

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

CAMILA OLIVEIRA DA SILVEIRA CAIRES LOPES

**EXPRESSÃO GÊNICA ENDOMETRIAL DE α -INIBINA E
BETAGLICANO E FALHA DE IMPLANTAÇÃO EM
MULHERES SUBMETIDAS A FERTILIZAÇÃO IN VITRO.**

**Belo Horizonte
2015**

CAMILA OLIVEIRA DA SILVEIRA CAIRES LOPES

**EXPRESSÃO GÊNICA ENDOMETRIAL DE α -INIBINA E
BETAGLICANO E FALHA DE IMPLANTAÇÃO EM
MULHERES SUBMETIDAS A FERTILIZAÇÃO IN VITRO.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Reprodução Humana e Patologia Ginecológica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

Co-Orientadora: Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto

**Belo Horizonte
2015**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Professor Jaime Arturo Ramírez

Pró-Reitoria de Pós-Graduação

Professor Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Professor Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Professora Sandhi Maria Barreto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

Coordenador

Professor Selmo Geber

Vice-Coordenador

Professor Fernando Marcos dos Reis

CAMILA OLIVEIRA DA SILVEIRA CAIRES LOPES

**EXPRESSÃO GÊNICA ENDOMETRIAL DE α -INIBINA E
BETAGLICANO E FALHA DE IMPLANTAÇÃO EM
MULHERES SUBMETIDAS A FERTILIZAÇÃO IN VITRO.**

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis – Presidente da banca - UFMG

Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto – Centro Universitário UNA

Profa. Dra. Márcia Cristina França Ferreira – UFMG

Prof. Dr. Enrrico Bloise - UFRJ

Membro suplente:

Profa. Dra. Márcia Mendonça Carneiro - UFMG

*Às pacientes inférteis,
que esse sonho tão buscado possa ser alcançado.
Às pacientes que participaram desse estudo e muito contribuíram para a conclusão
desse projeto.*

Resumo

A implantação embrionária inclui uma sequência de eventos complexos, com a participação de muitas moléculas mediadoras da interação entre o embrião e o endométrio materno. O presente estudo avaliou a expressão de α -inibina e betaglicano na fase secretora do endométrio de mulheres em propedêutica de infertilidade submetidas à fertilização *in vitro* (FIV), e a relação desses marcadores com a taxa de implantação embrionária. O estudo caso-controle incluiu 52 mulheres submetidas a FIV com transferência embrionária, divididas em dois grupos: casos com falha de implantação (n=33) e controles com gestação clínica confirmada (n=19). A expressão gênica endometrial de α -inibina e betaglicano foi avaliada na fase secretora do ciclo menstrual anterior à FIV por PCR em tempo real, através do protocolo do Power SYBR® *Green Master Mix*. Os resultados indicaram um aumento significativo da expressão gênica de α -inibina e betaglicano no endométrio das mulheres com falha de implantação. As áreas sob as curvas ROC para predizer falha de implantação foram, respectivamente, 0,692 e 0,678 para α -inibina e betaglicano. Os resultados do presente estudo sugerem que a expressão aumentada de mRNA de α -inibina e betaglicano na fase secretora do endométrio pode estar associada à ocorrência de falha de implantação em mulheres submetidas a FIV.

Palavras-chave e termos: α inibina, betaglicano, FIV, implantação embrionária

Abstract

Embryo implantation involves a complex sequence of events, and a large amount of molecules have been postulated to be involved in the interaction of embryo and endometrium. This study evaluated the endometrial expression of α -inhibin and betaglycan in the mid-secretory phase of women scheduled to IVF and tested whether these markers are associated with implantation failure. We conducted a nested case-control study including 52 women submitted to in vitro fertilization (IVF) and embryo transfer, divided into two groups: cases with implantation failure (n=33) and controls with confirmed clinical pregnancy (n=19). Endometrial α -inhibin and betaglycan gene expression was evaluated in the mid-secretory phase of the natural menstrual cycle immediately before IVF, using real time PCR. We found a higher gene expression of α -inhibin and betaglycan in implantation failure patients compared to confirmed clinical pregnancy patients. The areas under receiver operating characteristics curves for prediction of implantation failure in this context were, respectively, 0.692 and 0.678 for α -inhibin and betaglycan. The present results suggest that high expression levels of α -inhibin and betaglycan transcripts in secretory phase endometrium may associated to a implantation failure in IVF treatment.

Keywords: α -inhibin, betaglycan, embryo implantation, IVF

Agradecimentos

À Deus, por me dar forças e me mostrar os caminhos.

Ao Professor Fernando Marcos dos Reis, pelos ensinamentos, por despertar em mim o amor pela pesquisa e pela oportunidade de vivenciar o mestrado.

À Professora Helen Lima Del Puerto, pela disponibilidade, orientação e ajuda imprescindível em cada etapa do trabalho. Sem seu apoio e incentivo eu não teria conseguido.

À Dra. Carolina Passos de Rezende Martins, por ter gentilmente cedido suas amostras e por ser um exemplo de dedicação e seriedade.

Ao Dr. Francisco de Assis, Dra. Ines Katerina, Dra. Cláudia Navarro, Dra. Laura Maia e todos os preceptores do Laboratório de Reprodução Humana Prof. Aroldo Fernando Camargos por tantos ensinamentos.

Ao meu marido Marcos, pelo amor, cumplicidade e apoio incondicional na realização de todos os meus sonhos.

À minha pequena Letícia, que me apresentou um amor que jamais imaginei ser capaz de sentir. O seu sorriso e o brilho dos seus olhos transbordam ternura e me estimulam a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus pais Dayse e Paulo, pelo exemplo de garra e determinação e por ter me ensinado que dedicação e força de vontade são fundamentais para a busca dos nossos objetivos e a realização dos nossos sonhos.

Aos meus avós Elenice e Alcides, pelo carinho, incentivo e presença constante na minha vida.

Aos meus irmãos Juliana e Rafael, pela amizade e colaboração.

Patrocinadores e Colaboradores



Trabalho realizado no Laboratório de Reprodução Humana Prof. Aroldo F. Camargos, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais- FAPEMIG por meio do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Hormônios e Saúde da Mulher.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ActRI	Receptor de ativina Tipo I
ActRII	Receptor de ativina Tipo II
ActRIII	Receptor de ativina Tipo III
ALK4	<i>Activin receptor-like kinase 4</i>
AMH	Hormônio anti-mulleriano
cDNA	DNA complementar
CO₂	Dióxido de carbono
CT	<i>Cycle threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
FIV	Fertilização “ <i>in vitro</i> ”
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRHa	Análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas
HC	Hospital das Clínicas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
βhCG	Fração beta da gonadotrofina coriônica humana
HOC	Hiperestimulação ovariana controlada
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoide
IGFBP1	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 1</i>
IMC	Índice de massa corporal
LRH	Laboratório de Reprodução Humana
Min	Minutos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
RNase	Ribonuclease
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
Rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
S26	Subunidade da proteína ribossomal
SC	Via subcutânea
SF	Soro fisiológico
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β	Fator de crescimento e transformação beta
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USTV	Ultrassom transvaginal

Lista de Unidades e Medidas

Kda	Kilodáltons
mHz	Mili-hertz
mg	Miligramas
ml	Militro
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
UI	Unidades internacionais
°C	Graus Celsius

Índice

Resumo	vi
Abstract	vii
Agradecimentos	viii
Patrocinadores e Colaboradores	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
Lista de Unidades e Medidas.....	xi
Índice	xii
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 O endométrio	15
1.2 Receptividade endometrial	16
1.3 Ativinas e Inibinas	16
1.3.1 Ativinas	17
1.3.2 Inibinas.....	18
1.4 Betaglicano	19
2. OBJETIVO	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Pacientes.....	22
3.2 Coleta de tecido endometrial	23
3.3 Expressão dos genes alvos.....	23
3.4 Oligonucleotídeos específicos	24
3.5 Hiperestimulação ovariana controlada	26
3.6 Aspiração de folículos, fertilização <i>in vitro</i> , transferência embrionária e acompanhamento da paciente	26
3.7 Análise estatística	27
4. RESULTADOS	29
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
ANEXOS.....	36
Anexo 1: Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido.....	37
Anexo 2: Parecer de aprovação do COEP	40
Anexo 3: Parecer de aprovação do COEP para pedido de extensão.....	41

Índice de Figuras

Figura 1: Constituição das inibinas e ativinas a partir da ligação das subunidades α e β	17
Figura 2: Ativinas e inibinas nos tecidos gonadais e extra-gonadais (Adaptado de Makanji et al., 2014)	17
Figura 3: Mecanismo de sinalização da ativina através de sua ligação aos receptores serina-treonina-quinase ActRII e ActRI pela fosforilação de proteínas Smad.....	18
Figura 4: Mecanismo de sinalização da inibina através de sua ligação ao receptor ActRII impedindo a ligação da ativina e subsequente ativação do receptor ActRI	19
Figura 5: Utilização da Pipelle® para coleta de amostras endometriais	23
Figura 6: Gráfico da expressão gênica de α -Inibina em amostras endometriais obtidas na fase lútea média do ciclo menstrual anterior ao ciclo de fertilização in vitro com transferência embrionária. Os dados são expressos como <i>fold change</i> (\pm SD) da expressão gênica nos casos (falha de implantação, n = 33) em relação aos controles (gravidez clínica, n = 19). * p <0,05 (Mann-Whitney U-Test)	29
Figura 7: Gráfico da expressão gênica de betaglicano em amostras endometriais obtidas na fase lútea média do ciclo menstrual anterior ao ciclo de fertilização in vitro com transferência embrionária. Os dados são expressos como <i>fold change</i> (\pm SD) da expressão gênica nos casos (falha de implantação, n = 33) em relação aos controles (gravidez clínica, n = 19). * p <0,05 (Mann-Whitney U Test)	29
Figura 8: Gráfico da Curva ROC para predição de falha de implantação baseada na expressão endometrial de α -inibina e betaglicano.	30

Índice de Tabelas

Tabela 1: Características dos grupos de pacientes	22
Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR em tempo real para a amplificação específica do cDNA do betaglicano e da α -inibina	25

1. INTRODUÇÃO

Em reprodução humana, a implantação embrionária depende da qualidade do blastocisto, de um endométrio receptivo e da sincronização de ambos (SINGH *et al.*, 2011). A implantação do embrião é um desafio para a reprodução assistida e sua falha é considerada a principal causa de infertilidade em mulheres saudáveis (BULLETTI *et al.*, 1996). A implantação embrionária envolve uma sequência complexa de acontecimentos e acredita-se que muitas moléculas estejam envolvidas na interação do embrião com o endométrio (ACHACHE e REVEL, 2006).

1.1 O endométrio

O endométrio humano é um tecido dinâmico que sofre variações cíclicas a cada período menstrual sob o comando de esteroides sexuais ovarianos, com a eliminação de toda a camada funcional e posterior regeneração a partir da sua camada basal. É influenciado por variação hormonal, proliferação celular, diferenciação e apoptose (APLIN *et al.*, 2008).

A mucosa endometrial é composta por células epiteliais cilíndricas simples, glândulas tubulares simples, vasos sanguíneos e estroma. O estroma compreende o tecido de sustentação das glândulas endometriais, sendo constituído por fibroblastos, alguns macrófagos e linfócitos T e poucos linfócitos B (KELLY *et al.*, 2001).

A fase proliferativa do ciclo menstrual é influenciada pelo estrogênio com rápida proliferação celular. Após a ovulação, sob influência da progesterona produzida pelo corpo lúteo, o endométrio passa por uma diferenciação funcional para favorecer a implantação embrionária, quando as glândulas acumulam glicogênio e glicoproteínas, se expandem sobre a superfície endometrial, tornando-se tortuosas, ocorre edema do estroma com aumento do citoplasma e enovelamento das arteríolas espiraladas e inicia-se a secreção de proteínas específicas como prolactina, *Insulin-like growth factor-binding protein 1* (IGFBP1), e fator tecidual (HENRIET *et al.*, 2012).

1.2 Receptividade endometrial

Um endométrio receptivo é aquele que está apto para a implantação embrionária, o que permite a ocorrência de gravidez (LESSEY, 2011). O momento ideal para que isso ocorra é conhecido como janela de implantação, período da fase lútea média que vai do 20º ao 24º dia do ciclo e consiste em mudanças morfológicas e funcionais promovidas pelos esteroides ovarianos (ACHACHE e REVEL, 2006). A receptividade endometrial consiste na aquisição de moléculas de adesão e perda de componentes inibitórios que poderiam impedir a implantação embrionária (APLIN, 2000; ACHACHE e REVEL, 2006).

A decidualização é um processo pós ovulatório de remodelação endometrial essencial para a preparação do endométrio para a implantação embrionária. Envolve transformação nas glândulas uterinas, remodelação vascular e da matriz extracelular e estímulo à produção de citocinas e migração de células imunes para o endométrio, principalmente monócitos e células *natural killer* (STROWITZKI *et al.*, 2006; GELLERSEN *et al.*, 2007; SALAMONSEN *et al.*, 2009). Esse processo se inicia a partir do 22º dia do ciclo menstrual e continua durante a gravidez, transformando o endométrio em decídua (SALAMONSEN *et al.*, 2009).

Várias moléculas estão envolvidas em uma cascata de sinalização para melhorar a receptividade endometrial e favorecer a implantação e gravidez (SINGH *et al.*, 2011).

1.3 Ativinas e Inibinas

As Ativinas e Inibinas pertencem à superfamília dos fatores transformadores do crescimento β (“*transforming growth factor beta*” - TGF- β), e estão envolvidas no controle da proliferação e diferenciação celular, apoptose, metabolismo, homeostase, resposta imune e função endócrina (TSUCHIDA *et al.*, 2009).

As ativinas formam dímeros compostos por duas subunidades β da inibina, β_A/β_A (ativina A), β_B/β_B (ativina B), β_A/β_B (ativina AB). As inibinas são proteínas heterodiméricas compostas por uma subunidade α ligada a uma subunidade β por ponte de bissulfito: $\alpha\beta_A$ (inibina A) e $\alpha\beta_B$ inibina B (Figura 1) (CHEN *et al.*, 2006; TSUCHIDA *et al.*, 2009).

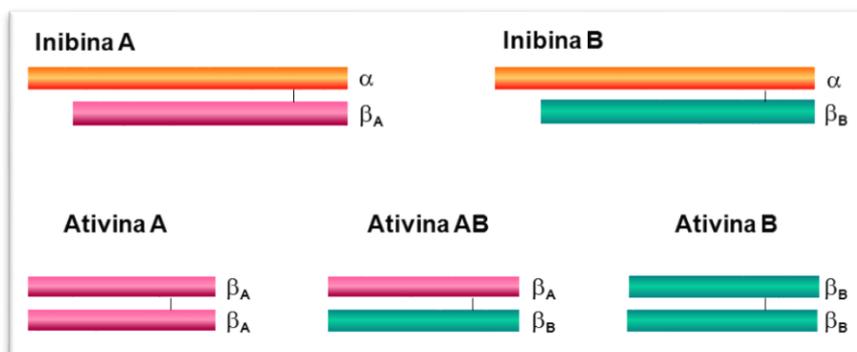


Figura 1: Constituição das inibinas e ativinas a partir da ligação das subunidades α e β .

1.3.1 Ativinas

A ativina foi originalmente isolada no ovário e identificada como proteína gonadal por sua ação regulatória na síntese e secreção do hormônio folículo estimulante hipofisário. Posteriormente foi detectada em muitos outros órgãos e tecidos, e não somente no trato reprodutivo, como placenta, hipófise, adrenais, fígado, tireoide, cérebro e medula óssea (Figura 2) (LUISI *et al.*, 2001; MAKANJI *et al.*, 2014).

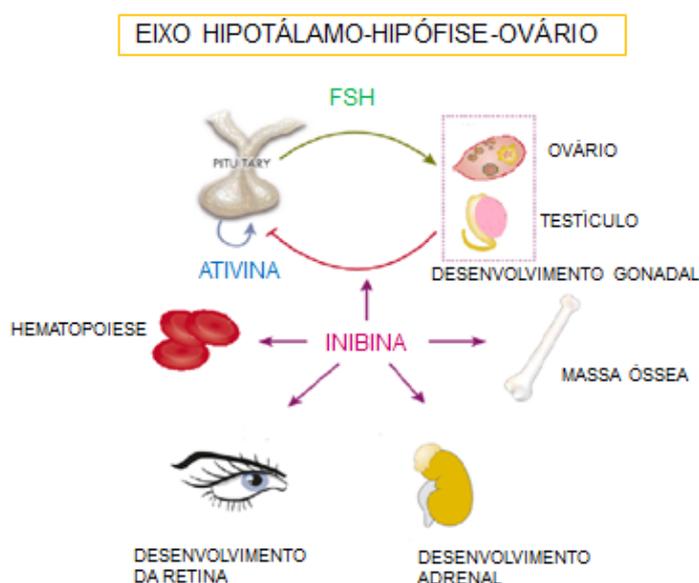


Figura 2: Ativinas e inibinas nos tecidos gonadais e extra-gonadais (Adaptado de Makanji *et al.*, 2014)

As subunidades da ativina são expressadas na superfície glandular e epitelial do endométrio de mulheres não grávidas, estando a ativina A presente também no fluido uterino e sangramento

menstrual de mulheres na menacme. Sua expressão aumenta consideravelmente na fase secretora e se mantém constante até o final do ciclo, estando sua avaliação no fluido uterino, associada à espessura endometrial (REFAAT, 2014).

A sinalização da ativina ao seu alvo ocorre por interação com 2 receptores transmembranas serina/treonina quinases, se ligando primeiro ao receptor tipo II (ActRII ou ActRIIB), permitindo recrutamento, fosforilação e subsequente ativação do receptor tipo I (ActRI ou ALK4), que participa do sinal de transdução fosforilando as proteínas sinalizadoras Smad2 e Smad3, que se dissociam e formam complexos heteroméricos com Smad 4, que translocam até o núcleo e, em conjunto com outros co-fatores, regulam a transcrição de genes alvo (FIGURA 3) (Makanji et al., 2014; Tsuchida et al., 2009). Os receptores da ativina também são ligantes de outras moléculas da superfamília dos TGF- β , como miostatina, fator de crescimento e diferenciação 11 e nodal, que apresentam atividades semelhantes às desempenhadas pela ativina (TSUCHIDA *et al.*, 2009).

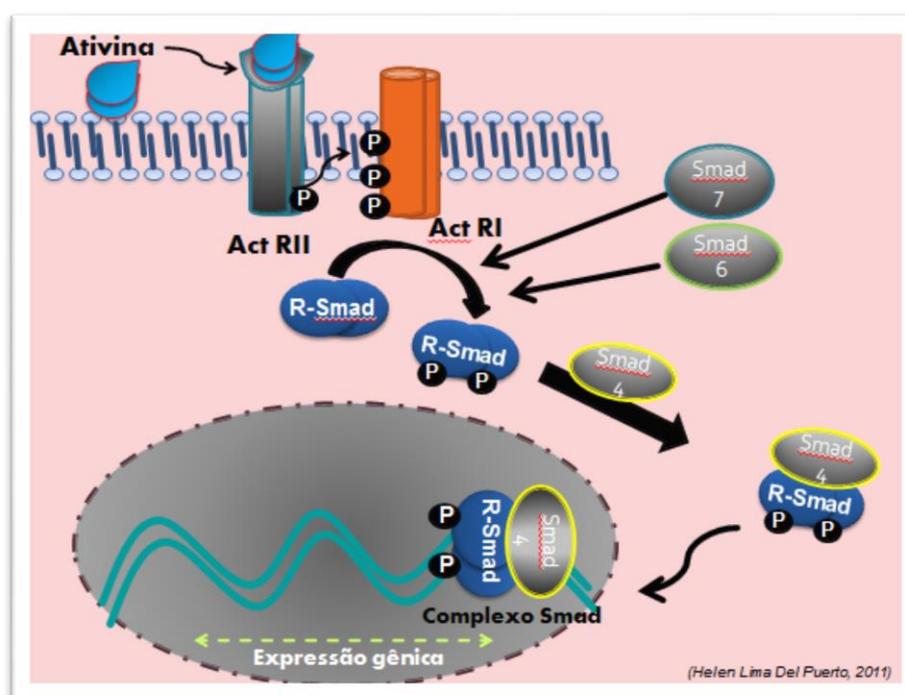


Figura 3: Mecanismo de sinalização da ativina através de sua ligação aos receptores serina-treonina-quinase ActRII e ActRI pela fosforilação de proteínas Smad

1.3.2 Inibinas

A inibina é uma glicoproteína dimérica que foi primeiramente descrita em 1932 por Roy McCullagh e regula o crescimento e a diferenciação de uma variedade de tipos celulares e tecidos, incluindo as células endometriais. A inibina é um potente antagonista seletivo da ativina, uma vez

que se liga a porção extracelular do receptor da ativina tipo II (ActRII) numa conformação que bloqueia a transmissão de sinal do receptor, prevenindo a ativação do ActRI pela ativina. A ação da Inibina é amplificada pelo betaglicano, que atua como um co-receptor (FIGURA 4) (LEWIS *et al.*, 2000; CHAPMAN *et al.*, 2002; TSUCHIDA *et al.*, 2009; MAKANJI *et al.*, 2014).

A subunidade α da Inibina é detectada no endométrio humano normal e está localizada predominantemente no epitélio glandular e luminal. A expressão da subunidade α da inibina no endométrio é significativamente maior na fase secretora precoce e tardia, em comparação com a fase proliferativa (MYLONAS *et al.*, 2003; WORBS *et al.*, 2007).

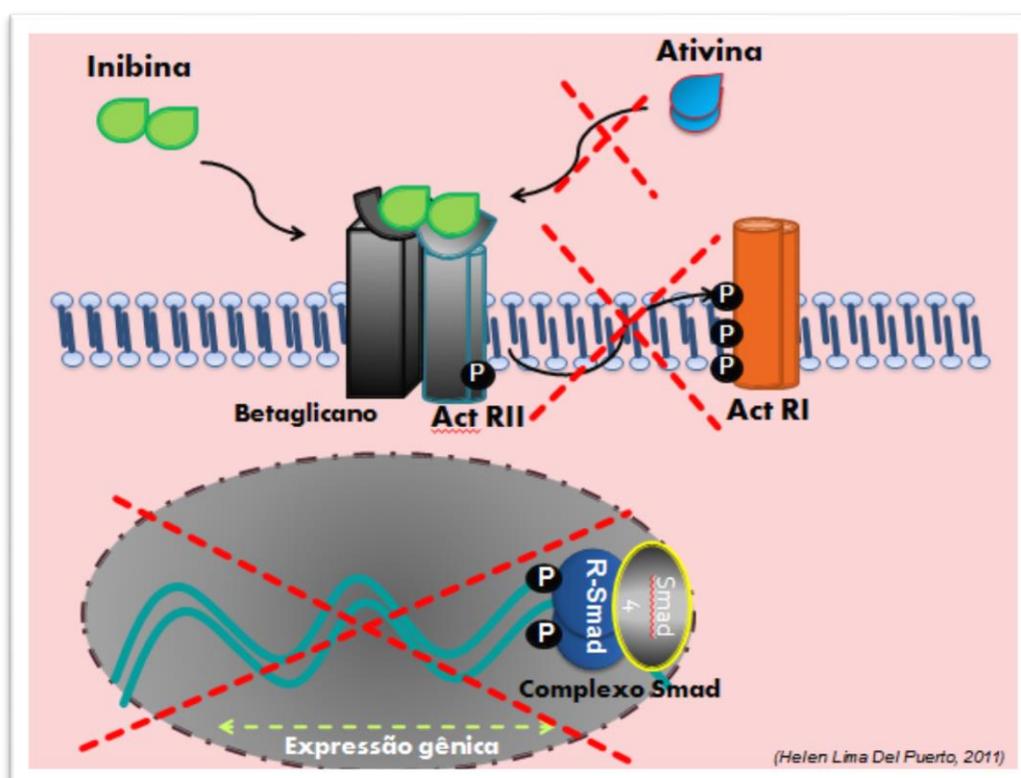


Figura 4: Mecanismo de sinalização da inibina através de sua ligação ao receptor ActRII impedindo a ligação da ativina e subsequente ativação do receptor ActRI

1.4 Betaglicano

Também pertencente à superfamília dos TGF- β , o betaglicano é um proteoglicano de membranas ancoradas chamado de receptor TGF- β tipo III (ActRIII), que se liga à sub-unidade α da inibina e atua como um co-receptor (LEWIS *et al.*, 2000; CHAPMAN *et al.*, 2002; TSUCHIDA *et al.*, 2009).

O betaglicano está localizado nas células estromais e epiteliais e é particularmente abundante nas bordas basais e apicais da célula (FLORIO *et al.*, 2005). Além disso, foi encontrado em células da decídua obtidas a partir do primeiro e do terceiro trimestre de gravidez e em células endoteliais na gravidez inicial (CIARMELA *et al.*, 2003). Ambos, inibina e betaglicano são fatores endometriais com uma expressão dinâmica durante o ciclo menstrual (FLORIO *et al.*, 2010).

Considerando as várias funções fisiológicas das ativinas e inibinas no endométrio e na decídua, justifica-se a investigação da participação dessas moléculas com as taxas de implantação em mulheres em propedêutica de infertilidade submetidas a FIV.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de mRNA de α -inibina e betaglicano em amostras de endométrio de mulheres submetidas a fertilização in vitro (FIV), afim de investigar a relação desses marcadores com a taxa de implantação.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar se a expressão gênica de α -inibina e betaglicano no endométrio secretor de pacientes em propedêutica de infertilidade no ciclo menstrual imediatamente anterior à FIV é diferente em pacientes grávidas e não grávidas.
- Avaliar se idade, tempo de infertilidade, espessura endometrial e nível sérico de hormônio anti-mulleriano (AMH) avaliados nas pacientes em propedêutica de infertilidade submetidas a FIV poderiam interferir com os resultados obtidos nas taxas de implantação.
- Avaliar a sensibilidade e especificidade da expressão gênica de α -inibina e betaglicano na predição de receptividade endometrial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes

No presente estudo, de caso-controle, foram avaliadas 52 pacientes encaminhadas para a fertilização *in vitro* convencional (FIV), ou injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil (REZENDE *et al.*, 2014). O consentimento informado foi obtido de todos os participantes antes da inclusão no estudo, que foi aprovado pelo Comitê local de Investigação Humana (Referência: 666/07). Os casos de falha de implantação (n=33) e controles com a gravidez clínica confirmada (n=19) foram pareados por idade e tinham características clínicas semelhantes, como mostrado na Tabela 1

Tabela 1: Características dos grupos de pacientes

	Falha de Implantação (n=33)	Gravidez Clínica (n=19)	P
Idade (anos)	34,0 (31,5-37,0)	33,0 (28,0-39,0)	0,523
Duração da infertilidade (anos)	7,0 (4,0-10,0)	5,0 (3,0-9,0)	0,211
FSH de 3° dia (mIU/ml)	7,1 (4,8-8,3)	7,4 (6,1-8,2)	0,506
AMH de 3° dia (ng/ml)	0,85 (0,48-2,49)	1,86 (0,74-3,37)	0,151
Contagem de Folículos Antrais	8 (6-11)	9 (6-11)	0,485
Espessura Endometrial (mm)	4,0 (4,0-5,0)	4,0 (4,0-5,0)	0,433
Dose de gonadotrofinas utilizadas (UI)	1800 (1650-1950)	1950 (1800-1950)	0,184
Número de óocitos	6 (4-10)	7 (4-11)	0,647
Taxa de Fertilização (%)	67 (47-82)	55 (50-75)	0,164
Número de embriões obtidos	3 (2-6)	4 (2-6)	0,923
Número de embriões transferidos	3 (2-3)	3 (2-3)	0,673

Os dados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. Os valores de P são para o teste de Mann-Whitney

Para ser admitida no programa de fertilização *in vitro*, a paciente deveria ter diagnóstico de infertilidade primária ou secundária com indicação de tratamento por FIV, apresentar idade inferior a 40 anos no momento da inclusão no programa e índice de massa corporal (IMC) inferior a 30 no momento do início do tratamento.

A porcentagem de mulheres com endometriose ou infertilidade sem causa aparente foi semelhante nos casos (5/33=15%) e controles (2/19=10%), enquanto o restante dos participantes tinham fator masculino (67% dos casos e 78% dos controles) ou obstrução das trompas (18% dos casos e 11% dos controles, qui-quadrado = 4,7 p=0,45) como causa da infertilidade

3.2 Coleta de tecido endometrial

Todas as pacientes foram submetidas à biópsia de tecido endometrial com o auxílio de uma cânula descartável de pequeno calibre (Pipelle®). As amostras foram coletadas entre o 18º e 20º dia do ciclo menstrual no mês anterior ao tratamento e foram imediatamente armazenadas em tubo de 2 mL estéril livre de RNase e DNase a -80°C para posterior extração de RNA total e avaliação da expressão gênica de α -Inibina, betaglicano e o o normalizador S26.

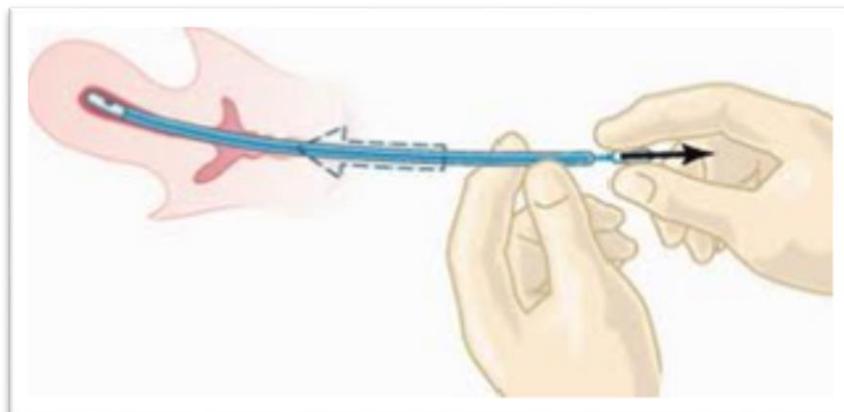


Figura 5: Utilização da Pipelle® para coleta de amostras endometriais

(Fonte: http://mcneilsurgical.com.au/catalogue/index.php?main_page=product_info&cPath=19&products_id=2549)

3.3 Expressão dos genes alvos

O RNA total foi isolado das amostras de biópsias endometriais, com o objetivo de avaliar a expressão dos genes alvos α -inibina, betaglicano e o normalizador S26. Para a extração do RNA total o tecido foi macerado em 1 mL de Trizol® (*Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) e posteriormente foi seguido o protocolo para o reagente Trizol®, sem modificações, como descrito brevemente a seguir. Foram adicionados 200 μ L de clorofórmio gelado a cada tubo com o tecido macerado em 1 ml de Trizol, e os tubos foram invertidos vigorosamente por 45 segundos, e após 2 minutos a temperatura ambiente os tubos foram centrifugados a 12.000 g a 4°C por 15 minutos.

Após a centrifugação o sobrenadante translúcido da primeira fase foi transferido para um novo tubo, evitando-se a transferência de contaminantes. Ao sobrenadante transferido para o novo tubo o RNA total foi precipitado com 800 μ L de Isopropanol gelado, e os tubos foram mantidos a -60°C, por 1 hora. Após o período de precipitação os tubos foram centrifugados a 12.000 g a 4°C por 15 minutos, e o sobrenadante descartado, e o pellet de RNA lavado com etanol 75%. Após a

lavagem com etanol 75%, os tubos foram centrifugados por a 12.000 g a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet de RNA seco a temperatura ambiente por 40 minutos. Em seguida o RNA foi suspenso em 50 µL de água para biologia molecular, livre de DNase e RNase.

Ao término do protocolo o RNA foi quantificado no NanoDrop (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delawa-re, USA*), utilizando-se uma alíquota de 2 µL. Com o objetivo de eliminar uma possível contaminação por DNA genômico, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (1 µg de RNA total para 1 unidade da enzima DNase I) (*Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), e em seguida requantificadas no NanoDrop (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delawa-re, USA*), para em seguida ser realizada a transcrição reversa.

3.4 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*. Os *primers* foram sintetizados pela *Invitrogen*, recebidos liofilizados e, em seguida, dissolvidos em H₂O DEPC, livre de RNase e DNase (*Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), para concentração final de 100 pmol/µL (concentração para estoque).

Foram preparadas alíquotas de 1 pmol/µL (concentração de uso para a PCR em tempo real), no dia da realização da PCR em tempo real. Para o alíquotamento dos *primers* foram empregadas ponteiros com barreira e todo o manuseio foi realizado utilizando-se luvas, gorro e máscara. A localização e sequência dos oligonucleotídeos sintetizados estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR em tempo real para a amplificação específica do cDNA do betaglicano e da α -inibina

<i>Primers</i>	<i>Sequência de Nucleótidos (nt)</i>	<i>Primer tamanho</i>	<i>Amplicon tamanho</i>	<i>GenBank Accession number</i>
S26HS (Sense)	5'- CATTGACCTCACCTTTCACCTGCT -3'	24 nt	96 pb	NM_001029.3
S26HS (anti-sense)	5'- TCGAATATGATGCGGTTCTGCTCG -3'	24 nt		
FwTGFB-R3.Hum (sense)	5'- GGGAAGATCAAGTGTTCCCTCCAA -3'	24 nt	84 pb	NM_003243.3
RevTGFB-R3.Hum (anti-sense)	5'- TGGGTTGAAGGTAAGTACTCAGCAAGGT -3'	24 nt		
FwAlfaINIB.Hum (sense)	5'- ACTGCCACAGAGTAGCACTGAACA -3'	24 nt	87 pb	NM_002191.2
RevAlfaINIB.Hum (anti-sense)	5'- AGTGGAAGATGAAACTGGGAGGGT-3'	24 nt		

A síntese do cDNA foi feita a partir de 1000 ng (1 μ g) de RNA total em 30 μ l de volume da reação final (33,3 ng RNA/ μ L), utilizando-se o kit *SuperScript®III cDNA Synthesis System (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)*, utilizando Oligo dT e random hexamers, e seguindo o protocolo sem modificações. 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, utilizando-se o kit *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 μ L. Em cada poço foram pipetados 82,5 ng de cDNA total (2,5 μ L) de amostra e adicionados posteriormente 17,5 μ L do mix contendo 10 μ L do *Power SYBR Green® PCR Master Mix Kit*, 1,5 μ L de *primer mix* (senso e antissenso) (Tabela 2) (1,5 pmol/cada) e o volume final completado com H₂O 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 em seguida, a placa era encaixada no equipamento de PCR em tempo real para dar-se 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 52°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 50°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.

3.5 Hiperestimulação ovariana controlada

Foi utilizado o protocolo longo e a hiperestimulação ovariana controlada (HOC) conforme protocolo do serviço de reprodução humana do HC-UFMG.

O bloqueio hipofisário foi feito com análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa). O uso de acetato de nafarelina por via intranasal 400 mcg por dia foi iniciado no 21º dia do ciclo anterior, sendo mantido até o dia da administração da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG). A hiperestimulação ovariana foi feita com FSH recombinante (Gonal F ®), 75UI/ampola, via subcutânea (SC), e/ou FSH altamente purificado associado a hormônio luteinizante altamente purificado (Menopur ®) 75 UI/ampola via subcutânea, 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 pelo ultrassom transvaginal (USTV). Antes do início da gonadotrofina, foi realizado um USTV para confirmar o bloqueio hipofisário obtido como o uso do GnRHa baseado na espessura endometrial menor do que 4 mm e ausência de crescimento folicular. Confirmado o bloqueio hipofisário, a HOC foi induzida seguida de monitorização ultrassonográfica seriada a cada dois dias a partir do quinto dia de terapia com FSH e depois diariamente após o diâmetro médio folicular atingir 14mm. O ciclo foi cancelado quando havia menos de três folículos em crescimento. Quando pelo menos um folículo dominante atingia um diâmetro de 18 mm, 250 mcg de hCG recombinante foi administrado

3.6 Aspiração de folículos, fertilização *in vitro*, transferência embrionária e acompanhamento da paciente

A aspiração dos folículos foi feita utilizando uma agulha de aspiração folicular de calibre 17 conectada a uma sonda de ultrassom transvaginal com uma pressão negativa de 100 mm Hg cerca de 36 horas após a injeção do hCG. O líquido folicular foi coletado em tubos de ensaio estéreis, e os oócitos imediatamente identificados com o auxílio de uma lupa em capela de fluxo laminar para manter o ambiente estéril. O número de oócitos coletados foi registrado.

Foi considerada como resposta ovariana inadequada a coleta de quatro ou menos oócitos ou, ainda, o cancelamento do tratamento por crescimento folicular ausente ou insuficiente após o estímulo

ovariano. Uma resposta normal foi a coleta de quatro a dezesseis oócitos. Pacientes foram consideradas como tendo uma resposta exagerada se apresentassem mais de dezesseis oócitos coletados ou quando o ciclo fosse cancelado por alto risco de hiperestímulo ovariano.

O sêmen foi preparado utilizando a técnica swim-up e a inseminação dos oócitos coletados foi realizada por fertilização in vitro simples (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) conforme indicação médica. A fertilização do oócito foi avaliada em um período de 18-20 horas após a inseminação pela confirmação da presença e da localização de dois pró-núcleos. Até quatro embriões foram selecionados para a transferência e os restantes foram deixados em cultivo até o estágio de blastocisto e subsequentemente criopreservados.

Os embriões obtidos foram então transferidos entre o segundo e quinto dia após a fertilização, segundo protocolo do serviço. Foi administrado progesterona por via vaginal na dose de 600mg/dia para suporte de fase lútea desde o dia da transferência de embriões até a confirmação da gravidez com β -hCG sérico duas semanas após a transferência. Se β -hCG positivo, a terapia seria prorrogada por até 8 semanas de gestação. A gravidez clínica foi definida pela presença de batimentos cardíacos embrionários presentes à ultrassonografia transvaginal em torno da sexta semana de gestação. Todas as gestantes foram acompanhadas até o parto.

3.7 Análise estatística

Os dados clínicos estão expressos em mediana e o intervalo interquartil e as medianas de grupo foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney não-paramétrico. Os resultados da PCR foram obtidos como Ct (*Cycle threshold*) e normalizadas para Δ Ct, que é o Ct do gene alvo menos o Ct do gene de referência, S26. A expressão gênica relativa (média \pm SD) foi calculada usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct$ é o Δ Ct do grupo caso menos o Δ Ct do grupo controle (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Comparações entre os grupos foram realizadas utilizando os valores médios de Δ Ct e teste de *Mann-Whitney*. O cálculo do tamanho da amostra indicou que 25 casos e 15 controles permitiriam detectar diferenças de expressão do mRNA, pelo menos 2 vezes entre os dois grupos com poder estatístico de 90% e intervalo de confiança de 95%.

Coeficientes de correlação parcial foram calculados para testar a correlação entre a taxa de implantação e a expressão endometrial de α -inibina e betaglicano. A curva ROC (*Receiver*

operating characteristic), foi calculada para a predição de falha de implantação com seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando SPSS versão 22, e o $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

A expressão gênica relativa de α -inibina em amostras do endométrio de pacientes com subsequente falha de implantação foi significativamente maior do que em mulheres que tiveram gravidez clínica (fold increase = $2,14 \pm 0,32$, $p < 0,05$, Figura 6). A expressão gênica do betaglicano também foi aumentada nas amostras endometriais de mulheres que tiveram falha de implantação, em comparação às que engravidaram (fold increase = $1,44 \pm 0,16$, $p < 0,05$, Figura 7).

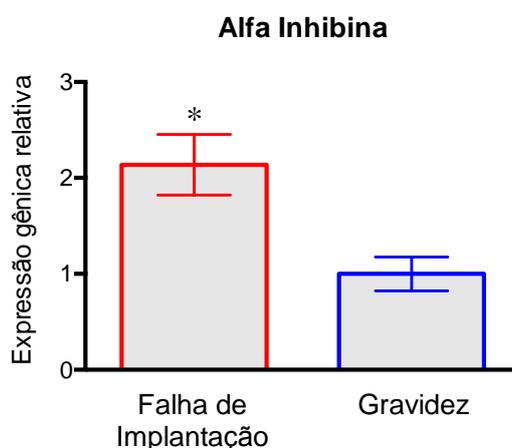


Figura 6: Gráfico da expressão gênica de α -Inibina em amostras endometriais obtidas na fase lútea média do ciclo menstrual anterior ao ciclo de fertilização in vitro com transferência embrionária. Os dados são expressos como *fold change* (\pm SD) da expressão gênica nos casos (falha de implantação, $n = 33$) em relação aos controles (gravidez clínica, $n = 19$). * $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-Test)

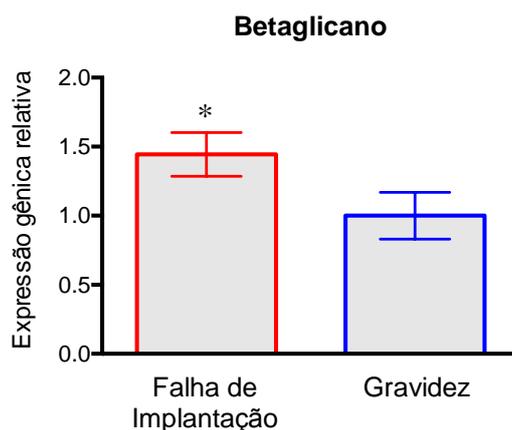


Figura 7: Gráfico da expressão gênica de betaglicano em amostras endometriais obtidas na fase lútea média do ciclo menstrual anterior ao ciclo de fertilização in vitro com transferência embrionária. Os dados são expressos como *fold change* (\pm SD) da expressão gênica nos casos (falha de implantação, $n = 33$) em relação aos controles (gravidez clínica, $n = 19$). * $p < 0,05$ (Mann-Whitney U Test)

A análise de correlação parcial ajustada por idade, tempo de infertilidade, espessura endometrial e níveis de AMH sérico mostrou uma associação independente entre a taxa de implantação e a expressão endometrial de α -inibina ($r = -0,391$, $p = 0,004$) e betaglicano ($r = -0,248$, $p = 0,048$).

Como demonstrado no gráfico da Figura 8, ambos os níveis de expressão gênica de α -inibina e betaglicano foram moderadamente acurados como marcadores de predição da receptividade endometrial. A área sob a curva ROC era de 0,692 para α -inibina (0,551- 0,833 com intervalo de confiança de 95%) e 0,678 para o betaglicano (0,526-0,830 com intervalo de confiança de 95%).

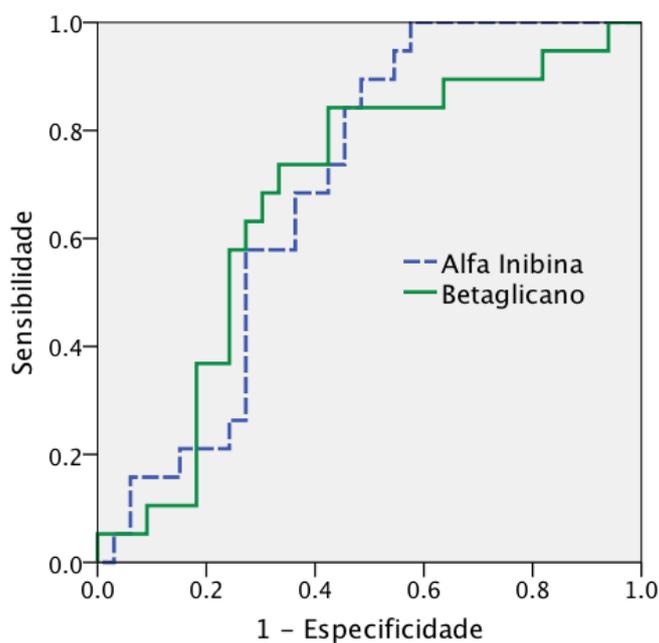


Figura 8: Gráfico da Curva ROC para predição de falha de implantação baseada na expressão endometrial de α -inibina e betaglicano.

5. DISCUSSÃO

Os estágios do processo de implantação do embrião: aposição, adesão e invasão envolvem a sincronização entre um endométrio receptivo e um blastocisto saudável. Uma sequência complexa de eventos de sinalização, com aquisição de moléculas de ligação em conjunto com a perda de componentes inibitórios são cruciais para o estabelecimento da gravidez (ACHACHE e REVEL, 2006).

As amostras de biópsia endometrial podem ser usadas para identificar um grande número de moléculas mediadoras importantes para predizer o sucesso de implantação embrionária, incluindo moléculas de adesão, hormônios, citocinas, fatores de crescimento e outros (SIMON *et al.*, 2000).

Os membros da superfamília de TGF- β são expressos no endométrio e têm um papel importante no processo de implantação (JONES *et al.*, 2006). Uma revisão de Singh (SINGH *et al.*, 2011) indica que os membros da superfamília de TGF- β desempenham um papel importante na implantação em ratos e humanos, e a desregulação de sua expressão e ação podem levar à falha absoluta ou parcial da implantação embrionária. No presente estudo, conduzido para determinar o envolvimento da expressão gênica de α -inibina e betaglicano na implantação embrionária em pacientes após ciclos de FIV, encontramos uma expressão gênica mais elevada de α -inibina e betaglicano no endométrio no mês anterior à estimulação ovariana, o que poderia estar envolvido na falha de implantação.

Os presentes resultados para α -inibina e betaglicano são baseados em uma expressão gênica quantitativa realizada por PCR em Tempo Real. Em 2007, Diedrich *et al.* (2007) propuseram que a expressão gênica seria um melhor indicador para datação endometrial do que a histologia, como Evans *et al.* (2012), que observou a expressão do mRNA com uma estreita correlação com marcadores endócrinos, determinando as fases não receptivas e potencialmente receptivas do endométrio.

Ainda é incerto o motivo pelo qual as pacientes com falha de implantação expressariam mais α -inibina e betaglicano do que o grupo controle. Estas alterações moleculares podem ser causa ou consequência da falha na diferenciação endometrial. Podemos postular que a presença de tais

moléculas poderiam promover um bloqueio dos efeitos positivos da ativina A na decidualização, tornando o endométrio menos receptivo a implantação embrionária.

Embora o desenvolvimento do endométrio em ciclos naturais poderia envolver um padrão diferente na expressão gênica em comparação aos ciclos com estimulação ovariana controlada (STROWITZKI *et al.*, 2006), a avaliação de biomarcadores endometriais pode ser útil para prever uma menor chance de alcançar a gravidez, justificando o insucesso do tratamento e aconselhando pacientes com falha de implantação, já que muitas vezes nos deparamos com situações aparentemente favoráveis a ocorrência de gravidez como endométrio trilaminar ao ultrassom e blastocisto de boa qualidade para transferência após um ciclo de FIV, sem desfecho de gravidez após sucessivas tentativas.

O uso dos marcadores na prática clínica ainda é limitado devido ao custo elevado e a necessidade de outros estudos com números maiores de pacientes, mas os resultados atuais podem abrir um novo caminho na busca de ferramentas farmacológicas para neutralizar os efeitos da α -inibina e do betaglicano no endométrio, aumentando a biodisponibilidade de receptores de ativina, e melhorando assim, a decidualização endometrial e a receptividade para implantação embrionária.

6. CONCLUSÃO

O dados apresentados indicam uma correlação entre uma maior expressão de α -inibina e betaglicano com ausência de gravidez após o processo de fertilização *in vitro*. A sua avaliação poderia ser útil para prever uma menor chance de alcançar a gravidez, correlacionando a maior expressão dessas moléculas com a falha de implantação embrionária.

REFERÊNCIAS

ACHACHE, H.; REVEL, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. **Hum Reprod Update**, v. 12, n. 6, p. 731-46, Nov-Dec 2006. ISSN 1355-4786 (Print) 1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982667> >.

APLIN, J. D. The cell biological basis of human implantation. **Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 14, n. 5, p. 757-64, Oct 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023797> >.

APLIN, J. D. et al. **The Endometrium: Molecular, Cellular and Clinical Perspectives**. CRC Press, 2008. ISBN 041538348X.

BULLETTI, C.; FLAMIGNI, C.; GIACOMUCCI, E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 2, p. 118-136, 1996. ISSN 1355-4786.

CHAPMAN, S. C. et al. Properties of inhibin binding to betaglycan, InhBP/p120 and the activin type II receptors. **Mol Cell Endocrinol**, v. 196, n. 1-2, p. 79-93, Oct 31 2002. ISSN 0303-7207 (Print) 0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12385827> >.

CHEN, Y. G. et al. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 231, n. 5, p. 534-44, May 2006. ISSN 1535-3702 (Print) 1535-3699 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16636301> >.

CIARMELA, P. et al. Expression of betaglycan in pregnant tissues throughout gestation. **Eur J Endocrinol**, v. 149, n. 5, p. 433-7, Nov 2003. ISSN 0804-4643 (Print) 0804-4643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585090> >.

DIEDRICH, K. et al. The role of the endometrium and embryo in human implantation. **Hum Reprod Update**, v. 13, n. 4, p. 365-77, Jul-Aug 2007. ISSN 1355-4786 (Print) 1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548368> >.

EVANS, G. E. et al. Gene expression confirms a potentially receptive endometrium identified by histology in fertile women. **Hum Reprod**, v. 27, n. 9, p. 2747-55, Sep 2012. ISSN 1460-2350 (Electronic) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740499> >.

FLORIO, P. et al. Inhibin alpha-subunit and the inhibin coreceptor betaglycan are downregulated in endometrial carcinoma. **Eur J Endocrinol**, v. 152, n. 2, p. 277-84, Feb 2005. ISSN 0804-4643 (Print) 0804-4643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15745937> >.

FLORIO, P. et al. Activins and related proteins in the establishment of pregnancy. **Reprod Sci**, v. 17, n. 4, p. 320-30, Apr 2010. ISSN 1933-7205 (Electronic) 1933-7191 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228378> >.

GELLERSEN, B.; BROSENS, I. A.; BROSENS, J. J. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. **Semin Reprod Med**, v. 25, n. 6, p. 445-53, Nov 2007. ISSN 1526-8004 (Print) 1526-4564 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17960529> >.

HENRIET, P.; GAIDE CHEVRONNAY, H. P.; MARBAIX, E. The endocrine and paracrine control of menstruation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 358, n. 2, p. 197-207, Jul 25 2012. ISSN 1872-8057 (Electronic) 0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21820486> >.

JONES, R. L. et al. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 217-32, Aug 2006. ISSN 1470-1626 (Print) 1470-1626 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16885531> >.

KELLY, R. W.; KING, A. E.; CRITCHLEY, H. Cytokine control in human endometrium. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 3-19, 2001. ISSN 1470-1626.

- LESSEY, B. A. Assessment of endometrial receptivity. **Fertil Steril**, v. 96, n. 3, p. 522-9, Sep 2011. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880273> >.
- LEWIS, K. A. et al. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. **Nature**, v. 404, n. 6776, p. 411-414, 2000. ISSN 0028-0836.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. ISSN 1046-2023.
- LUIZI, S. et al. Expression and secretion of activin A: possible physiological and clinical implications. **European journal of endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 225-236, 2001. ISSN 0804-4643.
- MAKANJI, Y. et al. Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review. **Endocr Rev**, v. 35, n. 5, p. 747-94, Oct 2014. ISSN 1945-7189 (Electronic) 0163-769X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25051334> >.
- MYLONAS, I. et al. Immunohistochemical expression of inhibin-alpha in human endometrium and the in vitro secretion of inhibin, estradiol and cortisol in cultured human endometrial glandular cells. **Arch Gynecol Obstet**, v. 268, n. 3, p. 142-50, Aug 2003. ISSN 0932-0067 (Print) 0932-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12883824> >.
- REFAAT, B. Role of activins in embryo implantation and diagnosis of ectopic pregnancy: a review. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 116, 2014. ISSN 1477-7827 (Electronic) 1477-7827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25421645> >.
- REZENDE, C. P. et al. Serum antimüllerian hormone measurements with second generation assay at two distinct menstrual cycle phases for prediction of cycle cancellation, pregnancy and live birth after in vitro fertilization. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 31, n. 10, p. 1303-1310, 2014. ISSN 1058-0468.
- SALAMONSEN, L. A. et al. Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2009. Preparing fertile soil: the importance of endometrial receptivity. **Reprod Fertil Dev**, v. 21, n. 7, p. 923-34, 2009. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19698296> >.
- SIMON, C.; MARTIN, J. C.; PELLICER, A. Paracrine regulators of implantation. **Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 14, n. 5, p. 815-26, Oct 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023802> >.
- SINGH, M.; CHAUDHRY, P.; ASSELIN, E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. **J Endocrinol**, v. 210, n. 1, p. 5-14, Jul 2011. ISSN 1479-6805 (Electronic) 0022-0795 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372150> >.
- STROWITZKI, T. et al. The human endometrium as a fertility-determining factor. **Human reproduction update**, v. 12, n. 5, p. 617-630, 2006. ISSN 1355-4786.
- TSUCHIDA, K. et al. Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. **Cell Commun Signal**, v. 7, n. 15, p. 10.1186, 2009.
- WORBS, S. et al. Expression of the inhibin/activin subunits (-alpha, -betaA and -betaB) in normal and carcinogenic endometrial tissue: possible immunohistochemical differentiation markers. **Oncol Rep**, v. 17, n. 1, p. 97-104, Jan 2007. ISSN 1021-335X (Print) 1021-335X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143484> >.

ANEXOS

Anexo 1: Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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 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, durante a realização do exame denominado histerossonografia, será coletado fluido e tecido endometrial. As 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. BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Este estudo trará informações importantes que poderão ter aplicação direta na terapêutica. O melhor conhecimento 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. A única intervenção realizada será a coleta de fluido e tecido 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 endometriais 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 fluido e tecido endometrial.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu,....., voluntariamente concordo que seja coletada amostra de 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:

Prof. Fernando M. Reis: (31) 3409 -9485

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 espermatozoide 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 informado em detalhes sobre nossos direitos e responsabilidades e, não havendo dúvidas, dataram e assinaram como segue:

CASAL: _____

MÉDICOS: _____

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____

Anexo 2: Parecer de aprovação do COEP



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

Anexo 3: Parecer de aprovação do COEP para pedido de extensão

Belo Horizonte, 29 de novembro de 2012.

Ref: 666/07

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

Ao Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Federal de Minas Gerais
a/c Prof. Antônio Lúcio Teixeira Jr., Vice- Presidente

Prezados Senhores,

Esta carta tem os seguintes objetivos:

- 1- Apresentar um breve relatório parcial do projeto
- 2- Solicitar a extensão do seu prazo de conclusão, com a devida justificativa
- 3- Solicitar emenda ao projeto original, com a devida justificativa

1. RELATÓRIO PARCIAL

O projeto de pesquisa intitulado *Fatores prognósticos em terapia de reprodução assistida: hormônio anti-mülleriano e secreção endometrial de urocortina* foi aprovado pelo COEP-UFMG em 07/03/2008 e foi iniciado logo após a aprovação. No período de junho/2008 a setembro/2010 foram selecionadas 146 participantes, das quais 11 foram excluídas do estudo com base nos critérios de exclusão previamente estabelecidos. Cinco pacientes foram excluídas do estudo durante o curso do tratamento de fertilização assistida, por não terem apresentado o bloqueio hormonal esperado na primeira fase do tratamento, conforme o protocolo assistencial de rotina. O grupo estudado incluiu um total de 135 pacientes que iniciaram e concluíram o tratamento adequadamente. Esse total foi dividido em dois grupos, para efeito de análise estatística, de acordo com a ocorrência ou não de gravidez clínica, definida pela presença de batimentos cardíaco-fetais à ultrassonografia transvaginal realizada em torno da sexta semana de gestação.

No mês anterior ao tratamento, as participantes foram submetidas aos seguintes procedimentos, como parte do protocolo de pesquisa: a) contagem de folículos antrais no terceiro dia do ciclo menstrual por ultrassonografia (n=135); b) dosagens de hormônio anti-mulleriano no sangue periférico obtido no terceiro e no 18º dias do ciclo menstrual (n=135); dosagem de urocortina no lavado endometrial obtido entre o 18º e 20º dias do ciclo menstrual (n=102); quantificação da expressão gênica de urocortina e dos receptores CRH-R1 e CRH-R2 em amostras endometriais colhidas entre o 18º e o 20º dias do ciclo menstrual (n = 55).

Os resultados parciais foram obtidos, analisados e publicados na forma de tese de doutorado e resumo submetido para apresentação em congresso internacional ao longo do ano de 2012. O primeiro artigo completo está em fase de redação para ser submetido a um periódico internacional. Até a presente fase do projeto, os resultados podem ser assim resumidos: a) a taxa de gravidez global foi de 21,5%. b) não houve diferença significativa da idade, dose de gonadotrofinas utilizada, contagem de folículos antrais e espessura endometrial ($p>0,05$) entre as pacientes que não engravidaram e as que engravidaram. c) as concentrações séricas de hormônio anti-mulleriano no terceiro dia ($p=0,006$) e no 18º – 20º dias do ciclo ($p=0,001$) foram

significativamente maiores nas pacientes que engravidaram. Não houve diferença significativa entre as duas dosagens hormonais da mesma paciente. A concentração de hormônio anti-mulleriano igual ou superior a 1,15 ng/ml foi preditiva da ocorrência de gravidez com sensibilidade de 62% e especificidade de 70%. d) a expressão gênica de urocortina foi 20% maior nas amostras endometriais de mulheres que engravidaram, mas a dosagem de urocortina no lavado endometrial não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,688$). e) não se observaram diferenças quanto à expressão gênica dos receptores CRH-R1 e CRH-R2 nas amostras endometriais de mulheres que engravidaram comparadas àquelas que não engravidaram.

2. SOLICITAÇÃO DE EXTENSÃO DO PRAZO

Solicitamos a extensão do prazo de conclusão do projeto até 31/12/2013 para que sejam realizadas novas análises de expressão gênica (RNA mensageiro e proteína correspondente) nas amostras endometriais obtidas durante a fase clínica do projeto. O novo prazo solicitado será destinado a complementar as análises laboratoriais de amostras obtidas na primeira fase do projeto. Não será necessário obter mais nenhuma informação adicional sobre as pacientes e nem coletar novas amostras.

3. SOLICITAÇÃO DE EMENDA

Nesta emenda, pretendemos complementar o estudo da urocortina e dos receptores CRH-1 e CRH-2 com a pesquisa de um outro marcador potencial de receptividade do endométrio, a ativina A. Trata-se de uma proteína produzida durante a diferenciação do endométrio na fase secretora e que tem ação local no endométrio, favorecendo sua conversão em decidua e sua capacidade de interagir com o embrião durante o processo de implantação embrionária e a primeira fase da gravidez (revisão completa em Florio et al., *Reprod Sci.* 2010;17:320-330). As análises complementares serão: nova extração de RNA dos tecidos congelados, síntese de cDNA, amplificação de sequências alvo por PCR em tempo real, extração de proteínas e processamento por ELISA e/ou Western blot. Acreditamos que a informação advinda desta nova análise laboratorial, acrescida aos dados obtidos com a urocortina, nos permita concluir o projeto com dados mais consistentes e significativos que, esperamos, venham a contribuir para o aprimoramento da assistência a casais inférteis.

Atenciosamente,



Prof. Fernando Marcos dos Reis
Departamento de Ginecologia e Obstetria
Faculdade de Medicina - UFMG