano é bom preditor da ocorrência de gestação em tratamentos de FIV, apresentando-se significativamente maior nas pacientes que engravidam. As concentrações de AMH são estáveis durante o ciclo menstrual, podendo o exame ser colhido em qualquer dia do ciclo. Valores acima de 1,15 ng/ml determinam maior chance de gravidez com especificidade de 70% e sensibilidade de 62,1%; (3) A expressão gênica relativa de urocortina no endométrio é 20% maior em pacientes que obtêm gravidez após tratamentos de FIV. Sua dosagem por ELISA no lavado endometrial não apresenta sensibilidade suficiente para ser utilizado como marcador da receptividade endometrial em tratamentos de FIV.

## ABSTRACT

**Objectives:** Evaluate the accuracy of prognostic factors in assisted reproduction therapy analyzing ovarian reserve by antral follicle count and serum levels of anti-müllerian hormone and endometrial receptivity by dosage of lavage urocortin and endometrial biopsy, following the specific objectives: (1) Investigate if the antral follicle count and anti-müllerian hormone serum levels, as well as the dosage of lavage urocortin and endometrial biopsy, measured in the previous month to the assisted reproduction cycle are different in patients who subsequently obtained a pregnancy compared to the ones that did not obtain pregnancy; (2) Evaluate the stability of the anti-müllerian hormone dosage during the menstrual cycle, comparing values in two distinct moments of the cycle; (3) Evaluate the sensibility and specificity of the three tests (antral follicle count, anti-müllerian hormone and urocortin) in predicting pregnancy in women submitted to assisted reproduction therapy.

**Material and methods:** Prospective study developed in the Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da UFMG. *Patients:* Patients admitted for accomplishment of FIV/ICSI. *Methods:* (1) Antral follicle count on the 3<sup>rd</sup> day of the menstrual cycle by endovaginal ultrasound (135 patients); (2) Dosage of the anti-müllerian hormone in peripheral blood, collected on the 3<sup>rd</sup> and between the 18<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> days of the cycle using ELISA kits (135 patients); (3) Endometrial lavage urocortin dosage collected between the 18<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> days of the cycle using ELISA kits (102 patients); (4) Quantification of the urocortin and receptors CRH-R1 and CRH-R2 gene expression by Real time PCR in samples collected between the 18<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> days of the cycle (55 patients).

**Results:** (1) The global pregnancy rate was of 21,48% and 25,89% when considering only patients who accomplished ovarian collection. The spontaneous abortion rate was of 34,5%; (2) There was a predominance of primary infertility (74,5% among non-pregnant – NG and 62,1% among pregnant-G); (3) The main cause of infertility was the masculine factor (45,3%-NG and 65,5%-G); (4) There was no significant difference among ages ( $p=0,122$ ), time of infertility ( $p=0,289$ ), FSH dosed on the 3<sup>rd</sup> day of the cycle ( $p=0,522$ ), gonadotropins dosage used ( $p=0,119$ ), antral follicle count ( $p=0,350$ ) and endometrial thickness ( $p=0,498$ ) between patients who got pregnant and who did not; (5) There was significant difference in the number of oocytes (5,0-NG X 7,0-G;  $p = 0,013$ ) and number of embryos (3,42-NG X 4,0-G;  $p = 0,013$ ) between patients who got pregnant and who did not; (6) The AMH dosages on the 3<sup>rd</sup> and between the 18<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> days of the cycle were significantly higher in patients who got pregnant ( $p = 0,006$  e  $p = 0,001$ ). There was no significant difference between the two dosages of AMH from the same patient. The AMH dosage of 1,15ng/ml, collected between the 18<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> days of the cycle, predicts the occurrence of pregnancy with a 70% specificity and 62,1% sensibility; (7) The urocortin relative gene expression was 20% higher in endometrial samples of patients who got pregnant, but the endometrial lavage urocortin dosage did not show significant difference between the groups ( $p=0,688$ ); (8) No significant alteration was observed in the gene expression of CRH-R1 and CRH-R2 in pregnant compared to non-pregnant patients ( $p = 0,1892$  e  $p= 0,1923$ ).

**Conclusions:** (1) The antral follicle count is a good predictor for the number of oocytes and embryos obtained in FIV treatments. It is not a good predictor for pregnancy occurrence and a cutoff value cannot be established and used as a pre-

treatment tracking exam; (2) The anti-müllerian hormone dosage is a good predictor for the pregnancy occurrence in FIV treatments being significantly higher in patients who got pregnant. The AMH concentrations are stable during the menstrual cycle and the exam can be collected at any moment of the cycle. Values over 1,15ng/ml determine higher pregnancy chance with specificity of 70% and sensibility of 62,1%; (3) The endometrial urocortin gene expression was 20% higher in patients who got obtained pregnancy after FIV treatments. The dosage of endometrial lavage using ELISA did not present enough sensibility to be used as a marker of endometrial receptivity in FIV treatments.

# 1 . INTRODUÇÃO



# 1 HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO (AMH)

## 1.1 Fisiologia do hormônio anti-mülleriano

O hormônio anti-mülleriano é uma glicoproteína dimérica composta de dois monômeros de 72 Kda ligados por pontes dissulfeto. Pertence à superfamília de fatores  $\beta$  de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ), que inclui várias outras glicoproteínas como inibinas e ativinas. Essa família é formada por glicoproteínas diméricas que estão envolvidas no controle do crescimento e diferenciação tecidual. O gene do AMH foi mapeado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.3). O AMH age através de dois receptores, ligando-se inicialmente ao receptor tipo II, que então transmite o sinal ao receptor tipo I (1)

No sexo masculino, o AMH é sintetizado nas células de Sertoli logo após a diferenciação testicular e é responsável pela regressão ipsilateral dos ductos de Müller, que ocorre em direção crânio-caudal e se completa em torno de oito semanas de vida embrionária. Posteriormente, a produção de testosterona pelas células de Leydig irá estimular os ductos de Wolff, formando epidídimos, ductos deferentes e vesículas seminais. Mutações do gene do AMH apresentam como única expressão consistente a ausência de regressão de útero e tubas uterinas no sexo masculino. No sexo feminino, a ausência do AMH, permite o desenvolvimento de trompas, útero e terço superior da vagina a partir dos ductos de Müller (paramesonéfricos). Esse desenvolvimento requer o surgimento primário dos ductos mesonéfricos e, por essa razão, anormalidades no sistema renal se associam a anormalidades de desenvolvimento de tubas, útero e região proximal da vagina (1).

O AMH apresenta também outras funções: exerce efeito inibitório na meiose oocitária, participa da descida dos testículos para a bolsa escrotal e inibe o acúmulo de surfactante nos pulmões. A clivagem proteolítica do AMH produz fragmentos que têm a habilidade de inibir o crescimento de vários tumores, o que pode constituir potencial aplicação terapêutica (1).

O AMH secretado pelas células de Sertoli é detectado em sangue de homens durante a infância, adolescência e vida adulta, com declínio de seus níveis após a puberdade em conseqüência do efeito supressor exercido pela testosterona. Em mulheres, o AMH secretado pelas células da granulosa não é mensurável até a puberdade. Essa diferença permite que sua dosagem sérica seja um marcador sensível da presença de tecido testicular em anomalias de intersexo (1).

Em mulheres, o AMH não se expressa antes do nascimento, garantindo a diferenciação feminina normal. Após a puberdade, o AMH é detectado nas células da granulosa de folículos primordiais e atinge pico de concentração em folículos antrais. A concentração de AMH em pequenos folículos antrais é quase três vezes maior do que em folículos pré-ovulatórios. Os níveis séricos de AMH se correlacionam com o número de folículos ovarianos em crescimento, portanto, com a reserva ovariana (2).

## **1.2 Reserva ovariana**

A determinação acurada da reserva ovariana permanece como um desafio para o especialista em infertilidade. Alcançar esse desafio representaria a possibilidade de predição das chances de sucesso da terapia de reprodução

assistida para determinada paciente. Deseja-se que seja possível a identificação daquelas com maiores riscos de interrupção do tratamento por má resposta ao estímulo ovariano ou mesmo de cancelamento de um ciclo de fertilização *in vitro* (FIV) por uma resposta exagerada, a qual poderia ocasionar efeitos colaterais potencialmente graves, como a síndrome de hiperestímulo ovariano (OHS). A correta avaliação da reserva ovariana permitiria um melhor planejamento do tratamento, ou, em casos extremos, a sua não realização. O aconselhamento pré-tratamento poderia reduzir o desgaste emocional das pacientes e amenizar a decepção diante de um resultado negativo.

O declínio do sucesso das terapias de reprodução assistida relacionado à idade da paciente é largamente atribuído a uma redução progressiva da quantidade e qualidade oocitárias. Nos últimos anos, diversos testes têm sido propostos para a avaliação da reserva ovariana, geralmente avaliando-se sua acurácia através de parâmetros como o número de oócitos obtidos em uma coleta ovariana, ou mesmo taxas de gravidez alcançadas. Muitos desses testes se tornaram parte dos procedimentos diagnósticos de rotina para pacientes inférteis que serão submetidas a técnicas de reprodução assistida, mas o real valor da maioria desses testes é ainda controverso.

### **1.3 Associação entre AMH e reserva ovariana**

A dosagem sérica do hormônio anti-mülleriano já foi extensamente estudada como teste preditor da reserva ovariana. O AMH tem ações regulatórias importantes

durante a foliculogênese, inibindo o recrutamento de folículos primordiais durante a seleção do folículo dominante, por diminuição da sensibilidade ao hormônio folículo estimulante (FSH). Em mulheres normo-ovulatórias, seus níveis se correlacionam fortemente com o número de folículos antrais (3,4). Avaliando-se o número de folículos primordiais em ovários de mulheres submetidas a ooforectomia por condições benignas, Hansen demonstrou correlação com os níveis séricos de AMH e com a contagem de folículos antrais (AFC), mesmo após ajuste para a idade cronológica (5). Em 2005, Tremellen verificou que em mulheres com reserva ovariana considerada normal, com base em níveis de FSH menores que 10 mUI/ml, os níveis de AMH permanecem relativamente estáticos dos 18 aos 29 anos de idade. Dos 30 aos 37 anos, ocorre importante queda do AMH, com mudanças mínimas no FSH (6). Van Rooij demonstrou que, acima dos 37 anos, o AMH permanece como o melhor marcador endócrino na avaliação do declínio da capacidade reprodutiva relacionado com a idade. Grupo de mulheres avaliadas em dois momentos distintos, aos 39 e aos 43 anos, apresentou alteração significativa dos níveis de AMH, FSH e inibina B e da contagem de folículos antrais com o passar do tempo, sendo a melhor consistência apresentada pelo AMH (7). Broer relatou que em mulheres normo-ovulatórias, observadas durante aproximadamente 11 anos, AMH foi bom preditor da idade da menopausa (8). O AMH decresce continuamente com o passar da idade. Em pacientes jovens, submetidas a tratamento de reprodução assistida, a dosagem de AMH pode ser ainda mais útil devido ao maior risco de hiperestímulo ovariano que essas pacientes apresentam, como também para a detecção daquelas pacientes cuja reserva ovariana diminuída poderia ser negligenciada devido à idade mais baixa (9).

Em revisão realizada em 2006 foram avaliados como preditores da reserva ovariana: hormônio anti-mülleriano (AMH), hormônio folículo estimulante (FSH) em fase folicular precoce, estradiol, inibina B, contagem de folículos antrais (AFC), volume ovariano, fluxo sanguíneo ovariano, teste do citrato de clomifeno, teste com estímulo com FSH. Todos esses testes demonstraram capacidades preditoras modestas ou ruins, tendo sido considerados, na época, de pouca relevância clínica. Em relação especificamente à dosagem de AMH, essa revisão considerou que seriam necessários estudos adicionais para comprovar a acurácia desse teste, sem uma conclusão definitiva com os dados disponíveis até aquele momento (10).

Desde 2002, estudos têm demonstrado que, em pacientes submetidas à FIV, AMH é forte preditor do número de oócitos coletados, sendo que menor AMH se associa a pior resposta ovariana ao tratamento (3,11,12). Estudo de Hazout, em 2004, descreveu que mulheres que engravidaram por FIV apresentaram maiores valores médios de AMH dosado no terceiro dia em comparação com as que não engravidaram, tendo o AMH a melhor contribuição independente para prever chances de gravidez. Há uma associação forte entre o AMH do terceiro dia e o prognóstico da FIV, sendo que maiores níveis de AMH se associam a maior número de oócitos maduros, maior número de embriões e maior taxa de gravidez (13). Ficioglu, em 2006, considerou o AMH como preditor mais sensível e específico da reserva ovariana, sendo sua dosagem no terceiro dia do ciclo menstrual significativamente maior em pacientes que tiveram mais de cinco oócitos coletados em ciclo de FIV. Não foi, no entanto, bom identificador das chances de gravidez nesse estudo (14). Em 2007, Smeenk descreveu o AMH como bom preditor do número de oócitos e de embriões após tratamentos de FIV, mas, em um primeiro momento, a dosagem de AMH não pôde ser relacionada com a qualidade

embrionária ou chance de gravidez (15). Riggs em 2008 e Kunt em 2011 verificaram que o AMH se correlaciona com o número de oócitos coletados com mais acurácia que idade, FSH, hormônio luteinizante (LH), inibina B e estradiol, e permanece como bom preditor quando analisado apenas o número de oócitos maduros (16,17). Riggs em 2011 avaliou pacientes jovens, selecionadas como doadoras de óvulos. Nessas pacientes, AMH se mostrou superior a outros marcadores como preditor de resposta ovariana insuficiente ou exagerada (18). Sendo bom preditor da resposta ovariana, AMH é útil como teste de rastreamento e orientação de decisões na prática clínica. Se seus níveis forem muito baixos (em estudo de 2008 determinado como menores que 1,26ng/ml), a reserva ovariana provavelmente está prejudicada, o que deve ser confirmado por outro teste como AFC (19).

Avaliando-se especificamente pacientes com característica de risco para má resposta ao estímulo ovariano, diversos estudos demonstraram boa acurácia do AMH. Nesse grupo de pacientes a dosagem de AMH foi considerada como melhor marcador isolado de predição do resultado do tratamento, apresentando a melhor associação com o número de oócitos coletados. Muttukrishna observou que os níveis de AMH foram significativamente mais baixos no grupo com cancelamento do ciclo, em comparação com o grupo que completou o tratamento (20). Em estudo de Nakhuda em 2007, comparando-se pacientes nas quais o ciclo foi cancelado com aquelas submetidas à coleta ovariana, observaram-se FSH e estradiol similares entre os grupos, enquanto o AMH foi significativamente menor no primeiro grupo. Nas pacientes submetidas à coleta, a concentração de AMH se correlacionou positivamente com o número de oócitos. Pacientes que foram excluídas do tratamento por apresentarem níveis elevados de FSH apresentaram também AMH baixo ou, até mesmo, indetectável (21). Esses achados permaneceram válidos para

o AMH dosado tanto no terceiro como no quinto dia do ciclo menstrual, com melhor capacidade preditora para o colhido no quinto dia. No entanto, nesse estudo, nenhuma das duas dosagens puderam prever as chances de gravidez. (22). McIlveen identificou AMH como bom preditor de cancelamento do ciclo e resposta deficiente à estimulação ovariana, sendo considerado o melhor preditor de resposta ovariana inadequada, com consistência entre os ciclos (23). Em 2009, Lee descreveu que em pacientes acima dos 35 anos, AMH é o melhor fator preditivo de nascidos vivos após FIV, sendo superior, inclusive, ao FSH (24). Segundo estudo de Fridén, em pacientes com idade mais avançada, de 39 a 46 anos, AMH é bom preditor do prognóstico do ciclo de FIV. Quanto menor o AMH, maior o risco de cancelamento do ciclo e menor o número de oócitos coletados, enquanto concentrações mais altas se associam a uma boa chance de sucesso do tratamento (25). Em pacientes com reserva ovariana diminuída, independentemente da idade, os níveis de AMH se correlacionam com a chance de ocorrência de nascido vivo após tratamento (26). AMH parece ser melhor marcador de predição da resposta ovariana ao estímulo hormonal que idade da paciente, FSH, estradiol e inibina B. Parece se equivaler a AFC como preditor da resposta ovariana, principalmente quando avaliados nas pacientes com resposta deficiente ao estímulo ovariano (27).

AMH permite a identificação de resposta inadequada e cancelamento do ciclo e, no outro extremo, de resposta exagerada e síndrome de hiperestímulo. Em pacientes inférteis com endometriose, de Carvalho demonstrou que o AMH é o melhor marcador de resposta inadequada ao estímulo ovariano (28). Na prática clínica, pode ser útil na individualização do tratamento, diminuindo os riscos de complicações da reprodução assistida (29,30). Protocolos de estímulo ovariano baseados em dosagem de AMH já foram propostos e demonstraram melhora dos

resultados clínicos, redução das complicações e do gasto financeiro associados à reprodução assistida (31).

O valor clínico do AMH também já foi avaliado em mulheres com falência ovariana prematura (FOP), comparando sua dosagem com a realização de histologia e imunohistoquímica. Os níveis séricos de AMH foram significativamente maiores em mulheres com mais de cinco folículos na histologia. A expressão de AMH foi normal nos folículos pré-antrais das pacientes com FOP, mas diminuída no estágio antral. Os níveis de AMH das pacientes com FOP podem ajudar a identificar aquelas com folículos remanescentes (32,33).

Estudos posteriores começaram a correlacionar os níveis de AMH com taxas de gravidez. Lekamge avaliou 126 pacientes submetidas à FIV. Aquelas com AMH e contagem de folículos antrais (AFC) mais baixos produziram um número significativamente menor de oócitos. Menor AMH se associou a menor taxa de fertilização, independentemente da técnica de realização da fertilização (FIV ou ICSI - injeção intra-citoplasmática de espermatozóide), menor número de embriões, maior incidência de abortamentos, resultando em menor taxa de gravidez por ciclo (34).

Estudos mais recentes têm demonstrado que níveis de AMH parecem prever não só a reserva ovariana como também a morfologia embrionária. Sua dosagem no dia da administração do HCG se correlaciona inversamente com os níveis basais de FSH e ambos se correlacionam significativamente com a idade da paciente, número de folículos maduros, número de oócitos coletados e níveis séricos de estradiol. Em 2006 Silberstein demonstrou que níveis de AMH se correlacionam significativamente com um maior número de embriões, maior escore atribuído à morfologia embrionária e maior taxa de implantação (35). Estudo de Sills verificou que o AMH dosado antes do tratamento de FIV apresenta correlação positiva com o



número de oócitos maduros coletados e com o número de embriões que atingem o estágio de blastocisto (36).

As características basais (idade, AMH, índice de massa corporal, tipo, duração e etiologia da infertilidade) das pacientes foram avaliadas por La Marca como preditores das chances de gravidez e nascido vivo após um tratamento de FIV. Após regressão logística, apenas a idade da paciente e a dosagem de AMH puderam ser associadas à ocorrência de nascido vivo (37).

Outros estudos têm avaliado se o momento da coleta do AMH seria relevante em sua acurácia como teste de reserva ovariana. Já em 2000, Cook demonstrou que a concentração de AMH varia pouco durante o ciclo menstrual, significando que suas dosagens poderiam ser realizadas a qualquer momento do tratamento, com maior conveniência para médicos e pacientes (38). Hehenkamp descreveu que várias dosagens de AMH, realizadas em diferentes dias do ciclo menstrual de uma mesma paciente, não apresentam diferença significativa, confirmando sua estabilidade intra-ciclo (39). Comparado a AFC, AMH apresenta menor variabilidade intra-ciclo e inter-ciclos menstruais, podendo ser considerado mais útil na prática clínica para avaliação da reserva ovariana em mulheres subférteis (40). Estudo de Tsepelidis de 2007 avaliou pacientes normo-ovulatórias, com idades entre 19 e 35 anos. O AMH foi coletado nos dias 3, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 21 e 25 de um ciclo menstrual espontâneo. Suas concentrações, avaliadas pelo dia do ciclo ou comparadas pelo dia da ovulação, não demonstraram variação significativa (41). Em concordância com esses achados, em 2007, La Marca demonstrou que a dosagem de AMH em qualquer dia do ciclo pode prever a resposta ovariana de mulheres em terapia de reprodução assistida. Níveis mais baixos foram detectados em mulheres mais velhas e que necessitaram de maiores doses de FSH recombinante em ciclos

de FIV. Todos os ciclos cancelados por ausência de resposta ocorreram no grupo com menor AMH, enquanto os ciclos cancelados por síndrome de hiperestímulo ovariano ocorreram nas pacientes com níveis mais altos de AMH (42). A dosagem de AMH já foi também realizada no decorrer do tratamento de FIV. Medidas no quinto dia de estímulo ovariano, dia da administração do hCG, dia da coleta ovariana e 14 dias após a coleta foram realizadas por Lee, em 2010, e demonstraram correlação com a resposta ovariana, mas o AMH realizado antes do tratamento apresentou melhor acurácia (43).

Todos esses estudos nos indicam a relevância em confirmar a acurácia do AMH como teste preditor da reserva ovariana, sendo potencialmente uma grande contribuição no aconselhamento das pacientes e planejamento de tratamentos de reprodução assistida. Essa confirmação se faz necessária para que o AMH possa ser inserido, de forma mais consistente, na prática diária do tratamento de infertilidade.

## **2 CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS (AFC)**

Há vários anos, diversos estudos avaliam a eficácia da contagem de folículos antrais como marcador da reserva ovariana. Os estudos publicados de 1980 a 2005 foram revisados e foi descrito que uma menor AFC reflete o envelhecimento ovariano, sendo esse achado mais precoce que o aumento nos níveis de FSH. AFC seria, possivelmente, um fator prognóstico melhor que a idade ou marcadores endócrinos (44). Revisão sistemática realizada em 2006, incluindo vários possíveis

marcadores da função ovariana, demonstrou acurácia modesta dos diversos parâmetros avaliados, inclusive da AFC (10). Nenhum parâmetro clínico ou biológico tem acurácia adequada para avaliar a qualidade oocitária e embrionária, mas a AFC e AMH sérico demonstraram ser melhores marcadores quantitativos da reserva ovariana e do prognóstico de tratamentos de reprodução assistida. Em 2010, Majumder demonstrou que AFC e AMH são bons preditores do número de oócitos e de embriões obtidos para transferência e congelamento (45). Estudo de Holte, em 2011, verificou que AFC pode ser correlacionada com taxas de gravidez e nascido vivo em pacientes submetidas à FIV, com resultados mantendo-se significativos mesmo após ajustados em relação ao número de oócitos coletados (46). AFC e AMH demonstraram ser os melhores preditores de resposta insuficiente ao estímulo ovariano em pacientes submetidas à FIV, apesar de não predizerem a não ocorrência de gestação, em estudo de Jayaprakasan em 2010 (47). Outros estudos reforçaram AFC e AMH como bons marcadores da função ovariana, podendo prever não só a má resposta como também o risco de resposta exagerada ao tratamento, sendo superior ou, pelo menos, similar a exames endócrinos mais complexos, caros e demorados, podendo ambos serem utilizados no planejamento do estímulo ovariano (48,49,50,51,52,53,54).

Nardo descreveu que AFC se correlaciona positivamente com os níveis séricos de AMH dosados no terceiro dia do ciclo menstrual e ambos se correlacionam negativamente com a idade e com o número de anos desde a menarca. Não há correlação desses marcadores com índice de massa corporal, tabagismo, consumo de álcool, origem étnica ou idade da menarca (55). Broer comparou a dosagem de AMH com realização de AFC, demonstrando acurácia e valor clínico similares dos dois testes para predição de má resposta e não ocorrência de gestação após

tratamentos de FIV (56). A dosagem de AMH apresenta como vantagem, em relação a AFC, uma menor variabilidade intra-ciclo e inter-ciclos menstruais, sendo, então, um método mais útil na prática clínica (57).

Todos os marcadores disponíveis têm, ainda, valor preditivo limitado, mas AFC (58) e dosagem de AMH se mostram superiores, devendo ser incluídos em modelos multivariados que possam ser propostos na análise da reserva ovariana (59). Outro estudo comparou esses modelos multivariados com a realização isolada da AFC. A acurácia para predição da resposta ovariana foi similar. Em relação a taxas de gravidez, não foram encontrados dados suficientes (60).

AFC se correlaciona com os níveis de FSH, podendo ser superior a esse em prever má resposta ao tratamento de FIV (61,62,63). Em relação à dosagem de inibina B no quinto dia do ciclo, AFC demonstrou propriedades preditoras similares para resposta ovariana ao tratamento de FIV (64). Quando comparada à avaliação do volume ovariano como preditor de má resposta ao tratamento, a AFC se mostrou superior, tendo sido considerada, por Hendriks em 2007, teste de escolha para avaliação quantitativa da reserva ovariana antes da FIV (65).

Erdem avaliou casais com infertilidade sem causa aparente, que seriam submetidos à inseminação intra-uterina., Uma menor AFC se associou a menores taxas de gravidez clínica e parto (66). Por outro lado, nesse mesmo grupo de pacientes, Checa demonstrou que a presença de dezesseis ou mais folículos antrais no terceiro dia do ciclo menstrual é bom preditor de cancelamento por resposta exagerada ao tratamento (67).

Apesar dos diversos estudos demonstrando seu valor na avaliação da reserva ovariana em pacientes submetidas a tratamentos de reprodução assistida, o papel da AFC como preditor de ocorrência de gestação espontânea é controverso e, assim

como FSH e outros testes disponíveis, não devem ser realizados na prática clínica com esse intuito (68).

A contagem de folículos antrais é significativamente menor em mulheres inférteis, quando comparadas com um grupo controle fértil (69).

AFC e AMH apresentam um declínio significativo e progressivo com a idade, correlacionado com a perda oocitária observada histologicamente (70). AFC se inclui entre os testes que poderiam ser utilizados como predição da menopausa a longo prazo. Outros possíveis parâmetros seriam a idade cronológica, história familiar, AMH, FSH e resposta inadequada a um tratamento de FIV. Para predição a curto prazo, devem ser considerados o encurtamento dos ciclos menstruais e a ocorrência de sintomas vasomotores. Esses parâmetros podem ser úteis como aconselhamento das pacientes, mas nenhum deles apresenta, até o momento, acurácia suficiente para predição da idade da menopausa de uma paciente individualmente (71). Apesar disso, já foi demonstrado que a contagem de folículos antrais é menor naquelas pacientes com história familiar de menopausa em idade mais precoce, podendo indicar um componente genético na sua determinação (72).

### 3 RECEPTIVIDADE ENDOMETRIAL

A implantação do embrião humano é um processo que envolve interação e sincronia entre um endométrio receptivo e um blastocisto com desenvolvimento adequado. Na presença dessas condições favoráveis, a implantação ocorrerá em um período limitado, denominado “janela de implantação”, que se estabelece entre o 20º e 24º dias do ciclo menstrual. Será necessária a ocorrência de uma seqüência complexa de eventos, incluindo a aquisição de moléculas de adesão, associada à perda de componentes inibitórios (73). Um dos eventos essenciais para a preparação do endométrio é a ocorrência de sua decidualização, que envolve diferenciação de células estromais, remodelamento tecidual e alterações similares a uma resposta inflamatória. Muitas pesquisas têm sido realizadas para entender melhor a regulação do endométrio e sua implicação clínica no processo da implantação (74). A avaliação endometrial histológica traz pouca informação de relevância clínica, sendo a receptividade endometrial melhor estudada por avaliações funcionais. Amostras endometriais ou a obtenção do fluido endometrial podem ser utilizadas para identificar moléculas associadas à receptividade uterina (73). Diversos marcadores moleculares já foram identificados, incluindo moléculas de adesão, citocinas, fatores de crescimento e outros. Diversos peptídeos e proteínas já foram sugeridos como participantes desse processo, dentre os quais a urocortina.

## 4 UROCORTINA (UCN)

### 4.1 Fisiologia da urocortina e sua atuação no sistema reprodutivo

A urocortina é um peptídeo composto por 40 aminoácidos, com estrutura similar ao hormônio liberador de corticotropina (CRH), já tendo sido descritos três tipos, nomeados urocortinas I, II e III.

A urocortina I (UCN I) foi localizada no ovário, endométrio, placenta, âmnio, córion, miométrio e próstata, locais que também apresentam seu receptor, sugerindo a ação desse peptídeo nesses sítios. *In vitro*, a UCN I age na placenta, estimulando a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), prostaglandinas e ativina A e regulando a resistência dos vasos placentários ao fluxo sanguíneo. A UCN I age ainda em células miometriais, estimulando a contração uterina. Esses achados sugerem uma importante ação da UCN I na fisiologia da gravidez e do parto (75).

As urocortinas II e III (UCN II e UCN III) já foram localizadas no citotrofoblasto e sincitiotrofoblasto. A UCN II também está presente em vasos fetais e maternos, além de células amnióticas. No entanto, UCN II e III não estimulam a secreção placentária de ACTH (76).

A urocortina apresenta capacidade de se ligar aos receptores do CRH dos tipos 1 e 2 (CRH-R1 e CRH-R2), com grande afinidade (77). Esses receptores já foram identificados em tecidos reprodutivos, como ovário, útero, tecidos fetais e placentários. Durante o ciclo menstrual, o CRH participa da decidualização endometrial. É produzido pelo trofoblasto embrionário e pelas células deciduais maternas, sugerindo seu importante papel na implantação e controle da invasão trofoblástica. CRH e urocortina placentários estão envolvidos na manutenção da

gestação e início do parto (78). Durante a gravidez, a urocortina é produzida pela decídua e pode ser detectada no plasma materno, tendo uma possível ação na regulação do fluxo sanguíneo útero-placentário (79). A expressão de RNAm do CRH, urocortina, proteína carreadora do CRH (CRH-BP) e receptores do CRH 1 e 2 foi investigada por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tecidos gestacionais de pacientes a termo, antes do parto. A placenta foi detectada como principal sítio de CRH e CRH-BP. Miométrio e decídua apresentaram quantidades relevantes de ambos receptores. A expressão de urocortina foi baixa em todos os tecidos investigados (80).

Revisão realizada em 2009 incluiu dados que sugerem que a UCN possuiu papel significativo na reprodução humana, estando envolvida em importantes funções, como esteroidogênese ovariana, manutenção da função placentária e parto (81). Foram realizadas PCR e imunohistoquímica em pacientes com gestação ectópica e pacientes não grávidas, tendo sido verificada menor expressão de UCN I e dos receptores de CRH 1 e 2 na trompa e no endométrio daquelas com ectópica. Isso sugere a participação dos peptídeos da família do CRH na implantação embrionária (82).

A presença da urocortina no sítio de implantação do blastocisto humano foi investigada, sendo confirmada no citotrofoblasto, no trofoblasto extraviloso e em células da decídua (83).

No útero da paciente não grávida, a identificação do RNAm da urocortina por PCR e do próprio peptídeo por imunohistoquímica foram realizadas por Florio em 2002. A urocortina foi imunolocalizada em células epiteliais e estromais do endométrio, como também no miométrio e células musculares vasculares. Não foram observadas diferenças entre as fases proliferativa e secretora. Esses



resultados foram confirmados por PCR (84). Em 2006 Florio descreveu a expressão do RNAm e dos peptídeos de UCN II e UCN III no endométrio humano durante o ciclo menstrual e na fase inicial da gestação. Os dois peptídeos foram imunolocalizados em células epiteliais, estromais e endoteliais. As maiores expressões de RNAm da UCN II foram no endométrio em fase proliferativa inicial e da UCN III na decídua materna (85).

Em 2007, estudo descreveu a expressão do RNAm e do peptídeo da urocortina em células epiteliais e estromais do endométrio humano, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual. Os resultados permitiram concluir que a concentração da UCN é maior na fase secretora, principalmente em sua fase mais tardia. Esteróides ovarianos modulam a secreção da UCN, a qual induz a decidualização endometrial (86).

A UCN tem também sido estudada em pacientes com endometriose. Seus níveis plasmáticos estão aumentados em mulheres com endometriomas, podendo ser útil no diagnóstico diferencial com outros cistos ovarianos benignos (87). Já foi também verificado que mulheres com endometriose podem apresentar alteração na expressão e função de CRH e UCN no endométrio eutópico. Em mulheres sem endometriose, a expressão de CRH e UCN é significativamente maior na fase secretora que na proliferativa, diferença não observada em mulheres com a doença. Na presença da endometriose, a expressão de CRH e UCN se reduz, e esses peptídeos não mais modulam a decidualização endometrial em culturas de células estromais (88). As UCN II e UCN III estão expressas nos tecidos endometrióticos. No endométrio eutópico de pacientes com endometriose, não apresentam mudanças cíclicas e estão em menor quantidade do que em mulheres sem a doença. UCN II e UCN III modulam a secreção do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e da interleucina 4

(IL-4) em cultura de células endometriais, sugerindo um possível papel desses peptídeos no mecanismo da endometriose (89).

Em reprodução humana, a secreção endometrial de UCN já foi avaliada como preditor de gravidez em ciclos de inseminação intra-uterina (IIU). Estudo de Florio, em 2008, avaliou a concentração de UCN no fluido endometrial de mulheres submetidas à IIU devido a infertilidade por fator cervical, fator masculino leve ou infertilidade sem causa aparente. A concentração de UCN foi significativamente maior nas mulheres que engravidaram (90). Esse achado sugere que a UCN possa exercer um papel importante na receptividade endometrial e no complexo mecanismo de implantação embrionária. Em tratamentos de FIV, a relevância da UCN endometrial nunca foi avaliada, justificando nosso interesse em incluí-la em nosso estudo.

## **2 . OBJETIVOS**

## **1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a acurácia de fatores prognósticos em terapia de reprodução assistida, analisando-se a reserva ovariana através da contagem de folículos antrais e dosagem sérica do hormônio anti-mülleriano e a receptividade endometrial pela dosagem de urocortina no lavado e biópsia endometriais.

## **2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar se a contagem de folículos antrais e se as concentrações de hormônio anti-mülleriano no soro e de urocortina no lavado e biópsia endometriais, medidas no mês anterior ao ciclo de reprodução assistida, são diferentes em pacientes que subseqüentemente obtiveram gestação comparadas às que não obtiveram gestação;
- Avaliar a estabilidade da dosagem do hormônio anti-mülleriano durante o ciclo menstrual, comparando seus valores em dois momentos distintos do ciclo;
- Avaliar a sensibilidade e a especificidade dos três testes (contagem de folículos antrais, hormônio anti-mülleriano e urocortina) na predição de gravidez em mulheres submetidas à terapia de reprodução assistida.

## **3 . MATERIAIS E MÉTODOS**

## 1 PACIENTES

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer número ETIC 666/07) e todas as pacientes assinaram o Termos de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram incluídas as pacientes admitidas no Programa de Fertilização Assistida do Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (LRH) para a realização de fertilização *in vitro* convencional (FIV) ou por injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), que concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido para participar do estudo. Para ser admitida no programa de fertilização *in vitro*, a paciente deve ter diagnóstico de infertilidade primária ou secundária com indicação de tratamento por FIV, ou apresentar algum fator que a impeça de engravidar espontaneamente ou por outros tratamentos de menor complexidade, estando incluídos realização prévia de salpingotripsia bilateral ou vasectomia e sorodiscordância para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), com o cônjuge portador do vírus. A paciente deve também apresentar idade inferior a 40 anos no momento de inclusão no programa e índice de massa corporal (IMC) inferior a 30 no momento de início do tratamento.

Preenchendo todos esses critérios, foram inicialmente alocadas 146 pacientes, no período de junho de 2008 a setembro de 2010. Desse total, 11 pacientes foram excluídas do estudo. Seis pacientes desistiram do tratamento antes mesmo do início da primeira medicação, alegando motivos pessoais diversos. Cinco pacientes iniciaram o uso da primeira medicação, o análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa), mas não apresentaram o efeito de bloqueio central que

seria esperado com o seu uso. Tiveram, então, que interromper o medicamento e seguir condutas diferentes das estabelecidas no protocolo inicial, sendo então excluídas.

O grupo estudado incluiu um total de 135 pacientes, que iniciaram e concluíram o tratamento adequadamente. Esse total foi dividido em dois grupos, de acordo com a ocorrência ou não de gravidez clínica, definida pela presença de batimentos cardíaco-fetais (BCF) à ultrassonografia transvaginal (USTV), realizada em torno da sexta semana de gestação.

## **2 COLETA E DOSAGEM DO AMH**

As pacientes com indicação de FIV ou ICSI são habitualmente submetidas à coleta de amostras sanguíneas com objetivo propedêutico, segundo o protocolo do serviço, incluindo a realização de sorologias e dosagem de FSH, hormônio tireoestimulante (TSH) e prolactina. Além dessas, foram coletadas amostras para a dosagem de AMH em dois momentos distintos: no terceiro dia e entre o 18º e o 20º dias do ciclo menstrual, no ciclo anterior ao início do tratamento. Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm por 10 minutos) para a obtenção do soro, o qual, após devidamente identificado, foi imediatamente armazenado a -80 °C.

Após a coleta de todas as amostras, foi realizada a dosagem do AMH com o kit AMH Gen II ELISA (Beckman Coulter®), o qual permite a avaliação quantitativa do AMH em soro. Esse teste é um imunoenensaio enzimaticamente amplificado de dois-sítios. No ensaio, padrões, controles e amostras de soro foram incubados em uma placa de ELISA de 96 poços revestida com anticorpo anti-AMH. Após incubação e

lavagem, a placa foi incubada com outro anticorpo de detecção anti-AMH marcado com biotina, novamente lavada, e em seguida incubada com streptavidina-peroxidase de rábano (HRP). Após a terceira incubação e lavagem, acrescentou-se o substrato tetrametilbenzidina (TMB). Uma solução ácida de interrupção foi então adicionada e o grau de reposição enzimática do substrato foi determinado por medida de absorvância em duplo comprimento de onda a 450 e entre 600 e 630nm. A absorvância medida foi diretamente proporcional à concentração de AMH presente. Um conjunto de padrões AMH foi usado para traçar a curva padrão de absorvância versus a concentração e, a partir dessa curva, a concentração de AMH nas amostras pôde ser calculada. A faixa de concentração de AMH detectável pelo kit é de 0,08 a 22,5 ng/ml. O coeficiente de variação intra-ensaio é de 7,7% e inter-ensaio de 5,7%.



### **3 CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS**

A contagem de folículos antrais foi realizada através de ultrassonografia endovaginal, com a sonda 3 – 7,5 mHz, de aparelho de marca Aloka, no terceiro dia do ciclo menstrual. Todos os exames foram realizados pela própria pesquisadora, fazendo-se a medida da espessura endometrial e a contagem de todos os folículos ovarianos que estivessem com medidas entre dois e dez milímetros nos dois ovários (91).

## **4 LAVADO E BIÓPSIA ENDOMETRIAIS E DOSAGEM DA UROCORTINA**

Acredita-se que a urocortina possa ser um marcador da receptividade endometrial e sua dosagem poderia auxiliar na predição das chances de gravidez em tratamentos de reprodução assistida. A avaliação da receptividade endometrial ao embrião deve ser feita na fase secretora do ciclo menstrual, pois é nessa fase que a implantação ocorrerá ou não. O lavado e a biópsia endometriais foram então coletados entre o 18° e 20° dias do ciclo imediatamente anterior ao tratamento de reprodução assistida.

### **4.1 Realização do lavado endometrial**

Para a realização do lavado endometrial, a paciente foi posicionada em litotomia e inserido espéculo vaginal com exposição adequada do colo uterino. Um volume de 4ml de água bidestilada (ABD) foi aspirado em uma seringa de 20ml. A essa seringa foi acoplada uma sonda uretral número 12. A sonda foi então inserida no colo uterino, ultrapassando seu orifício interno para que fosse atingida a cavidade endometrial. Estando a ponta da sonda na cavidade endometrial, foram injetados os 4ml de ABD, aspirando-se, a seguir, o líquido injetado. Devido a uma perda para a própria cavidade endometrial, o volume recuperado era menor que o injetado, sendo em torno de 2ml. O volume recuperado foi então centrifugado (3000 rpm por 10 minutos) para eliminar os componentes celulares, restando 1,5ml de líquido que foi, então, devidamente identificado e armazenado a -80°C.

## 4.2 Dosagem da urocortina

Após a coleta das amostras de todas as pacientes alocadas, foi realizada a dosagem de urocortina com o kit de ELISA produzido pela Phoenix Pharmaceuticals®. Antes da realização do ELISA, foi realizada a extração de peptídeos do lavado endometrial. A amostra foi acidificada e pipetada em colunas de cromatografia C18 pré-equilibradas. Após realização de duas lavagens lentas, o peptídeo foi eluído e o eluente coletado em tubo de poliestireno. Os tubos foram então centrifugados a vácuo por 12 horas. Os peptídeos liofilizados foram mantidos a 4° C até realização do ELISA.

Para realização do ELISA, as amostras foram ressuspendidas em 65 µl do tampão do ensaio. Amostras de 50 µl foram adicionadas a uma placa de 96 poços revestidos com anticorpo de captura (imunoglobulina de coelho). Vinte e cinco microlitros de anticorpo anti-urocortina humana e vinte e cinco microlitros de peptídeo marcado com biotina foram então adicionados, incubando-se por 2 horas em temperatura ambiente. Fez-se então uma primeira lavagem, seguida da adição de streptavidina-peroxidase de rábano (HRP), incubando-se por mais uma hora em temperatura ambiente. Fez-se uma segunda lavagem e foi adicionado o substrato tetrametilbenzidina (TMB), incubando-se novamente por mais uma hora. A reação foi então interrompida pela adição de uma solução ácida (ácido clorídrico - HCL), fazendo-se a leitura da densidade óptica em 450nm. A absorbância medida foi indiretamente proporcional à concentração de urocortina presente. Um conjunto de padrões de urocortina foi usado para traçar a curva padrão de absorbância versus a concentração e, a partir dessa curva, a concentração de urocortina nas amostras pôde ser calculada. A faixa de concentração da urocortina detectável pelo kit é de

0,01 a 100 ng/ml. O coeficiente de variação intra-ensaio é de 5,2% e inter-ensaio de 14%.

### **4.3 Coleta da biópsia endometrial**

Após a realização do lavado endometrial, foi realizada biópsia endometrial com Pipelle®. A amostra obtida foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido, até que pudesse, logo a seguir, ser armazenada em -80°C. Depois de obtidas as amostras de todas as pacientes, foi, então, realizada a extração do RNA para realização de PCR.

### **4.4 Extração de RNA e PCR em tempo real para urocortina e seus receptores nas amostras de endométrio**

#### **4.4.1 Extração de RNA total**

Foram utilizadas as amostras de todas as pacientes grávidas e, pelo menos, um controle extraído do grupo das não grávidas, pareado por idade. Foi então realizada a extração de 29 amostras de pacientes do grupo de grávidas e 34 amostras de pacientes do grupo de não grávidas.

Para a extração do RNA total o tecido endometrial foi macerado em 1 ml de Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), utilizando-se o protocolo para o reagente Trizol®, sem modificações. Ao término do protocolo, o RNA total foi quantificado no NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA),

utilizando-se uma alíquota de 1  $\mu$ l. Com o objetivo de eliminar uma possível contaminação por DNA genômico, as amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNA-free kit (Ambion Inc., Foster, California, USA), e em seguida requantificadas no NanoDrop.

#### **4.4.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) pela transcrição reversa (RT)**

A síntese do cDNA foi feita a partir de 2  $\mu$ g de RNA total em 60  $\mu$ l de volume da reação final (33 ng RNA/ $\mu$ L), utilizando oligonucleotídeos complementares reversos (anti-senso) ao RNAm dos genes alvos (Tabela 1). O RNA foi inicialmente desnaturado a 70°C por 10 minutos juntamente com os iniciadores reversos (25 pmols de cada) (Tabela 1). Em seguida, foi incubado com a transcriptase reversa na presença do tampão RT (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4), 4  $\mu$ l de dNTP mix (250 mM de cada), 40 U de inibidor de RNase e água livre de RNase para completar o volume final. A reação foi incubada (60  $\mu$ l) a 43°C por 1 hora, finalizada a 4°C e armazenada a -80°C até o uso. Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen® (SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR).

#### **4.4.3 Oligonucleotídeos Específicos**

Os *primers* designados para a transcrição reversa, reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foram estudados e selecionados com base na análise da sequência descrita no GeneBank, obtida no *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). As sequências foram posteriormente analisadas no *site* da empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT)

(<http://www.idtdna.com>), que permitiu a elaboração dos *primers* para as regiões-alvo de cada gene, de acordo com as nossas especificações para as condições de cada *primer*.

Como gene de referência para correção da expressão dos genes alvos na PCR em tempo real foi utilizado o gene que codifica a proteína ribossomal S26.

Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen, recebidos liofilizados e, em seguida, dissolvidos em H<sub>2</sub>O DEPC, livre de RNase e DNase (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA), para concentração final de 100 pmol/ $\mu$ l (concentração para estoque). Foram preparadas alíquotas de 1 pmol/ $\mu$ l (concentração de uso para a PCR em tempo real), no dia da PCR em tempo real. Para o alíquotamento dos *primers*, foram empregadas ponteiras com barreira e todo o manuseio foi realizado utilizando-se luvas e máscara. A localização e sequência dos oligonucleotídeos sintetizados estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR para a amplificação específica do cDNA da urocortina e receptores CRH-R1 e CRH-R2

Primers	Sequência de nucleotídeos (nt)	Tamanho	Fragmento amplificado	GenBank Accession number
Urocortina (Senso)	5'- CATTGACCTCACCTTTCACCTGCT -3'	24 nt	96 pb	NM_003353.2
Urocortina (anti-senso)	5'- TCGAATATGATGCGGTTCTGCTCG -3'	24 nt		
CRH-R1 (senso)	5'- ACATGCTGTTCTTCGTCAATCCCG - 3'	24 nt	101 pb	L23333.1
CRH-R1 (anti-senso)	5'- AGACACAAAGAAGCCCTGGAAGGA - 3'	24 nt		
CRH-R2 (senso)	5'- TCACTGGAACCTCATCACCTT -3'	24 nt	95 pb	U34587.1
CRH-R2 (anti-senso)	5'- AGACCTCATTGCTCTCGTGCACTT -3'	24 nt		
S26 (senso)	5'- CGTGCTTCCCAAGCTGTACGTGA - 3'	24 nt	75 pb	NM_001029.3
S26 (anti-senso)	5'- CGATTCCGGACTACCTTGCTGTG - 3'	24 nt		

#### 4.4.4 Realização da RT-PCR em tempo real

As amostras de cDNA resultantes da RT foram submetidas à PCR em tempo real realizada no equipamento de sistema de PCR em tempo real ABI PRISM® 7500 *Sequence Detection System* (Laboratório de Reprodução Humana HC/UFMG), utilizando-se o *Power SYBR Green® PCR Master Mix Kit* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços (ABI PRISM® 96-Well *Optical Reaction Plate with Barcode*, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em duplicata, no volume final de reação de 20 µl. Em cada poço foram pipetados 2 µl (75 ng de cDNA total) de amostra e adicionados posteriormente 18 µl do *mix* contendo 10 µl do *Power SYBR Green® PCR Master Mix Kit*, 0,5 µl de cada *primer* (senso e antissenso) (0,5 pmol/cada) e o volume final completado com H<sub>2</sub>O livre de RNase e DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM® *Optical Adhesive Covers*, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e recebeu um *spin* para trazer todo o volume para o fundo do poço. Em seguida, a placa foi encaixada no equipamento de PCR em tempo real para dar início à leitura. Durante todo o processo, luvas, máscara e ponteiros com barreira foram utilizadas. As reações de PCR em tempo real ocorreram no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 60°C/1 min. Ao término da ciclagem, foi realizada a curva de *melting* a 60°C por um minuto, para a construção da curva de dissociação, que tem por objetivo determinar a especificidade dos fragmentos amplificados.

## 5 HIPERESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA

A hiperestimulação ovariana controlada (HOC) foi realizada conforme protocolo do serviço.

O bloqueio hipofisário foi feito com análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa). Acetato de nafarelina por via intranasal ou acetato de leuprolida por via subcutânea foi iniciado no 21º dia do ciclo menstrual, sendo mantido até o dia da administração da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG). A hiperestimulação ovariana foi feita com hormônio folículo estimulante recombinante (Gonal F ®), 75UI/ampola, via subcutânea (SC), e/ou hormônio folículo estimulante altamente purificado associado a hormônio luteinizante altamente purificado (Menopur ®), 75 UI/ampola, via subcutânea. Esses medicamentos foram utilizados na dose de quatro ampolas/dia, do primeiro ao terceiro dias do ciclo, passando para duas ampolas/dia a partir do quarto dia.

A monitorização da HOC foi feita por ultrassonografia transvaginal (USTV). Antes do início das gonadotrofinas, foi realizado um USTV, para confirmar o bloqueio hipofisário obtido com a utilização do GnRHa, avaliando-se o padrão endometrial, cuja espessura deveria ser menor do que 5 mm, e afastando-se a presença de folículos em desenvolvimento ou cistos ovarianos ou foliculares. Confirmado o bloqueio hipofisário, a paciente iniciou o uso de gonadotrofinas, com monitorização ultrassonográfica seriada a partir do sexto dia de uso. O hCG recombinante, 250 microgramas, subcutâneo, foi administrado quando detectado ao USTV pelo menos um folículo maior que 18 mm de diâmetro médio.



## **6 ASPIRAÇÃO DE FOLÍCULOS, FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*, TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA E ACOMPANHAMENTO DA PACIENTE**

As coletas ovarianas foram realizadas por especialistas com formação no próprio laboratório e experiência similar. A aspiração dos folículos foi feita através do USTV, utilizando-se uma pressão negativa artificial constante de 100 mmHg, cerca de 36 horas após a injeção do hCG. O líquido foi coletado em tubos de ensaio estéreis, e os oócitos imediatamente foram identificados com o auxílio de uma lupa, em capela de fluxo laminar para manter o ambiente estéril. O número de oócitos coletados foi registrado.

Os oócitos coletados foram submetidos à fertilização *in vitro* simples (FIV) ou injeção intracitoplasmática do espermatozóide (ICSI) conforme indicação médica. Os embriões obtidos foram então transferidos entre o segundo e quinto dia após a fertilização, segundo protocolo do serviço. As transferências foram realizadas por especialistas com formação no próprio laboratório e experiência similar. Após a transferência embrionária, foi administrada progesterona por via vaginal, na dose de 600 mg/dia, para o suporte de fase lútea, mantida pelo menos até a confirmação ou não da presença de gravidez. Quatorze dias após a transferência embrionária a paciente foi submetida à dosagem de  $\beta$ -hCG. Na presença de gravidez, foi mantido o uso da progesterona, na mesma dosagem, até que se completassem oito semanas de gestação. Foi realizado USTV em torno da sexta semana de gestação

para confirmação da presença de um ou mais embriões e sua viabilidade, avaliada pela detecção de batimentos cardíacos.

## 7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 7.1 Análise Estatística Geral

A análise estatística foi realizada no programa SPSS para Windows, versão 18.0. As variáveis analisadas pelo estudo apresentaram distribuição não paramétrica, sendo então descritas em medianas, intervalos inter-quartis, e percentis 10 e 90 e representadas por gráficos de Boxplot. Foi realizado teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos. A comparação entre as dosagens séricas do AMH realizadas no 3º dia e entre o 18º e o 20º dias do ciclo menstrual foi feita pelo teste não paramétrico para duas amostras pareadas (teste de Wilcoxon). As possíveis correlações entre as diversas variáveis foram analisadas pelo teste de Spearman para correlação linear. Avaliando-se as diversas variáveis estudadas como possíveis preditores da ocorrência ou não de gravidez, foi construída a curva ROC, inicialmente incluindo todas as pacientes e, posteriormente, com subgrupos de pacientes de acordo com as variáveis analisadas. Em todos os testes a significância estatística foi estabelecida em 95%.

Com base em dados de estudos anteriores (92,90), calculamos que para identificar uma diferença de pelo menos 3 ng/ml no AMH sérico ou de 0,2 ng/ml na concentração de urocortina no lavado endometrial entre os dois grupos, com poder estatístico de 90% e nível de confiança de 95%, seriam necessários no mínimo 56 pacientes (ou 14 gestações, considerando a estimativa de uma taxa de gravidez de 25%). Também avaliamos a sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança dos testes para prever a ocorrência de gestação. Os pontos de corte dos testes (AFC, AMH e urocortina) foram determinados pela análise das

curvas ROC. Para valores esperados de sensibilidade e especificidade em torno de 80% com limite inferior mínimo de 50% para o intervalo de confiança de 95% e poder estatístico de 95% seria necessária uma amostra de 28 casos de gestação, ou no mínimo 112 pacientes, estimando-se a taxa global de gravidez em torno de 25% (93).

## 7.2 Análise Estatística da PCR em tempo real

Para ajustar o controle interno, os resultados foram expressos como  $\Delta CT$ , que é o resultado da subtração do CT dos genes-alvo (Urocortina, CRH-R1 e CRH-R2) pelo CT do gene de referência (S26 - Proteína ribossomal). A expressão gênica relativa foi calculada como *fold change*, definido pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta CT = \Delta CT$  das amostras subtraído do  $\Delta CT$  médio do grupo das não grávidas. As análises foram realizadas tendo por base o  $\Delta CT$ , que é a fonte primária da variação (94). Para maior clareza, os gráficos foram expressos como  $-\Delta CT$ , o qual é diretamente proporcional à expressão dos genes-alvo.

Os cálculos estatísticos da PCR em tempo real foram realizados no programa *GraphPad Prism 5*. Para avaliar a distribuição do  $\Delta CT$  dos genes-alvo analisados e do *fold change* da UCN, foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov, que demonstrou distribuição paramétrica para o  $\Delta CT$  da UCN e não-paramétrica para *fold change* da UCN e  $\Delta CT$  do CRH-R1 e CRH-R2. O teste *t* de *Student* não pareado monocaudal foi utilizado para comparar a expressão do gene da UCN entre as pacientes não grávidas e grávidas. Foram calculadas e comparadas as medianas do *fold change* da UCN nos dois grupos. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para

comparar a expressão do CRH-R1 e CRH-R2. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

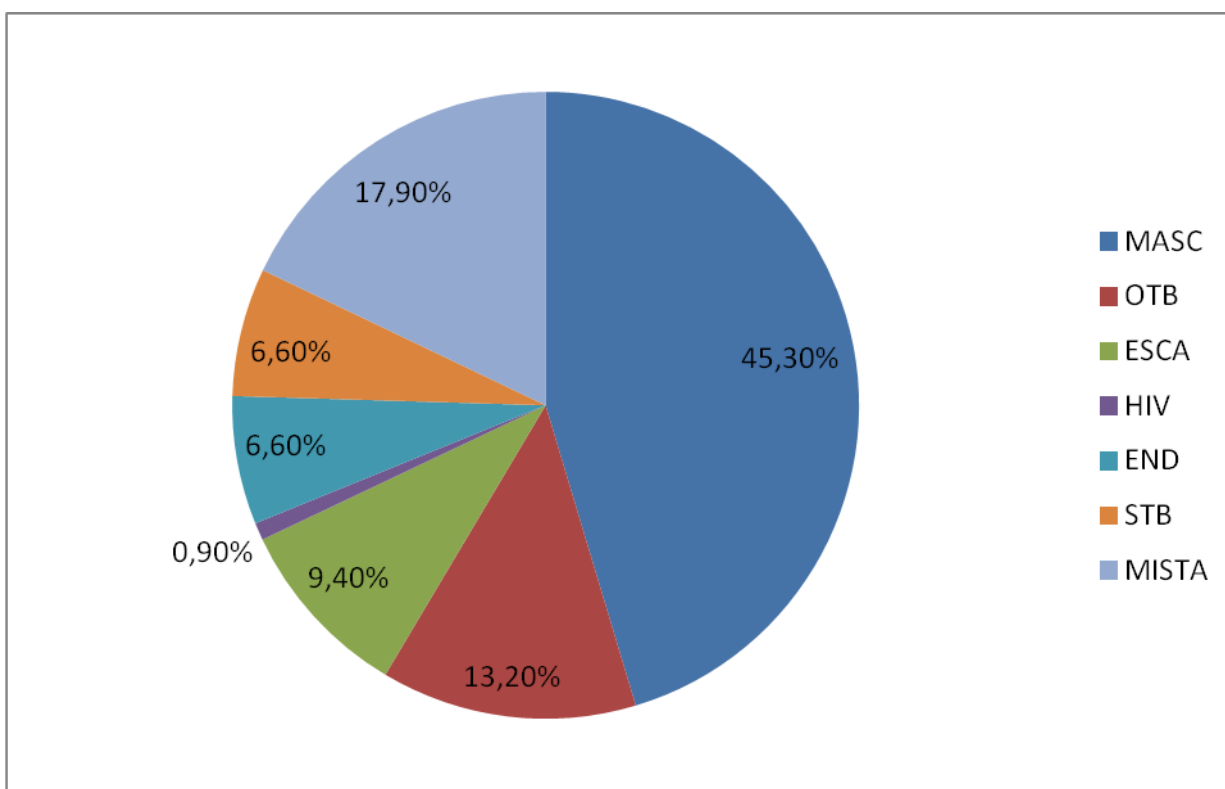
## 1 TAXA DE GESTAÇÃO

Das 135 pacientes incluídas no estudo, 29 engravidaram, correspondendo a uma taxa global de gravidez de 21,48%, compatível com a encontrada na literatura. Das 29 gravidezes obtidas, 10 evoluíram com a ocorrência de abortamento espontâneo, representando uma taxa de 34,5% de abortamento.

Vinte e três pacientes tiveram seu ciclo de FIV cancelado por resposta ovariana inadequada às gonadotrofinas, não tendo sido submetidas à coleta ovariana. Se forem consideradas apenas as 112 pacientes submetidas à coleta ovariana, a taxa de gestação foi de 25,89%.

## 2 CARACTERÍSTICAS DESCRITIVAS DOS GRUPOS

O grupo de não grávidas foi formado por 106 pacientes, sendo 74,5% com infertilidade conjugal primária e 25,5% secundária. As causas de infertilidade foram distribuídas de acordo com a figura 1.

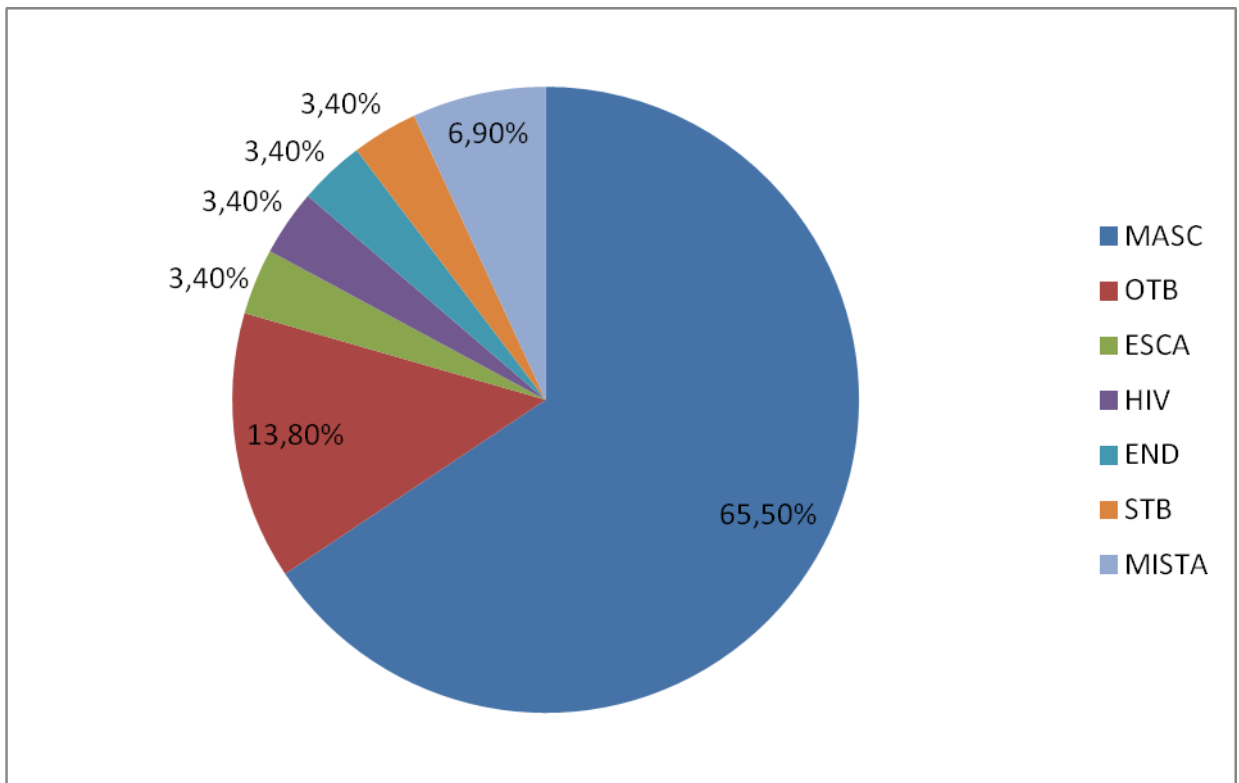


**Figura 1** – Causas de infertilidade no grupo de pacientes não grávidas

MASC – fator masculino; OTB – obstrução tubárea bilateral; ESCA – esterilidade sem causa aparente; HIV – sorodiscordância para o vírus HIV com parceiro portador; END – endometriose; STB – salpingotripsia bilateral; MISTA – mais de uma causa associada



O grupo de grávidas foi formado por 29 pacientes, sendo 62,1% com infertilidade conjugal primária e 37,9% secundária. As causas de infertilidade foram distribuídas de acordo com a figura 2.



**Figura 2** – Causas de infertilidade no grupo de pacientes grávidas

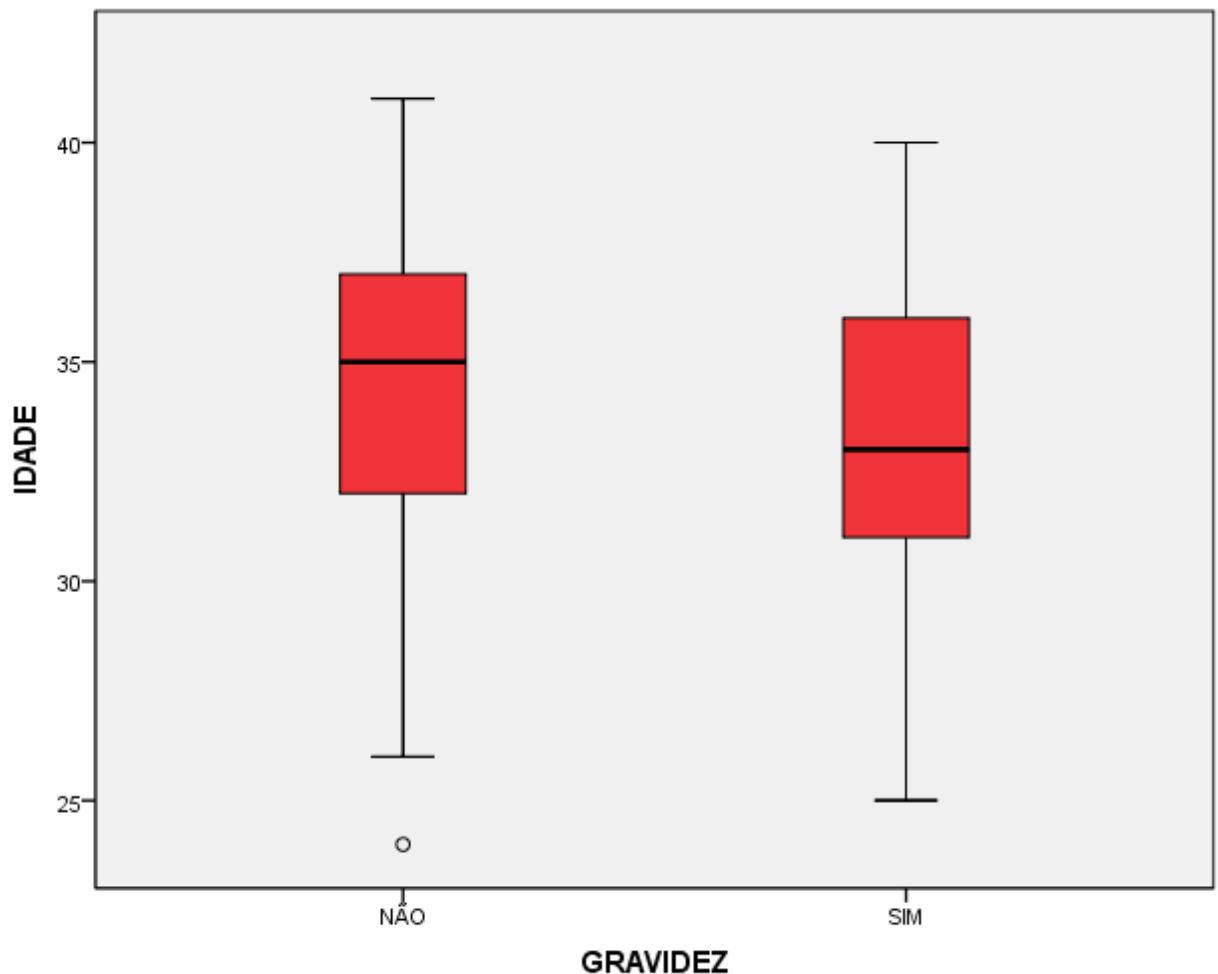
MASC – fator masculino; OTB – obstrução tubárea bilateral; ESCA – esterilidade sem causa aparente; HIV – sorodiscordância para o vírus HIV com parceiro portador; END – endometriose; STB – salpingotripsia bilateral; MISTA – mais de uma causa associada

### 3 VARIÁVEIS AVALIADAS NO ESTUDO

#### 3.1 Idade (anos)

A idade apresentou mediana de 35 entre as pacientes que não engravidaram e 33 entre as pacientes que engravidaram, não sendo essa diferença estatisticamente significativa (Fig. 3,  $p = 0,122$ ).

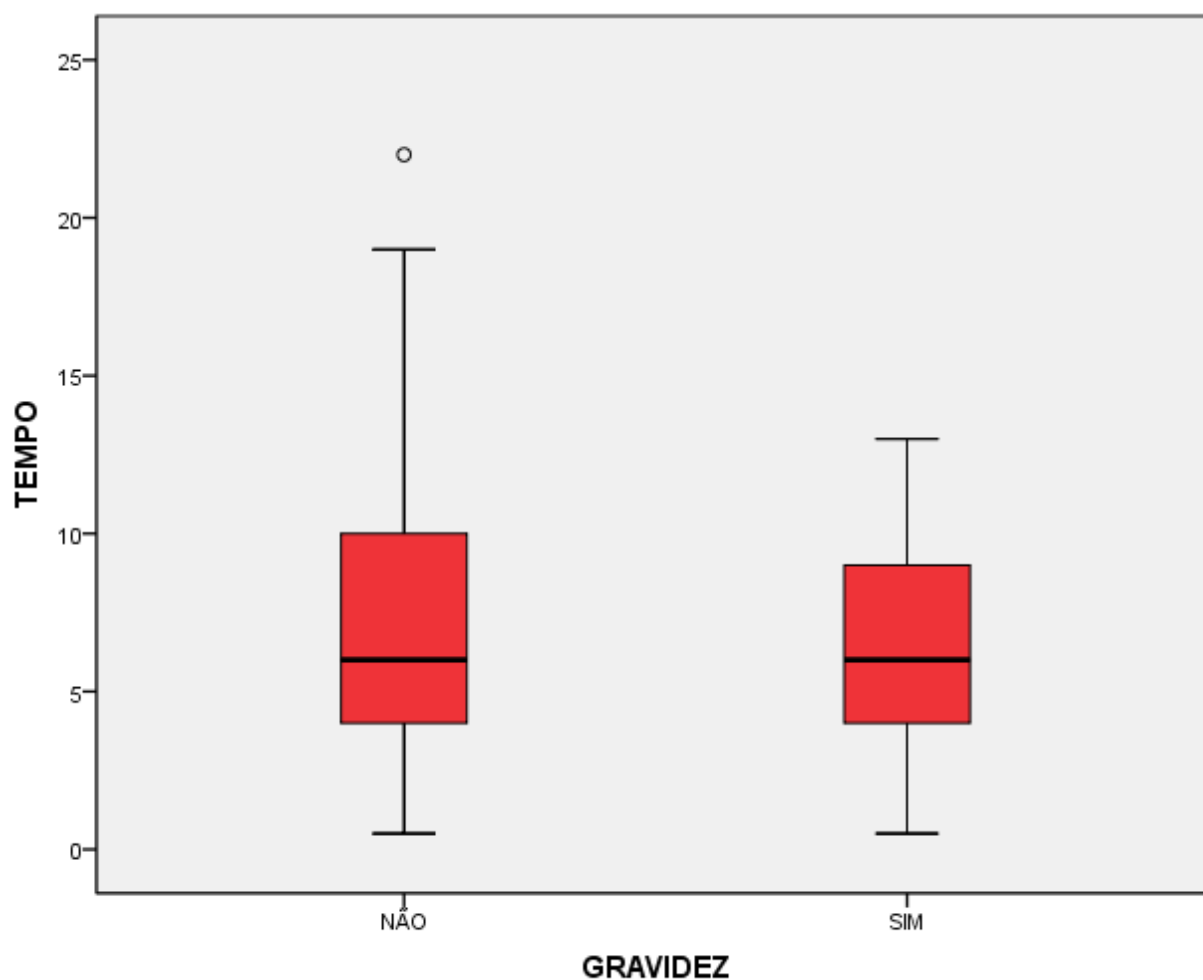
Dos 135 ciclos iniciados, 23 foram cancelados por resposta ovariana inadequada à indução. A mediana de idade das pacientes nesse subgrupo com ciclo cancelado foi de 37, enquanto no subgrupo de pacientes que seguiram o tratamento até a coleta ovariana, a mediana foi de 34. Essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p = 0,003$ ).



**Figura 3** – Distribuição da idade em anos nos dois grupos ( $p = 0,122$ )

### 3.2 Tempo de infertilidade (anos)

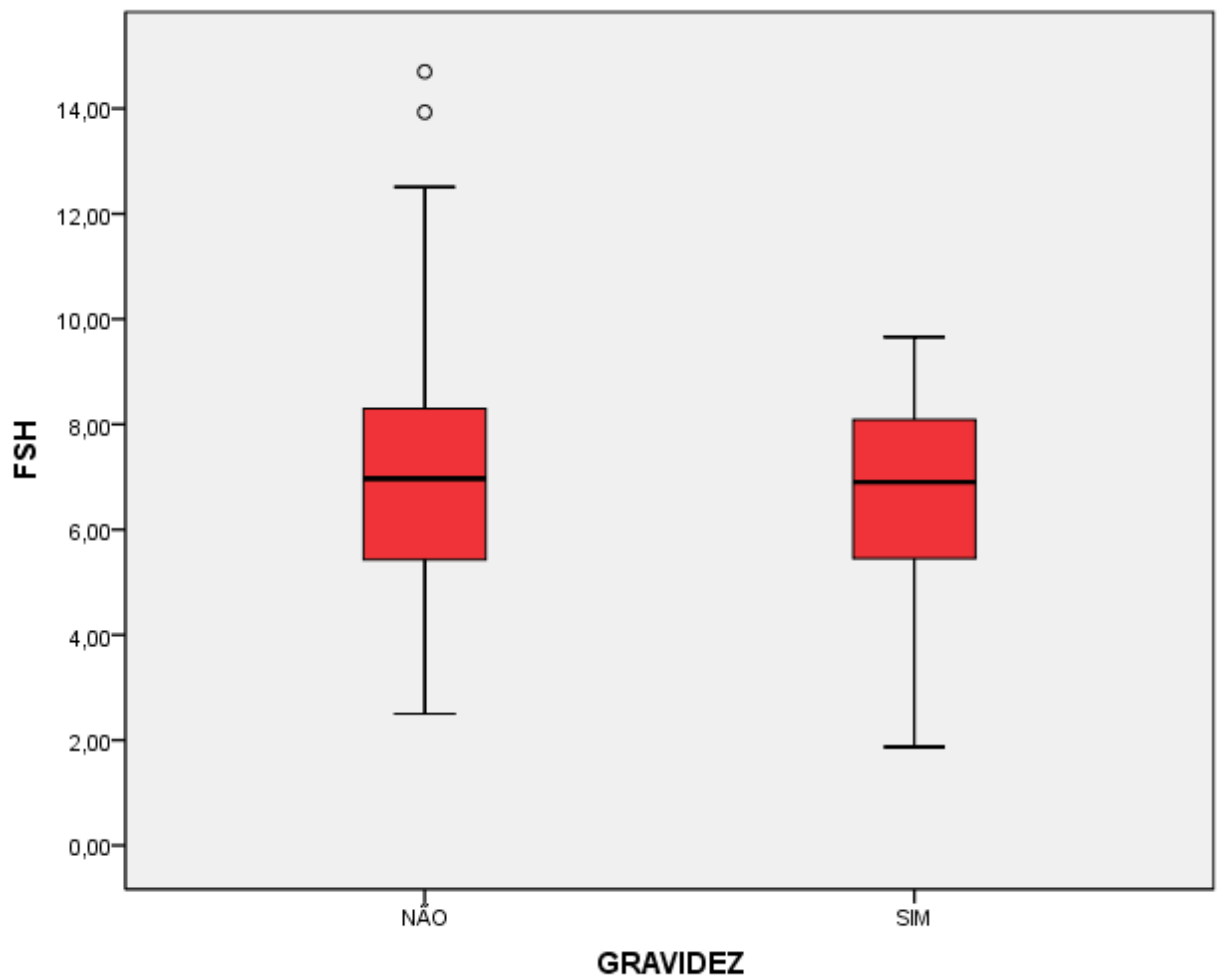
O tempo de infertilidade apresentou mediana de 6,0 entre as pacientes que não engravidaram e também 6,0 entre as pacientes que engravidaram, não sendo essa diferença estatisticamente significativa (Fig 4,  $p = 0,289$ ).



**Figura 4** – Distribuição do tempo de infertilidade em anos nos dois grupos  
( $p = 0,289$ )

### 3.3 FSH sérico dosado no terceiro dia do ciclo menstrual (mUI/ml)

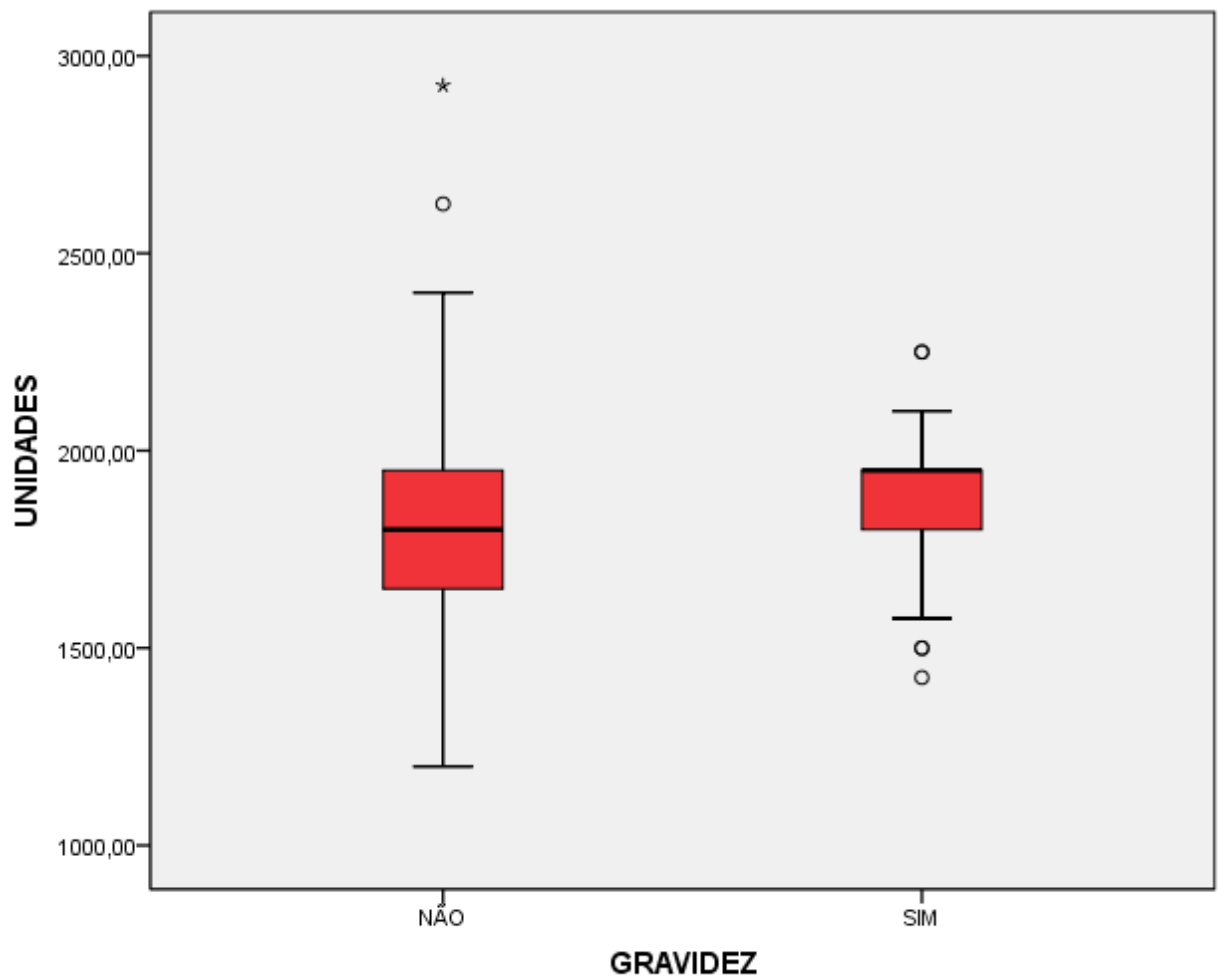
O FSH apresentou mediana de 6,97 entre as pacientes que não engravidaram e 6,90 entre as pacientes que engravidaram, não sendo essa diferença estatisticamente significativa (Fig. 5,  $p = 0,522$ ).



**Figura 5** – Distribuição do FSH sérico em mUI/ml nos dois grupos ( $p = 0,522$ )

### 3.4 Dose de gonadotrofinas utilizada (UI)

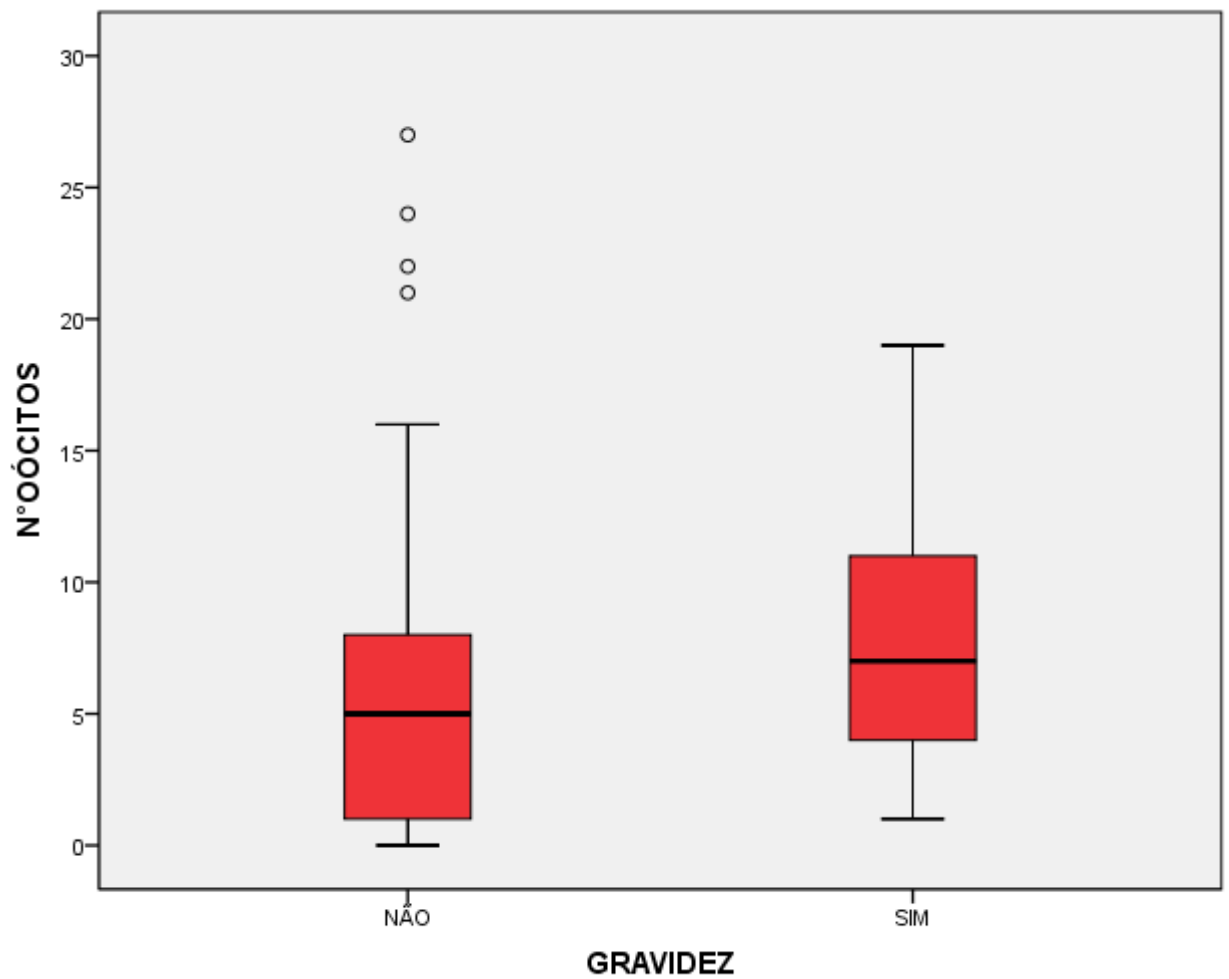
A dose de gonadotrofinas utilizada apresentou mediana de 1.800 entre as pacientes que não engravidaram e 1.950 entre as pacientes que engravidaram, não sendo essa diferença estatisticamente significativa (Fig. 6,  $p = 0,119$ ).



**Figura 6** – Distribuição da dose de gonadotrofinas utilizada em unidades internacionais nos dois grupos ( $p = 0,119$ )

### 3.5 Número de oócitos

O número de oócitos coletados apresentou mediana de 5,0 entre as pacientes que não engravidaram e 7,0 nas pacientes que engravidaram, sendo essa diferença estatisticamente significativa (Fig. 7,  $p = 0,013$ ).

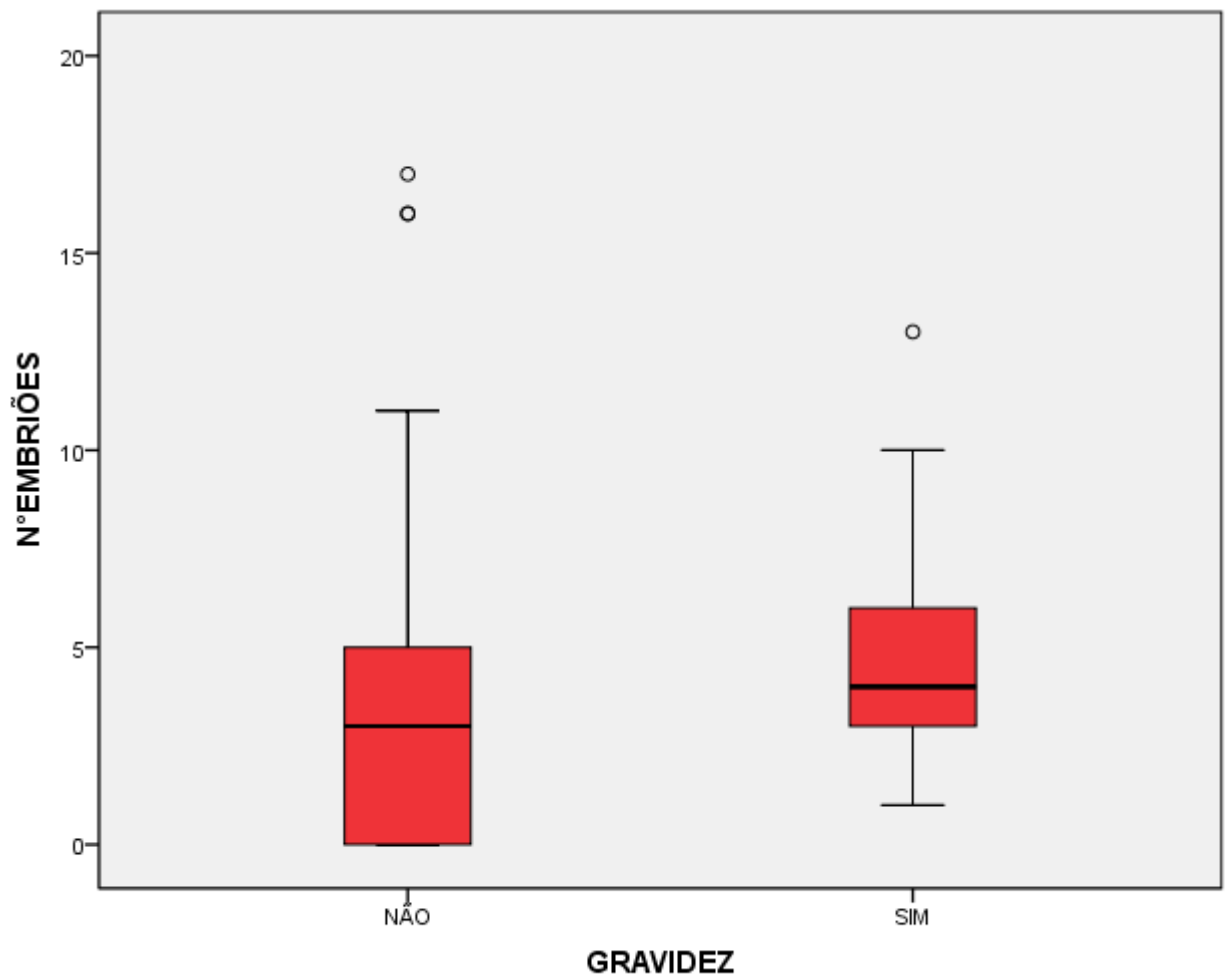


**Figura 7** – Número de oócitos coletados nos dois grupos ( $p = 0,013$ )

### 3.6 Número de embriões

O número de embriões obtidos apresentou mediana de 3,42 entre as pacientes que não engravidaram e 4,0 nas pacientes que engravidaram, sendo essa diferença estatisticamente significativa (Fig. 8,  $p = 0,013$ ).

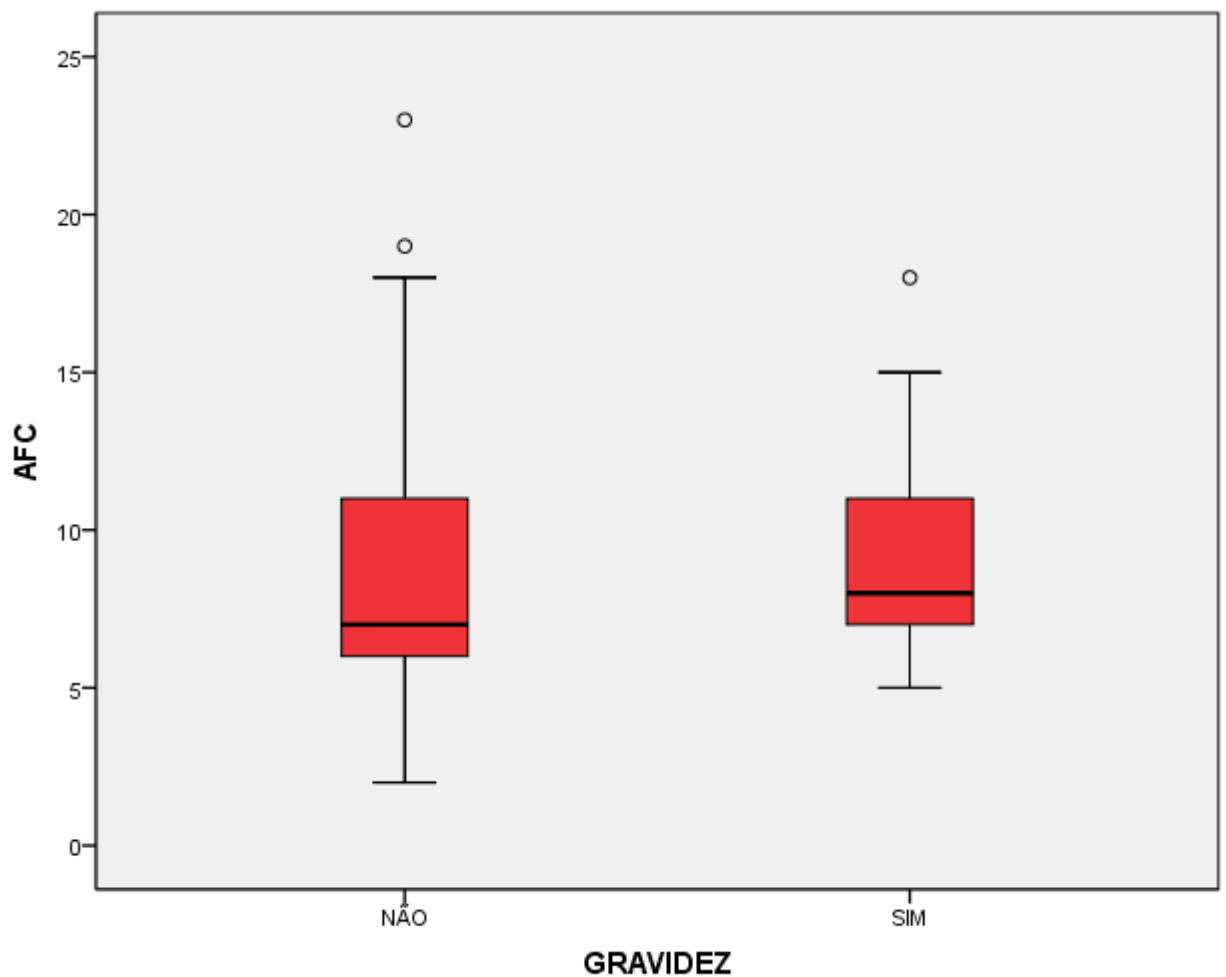
É importante ressaltar que não houve diferença entre o número de embriões transferidos em cada grupo, sendo a mediana de 3,0 entre as pacientes que não engravidaram e também 3,0 entre as pacientes que engravidaram ( $p = 0,488$ ).



**Figura 8** – Número de embriões obtidos nos dois grupos ( $p = 0,013$ )

### 3.7 Contagem de folículos antrais

A contagem de folículos antrais apresentou mediana de 7,0 entre as pacientes que não engravidaram e 8,0 nas pacientes que engravidaram, não sendo essa diferença estatisticamente significativa (Fig. 9,  $p = 0,350$ ). É importante ressaltar que essa diferença permanece não significativa mesmo quando excluídas as pacientes portadoras de ovários policísticos ( $p = 0,340$ ).

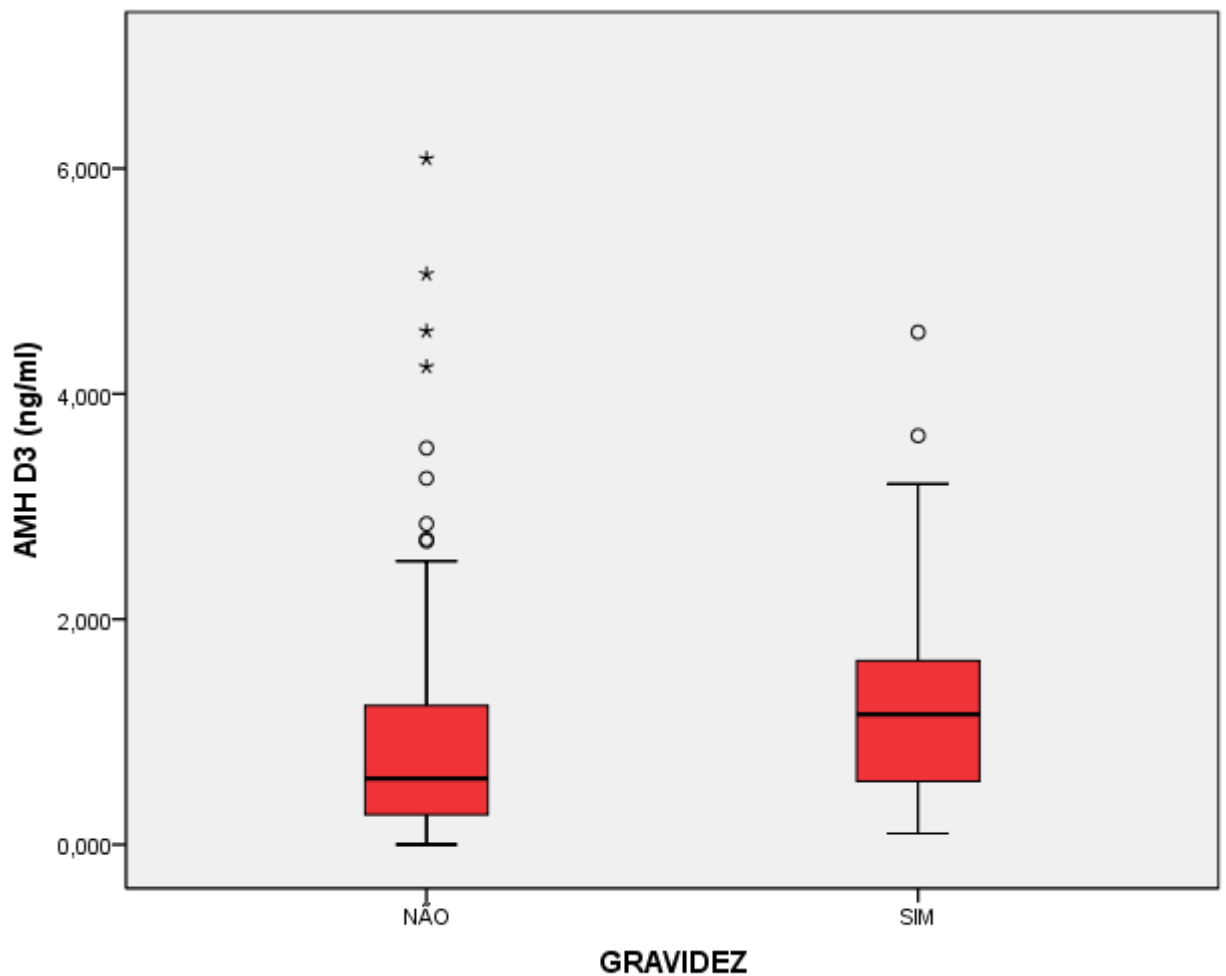


**Figura 9** – Contagem de folículos antrais nos dois grupos ( $p = 0,350$ )



### 3.8 Dosagem do AMH sérico no 3º dia do ciclo menstrual (ng/ml)

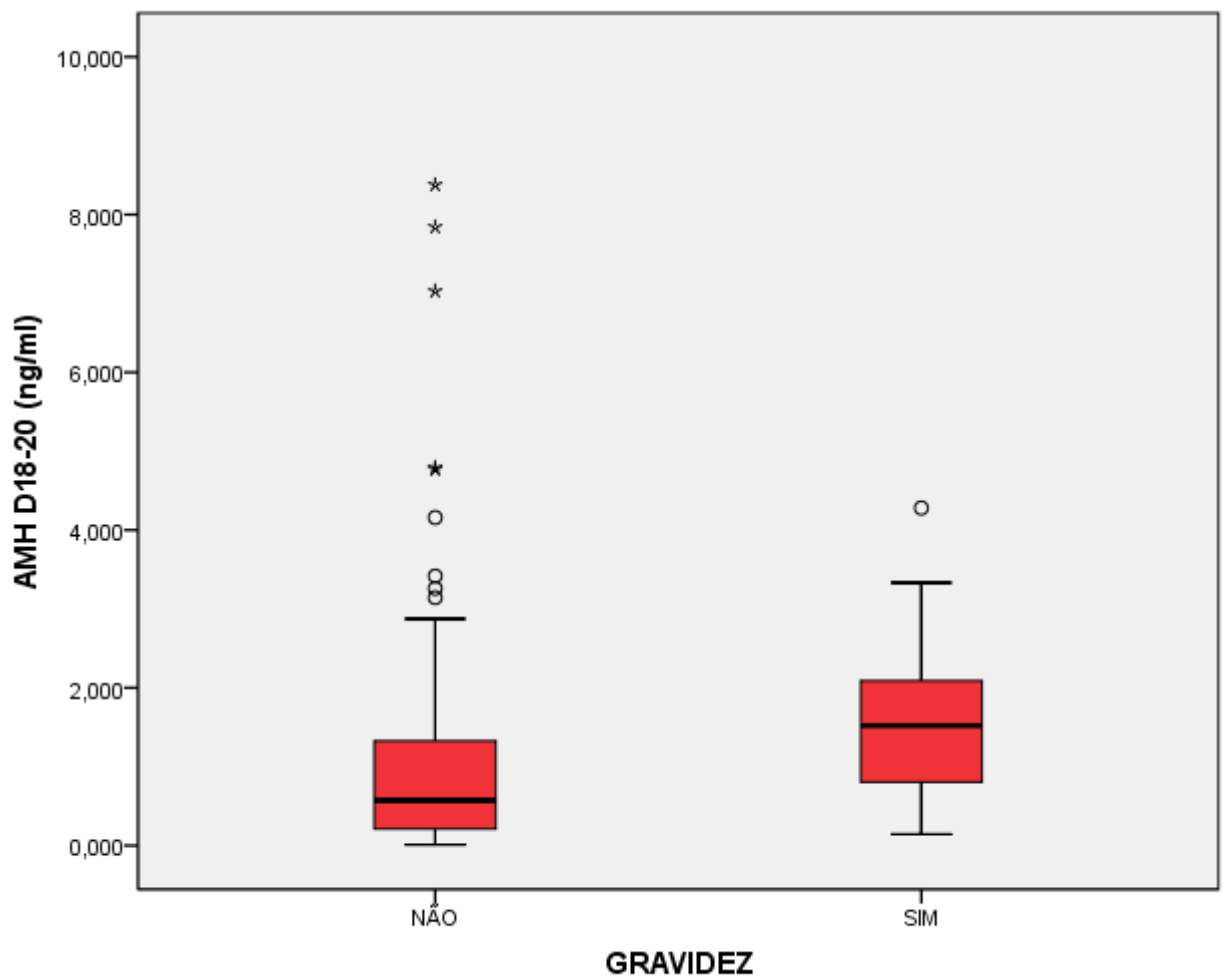
A dosagem de AMH no 3º dia do ciclo menstrual apresentou mediana de 0,59 entre as pacientes que não engravidaram e 1,16 entre as pacientes que engravidaram, sendo essa diferença estatisticamente significativa (Fig. 10,  $p = 0,006$ ).



**Figura 10** – Dosagem de AMH no 3º dia do ciclo nos dois grupos ( $p = 0,006$ )

### 3.9 Dosagem do AMH sérico entre o 18º e 20º dias do ciclo menstrual (ng/ml)

A dosagem de AMH entre o 18º e 20º dias do ciclo menstrual apresentou mediana de 0,57 entre as pacientes que não engravidaram e 1,52 entre as pacientes que engravidaram, sendo essa diferença estatisticamente significativa (Fig. 11,  $p = 0,001$ ).



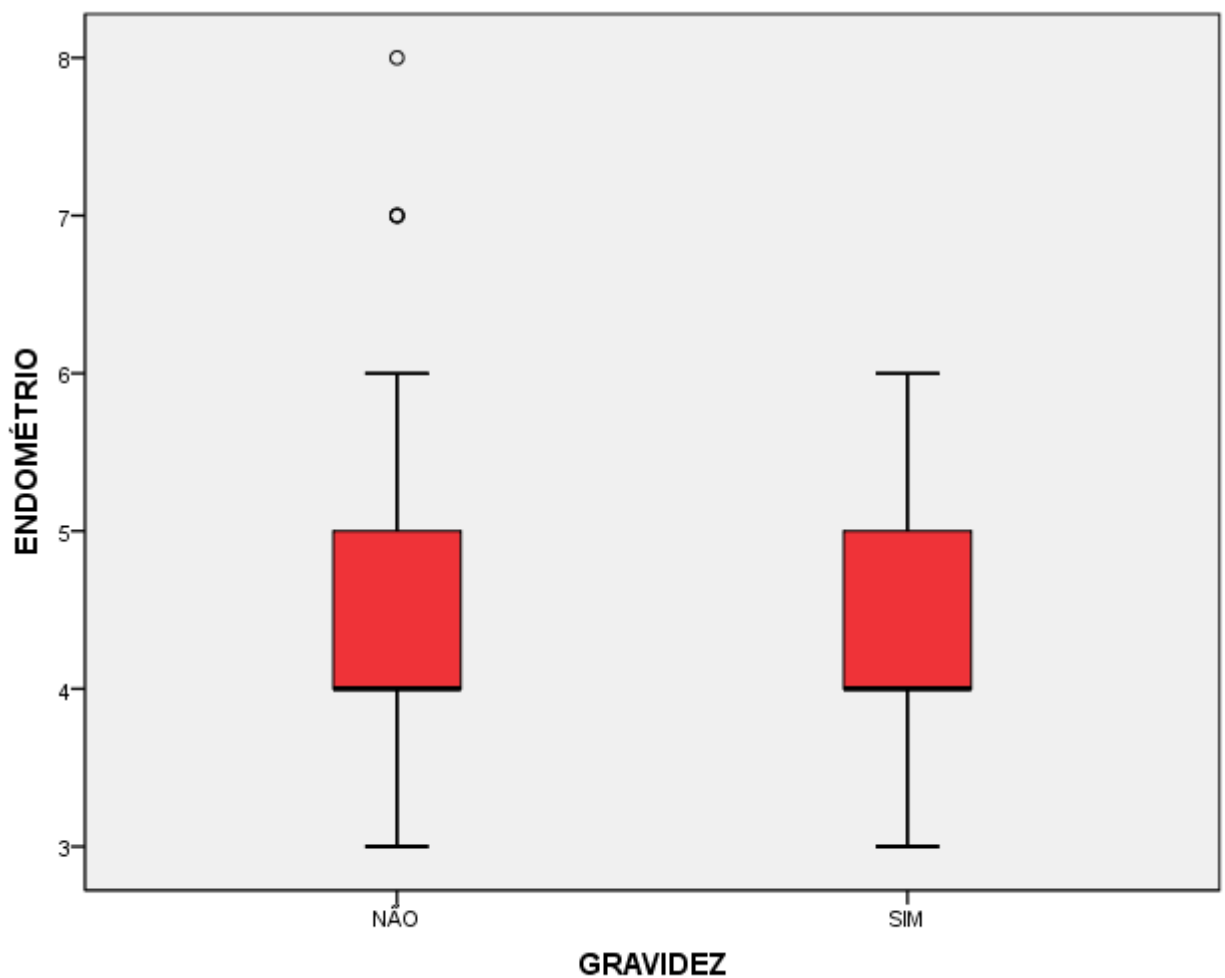
**Figura 11** – Dosagem de AMH entre 18º e 20º dias do ciclo nos dois grupos ( $p = 0,001$ )

## **4 VARIÁVEIS MEDIDAS NO ESTUDO RELACIONADAS COM O ENDOMÉTRIO**

Para correta avaliação das variáveis relacionadas ao endométrio, foram consideradas apenas aquelas pacientes que realizaram transferência de, pelo menos, 1 embrião. Foram excluídas aquelas que tiveram o ciclo de FIV suspenso por má resposta às gonadotrofinas, aquelas nas quais não foi obtido nenhum oócito após a coleta ovariana, como também aquelas nas quais nenhum oócito foi fertilizado. Excluindo-se essas pacientes, foram totalizadas 102 pacientes. Esse subgrupo foi dividido em 73 pacientes que não engravidaram e 29 pacientes que engravidaram.

#### 4.1 Espessura endometrial (mm)

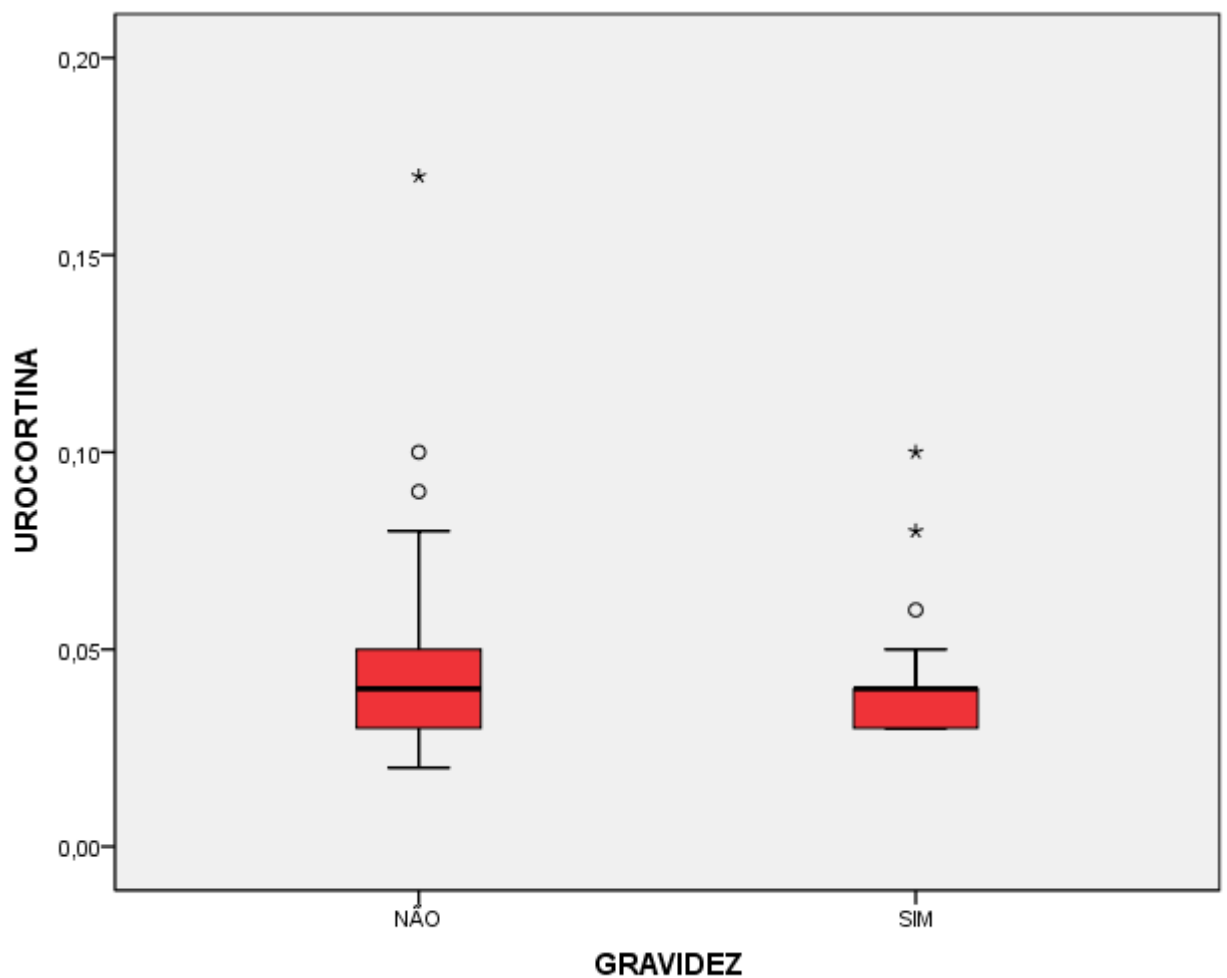
A espessura endometrial medida no 3º dia do ciclo menstrual apresentou mediana de 4,0mm entre as pacientes que não engravidaram e também 4,0mm nas pacientes que engravidaram, não sendo essa diferença estatisticamente significativa (Fig. 12,  $p = 0,498$ ).



**Figura 12** – Espessura endometrial nos dois grupos ( $p = 0,498$ )

#### 4.2 Dosagem de urocortina no lavado endometrial

A dosagem de urocortina no lavado endometrial apresentou mediana de 0,04ng/ml entre as pacientes que não engravidaram e também 0,04ng/ml nas pacientes que engravidaram, não sendo essa diferença estatisticamente significativa (Fig 13,  $p = 0,688$ ).



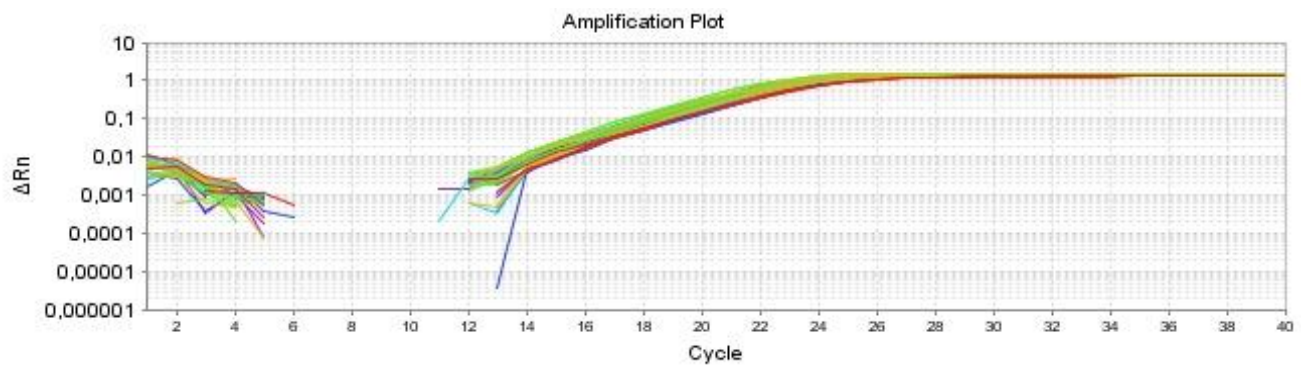
**Figura 13** – Dosagem de urocortina no lavado endometrial nos dois grupos

( $p = 0,688$ )

### 4.3 PCR em tempo real para UCN, CRH-R1 e CRH-R2

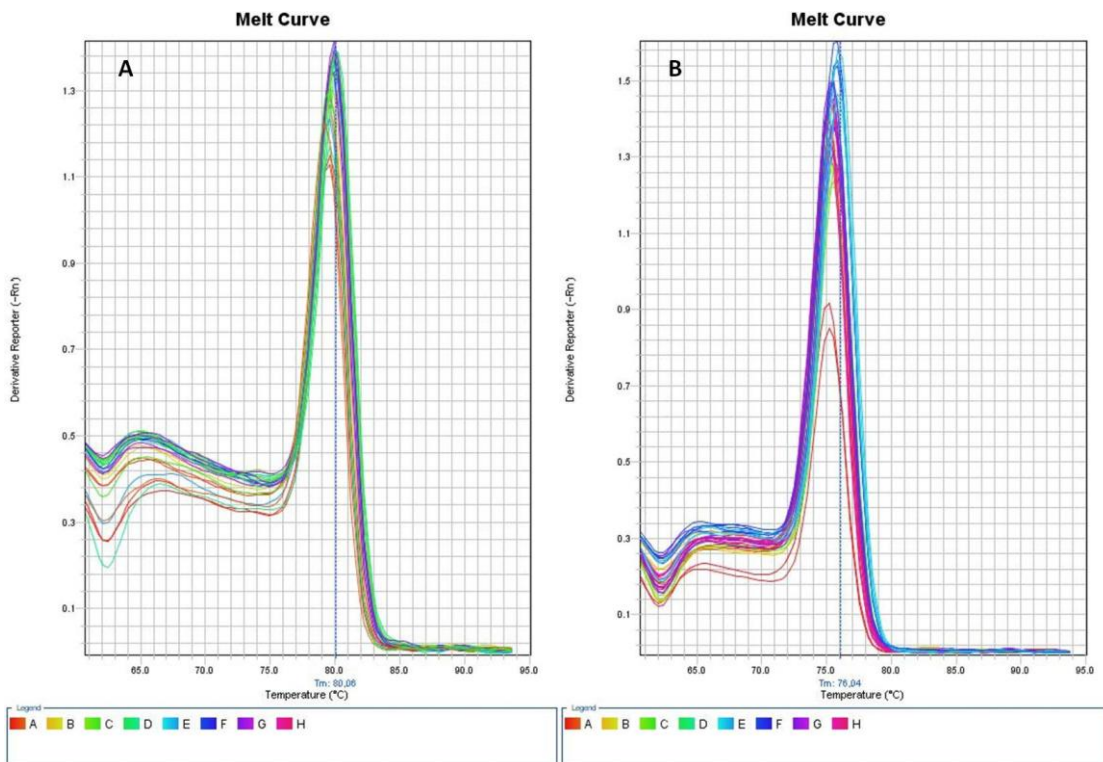
Foram utilizadas para realização da PCR em tempo real 29 amostras endometriais das pacientes grávidas e 34 amostras de pacientes não grávidas, pareadas por idade. Foram excluídas 5 amostras do grupo de pacientes grávidas e 3 amostras do grupo de pacientes não grávidas por não terem apresentado amplificação adequada do gene de referência S26. Para análise, foram então utilizadas 24 amostras de pacientes grávidas e 31 amostras de pacientes não grávidas.

Os resultados de PCR em tempo real demonstraram-se homogêneos para amplificação do gene de referência S26 (Fig.14).



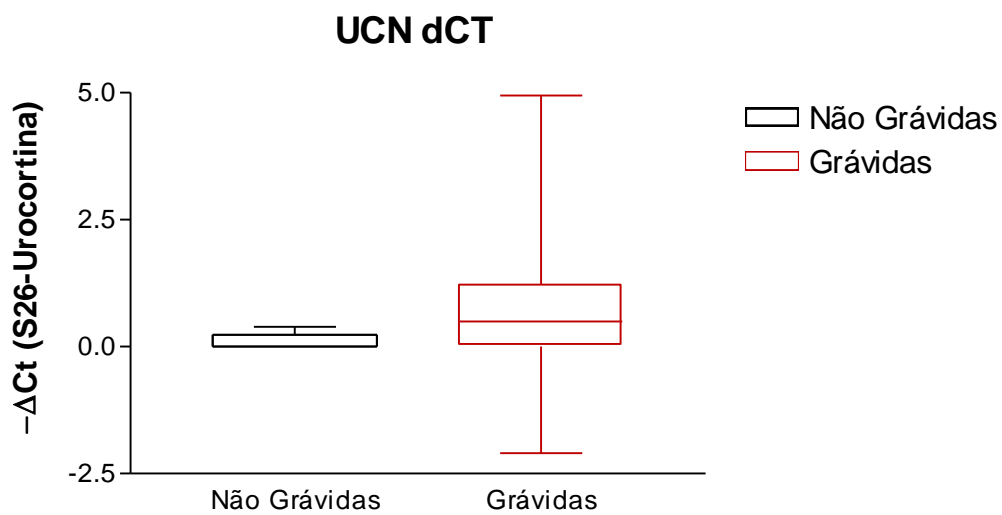
**Figura 14** - *Amplification plot*, demonstrando homogeneidade na amplificação do S26 (gene de referência)

As duplicatas das amostras foram concordantes e a curva de *Melting* apresentou pico único para cada gene-alvo, demonstrando a confiabilidade dos resultados (Fig.15)



**Figura 15** – Curvas de *Melting* com picos únicos, comprovando a especificidade dos fragmentos amplificados

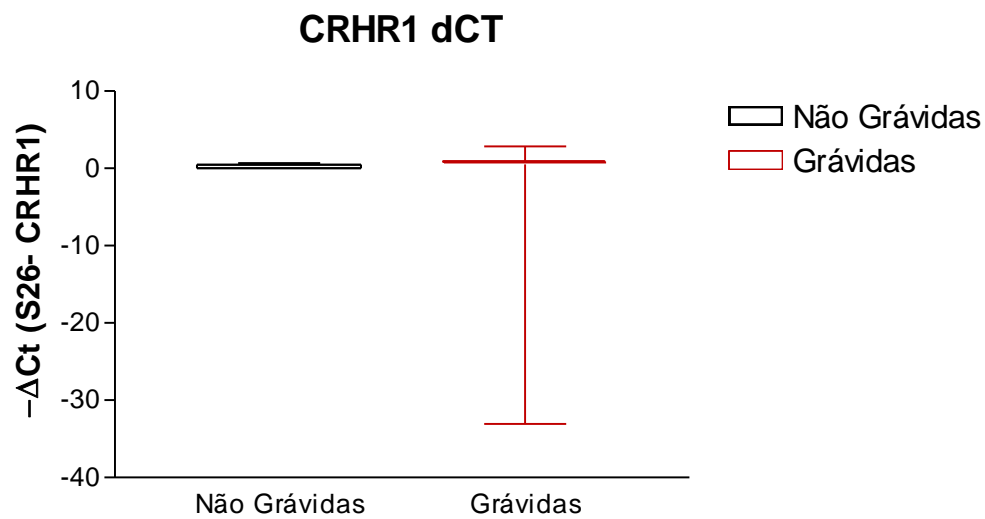
A expressão gênica de UCN foi significativamente maior nas pacientes grávidas quando comparadas com as pacientes não grávidas (Fig.16,  $p = 0,0466$ ). Os dados foram expressos como  $-\Delta\text{CT}$  (CT S26 - CT Urocortina). Analisando-se o *fold change* da UCN, observamos uma expressão relativa 20% maior nas pacientes grávidas.



**Figura 16** – Expressão gênica da Urocortina nos dois grupos ( $p= 0,0466$ )

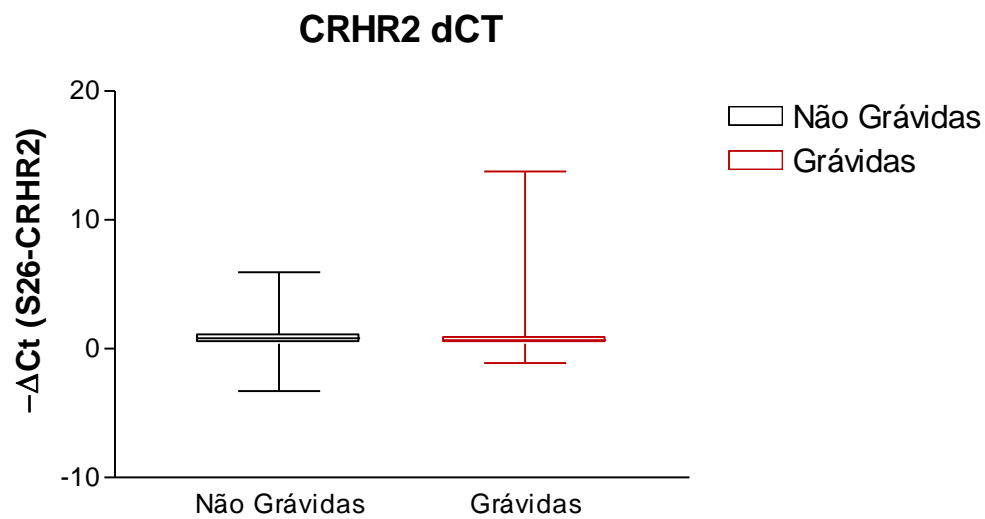


Não foi observada nenhuma alteração na expressão gênica de CRH-R1 nas pacientes grávidas quando comparadas com as pacientes não grávidas (Fig.17,  $p = 0,1892$ ). Os dados foram expressos como  $-\Delta\text{CT}$  (CT S26 - CT CRH-R1).



**Figura 17** – Expressão gênica do CRH-R1 nos dois grupos ( $p= 0,1892$ )

Não foi observada nenhuma alteração na expressão gênica de CRH-R2 nas pacientes grávidas quando comparadas com as pacientes não grávidas (Fig.18,  $p = 0,1923$ ). Os dados foram expressos como  $-\Delta\text{CT}$  (CT S26 - CT CRH-R2).



**Figura 18** – Expressão gênica do CRH-R2 nos dois grupos ( $p= 0,1923$ )

## **5 COMPARAÇÃO ENTRE AS DOSAGENS DE AMH NO 3º E ENTRE 18º E 20º DIAS DO CICLO MENSTRUAL**

As dosagens séricas do AMH mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, quando realizadas no 3º dia, como também quando realizadas entre o 18º e o 20º dias do ciclo menstrual. Para comparação das duas dosagens repetidas nas mesmas pacientes, foi aplicado o teste de Wilcoxon. Não foi demonstrada diferença estatística entre as duas dosagens ( $p = 0,143$ ), demonstrando sua equivalência e confirmando a estabilidade da dosagem do AMH durante o ciclo menstrual.

## 6 CORRELAÇÕES ENTRE AS DIVERSAS VARIÁVEIS ANALISADAS

Como as variáveis analisadas apresentaram distribuição não paramétrica, para avaliar as possíveis correlações entre elas, foi aplicado o teste de Spearman para correlação linear. A Tabela 2 demonstra essas correlações.

**Tabela 2** - Correlações entre as diversas variáveis analisadas

	Idade	Tempo	FSH	AFC	End	Gon	Ooc	Emb	Amhd3	Amhd18	Uro
Idade	-	,236**	,129	-,354**	,134	,002	-,301**	-,232**	-,252**	-,204*	,176*
Tempo	,236**	-	,045	-,161	,140	-,004	-,211*	-,194*	-,159	-,178*	,058
FSH	,129	,045	-	-,199*	-,088	-,030	-,297**	-,232**	-,260**	-,246**	,104
AFC	-,354**	-,161	-,199*	-	-,010	,004	,441**	,464**	,562**	,501**	-,179*
End	,134	,140	-0,88	-0,10	-	-,054	-,048	-,043	,002	-,010	,051
Gon	,002	-,004	-,030	,004	-,054	-	,170*	,151	,179*	,204*	-,150
Ooc	-,301**	-,211*	-,297**	,441**	-,048	,170*	-	,862**	,667**	,656**	-,058
Emb	-,232**	-,194*	-,232**	,464**	,002	,151	,862**	-	,591**	,569**	-,131
Amhd3	-,252**	-,159	-,260**	,562**	,002	,179*	,667**	,591**	-	,873**	-,053
Amhd18	-,204*	-,178*	-,246**	,501**	-,010	,204*	,656**	,569**	,873**	-	-,013
Uro	,176*	,058	,104	-,179*	,051	-,150	-,058	-,131	-,053	-,013	-

End – espessura endometrial; Gon – Gonadotrofinas em unidades internacionais, Ooc – número de óocitos; Emb – número de embriões; Uro – urocortina

\*\*Correlação é significativa no nível 0,01

\*Correlação é significativa no nível 0,05

A idade, analisada de uma forma geral, não foi determinante da ocorrência ou não de gravidez. Observamos, no entanto, que a idade apresentou correlações negativas com variáveis importantes como AFC, número de oócitos, número de embriões, dosagem do AMH no 3º e entre 18º e 20º dias do ciclo. Apresentou ainda correlação positiva com o tempo de infertilidade e dosagem de urocortina no lavado endometrial.

A dosagem sérica de FSH basal, classicamente utilizada como marcador da reserva ovariana e conseqüentemente como fator preditor em tratamentos de infertilidade, apresentou correlação negativa com o número de oócitos, número de embriões, dosagens de AMH no 3º e entre 18º e 20º dias do ciclo e AFC.

A contagem de folículos antrais apresentou correlação positiva com o número de oócitos, número de embriões, dosagens de AMH no 3º e entre 18º e 20º dias do ciclo. Apresentou correlação negativa com a idade, FSH e dosagem de urocortina no lavado endometrial.

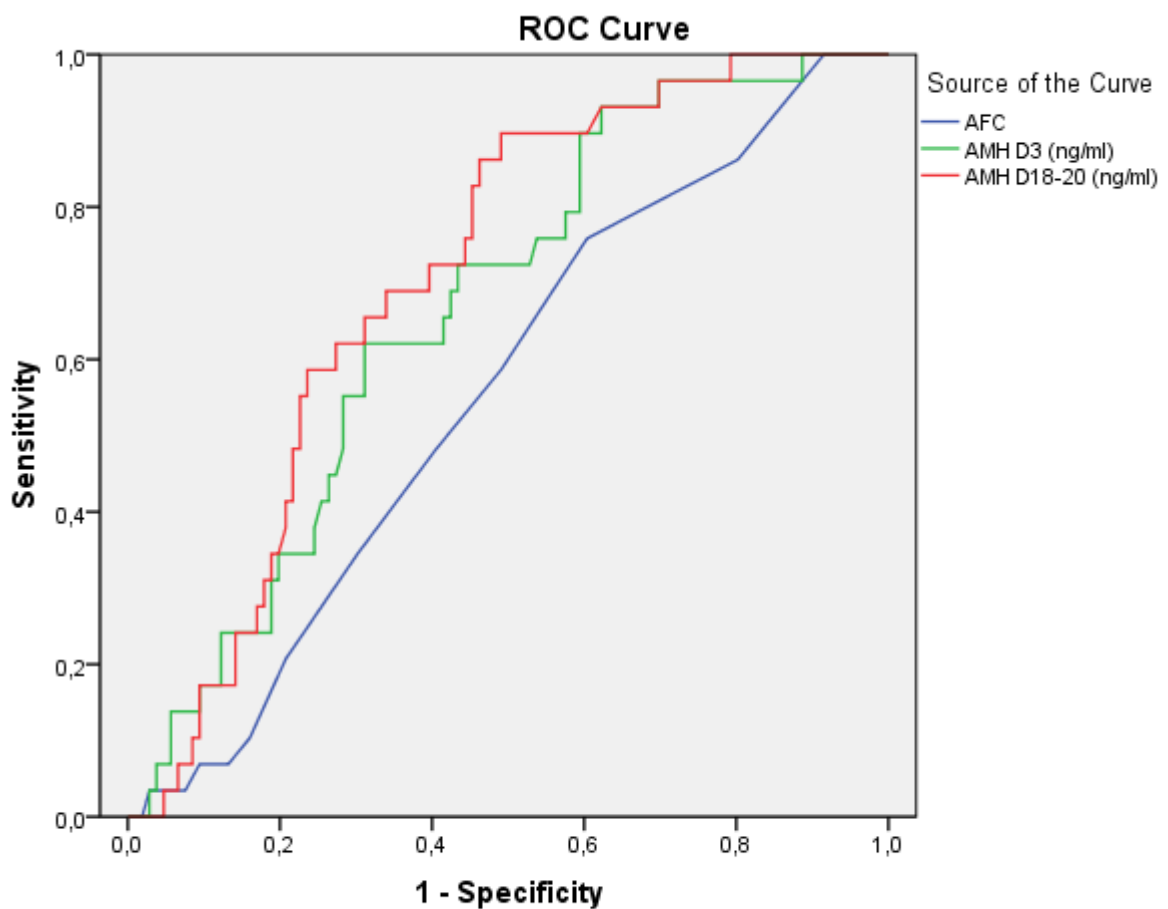
A dosagem de AMH do 3º dia do ciclo apresentou correlação positiva com AFC, número de oócitos, número de embriões, dosagem do AMH entre 18º e 20º dias do ciclo. Apresentou correlação negativa com a idade e FSH.

A dosagem de AMH entre 18º e 20º dias do ciclo apresentou correlação positiva com AFC, número de oócitos, número de embriões e dosagem de AMH do 3º dia. Apresentou correlação negativa com FSH, idade e tempo de infertilidade.

A dosagem de urocortina no lavado endometrial apresentou correlação positiva com a idade e correlação negativa com AFC.

## 7 PREDIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE GRAVIDEZ

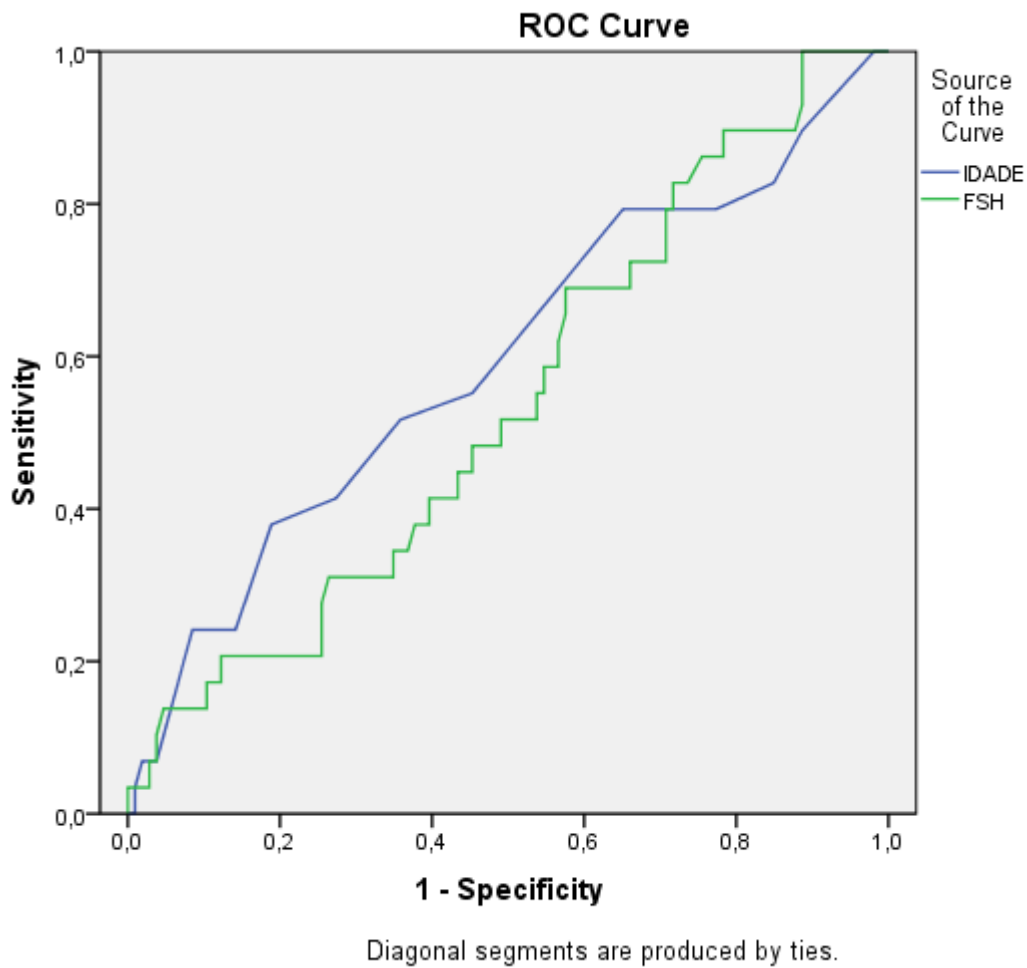
Analisando-se as diversas variáveis estudadas como possíveis preditores da ocorrência ou não de gravidez, foi construída a curva ROC, inicialmente incluindo todas as 135 pacientes (Fig.19 e Fig.20)



Diagonal segments are produced by ties.

**Figura 19** – Curva ROC incluindo AFC, AMH D3 e AMH D18-20

Áreas sob a curva: AFC – 0,556 (IC 95% 0,447-0,666); AMH D3 – 0,660 (IC 95% 0,565 – 0,766); AMH D18-20 – 0,708 (IC 95% 0,615 – 0,801)

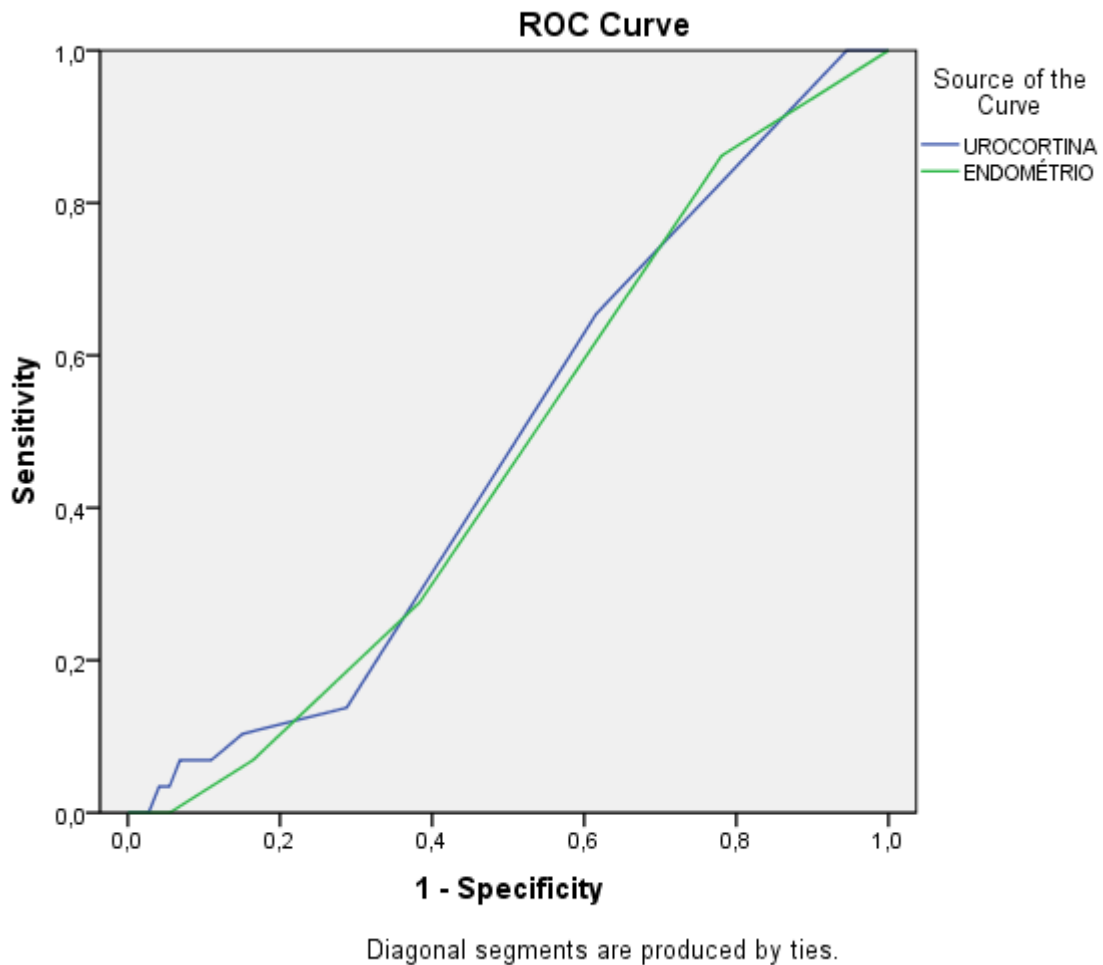


**Figura 20** – Curva ROC incluindo idade e FSH

Áreas sob a curva: idade – 0,594 (IC 95% 0,470 - 0,717); FSH – 0,539 (IC 95% 0,424 – 0,654)

Analisando essas curvas ROC, observamos que o AMH colhido entre o 18<sup>o</sup> e o 20<sup>o</sup> dias do ciclo menstrual apresentou a melhor área sob a curva (0,708). A dosagem de AMH de 1,15 ng/ml foi determinada como melhor ponto de corte, com especificidade de 70% e sensibilidade de 62,1% para determinação da ocorrência de gravidez.

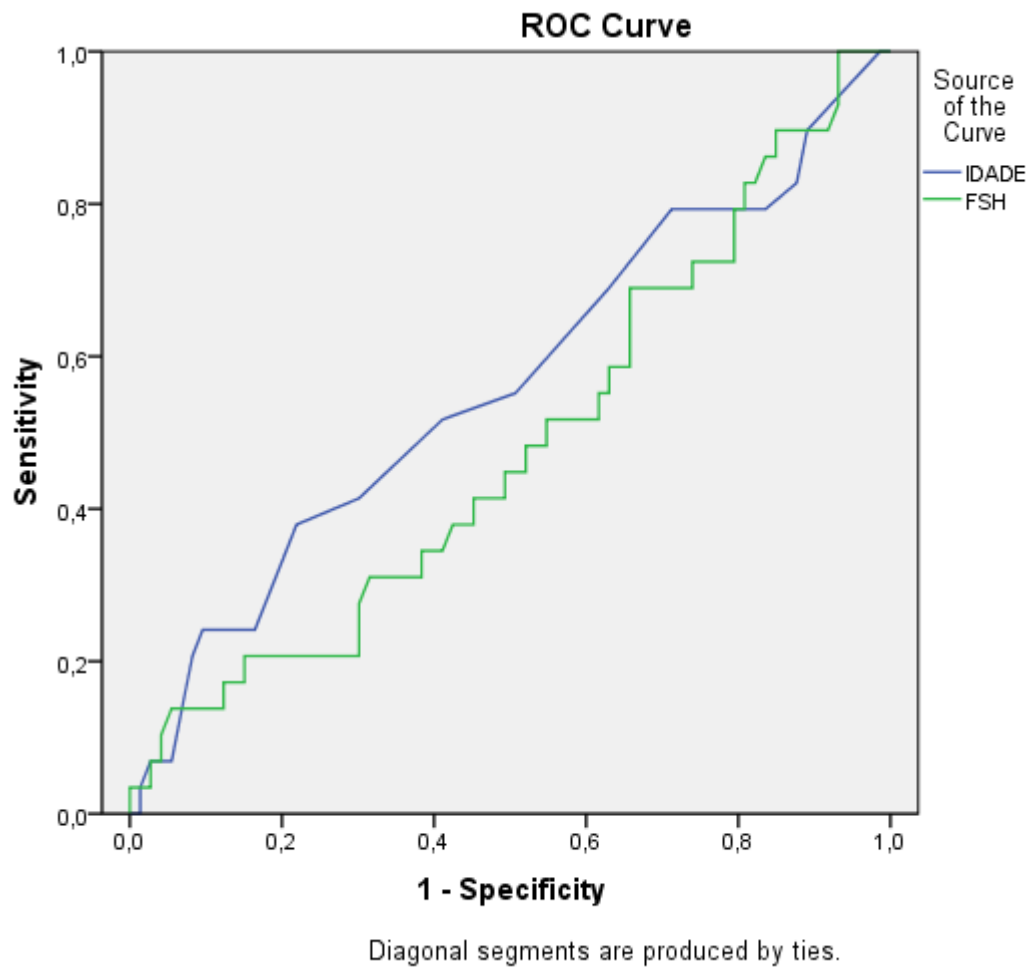
Para melhor análise do impacto dos fatores endometriais foram construídas outras curvas ROC, incluindo apenas aquelas 102 pacientes que realizaram transferência embrionária (Fig.21 e Fig.22).



**Figura 21** – Curva ROC incluindo urocortina e espessura endometrial

Áreas sob a curva: urocortina – 0,482 (IC 95% 0,365 - 0,599); endométrio – 0,472 (IC 95% 0,356 – 0,588)





**Figura 22** – Curva ROC incluindo idade e FSH

Áreas sob a curva: idade – 0,563 (IC 95% 0,433 - 0,692); FSH – 0,485 (IC 95% 0,359 – 0,611)

## 8 IMPACTO DA ENDOMETRIOSE

Das 135 pacientes alocadas no estudo, 15 apresentavam o diagnóstico de endometriose, representando uma prevalência da doença de 11%. Dessas 15 pacientes, apenas uma engravidou, gerando uma taxa de gravidez de apenas 6% nesse subgrupo. É também importante ressaltar que as pacientes com endometriose apresentaram uma alta taxa de cancelamento do ciclo de FIV por resposta inadequada a gonadotrofinas, chegando a 46,6% do total de ciclos iniciados.

Realizando-se uma nova análise das diversas variáveis, excluindo-se essas pacientes com endometriose, permanecem estatisticamente significativas as dosagens séricas de AMH no 3º e entre 18º e 20º dias do ciclo menstrual. O valor prognóstico da idade apresenta importante melhora, aproximando-se muito da significância estatística. Também ficam próximos à significância o número de oócitos e número de embriões. As demais variáveis, incluindo AFC, tempo de infertilidade, FSH, dose de gonadotrofinas e urocortina permanecem sem diferença entre os grupos de pacientes grávidas e não grávidas (Tabela 3).

**Tabela 3** – Análise das diversas variáveis entre os dois grupos, excluindo-se as pacientes com endometriose (teste de Mann-Whitney)

	<b>P</b>
<b>AFC</b>	0,727
<b>Idade</b>	0,058
<b>Tempo de infertilidade</b>	0,300
<b>FSH</b>	0,756
<b>Gonadotrofinas</b>	0,139
<b>Número de oócitos</b>	0,051
<b>Número de embriões</b>	0,052
<b>AMH D3</b>	0,037
<b>AMH D18</b>	0,008
<b>Urocortina</b>	0,276

## **5 . DISCUSSÃO**

O advento das terapias de reprodução assistida trouxe a possibilidade de gravidez para muitos casais que não a alcançariam naturalmente. Os tratamentos têm se modernizado, mas ainda se caracterizam por serem de alta complexidade, custo elevado, chance de sucesso relativamente baixa e grande desgaste para os pacientes. Isso se torna ainda mais evidente quando lidamos com pacientes de menor poder aquisitivo, que contam com o sistema público de saúde para a realização de seu tratamento, como as pacientes alocadas em nosso estudo. Além de todas as dificuldades já citadas previamente, os casais ainda enfrentam filas de espera para a realização da tão sonhada tentativa de engravidar. Possibilitar que um casal tenha a chance de ter seu filho é uma grande responsabilidade e um enorme privilégio para o ginecologista que se especializa em infertilidade. Buscar progressos nas terapias de reprodução assistida é fundamental para o médico que trabalha nessa área. Esses progressos incluem a busca de exames mais acurados, que permitam melhor planejamento do tratamento e um aconselhamento e orientação mais adequadas para o casal. Nosso estudo segue esse objetivo.

Obtivemos um total de 135 pacientes, divididas em dois grupos: (1) 106 que não engravidaram e (2) 29 que engravidaram. Em ambos os grupos houve uma predominância de infertilidade conjugal primária. Isso é compatível com o fato do estudo envolver pacientes com indicação de fertilização *in vitro*, sendo que a maioria delas apresentava fatores que as impediram de engravidar espontaneamente.

Os grupos apresentaram também similaridade em relação às causas de infertilidade, com predominância de fator masculino e obstrução tubárea bilateral. Ambos os grupos apresentaram também uma parcela importante de casais com

mais de uma causa de infertilidade associada, sendo essa parcela mais relevante ainda no grupo de pacientes que não engravidaram. A associação de mais de um fator de infertilidade piora o prognóstico do casal, o que é compatível com a presença de um maior número de casais com essa característica no grupo que não obteve gravidez. Observamos uma prevalência muito significativa de fator masculino na indicação das FIVs de nosso laboratório. Números da *American Society for Reproductive Medicine (ASRM)* de 2010 de indicações de FIV mostram a seguinte distribuição: 17% fator masculino, 15% reserva ovariana diminuída, 13% esterilidade sem causa aparente, 7% fator tubáreo, 7% fator ovulatório, 4% endometriose, 1% fator uterino, 7% outros fatores e 29% mais de um fator associado. A predominância de fator masculino como principal indicação de FIV ocorreu, como em nosso estudo, mas em menor proporção em relação às outras causas. Isso pode ser atribuído, em parte, à realização, no LRH, de inseminação intra-uterina em pacientes com fator ovulatório, esterilidade sem causa aparente ou outros fatores, diminuindo o número desse tipo de paciente na FIV. De forma similar ao nosso estudo, a ASRM registra parcela importante de casais com mais de uma causa de infertilidade associada. Em relação especificamente à endometriose observamos, em nosso estudo, uma prevalência mais significativa, em torno de 11% das pacientes.

A idade é, sabidamente, o principal determinante da reserva ovariana de uma paciente e, conseqüentemente, o principal fator prognóstico caso essa paciente precise se submeter a um tratamento de reprodução assistida. Em nosso estudo, as 135 pacientes alocadas apresentaram uma idade variando de 24 a 41 anos. As pacientes mais jovens apresentaram maior contagem de folículos antrais e maiores dosagens de AMH. Quando submetida à coleta ovariana, a paciente com idade

inferior apresentou maior número de oócitos e embriões. Uma idade mais elevada representou maior risco de cancelamento do ciclo de FIV por resposta ovariana inadequada à indução. Além desses achados, era também de se esperar que as pacientes que engravidaram tivessem uma média de idade inferior. No entanto, isso não pôde ser observado em nosso estudo, não tendo sido encontrada diferença significativa entre a idade das pacientes que engravidaram e as que não engravidaram. Um motivo para que essa diferença não tenha sido encontrada é o número de pacientes envolvidas no estudo. O cálculo amostral do estudo foi baseado na taxa de gravidez, estimada em torno de 25% (93), sendo que o total de pacientes provavelmente não foi suficiente para demonstrar o impacto da idade nas chances de ocorrência ou não de gravidez. Devemos também ressaltar que, quando analisamos a chance de gravidez em tratamentos de FIV, muitos outros fatores além da idade da mulher estarão envolvidos na ocorrência ou não de gravidez, como a causa e o tempo de infertilidade e a receptividade endometrial, que pode ser influenciada por fatores coexistentes como o diagnóstico de endometriose. Isso se torna mais evidente quando fazemos uma segunda análise dos dados excluindo-se as pacientes portadoras de endometriose. Apesar da redução do número total de pacientes para 120, o impacto da idade se torna mais importante na determinação da ocorrência ou não de gravidez, ficando muito próximo da significância estatística.

Em relação ao tempo de infertilidade, sabe-se que seu aumento é um fator de pior prognóstico para o casal, mas, como fator isolado, não será determinante da ocorrência ou não de gravidez após o tratamento de reprodução assistida. Sua relevância se relaciona, provavelmente, com o aumento associado da idade materna. Em nosso estudo, os grupos de pacientes que não engravidaram e

engravidaram apresentaram a mesma mediana de tempo de infertilidade, que foi de 6 anos. Observamos que é um tempo alto, ainda mais se considerarmos que, após um ano de tentativa de engravidar sem sucesso, o casal já tem indicação de ser submetido à propedêutica e tratamento adequados. Mesmo que esse casal tenha possibilidade de realização de tratamentos de menor complexidade, como orientação de coito e inseminação intra-uterina, esses tratamentos poderiam ter sido realizados em um período de aproximadamente 1 ano, considerando a realização preconizada de até seis ciclos de cada. Além da demora em procurar tratamento médico, que pode acontecer com muitos casais, o principal fator que impacta nesse elevado tempo de infertilidade de nosso estudo é o fato das pacientes terem sido alocadas em um laboratório que atende exclusivamente pelo sistema público de saúde. Sendo um tratamento de alta complexidade, de realização muito restrita em nível público, mesmo se considerarmos em âmbito nacional, a demanda de pacientes torna-se muito maior que a oferta de tratamentos. Geram-se filas de espera, que, infelizmente, podem vir a piorar o prognóstico de alguns casais, principalmente devido ao aumento da idade materna. De forma análoga à idade, o tempo de infertilidade também não apresentou diferença significativa entre as pacientes que engravidaram ou não, podendo isso se dever aos mesmos fatores descritos para a idade, associando-se o fato do tempo de infertilidade ter sido elevado nos dois grupos, diminuindo o seu impacto no resultado final.

Analisando-se especificamente a reserva ovariana da paciente que será submetida a um tratamento de reprodução assistida, a dosagem de FSH no 3º dia do ciclo menstrual é ainda o exame mais difundido e utilizado na prática clínica. No entanto, diversos estudos já demonstraram sua baixa acurácia como preditor de



reserva ovariana e novos marcadores são indispensáveis para melhor avaliação da provável resposta de uma paciente a uma indução de ovulação. Em nosso estudo, a dosagem sérica de FSH no 3º dia do ciclo menstrual variou de 1,87 a 14,7 mUI/ml. Houve uma correlação negativa entre o FSH e o número de oócitos e embriões obtidos. No entanto, não houve diferença significativa do FSH entre as pacientes que não engravidaram e aquelas que engravidaram. O FSH realmente apresenta valor muito limitado em termos da predição da reserva ovariana de determinada paciente que será submetida a um tratamento de reprodução assistida. Continua sendo utilizado como um parâmetro de função ovariana devido à sua facilidade de realização, grande disponibilidade, mesmo no sistema público de saúde, e baixo custo quando comparado a outros exames endócrinos disponíveis. Apresenta como inconveniente a necessidade de ser realizado no 3º dia do ciclo menstrual. Oferece maior acurácia apenas quando seus níveis já estão muito elevados. Pode ser utilizado como um parâmetro de ajuste de dose de medicações indutoras da ovulação, principalmente quando já apresenta valores alterados, mas apresenta valor muito limitado para inferir possibilidade de ocorrência ou não de gravidez. Essas limitações indicam a necessidade de busca por outro teste de reserva ovariana que possa substituir o FSH.

A dose de gonadotrofinas utilizada para indução da ovulação não apresentou diferença significativa entre as pacientes que não engravidaram e aquelas que engravidaram. Esse achado é compatível com o esperado, pois utilizar maior dose de gonadotrofinas não aumenta a chance de uma paciente engravidar em um ciclo de FIV. A hiperestimulação ovariana controlada (HOC) exige uma dose supra-fisiológica de gonadotrofinas, mas um aumento exagerado dessa dose não

melhora o prognóstico da paciente e aumenta o risco de resposta inadequadamente alta e desenvolvimento de síndrome de hiperestímulo ovariano (OHS). Todas as pacientes alocadas utilizaram protocolo longo de indução ovariana, com início de gonadotrofinas em uma mesma dose, com ajustes posteriores analisados individualmente, chegando a uma dose final diferente para cada paciente. O desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida tem levado a uma tendência de transferir um menor número de embriões, reduzindo a chance de gemelaridade e os riscos a ela relacionados. Essa tendência é acompanhada pela utilização de menor dose de gonadotrofinas, diminuindo os riscos do tratamento, sem afetar a chance de sucesso. A não interferência da dose de gonadotrofinas na ocorrência ou não de gravidez fortalece essa tendência.

O número de oócitos obtidos foi significativamente maior nas pacientes que engravidaram quando comparado às que não engravidaram. Houve uma correlação negativa entre o número de oócitos e a idade da paciente, tempo de infertilidade e dosagem de FSH. Esses achados são compatíveis com o esperado, pois a idade é o principal fator prognóstico em terapia de reprodução assistida. A paciente mais velha tem maior possibilidade de responder pior à indução da ovulação e, conseqüentemente, apresentar um menor número de oócitos coletados. O impacto do tempo de infertilidade no número de oócitos reflete, da mesma forma, um aumento na idade da paciente. O mesmo vale para o FSH, sendo que a paciente mais velha tem tendência de apresentar FSH mais elevado, o qual irá se correlacionar negativamente com o número de oócitos, apesar de não poder prever a ocorrência ou não de gestação. O número de oócitos se correlacionou ainda, de forma positiva, com a AFC e AMH. Esses achados são também

compatíveis com o esperado. Diversos estudos já demonstraram que quanto maior a AFC e os níveis de AMH, melhor costuma ser a resposta da paciente à indução da ovulação, refletindo em um maior número de oócitos após a coleta ovariana.

O número de embriões foi significativamente maior nas pacientes que engravidaram quando comparado às que não engravidaram. O número de embriões apresenta correlação com o número de oócitos. Portanto, as mesmas correlações encontradas para os oócitos serão válidas para os embriões. Houve uma correlação negativa do número de embriões com a idade, tempo de infertilidade e dosagem de FSH. As pacientes com idade mais elevada, geralmente associada a um maior tempo de infertilidade e níveis mais altos de FSH, apresentam menor número de oócitos, e, conseqüentemente, menor número de embriões. O advento da ICSI tornou essa relação ainda mais evidente. Mesmo em casos de fator masculino grave, a ICSI permite melhor taxa de fertilização, tornando muito próximo o número de oócitos maduros e embriões. Houve uma correlação positiva do número de embriões com AFC e AMH, que também pode estar associada com o maior número de oócitos. É importante ressaltar que o número de embriões transferidos não apresentou diferença significativa entre as pacientes que engravidaram e as que não engravidaram. Na época em que o estudo foi realizado, foram transferidos de 1 a 4 embriões por transferência. A mediana de embriões transferidos foi de 3, tanto nas pacientes que engravidaram, quanto nas que não engravidaram. Observamos que a ocorrência ou não de gravidez não pode ser determinada simplificada pelo número de embriões transferidos. A presença de gestação provavelmente se relaciona muito mais com a qualidade desses embriões, associada a outros fatores, com destaque para a receptividade endometrial.

A contagem de folículos antrais não apresentou diferença significativa entre as pacientes que engravidaram ou não engravidaram. Isoladamente, AFC não pode ser usado como fator preditor da ocorrência ou não de gestação. Quando analisamos a AFC, é importante uma subanálise excluindo as pacientes portadoras de ovários policísticos, pois elas apresentam maior AFC, sem haver uma correspondente melhora no prognóstico da resposta ovariana à indução da ovulação. Mesmo excluindo-se essas pacientes, AFC não foi significativamente diferente entre os dois grupos. Em nosso estudo, AFC apresentou como ponto positivo uma correlação com o número de oócitos e embriões. Apresenta ainda correlação positiva com as dosagens de AMH e negativa com idade e FSH. Apesar de não ter sido determinante da ocorrência ou não de gestação, maior AFC pode ser considerado bom preditor da resposta ovariana à indução da ovulação.

As dosagens de AMH do 3º e entre 18º e 20º dias do ciclo menstrual demonstraram diferença estatisticamente significativa entre as pacientes que engravidaram e não engravidaram. AMH isoladamente pode ser considerado bom preditor da reserva ovariana e, mais do que isso, da ocorrência ou não de gravidez em tratamentos de FIV. AMH mais elevado se associa a maior número de oócitos e embriões. Apresenta correlação positiva com AFC. Por outro lado, menor AMH é apresentado por aquelas pacientes com idade mais avançada e FSH mais elevado e se associa a menor número de oócitos e embriões. Em termos de capacidade de predição da ocorrência ou não de gestação, AMH foi superior ao FSH, podendo ser cotado como substituto desse na prática clínica. Apresenta, como uma grande vantagem, sua estabilidade durante o ciclo menstrual, já descrita em outros estudos

e comprovada, em nosso estudo, pela ausência de diferença entre suas dosagens no 3º e entre 18º e 20º dias do ciclo menstrual de uma mesma paciente. Isso permite sua dosagem em qualquer dia do ciclo menstrual, com maior comodidade para paciente e médico, sendo, também sob esse aspecto, superior ao FSH dosado no 3º dia do ciclo. Estudos prévios descrevem também sua estabilidade entre diferentes ciclos menstruais, fazendo do AMH, mesmo quando dosado em um ciclo menstrual prévio, um melhor preditor da resposta ovariana no ciclo de tratamento de FIV. O AMH, atualmente, ainda apresenta como desvantagem seu custo elevado e baixa disponibilidade de laboratórios que o executam rotineiramente. No entanto, essa realidade pode se modificar com o passar dos anos, tornando a dosagem de AMH um exame mais acessível e, conseqüentemente, de uso mais difundido na prática clínica.

Em relação à receptividade endometrial, ainda não há, até o momento, nenhum exame com acurácia suficiente para ser de uso difundido na prática clínica. A implantação embrionária apresenta um mecanismo extremamente complexo e a receptividade do endométrio ao embrião envolve a interação de diversos fatores, sendo que nenhum fator isolado será capaz de definir a ocorrência ou não de gravidez. A busca por marcadores endometriais não é simplesmente o achado de alguma proteína específica, mas sim o estudo de vários marcadores que possam estar envolvidos na receptividade endometrial, almejando, a longo prazo, tentar traçar um painel de proteínas mais relevantes para a ocorrência ou não da implantação. Para uma correta análise dos fatores endometriais, foram consideradas, em nosso estudo, apenas aquelas pacientes que realizaram transferência de, pelo menos, 1 embrião, com o total de 102 pacientes.

A avaliação da espessura endometrial não apresentou diferença significativa entre as pacientes que engravidaram e as que não engravidaram, com mediana de 4,0 mm nos dois grupos. No entanto, é fundamental ressaltar que essa medida de espessura endometrial foi realizada no mesmo USTV da contagem de folículos antrais, ou seja, no 3º dia do ciclo menstrual. O endométrio medido em fase folicular precoce não reflete a resposta endometrial ao estímulo estrogênico conseqüente à indução da ovulação e, portanto, não pode ser considerado como bom parâmetro de receptividade endometrial. A avaliação endometrial após estímulo ovariano, analisando-se não só a espessura, como também o aspecto endometrial (proliferativo, trilaminar, secretor), poderia ser mais representativa da receptividade endometrial, mas esse tipo de análise foge aos objetivos de nosso estudo.

A dosagem de urocortina no lavado endometrial não apresentou diferença significativa entre as pacientes que não engravidaram e as que engravidaram, com mediana de 0,04 ng/ml nos dois grupos. Em nosso estudo, a concentração de UCN no lavado endometrial das pacientes que realizaram transferência variou de 0,02 a 0,86 ng/ml. De uma forma geral, observamos uma concentração baixa de UCN. No estudo de Florio, que avaliou a UCN no lavado endometrial de pacientes submetidas à IIU, as concentrações foram em média de 0,39 ng/ml nas pacientes que engravidaram e 0,13 ng/ml nas pacientes que não engravidaram, concentrações bem superiores às encontradas na maioria de nossas pacientes (90). Nesse estudo, o lavado foi realizado no próprio ciclo de IIU e com menor volume (2,0 ml) de soro fisiológico. As dosagens foram realizadas pelo mesmo kit de ELISA utilizado por nós. Em nosso estudo, não seria recomendável a realização do lavado endometrial no próprio ciclo de tratamento, pois as pacientes foram submetidas a ciclos de FIV com

protocolo longo, com início do análogo do GnRH no ciclo anterior ao tratamento, tendo sido o lavado endometrial e a biópsia endometrial realizados antes do início de qualquer medicação. Em relação ao volume de água utilizada em nosso estudo, que foi de 4,0 ml, foi tentada a utilização de um volume menor, mas não conseguimos obter um lavado adequado com o tipo de sonda uretral disponível, optando-se, então pela utilização dos 4,0 ml. Em se tratando da cavidade uterina, permanece sendo um volume reduzido. Para preencher a cavidade, por exemplo, para a realização de uma histerossonografia, são necessários 10 a 20 ml de soro fisiológico. De uma forma geral, pode ser que o lavado endometrial por nós realizado tenha ocasionado uma maior diluição da UCN. Tentando minimizar esse efeito, ainda mais por se tratar de um peptídeo pequeno, foi realizada a extração do peptídeo antes do ELISA, mas ainda assim as concentrações permaneceram baixas. Talvez a realização da dosagem por um método mais sensível como radioimunoensaio pudesse ter obtido resultados mais significativos.

Já quando analisamos a expressão gênica da UCN no endométrio pela PCR em tempo real, observamos uma expressão significativamente maior nas pacientes grávidas, sendo a expressão relativa 20% maior nessas pacientes. Esses achados nos indicam a probabilidade da UCN ser uma das possíveis proteínas envolvidas na implantação embrionária, sendo que sua maior expressão pode ser favorável à ocorrência de gestação. Com certeza, vários outros marcadores estão envolvidos nesse processo e deverão ser ainda estudados. Não foi possível em nosso estudo, confirmar essa relevância da UCN pela dosagem direta do peptídeo no lavado endometrial, mas a dosagem por método mais sensível do que o por nós realizado talvez possa confirmar uma maior concentração nas pacientes que obtêm a gravidez. Em nosso estudo, também não foi observada nenhuma alteração na

expressão gênica dos receptores CRH-R1 e CRH-R2 nas pacientes grávidas quando comparadas com as não grávidas. Outros estudos serão necessários para confirmar a relevância de uma maior concentração de UCN favorecendo uma maior chance de implantação embrionária, e, por conseguinte, maior ocorrência de gestação e, mais do que isso, esses estudos serão necessários para buscar vários outros marcadores que possam preencher um painel que determinará a receptividade endometrial.

Para melhor análise das diversas variáveis como preditores da ocorrência ou não de gestação, foram construídas as curvas ROC, inicialmente com todas as pacientes e, posteriormente com aquelas que realizaram transferência embrionária. Na análise de todas as pacientes em conjunto, idade, FSH, AFC e AMH do 3º dia do ciclo não forneceram uma boa área sob a curva. A dosagem de AMH entre 18º e 20º dias do ciclo forneceu a melhor área sob a curva (0,708). A concentração de 1,15 ng/ml foi determinada como ponto de corte, com especificidade de 70% e sensibilidade de 62,1% para determinação da ocorrência de gestação. Analisando-se apenas as pacientes que realizaram transferência embrionária, idade, FSH, espessura endometrial e urocortina não forneceram uma boa área sob a curva, não sendo possível determinar um ponto de corte dessas variáveis que possa ser utilizado como preditor da ocorrência ou não de gestação.



## **6 . CONCLUSÕES**

1 – A contagem de folículos antrais é bom preditor do número de oócitos e de embriões obtidos em tratamentos de FIV. Não é bom preditor da ocorrência de gestação, não podendo ser estabelecido um valor de corte para ser utilizado como exame de rastreamento pré-tratamento.

2 – A dosagem de hormônio anti-mülleriano é bom preditor da ocorrência de gestação em tratamentos de FIV, apresentando-se significativamente maior nas pacientes que engravidam. As concentrações de AMH são estáveis durante o ciclo menstrual, podendo o exame ser colhido em qualquer dia do ciclo. Valores acima de 1,15 ng/ml determinam maior chance de gravidez com especificidade de 70% e sensibilidade de 62,1%.

3 – A expressão gênica relativa de urocortina no endométrio é 20% maior em pacientes que obtêm gravidez após tratamentos de FIV. Sua dosagem por ELISA no lavado endometrial não apresenta sensibilidade suficiente para ser utilizado como marcador da receptividade endometrial em tratamentos de FIV.

# **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1 - Speroff, L, Fritz MA. Clinical gynecology endocrinology and infertility. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins, 2005:325-327.
- 2 - Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of anti-Mullerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:4064-9.
- 3 - Gruijters MJ, Visser JA, Durlinger AL, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2003;211:85-90.
- 4 - Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction.* 2006;131(1):1-9.
- 5 - Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil Steril* 2011;95:170-5.
- 6 - Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005;45:20-4.
- 7 - van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Fauser BJ, Themmen AP, te Velde ER. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril* 2005;83:979-87.
- 8 - Broer SL, Eijkemans MJ, Scheffer GJ, van Rooij IA, de Vet A, Themmen AP, Laven JS, de Jong FH, Te Velde ER, Fauser BC, Broekmans FJ. Anti-mullerian hormone predicts menopause: a long-term follow-up study in normoovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2532-9.
- 9 - Barad DH, Weghofer A, Gleicher N. Utility of age-specific serum anti-Müllerian hormone concentrations. *Reprod Biomed Online* 2011;22:284-91.
- 10 - Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006;12:685-718
- 11 - van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, Themmen AP. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002;17:3065-71.
- 12 - Fréour T, Mirallié S, Colombel A, Bach-Ngohou K, Masson D, Barrière P. Anti-mullerian hormone: clinical relevance in assisted reproductive therapy. *Ann Endocrinol* 2006;67:567-74.
- 13 - Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Serum antimullerian hormone/mullerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome thanfollicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril* 2004;82:1323-9.

- 14 - Ficicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2006; 85:592-6.
- 15 - Smeenk JM, Sweep FC, Zielhuis GA, Kremer JA, Thomas CM, Braat DD. Antimüllerian hormone predicts ovarian responsiveness, but not embryo quality or pregnancy, after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2007;87:223-6.
- 16 - Riggs RM, Duran EH, Baker MW, Kimble TD, Hobeika E, Yin L, Matos-Bodden L, Leader B, Stadtmauer L. Assessment of ovarian reserve with anti-Müllerian hormone: a comparison of the predictive value of anti-Müllerian hormone, follicle-stimulating hormone, inhibin B, and age. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:202.1-8.
- 17 - Kunt C, Ozaksit G, Keskin Kurt R, Cakir Gungor AN, Kanat-Pektas M, Kilic S, Dede A. Anti-Müllerian hormone is a better marker than inhibin B, follicle stimulating hormone, estradiol or antral follicle count in predicting the outcome of in vitro fertilization. *Arch Gynecol Obstet* 2011;283:1415-21.
- 18 - Riggs R, Kimble T, Oehninger S, Bocca S, Zhao Y, Leader B, Stadtmauer L. Anti-Müllerian hormone serum levels predict response to controlled ovarian hyperstimulation but not embryo quality or pregnancy outcome in oocyte donation. *Fertil Steril* 2011;95:410-2.
- 19 - Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod* 2008;23:1359-65.
- 20 - Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M. Inhibin B and anti-Müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG*. 2004;111:1248-53.
- 21 - Nakhuda GS, Sauer MV, Wang JG, Ferin M, Lobo RA. Müllerian inhibiting substance is an accurate marker of ovarian response in women of advanced reproductive age undergoing IVF. *Reprod Biomed Online* 2007;14:450-4.
- 22 - Penarrubia J, Fabregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, Carmona F, Vanrell JA, Balasch J. Basal and stimulation day 5 anti-Müllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. *Hum Reprod* 2005;20:915-22.
- 23 - McIlveen M, Skull JD, Ledger WL. Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Hum Reprod*. 2007;22:778-85.
- 24 - Lee TH, Liu CH, Huang CC, Hsieh KC, Lin PM, Lee MS. Impact of female age and male infertility on ovarian reserve markers to predict outcome of assisted reproduction technology cycles. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:100.

- 25 - Fridén B, Sjöblom P, Menezes J. Using anti-Müllerian hormone to identify a good prognosis group in women of advanced reproductive age. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2011;51:411-5.
- 26 - Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Anti-Müllerian hormone (AMH) defines, independent of age, low versus good live-birth chances in women with severely diminished ovarian reserve. *Fertil Steril* 2010;94:2824-7.
- 27 - Tolikas A, Tsakos E, Gerou S, Prapas Y, Loufopoulos A. Anti-Mullerian Hormone (AMH) levels in serum and follicular fluid as predictors of ovarian response in stimulated (IVF and ICSI) cycles. *Hum Fertil* 2011;14:246-53.
- 28 - de Carvalho BR, Rosa-e-Silva AC, Rosa-e-Silva JC, dos Reis RM, Ferriani RA, de Sá MF. Anti-müllerian hormone is the best predictor of poor response in ICSI cycles of patients with endometriosis. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2011;38:119-22.
- 29 - La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artenisio AC, Stabile G, Volpe A. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 2010;16:113-30.
- 30 - Broer SL, Dólleman M, Opmeer BC, Fauser BC, Mol BW, Broekmans FJ. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011;17:46-54.
- 31 - Yates AP, Rustamov O, Roberts SA, Lim HY, Pemberton PW, Smith A, Nardo LG. Anti-Mullerian hormone-tailored stimulation protocols improve outcomes whilst reducing adverse effects and costs of IVF. *Hum Reprod* 2011;26:2353-62.
- 32 - Massin N, Méduri G, Bachelot A, Misrahi M, Kuttenn F, Touraine P. Evaluation of different markers of the ovarian reserve in patients presenting with premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol* 2008;282:95-100.
- 33 - Kallio S, Aittomäki K, Piltonen T, Veijola R, Liakka A, Vaskivuo TE, Dunkel L, Tapanainen JS. Anti-Mullerian hormone as a predictor of follicular reserve in ovarian insufficiency: special emphasis on FSH-resistant ovaries. *Hum Reprod* 2012 Jan
- 34 - Lekamge DN, Barry M, Kolo M, Lane M, Gilchrist RB, Tremellen KP. Anti-Müllerian hormone as a predictor of IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2007;14:602-10.
- 35 - Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, Keefe DL, Blazar AS. Mullerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. *Hum Reprod* 2006;21:159-63.
- 36 - Sills ES, Collins GS, Brady AC, Walsh DJ, Marron KD, Peck AC, Walsh AP, Salem RD. Bivariate analysis of basal serum anti-Müllerian hormone measurements and human blastocyst development after IVF. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:153.

- 37 - La Marca A, Nelson SM, Sighinolfi G, Manno M, Baraldi E, Roli L, Xella S, Marsella T, Tagliasacchi D, D'Amico R, Volpe A. Anti-Müllerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2011;22:341-9.
- 38 - Cook CL, Siow Y, Taylor S and Fallat ME. Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2000; 73:859-61.
- 39 - Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJ. Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4057-63.
- 40 - van Disseldorp J, Lambalk CB, Kwee J, Looman CW, Eijkemans MJ, Fauser BC, Broekmans FJ. Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Mullerian hormone and antral follicle counts. *Hum Reprod* 2010;1:221-7.
- 41 - Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy Ch, Englert Y. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 2007;22:1837-40.
- 42 - La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, Volpe A. Anti-Mullerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2007;22:766-71.
- 43 - Lee JR, Kim SH, Kim SM, Jee BC, Ku SY, Suh CS, Choi YM, Kim JG, Moon SY. Anti-Mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation and optimal timing of measurement for outcome prediction. *Hum Reprod* 2010;25:2597-604.
- 44 - Johnson NP, Bagrie EM, Coomarasamy A, Bhattacharya S, Shelling AN, Jessop S, Farquhar C, Khan KS. Ovarian reserve tests for predicting fertility outcomes for assisted reproductive technology: the International Systematic Collaboration of Ovarian Reserve Evaluation protocol for a systematic review of ovarian reserve test accuracy. *BJOG* 2006;113:1472-80.
- 45 - Majumder K, Gelbaya TA, Laing I, Nardo LG. The use of anti-Müllerian hormone and antral follicle count to predict the potential of oocytes and embryos. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;150:166-70.
- 46 - Holte J, Brodin T, Berglund L, Hadziosmanovic N, Olovsson M, Bergh T. Antral follicle counts are strongly associated with live-birth rates after assisted reproduction, with superior treatment outcome in women with polycystic ovaries. *Fertil Steril* 2011;96:594-9.
- 47 - Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. A prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2010;93:855-64.

- 48 - Kwee J, Elting ME, Schats R, McDonnell J, Lambalk CB. Ovarian volume and antral follicle count for the prediction of low and hyper responders with in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;15:5-9.
- 49 - Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S, Oskouian L. Prediction of high ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation: anti-Müllerian hormone versus small antral follicle count (2-6 mm). *J Assist Reprod Genet* 2009;26:319-25.
- 50 - Vrontikis A, Chang PL, Kovacs P, Lindheim SR. Antral follicle counts (AFC) predict ovarian response and pregnancy outcomes in oocyte donation cycles. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:383-9.
- 51 - Broer SL, Dólleman M, Opmeer BC, Fauser BC, Mol BW, Broekmans FJ. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011;17:46-54.
- 52 - Styer AK, Toth TL. Antral follicle count in clinical practice: building the bridge from ovarian reserve to in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 2011;95:480-1.
- 53 - Hsu A, Arny M, Knee AB, Bell C, Cook E, Novak AL, Grow DR. Antral follicle count in clinical practice: analyzing clinical relevance. *Fertil Steril* 2011;95:474-9.
- 54 - Alviggi C, Humaidan P, Ezcurra D. Hormonal, functional and genetic biomarkers in controlled ovarian stimulation: tools for matching patients and protocols. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;10:9.
- 55 - Nardo LG, Christodoulou D, Gould D, Roberts SA, Fitzgerald CT, Laing I. Anti-Müllerian hormone levels and antral follicle count in women enrolled in in vitro fertilization cycles: relationship to lifestyle factors, chronological age and reproductive history. *Gynecol Endocrinol* 2007;23:486-93.
- 56 - Broer SL, Mol BW, Hendriks D, Broekmans FJ. The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril* 2009;91:705-14.
- 57 - van Disseldorp J, Lambalk CB, Kwee J, Looman CW, Eijkemans MJ, Fauser BC, Broekmans FJ. Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Mullerian hormone and antral follicle counts. *Hum Reprod* 2010;25:221-7.
- 58 - la Cour Freiesleben N, Gerds TA, Forman JL, Silver JD, Nyboe Andersen A, Popovic-Todorovic B. Risk charts to identify low and excessive responders among first-cycle IVF/ICSI standard patients. *Reprod Biomed Online* 2011;22:50-8.
- 59 - de Carvalho BR, Rosa e Silva AC, Rosa e Silva JC, dos Reis RM, Ferriani RA, Silva de Sá MF. Ovarian reserve evaluation: state of the art. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:311-22.



- 60 - Verhagen TE, Hendriks DJ, Bancsi LF, Mol BW, Broekmans FJ. The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2008;14:95-100.
- 61 - Hazout A. Oocyte quality and ovarian reserve. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2006;35:2S35-2S36.
- 62 - Avril C. Antral follicle count and oocyte quality. *Hum Reprod* 2007;22:778-85.
- 63 - Melo MA, Garrido N, Alvarez C, Bellver J, Meseguer M, Pellicer A, Remohí J. Antral follicle count (AFC) can be used in the prediction of ovarian response but cannot predict the oocyte/embryo quality or the in vitro fertilization outcome in an egg donation program. *Fertil Steril* 2009;91:148-56.
- 64 - Peñarrubia J, Peralta S, Fábregues F, Carmona F, Casamitjana R, Balasch J. Day-5 inhibin B serum concentrations and antral follicle count as predictors of ovarian response and live birth in assisted reproduction cycles stimulated with gonadotropin after pituitary suppression. *Fertil Steril* 2010;94:2590-5.
- 65 - Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW, te Velde ER, Broekmans FJ. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril* 2007;87:764-75.
- 66 - Erdem M, Erdem A, Guler I, Atmaca S. Role of antral follicle count in controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination cycles in patients with unexplained subfertility. *Fertil Steril* 2008;90:360-6.
- 67 - Checa MA, Prat M, Carreras R. Antral follicle count as a predictor of hyperresponse in controlled ovarian hyperstimulation/intrauterine insemination in unexplained sterility. *Fertil Steril* 2010;94:1105-7.
- 68 - Haadsma ML, Groen H, Fidler V, Bukman A, Roeloffzen EM, Groenewoud ER, Broekmans FJ, Heineman MJ, Hoek A. The predictive value of ovarian reserve tests for spontaneous pregnancy in subfertile ovulatory women. *Hum Reprod* 2008;23:1800-7.
- 69 - Rosen MP, Johnstone E, Addauan-Andersen C, Cedars MI. A lower antral follicle count is associated with infertility. *Fertil Steril* 2011;95:1950-4. Styer AK, Toth TL.
- 70 - Rosen MP, Johnstone E, McCulloch CE, Schuh-Huerta SM, Sternfeld B, Reijo-Pera RA, Cedars MI. A characterization of the relationship of ovarian reserve markers with age. *Fertil Steril* 2012;97:238-43.
- 71 - Lambalk CB, van Disseldorp J, de Koning CH, Broekmans FJ. Testing ovarian reserve to predict age at menopause. *Maturitas* 2009;63:280-91.
- 72 - Rosen MP, Johnstone EB, Gillham SJ, Modan AE, Lipshutz AK, Reijo-Pera R, Cedars MI. Is antral follicle count a genetic trait? *Menopause* 2010;17:109-13.

- 73 - Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation *Hum Reprod Update* 2006;12:731-46
- 74 - Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor *Hum Reprod Update* 2006;12:617-30.
- 75 - Florio P, Vale W, Petraglia F. Urocortins in human reproduction. *Peptides* 2004;25:1751-7.
- 76 - Imperatore A, Florio P, Torres PB, Torricelli M, Galleri L, Toti P, Occhini R, Picciolini E, Vale W, Petraglia F. Urocortin 2 and urocortin 3 are expressed by the human placenta, deciduas, and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:288-95.
- 77 - Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, Corrigan AZ, Lewis KA, Rivier JE, Vale W., et al. Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology* 1996;137:2167-70.
- 78 - Zoumakis E, Kalantaridou SN, Makrigiannakis A. CRH-like peptides in human reproduction. *Curr Med Chem* 2009;16:4230-5.
- 79 - Gu Q, Clifton VL, Schwartz J, Madsen G, Sha J, Smith R. Characterization of urocortin in human pregnancy. *Chin Med J (Engl)*. 2001 Jun;114(6):618-22
- 80 - Sehringer B, Zahradnik HP, Simon M, Ziegler R, Noethling C, Schaefer WR. mRNA expression profiles for corticotrophin-releasing hormone, urocortin, CRH-binding protein and CRH receptors in human term gestational tissues determined by real-time quantitative RT-PCR. *J Mol Endocrinol* 2004;32:339-48.
- 81 - Iavazzo C, Baka S, Malamitsi-Puchner A. The role of urocortin in gynecological and obstetrical conditions. *Arch Gynecol Obstet* 2009;279:613-9.
- 82 - Borges LE, Horne AW, McDonald SE, Shaw JL, Lourenco PC, Petraglia F, Critchley HO. Attenuated tubal and endometrial urocortin 1 and corticotropin-releasing hormone receptor expression in ectopic pregnancy. *Reprod Sci* 2011;18:261-8.
- 83 - Bamberger CM, Minas V, Bamberger AM, Charalampopoulos I, Fragouli Y, Schulte HM, Makrigiannakis A. Expression of urocortin in the extravillous human trophoblast at the implantation site. *Placenta* 2007;28:127-32.
- 84 - Florio P, Arcuri F, Ciarmela P, Runci Y, Romagnoli R, Cintorino M, Di Blasio AM, Petraglia F. Identification of urocortin mRNA and peptide in the human endometrium. *J Endocrinol* 2002;173:9-14.
- 85 - Florio P, Torres PB, Torricelli M, Toti P, Vale W, Petraglia F. Human endometrium expresses urocortin II and III messenger RNA and peptides. *Fertil Steril* 2006;86:1766-70.

- 86 - Torricelli M, De Falco G, Florio P, Rossi M, Leucci E, Viganò P, Leoncini L, Petraglia F. Secretory endometrium highly expresses urocortin messenger RNA and peptide: possible role in the decidualization process. *Hum Reprod* 2007;22:92-6.
- 87- Florio P, Reis FM, Torres PB, Calonaci F, Toti P, Bocchi C, Linton EA, Petraglia F. Plasma urocortin levels in the diagnosis of ovarian endometriosis. *Obstet Gynecol* 2007;110:594-600.
- 88 - Novembri R, Borges LE, Carrarelli P, Rocha AL, De Pascalis F, Florio P, Petraglia F. Impaired CRH and urocortin expression and function in eutopic endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1145-50.
- 89 - Novembri R, Carrarelli P, Toti P, Rocha AL, Borges LE, Reis FM, Piomboni P, Florio P, Petraglia F. Urocortin 2 and urocortin 3 in endometriosis: evidence for a possible role in inflammatory response. *Mol Hum Reprod* 2011;17:587-93.
- 90 - Florio P, Bruni L, De Falco C, Filardi G, Torricelli M, Reis FM, Galleri L, Voltolini C, Bocchi C, De Leo V, Petraglia F. Evaluation of endometrial urocortin secretion for prediction of pregnancy after intrauterine insemination. *Clin Chem* 2008;54:350-5.
- 91 - Broekmans FJ, de Ziegler D, Howles CM, Gougeon A, Trew G, Olivennes F. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril* 2010;94(3):1044-51.
- 92 - La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, Volpe A. Anti-Mullerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod*. 2007;22:766-71.
- 93 - Flahault A, Cadilhac M, Thomas G. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. *J Clin Epidemiol* 2005;58:859-62.
- 94 - Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method. *Methods* 2001; 25 (4):402-8.

## **8. ANEXOS**

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Fatores prognósticos em terapia de reprodução assistida: hormônio anti-mülleriano e secreção endometrial de urocortina

Prezada Senhora,

Gostaria de convidá-la a participar de um estudo científico que irá avaliar dois novos exames cuja finalidade é ajudar a prever melhor as chances de sucesso em terapias de reprodução assistida.

### **I. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

Esta pesquisa visa ao estudo de novas opções de teste para avaliar a reserva ovariana e a receptividade do endométrio, com o objetivo de tentar prever melhor as chances de sucesso do tratamento em mulheres submetidas a terapias de reprodução assistida (fertilização in vitro – FIV ou ICSI). Nesta pesquisa, além dos exames de rotina realizados antes da fertilização assistida, será coletada amostra de sangue para a dosagem de uma substância denominada hormônio anti-mülleriano. Durante a realização do exame denominado histerossonografia, será coletado o fluido endometrial. Ambas coletas serão realizadas entre o 18º e o 20º dias do ciclo menstrual. O resultado desses testes não exercerá nenhuma influência no prosseguimento do tratamento.

### **II. SIGILO DOS DADOS**

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 estas informações que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

### **III. BENÉFICIOS DA PESQUISA**

Este estudo trará informações importantes que poderão ter aplicação direta na terapêutica. O melhor conhecimento da reserva ovariana e da receptividade endometrial permitirá um melhor planejamento do tratamento e maiores informações para a paciente em relação às suas chances de sucesso na obtenção de uma gravidez.

### **IV. RISCOS**

O estudo não acrescenta nenhum risco às pacientes, uma vez que não exerce nenhuma influência ou modificação no tratamento. As únicas intervenções realizadas serão a coleta de amostras sanguíneas, além das que já são habitualmente coletadas, e a coleta do fluido endometrial durante a realização da histerossonografia.

### **V. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS**

Não está prevista qualquer forma de remuneração para as voluntárias. Todas as despesas específicas relacionadas com o estudo são de responsabilidade do Laboratório de Reprodução Humana da Universidade Federal de Minas Gerais. O estudo não acarretará nenhuma despesa extra às voluntárias, sendo que a coleta das amostras sanguíneas e do fluido endometrial será programada para dias em que a paciente já teria a necessidade de se locomover até o Laboratório de Reprodução Humana.

### **VI. DEMAIS ESCLARECIMENTOS**

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. 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. Não será realizado qualquer tipo de manipulação, experimento ou intervenção direta com o paciente, exceto a coleta de amostras de sangue periférico (5 ml por coleta, volume equivalente a uma colher de sopa) e do fluido endometrial.

### **TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu,....., voluntariamente concordo que seja coletada amostra sanguínea para dosagem de hormônio anti-mülleriano e fluido endometrial durante a realização da histerossonografia, para fins de pesquisa científica no Laboratório de Reprodução Humana da Universidade Federal de Minas Gerais. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo à minha saúde ou ao tratamento.

Belo Horizonte,.....de.....de 20.....

---

Assinatura da voluntária:

Telefones para contato:

Dra. Carolina Passos de Rezende – 3409 9484 / 9191 5917

Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG: (31) 3499-4592

**CONSENTIMENTO PARA TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA (FIV)**

Vimos, através deste termo, declarar que:

Consentimos livremente em participar do Programa de Fertilização Assistida. Este programa visa a obtenção de uma gestação, como parte integrante do tratamento de esterilidade conjugal ao qual estamos nos submetendo.

Tivemos a oportunidade de esclarecer todas as nossas dúvidas relativas ao referido programa, aos tratamentos alternativos, aos possíveis desconfortos, efeitos colaterais e riscos inerentes ao programa. Estamos cientes da possibilidade de ocorrerem outras complicações além daquelas descritas neste documento. Reconhecendo que, embora sejam empenhados todos os esforços a fim de evitar ou minimizar os efeitos colaterais e complicações, estes podem ser imprevisíveis tanto em natureza como em gravidade.

Estamos cientes que não seremos penalizados se nos recusarmos a participar do referido programa e de que seremos informados em detalhes e com antecedência sobre a ovulação e mudanças referentes ao programa que venham influenciar nossa decisão de prosseguir com o programa ou não.

Estamos cientes de que o programa poderá ser suspenso, a critério médico, quando houver algum fato significativo que possa aumentar o desconforto, efeitos colaterais e/ou riscos, ou ainda no caso de não haver boas chances de sucesso (gestação) com a progressão do programa.

Estamos, ainda, cientes de que qualquer informação obtida durante a realização deste programa que se refira diretamente a nós é verdadeira; e permanecerá confidencial, como previsto em lei. Concordamos que os dados obtidos durante o programa possam ser objeto de publicação em literatura médica, sob condição de que nossa identidade seja resguardada.

Tendo lido com atenção e compreendido todas as informações contidas neste documento, recebido informações adicionais e esclarecimentos completos, concordamos em participar do Programa de Fertilização Assistida. Reconhecemos ter sido informados em detalhes sobre nossos direitos e responsabilidades e, não havendo dúvidas, datamos e assinamos como segue:

CASAL: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

MÉDICOS: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**CONSENTIMENTO PARA TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA (ICSI)**

Vimos, através deste termo, declarar que:

Consentimos livremente em participar do Programa de Fertilização Assistida. Este programa visa a obtenção de uma gestação, como parte integrante do tratamento de esterilidade conjugal ao qual estamos nos submetendo.

Tivemos a oportunidade de esclarecer todas as nossas dúvidas relativas ao referido programa, aos tratamentos alternativos, aos possíveis desconfortos, efeitos colaterais e riscos inerentes ao programa. Estamos cientes da possibilidade de ocorrerem outras complicações além daquelas descritas neste documento. Reconhecendo que, embora sejam empenhados todos os esforços a fim de evitar ou minimizar os efeitos colaterais e complicações, estes podem ser imprevisíveis tanto em natureza como em gravidade.

Estamos cientes que não seremos penalizados se nos recusarmos a participar do referido programa e de que seremos informados em detalhes e com antecedência sobre a ovulação e mudanças referentes ao programa que venham influenciar nossa decisão de prosseguir com o programa ou não.

Estamos cientes de que o programa poderá ser suspenso, a critério médico, quando houver algum fato significativo que possa aumentar o desconforto, efeitos colaterais e/ou riscos, ou ainda no caso de não haver boas chances de sucesso (gestação) com a progressão do programa.

Estamos, ainda, cientes de que qualquer informação obtida durante a realização deste programa que se refira diretamente a nós é verdadeira; e permanecerá confidencial, como previsto em lei. Concordamos que os dados obtidos durante o programa possam ser objeto de publicação em literatura médica, sob condição de que nossa identidade seja resguardada.

Pra tanto autoriza o casal a realização da Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), que consiste na injeção de um único espermatozóide no interior de um óvulo. Estamos cientes que esta é a melhor opção de uma gestação no nosso caso.

Tendo lido com atenção e compreendido todas as informações contidas neste documento, recebido informações adicionais e esclarecimentos completos, concordamos em participar do Programa de Fertilização Assistida. Reconhecemos ter sido informados em detalhes sobre nossos direitos e responsabilidades e, não havendo dúvidas, datamos e assinamos como segue:

CASAL: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

MÉDICOS: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

**Parecer nº. ETIC 666/07**

**Interessado(a): Prof. Fernando Marcos dos Reis  
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia  
Faculdade de Medicina - UFMG**

### **DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 07 de março de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Fatores prognósticos em terapia de reprodução assistida: hormônio anti-mulleriano e secreção endometrial de urocortina"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Prof. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

**Parecer nº. ETIC 666/07**

**Interessado(a): Prof. Fernando Marcos dos Reis**  
**Departamento de Ginecologia e Obstetrícia**  
**Faculdade de Medicina - UFMG**

### **DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 12 de agosto de 2009, a extensão do projeto de pesquisa intitulado "**Fatores prognósticos em terapia de reprodução assistida: hormônio anti-mulleriano e secreção endometrial de urocortina**" com as seguintes alterações:

1. prorrogar a etapa de coleta de amostras até 30 de novembro de 2009;
2. introduzir uma modificação nos procedimentos de coleta de fluido endometrial, com a inclusão de uma amostra de tecido endometrial;
3. alterar o texto do projeto (com essa mudança);
4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (com as modificações).

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**



**FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
[cpg@medicina.ufmg.br](mailto:cpg@medicina.ufmg.br)



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **CAROLINA PASSOS DE REZENDE MARTINS**, nº de registro 2011655590. No dia **quinze de junho de dois mil e doze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de Tese indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“FATORES PROGNÓSTICOS EM TERAPIA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA: HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO E SECREÇÃO ENDOMETRIAL DE UROCORTINA”**, requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Patologia Ginecológica e Reprodução. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Fernando Marcos dos Reis, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Fernando Marcos dos Reis/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTA</u>
Profa. Cláudia Navarro Carvalho Duarte Lemos	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTO</u>
Prof. Selmo Geber	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTA</u>
Prof. Alessandra Duarte Clarizia	Instituição: UNI-BH	Indicação: <u>APto</u>
Profa. Rívia Mara Lamaita	Instituição: PRO-CRIAR	Indicação: <u>apto</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de junho de 2012.

Prof. Fernando Marcos dos Reis [assinatura]

Profa. Cláudia Navarro Carvalho Duarte Lemos [assinatura]

Prof. Selmo Geber [assinatura]

Prof. Alessandra Duarte Clarizia [assinatura]

Profa. Rívia Mara Lamaita – PRO-CRIAR [assinatura]

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral/Coordenador [assinatura]

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e o carimbo do Coordenador.

Em tempo: onde se lê "nº de registro 2011655590..."  
leia-se "nº de registro 2008670940..."

[assinatura]  
Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Saúde da Mulher  
Faculdade de Medicina - UFMG



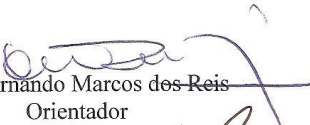
FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

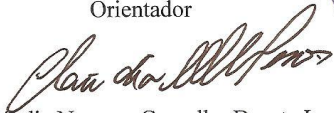
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640  
cpg@medicina.ufmg.br





## DECLARAÇÃO


A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Fernando Marcos dos Reis, Cláudia Navarro Carvalho Duarte Lemos, Selmo Geber, Alessandra Duarte Clarizia e Rívia Mara Lamaita, aprovou a defesa da Tese intitulada **“FATORES PROGNÓSTICOS EM TERAPIA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA: HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO E SECREÇÃO ENDOMETRIAL DE UROCORTINA”**, apresentada pela doutoranda **CAROLINA PASSOS DE REZENDE MARTINS**, para obtenção do título de Doutor em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Patologia Ginecológica e Reprodução da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 15 de junho de 2012.

  
Prof. Fernando Marcos dos Reis  
Orientador

  
Profa. Cláudia Navarro Carvalho Duarte Lemos

  
Prof. Selmo Geber

  
Profa. Alessandra Duarte Clarizia

  
Profa. Rívia Mara Lamaita