



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Laura Diniz Vagnini

**Influência dos Polimorfismos TP53
(rs1625895), TP73 (rs3765730), MMP9 (rs17576)
e MTHFR (rs868014) na Classificação da
Reserva Ovariana em Pacientes Inférteis.**

**São José do Rio Preto
2019**

Laura Diniz Vagnini

**Influência dos Polimorfismos TP53 (rs1625895),
TP73 (rs3765730), MMP9 (rs17576) e MTHFR
(rs868014) na Classificação da Reserva Ovariana
em Pacientes Inférteis.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso
de Pós-graduação em Ciências da Saúde,
Eixo Temático: Medicina e Ciências
Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Antônio Hélio Oliani

Coorientador: Prof. Dr. José Gonçalves Franco Jr.

São José do Rio Preto
2019

Vagnini, Laura Diniz

Influência dos polimorfismos TP53 (rs1625895), TP73 (rs3765730), MMP9 (rs17576) e MTHFR (rs868014) na classificação da reserva ovariana em pacientes inférteis.

São José do Rio Preto, 2019

44 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Antônio Hélio Oliani

Coorientador: Prof. Dr. José Gonçalves Franco Júnior

1. Reserva Ovariana; 2. Hormônio Anti-Mulleriano; 3. Contagem de Folículos Antrais; 4. Polimorfismos de Nucleotídeo Único; 5. Reprodução Assistida; 6. Fertilização *in vitro*/Intracytoplasmic Sperm Injection.

Laura Diniz Vagnini

**Influência dos Polimorfismos TP53 (rs1625895),
TP73 (rs3765730), MMP9 (rs17576) e MTHFR
(rs868014) na Classificação da Reserva Ovariana
em Pacientes Inférteis.**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Antônio Hélio Oliani

Coorientador: Prof. Dr. José Gonçalves Franco Júnior

2º Examinador: Profa. Dra. Cinara de Cassia Brandao de Mattos

3º Examinador: Dra. Adriana Renzi

1º Suplente: Profa. Dra. Denise Cristina Mos Vaz Oliani

2º Suplente: Dr. João Batista Alcântara Oliveira

São José do Rio Preto, 31/07/2019.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas	vi
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
1. Introdução.....	01
1.1. Objetivo.....	05
2. Casuística e Métodos.....	06
3. Resultados.....	19
4. Discussão.....	25
5. Conclusões.....	29
6. Referências Bibliográficas.....	30
7. Anexos	
Anexo I: Ficha de Anamnese.....	39
Anexo II: Ficha clínica.....	40
Anexo III. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa –CRSM.....	41
Anexo IV. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – FAMERP.....	42
Anexo V. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	43

*Ao meu esposo Jefferson,
pelo amor e cuidado.*

*Aos meus filhos Matheus e Lorena,
pelo incentivo e compreensão.*

*E à minha mãe,
pelo exemplo de dedicação e luta.*

Agradecimentos

A Deus, pela oportunidade de ver pelos olhos da ciência.

À minha mãe, Maria Helena pelo amor incondicional.

Ao meu marido, Jefferson por sempre estar ao meu lado, aconselhando e motivando a conclusão desse trabalho.

Aos meus filhos, Matheus e Lorena por torcerem por mim e serem minha grande inspiração.

À minha cunhada, Suzimeire que me incentivou a fazer o mestrado.

À Adriana pelas sugestões e análise crítica do texto.

Ao Dr. João Batista pelas sugestões na análise estatística.

Ao meu chefe, Prof. Dr. Franco Jr., um entusiasta da ciência, pelas oportunidades que me deu durante toda minha carreira profissional, minha eterna gratidão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hélio Oliani, por sua capacidade em agregar pessoas interessadas na evolução da ciência, o meu eterno agradecimento pela confiança e amizade.

“Se eu vi longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

Lista de Figuras

Figura 1: Avaliação ecográfica dos ovários.....07

Figura 2: Representação esquemática da reação ELISA09

Figura 3: Representação esquemática da extração de DNA.....11

Figura 4: Representação esquemática da localização dos SNPs estudados:
TP53/rs1625895 (4a), TP73/rs3765730 (4b), MMP9/rs17576 (4c) e MTHFR/rs868014
(4d). Fonte: *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI).....12

Lista de Tabelas

Tabela 1: Descrição dos genes e SNPs incluídos no estudo	10
Tabela 2. Caracterização da população	20
Tabela 3. Distribuição da frequência dos genótipos e alelos nos grupos reserva ovariana baixa e reserva ovariana normal	21
Tabela 4. Genótipo X chance de apresentar reserva ovariana baixa	23
Tabela 5. Associação entre os polimorfismos TP53 (rs1625895) e TP73 (rs3765730) na predição da reserva ovariana baixa	24

Lista de Abreviaturas

%	Porcentagem
AMH	Do inglês <i>Anti-Mullerian Hormone</i>
BMP15	Do inglês <i>Bone morphogenetic proteins factor 15</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CRH	Centro de Reprodução Humana – Prof. Franco Jr
CFA	Contagem de Folículos Antrais
CPDP	Centro Paulista de Diagnóstico, Pesquisa e Treinamento
CYP19	Do inglês <i>Cytochrome P450 Family 19</i>
DNA	Do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
ELISA	Do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio de imunoabsorção enzimática
ESR1	Do inglês <i>Estrogen Receptor 1</i>
ESR2	Do inglês <i>Estrogen Receptor 2</i>
FAMERP	Faculdade de Medicina de Rio Preto
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSHR	Do inglês <i>Follicle Stimulating Hormone Receptor</i>
Gen II	Segunda geração
HAM	Hormônio Anti-Mulleriano
IC	Intervalo de confiança
ICSI	Do inglês <i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i> - Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides
IMC	Índice de massa corpórea
IMR	Instituto de Medicina Reprodutiva e Fetal
MMP9	Do inglês <i>Matrix Metalloproteinase 9</i>
MTHFR	Do inglês <i>Methylenetetrahydrofolate Reductase</i>
MAF	Frequência do alelo menos comum
mL	Mililitro
NCBI	Do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ng	Nanograma
NGS	Do inglês <i>Next-Generation Sequencing</i> - Sequenciamento de Nova

	Geração
ORPI	Do inglês <i>Ovarian Response Prediction Index</i> - Índice Predição da Reserva Ovariana
PCR	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
r-hFSH	Do inglês <i>Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone</i> - Hormônio Foliculo Estimulante Recombinante Humano
RB	Reserva ovariana baixa
RN	Reserva ovariana normal
SHO	Síndrome de Hiperestimulação Ovariana
SNPs	Do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> - Polimorfismos de nucleotídeo único
TP53	Do inglês <i>Tumor Protein p53</i>
TP73	Do inglês <i>Tumor Protein p73</i>
μL	Microlitro

Resumo

Introdução: Dentre os vários desafios a serem superados pelos médicos e pacientes nos tratamentos de FIV/ICSI podemos destacar a alta variabilidade e dificuldade em prever a resposta ovariana, após o uso das gonadotrofinas em diferentes protocolos de estimulação. Os critérios idade, dosagem do hormônio anti-mulleriano (HAM) e contagem de folículos antrais (CFA) vêm sendo empregados com a finalidade de ajudar os médicos na individualização dos protocolos de estimulação ovariana em ciclos de reprodução assistida. Embora esses parâmetros sejam largamente utilizados para prever a reserva ovariana, muitas vezes não se tem um valor preditivo significativo. Essa variabilidade pode ser devida às predisposições genéticas dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). **Objetivo:** Verificar a influência dos polimorfismos TP53 (rs1625895), TP73 (rs3765730), MMP9 (rs17576) e MTHFR (rs868014) na classificação da reserva ovariana em pacientes inférteis. **Casuística e Métodos:** Um estudo de coorte foi conduzido em 145 mulheres inférteis que procuraram os Centros de Reprodução Assistida envolvidos. Os critérios de inclusão foram: idade ≤ 37 anos, ciclo menstrual regular, a presença dos dois ovários avaliados pelo ultrassom, sem história de cirurgia ovariana, sem história de endometriose e sem hidrossalpinge, infecções ou problemas endócrinos. Amostra de sangue periférico de cada paciente foi usada na determinação do hormônio anti-mulleriano utilizando-se o kit da Beckman Coulter Inc (GenII) e na obtenção do DNA genômico para genotipagem dos polimorfismos TP53 T>C (rs1625895), TP73 G>A (rs3765730), MMP9 Gln>Arg (rs17576) e MTHFR A>G (rs868014) através da técnica de PCR em tempo real. A contagem de folículos antrais foi realizada por meio da ultrassonografia transvaginal. Para a comparação das variáveis categóricas foi utilizado o teste exato de Fisher. Para comparação das variáveis

contínuas com distribuição normal foi utilizado o teste *t*-Student e para àquelas que não tinham distribuição normal foi utilizado o teste Mann-Whitney. Além disso, a análise de razão de chance (odds ratio) foi utilizada para determinar a associação de cada polimorfismo na predição da reserva ovariana baixa. O valor alfa adotado foi 5%.

Resultados: Foram compostos 02 grupos através das diferentes dosagens do HAM e CFA: 86 mulheres foram caracterizadas como sendo Reserva ovariana Baixa (RB) (HAM <1ng/mL + CFA ≤9) e 59 como Reserva ovariana Normal (RN) (HAM >2ng/mL + CFA ≥15). A partir dessa classificação, comparamos os dois grupos (RB X RN) em relação aos genótipos de cada polimorfismo estudado. As mulheres caracterizadas como reserva ovariana baixa apresentaram uma incidência maior dos seguintes genótipos: TP53-T/T; TP73-G/G; MMP9-Gln/Gln e MTHFR-AA. **Conclusões:** A presença dos genótipos TP53-T/T, TP73-G/G, MMP9-Gln/Gln e MTHFR-AA aumenta, respectivamente, em 3,5 / 2,5 / 3,0 e 3,6 vezes a chance da mulher apresentar RB. Adicionalmente, a associação dos genótipos TP53-T/T+TP73-G/G aumenta em 4,7 vezes a chance da mulher apresentar RB. Portanto, esses polimorfismos podem ser utilizados como uma ferramenta adicional para classificar a reserva ovariana.

Palavras-chave: 1. Reserva Ovariana; 2. Hormônio Anti-Mulleriano; 3. Contagem de Folículos Antrais; 4. Polimorfismos de Nucleotídeo Único; 5. Reprodução Assistida; 6. Fertilização *in vitro*/Intracytoplasmic Sperm Injection.

Abstract

Introduction: Among all the challenges to be overcome by physicians and patients in IVF/ICSI treatments, we can highlight the high variability and the difficulty in predicting the ovarian response after the use of gonadotrophins in different stimulation protocols. The criteria such as age, anti-müllerian hormone (AMH) and antral follicle count (AFC) had been employed to assist physicians in the individualization of ovarian stimulation protocols for assisted reproduction cycles. Although these parameters are widely used to predict ovarian reserve, we often do not have a significant predictive value. This variability may be due to genetic predispositions of single nucleotide polymorphisms (SNPs). **Objective:** To investigate the influence of TP53 (rs1625895), TP73 (rs3765730), MMP9 (rs17576) e MTHFR (rs868014) polymorphisms in the classification of ovarian reserve in infertile patients. **Casuistics and Method:** A cross-sectional study was carried out in 145 infertile women who underwent infertility evaluation in the Assisted Reproduction Centers involved. All of the recruited women met the following inclusion criteria: age ≤ 37 years, body mass index between 20-30 kg/m², regular menstrual cycle, ultrasound evidence of the two ovaries and no ovarian surgery, no endometriosis, no hydrosalpinx, infections or endocrine problems. Peripheral blood sample from each patient was used to measure anti-Müllerian hormone using the Beckman Coulter Inc (GenII) kit and to genotype the TP53T>C (rs1625895), TP73G> A (rs3765730), MMP9Gln>Arg (rs17576) and MTHFR A>G (rs868014) polymorphisms. The antral follicle count was performed by transvaginal ultrasonography. Fisher's exact test was used to compare the categorical variables. For the comparison of continuous variables with normal distribution, the Student's t test was used and for those without normal distribution, the Mann-Whitney

test was used. In addition, odds ratio analysis was used to determine the association of each polymorphism in the prediction of low ovarian reserve. The alpha value adopted was 5%. **Results:** Two groups were selected by different dosages of AMH and AFC: 86 women were characterized as being low ovarian reserve (LOR) (AMH <1ng/mL + AFC ≤9) and 59 as normal ovarian reserve (NOR) (AMH >2ng/mL + AFC ≥15). After this classification, we compared the two groups (LOR X NOR) in relation to the genotypes of each polymorphism studied. Women characterized as LOR presented higher incidence of the following genotypes: TP53-T/T; TP73-G/G; MMP9-Gln/Gln and MTHFR-A/A. **Conclusions:** The presence of the TP53-T/T, TP73-G/G, MMP9-Gln/Gln and MTHFR-A/A genotypes increases, respectively in 3.5 / 2.5 / 3.0 / 3.6-fold in the chance of the woman presenting LOR. In addition, the association of the TP53-T/T + TP73-G/G genotypes increases in 4.7-fold the chance of the woman presenting LOR. Therefore, these polymorphisms can be used as an additional tool to classify the ovarian reserve.

Keywords: 1. Ovarian Reserve; 2. Anti-Müllerian Hormone; 3. Antral Follicle count; 4. Single Nucleotide Polymorphisms; 5. Assisted Reproduction; 6. *In vitro* Fertilization/Intracytoplasmic Sperm Injection.

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Tem sido bem documentado que a resposta ovariana à estimulação com gonadotrofinas é variável e imprevisível.⁽¹⁾ Essa variabilidade na resposta representa um dos desafios para assegurar a eficácia e a segurança nos tratamentos de FIV. Algumas mulheres apresentam resposta aumentada com uma dose mínima de hormônio folículo estimulante recombinante humano (r-hFSH) favorecendo o desenvolvimento da Síndrome de Hiperestimulação Ovariana (SHO), enquanto outras mulheres apresentam baixa resposta resultando em uma diminuição do número de oócitos maduros impossibilitando a formação de um embrião viável, levando ao cancelamento do ciclo.⁽²⁾

Ambas situações implicam em repetições do ciclo de estimulação durante o tratamento de FIV podendo trazer desconforto e risco às pacientes, além de uma diminuição nas chances de obter uma gravidez. Métodos alternativos de estimulação ovariana estão sendo desenvolvidos para que o manejo de pacientes com SHO ou de pacientes que respondem mal à estimulação seja mais assertivo facilitando o nascimento de uma criança saudável com o menor número de ciclos de estimulação.⁽³⁾

É sabido que o uso isolado da idade como fator preditivo da reserva ovariana, bem como da resposta aos ciclos de FIV/ICSI não é eficiente.⁽⁴⁾ Na grande maioria, o número e a qualidade dos oócitos diminuem com a idade, mas há mulheres de uma mesma faixa etária que apresentam potencial reprodutivo totalmente diferente. O padrão de depleção folicular, bem como os fatores que estão envolvidos no mecanismo de redução do número e qualidade dos oócitos permanecem não esclarecidos.⁽⁵⁾

Além da idade, vários fatores tem sido utilizados para prever a reserva ovariana.^(6,7) Dentre esses marcadores podemos destacar a dosagem do hormônio anti-mulleriano (HAM) e a contagem dos folículos antrais (AFC).⁽⁶⁻¹⁵⁾

O HAM é uma proteína produzida pelas células da granulosa que circundam os folículos pré-antrais e antrais de tamanho pequeno e sua dosagem em amostra de sangue periférico reflete o tamanho do pool desses folículos.^(16,17) É uma maneira indireta de prever a capacidade reprodutiva. Vários estudos demonstraram que o HAM diminui com a idade e tem uma boa correlação com a resposta ovariana.⁽¹⁸⁾ Embora haja relatos na literatura que o HAM se mantém estável durante o ciclo menstrual,⁽¹⁹⁾ há pesquisas que mostram que a dosagem do AMH em pacientes com Síndrome do ovário policístico devem ser feitas na fase folicular, sem a influência do FSH exógeno.⁽²⁰⁾ Estudos demonstram que variação pré-analítica faz com que o uso isolado do HAM seja considerado ineficiente na determinação da reserva ovariana.^(21,22)

A contagem de folículos antrais (CFA) é determinada através da avaliação ultrassonográfica transvaginal durante a fase folicular. A CFA consiste na soma dos folículos <10 mm em ambos ovários. Apesar do potencial desse marcador em prever a reserva ovariana, há fatores que interferem na classificação correta do tamanho dos folículos antrais podendo levar a erros na CFA, são eles, pacientes com IMC elevado, variação significativa do tamanho dos folículos durante o ciclo menstrual, variabilidade entre a tecnologia 2D e 3D e observador dependente.⁽²³⁻²⁷⁾

Um estudo foi realizado para determinar um índice para prever a resposta ovariana (ORPI – *ovarian response prediction index*). O valor do ORPI foi calculado multiplicando o valor do HAM (ng/mL) pelo número de folículos antrais (2-9mm) e o resultado foi dividido pela idade (anos) da paciente. Embora evidências indicam que esse índice aumente as chances de classificar corretamente as pacientes, ainda não há um consenso em relação ao uso do ORPI para prever a resposta ovariana.⁽²⁸⁾

Polimorfismos em vários genes tem sido estudados para se determinar marcadores genéticos que possam prever a reserva ovariana.⁽²⁹⁻³⁵⁾

Aproveitando o potencial da farmacogenética, no qual variações nos genótipos em determinados genes podem estar associadas à resposta ao medicamento utilizado nos ciclos de estimulação ovariana, vários estudos vem sendo realizados para se determinar o poder desses marcadores genéticos. Polimorfismos nos genes *Estrogen Receptor 1* (ESR1), *Estrogen Receptor 2* (ESR2), *Cytochrome P450 Family 19* (CYP19), *Bone Morphogenetic Proteins Factor 15* (BMP15), *Anti-Mullerian Hormone Receptor* (AMHR) e *Follicle Stimulating Hormone Receptor* (FSHR) tem sido estudados como preditor da resposta ovariana.⁽³⁵⁻³⁸⁾

Uma metanálise sugere que polimorfismos no gene FSHR possam ser usados como preditores da baixa resposta ovariana.⁽³⁹⁾ Entretanto, há estudos em diferentes etnias que não observaram essa correlação.^(40,41,42) Uma pesquisa demonstrou que na população brasileira o polimorfismo (rs4648551, A>G) no gene TP73 está associado com a diminuição da reserva ovariana.⁽⁴³⁾ Essas observações contraditórias e isoladas sugerem que é necessário mais pesquisas a fim de se estabelecer o uso de polimorfismos como preditores da reserva ovariana.

Todos esses marcadores utilizados de maneira isolada apresentam uma acurácia modesta em prever os extremos da resposta ovariana. Para alcançar o sucesso no tratamento de FIV/ICSI há a necessidade de individualizar e otimizar os protocolos de estimulação nos ciclos de reprodução assistida a fim de reduzir os riscos tanto da hiperestimulação ovariana como também da baixa resposta ovariana.

Foi demonstrado que 10% dos casais que abandonam os programas de FIV tem como causa principal a inadequada resposta à estimulação ovariana.⁽⁴⁴⁾ Portanto, se faz

necessária a correlação da reserva ovariana com os parâmetros acima citados a fim de se estabelecer um perfil com potencial fator prognóstico para predizer a estimulação ovariana fornecendo aos médicos ferramentas para auxiliar nos tratamentos de FIV/ICSI. Considerando que diferentes protocolos de estimulação ovariana tem sido utilizados para induzir o crescimento do número de folículos aumentando com isso o número de oócitos viáveis, predizer corretamente a resposta ovariana em cada paciente é essencial para o sucesso nos tratamentos de reprodução assistida.

A correta avaliação da reserva ovariana pode ajudar os médicos a ajustar a dose da medicação nos ciclos de FIV/ICSI reduzindo assim seus efeitos adversos. No entanto, a reserva ovariana é um fenômeno clínico complexo, influenciado não apenas pela idade, mas também pelas variáveis ambientais e genéticas. Estudos farmacogenéticos e genômicos conduzirá a uma era em que a sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA) de um indivíduo será considerada determinante para qualquer terapia medicamentosa.

Os membros da família p53 (TP53, TP63 e TP73), são fatores de transcrição poderosos e pequenas variações em sua estrutura de DNA podem modificar os padrões de expressão desses genes. O gene *Tumor Protein* p53 (TP53) está envolvido no processo de implantação embrionária e na manutenção da integridade das células germinativas, mas ainda não há estudos mostrando sua influência na função ovariana. O gene *Tumor Protein* p73 (TP73) controla o fuso meiótico e está envolvido na resposta celular ao estresse e desenvolvimento. Embora estudos em animais demonstrem que alterações nesse gene podem levar a redução do pool folicular e a um aumento de oócitos com defeito no fuso,⁽⁴⁵⁾ há poucos estudos em humanos demonstrando essa correlação.⁽⁴⁶⁾

O sistema da matriz metaloproteinase (MMP) regula as mudanças que ocorrem na arquitetura extracelular ovariana e uterina. Esse sistema atua para controlar os processos de remodelação do tecido conjuntivo e é composto por um componente proteolítico, as MMPs e um componente regulador, os inibidores das metaloproteinases.⁽⁴⁷⁾ O gene *Matrix Metalloproteinase 9* (MMP9) é expresso somente nas células da granulosa e estudos indicam que esse gene está envolvido em diferentes estágios da reprodução feminina, como ciclo menstrual, ovulação, implantação e parto.⁽⁴⁸⁾ Apesar do seu papel na reprodução feminina, pouco se sabe sobre sua influência na reserva ovariana.

A enzima MTHFR está presente em oócitos humanos e em embriões no estágio de pré-implantação. Evidências mostram que polimorfismos no gene MTHFR está associado a altos níveis basais de FSH e pode ser um determinante da resposta à estimulação ovariana, sugerindo que esse polimorfismo seria o modulador da foliculogênese.⁽⁴⁹⁾

Devido a relevância desses genes na reprodução humana, a investigação de possíveis SNPs capazes de prever a reserva ovariana tem um papel importante na busca de marcadores que possam assegurar a eficácia e a segurança nos tratamentos de FIV/ICSI.

1.1. OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi verificar a influência dos polimorfismos TP53 (rs1625895), TP73 (rs3765730), MMP9 (rs17576) e MTHFR (rs868014) na classificação da reserva ovariana em pacientes inférteis.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1 Sujeitos

O estudo de coorte foi conduzido entre 2017 e 2018 com 145 mulheres brasileiras em tratamento de FIV/ICSI nos três centros colaboradores dessa pesquisa: Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Rio Preto (FAMERP), Centro de Reprodução Humana – Prof. Franco Jr (CRH) e Instituto de Medicina Reprodutiva e Fetal (IMR). A dosagem do HAM e a genotipagem dos SNPs de todas as pacientes foram realizadas no Centro Paulista de Diagnóstico, Pesquisa e Treinamento (CPDP). A CFA foi feita nos respectivos centros colaboradores.

Todas as 145 mulheres incluídas no grupo de estudo seguiram os seguintes critérios de inclusão: idade ≤ 37 anos, ciclo menstrual regular, presença de ambos ovários avaliado pelo ultrassom, sem história de cirurgia ovariana, endometriose, hidrossalpinge, infecções ou problemas endócrinos.

2.2 Gerenciamento dos dados coletados

Os participantes da pesquisa tiveram seus dados coletados pelo médico durante a consulta nas clínicas de reprodução humana através da anamnese e preenchimento da ficha clínica (Anexo I e II). Todos esses dados foram posteriormente transferidos para uma planilha de excel. O anonimato foi mantido utilizando o número de registro gerado no cadastro da paciente para sua identificação. Nessa mesma planilha, foram inseridos os resultados de todos os exames avaliados nessa pesquisa, portanto, tivemos todos os dados de cada paciente em um único banco de dados onde foi obtido as variáveis para as análises estatísticas. Foi realizado backup semanalmente de todos computadores das clínicas participantes do estudo para segurança dos dados.

2.3 Análise das Imagens Ultrassonográficas

O exame ecográfico é um exame rotineiro para as pacientes que se submetem a programas de FIV/ICSI e foi realizado no centro o qual a paciente fez o procedimento de fertilização. As pacientes foram submetidas a ultrassonografia transvaginal durante a fase folicular em ciclos prévio a FIV/ICSI. O marcador ultrassonográfico utilizado nesse estudo foi a contagem de folículos antrais (CFA). O número total de folículos antrais medindo entre 2-9mm, em ambos ovários, foi utilizado para classificar essas pacientes. As imagens (Figura 1) foram analisadas pelo médico ultrassonografista com experiência em medicina reprodutiva para que os critérios de avaliação fossem idênticos nos três Centros de Reprodução Assistida participantes.

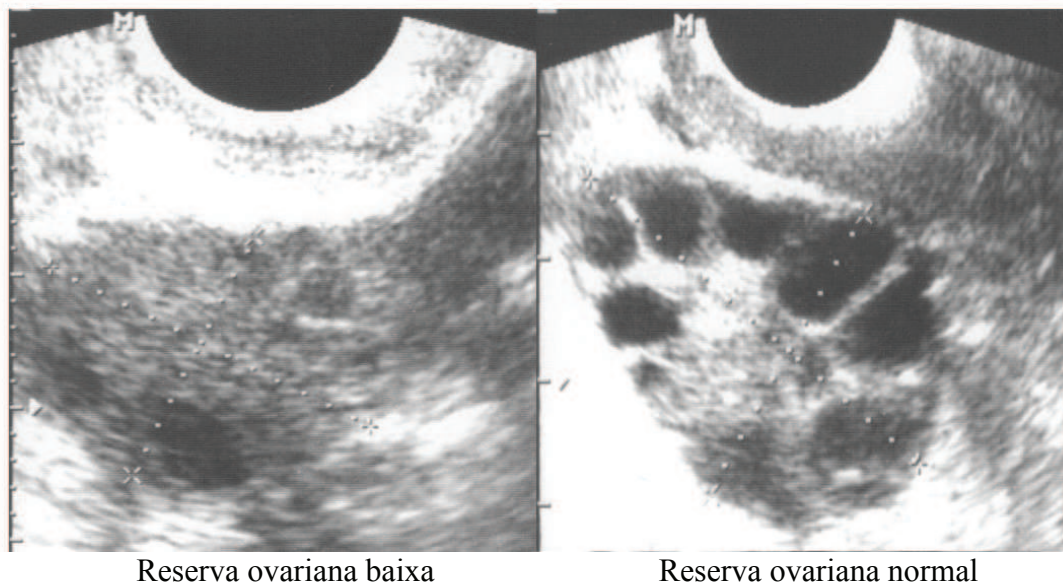


Figura 1. Avaliação ecográfica dos ovários.

2.4 Análise laboratorial

A coleta de sangue periférico para dosagem do HAM e genotipagem dos SNPs foi realizada pela enfermagem nos três Centros de Reprodução Assistida participantes do

estudo. Foram coletados 02 tubos de cada paciente (01 SST™ Ref 360060 e 01 K2EDTA Ref 360057). A dosagem do HAM é um exame de avaliação rotineira da reserva ovariana nos centros participantes e a coleta para genotipagem dos polimorfismos foi proposta ao participante da pesquisa mediante consentimento livre e esclarecido. Amostras de sangue periférico venoso foram obtidas das pacientes segundo as normas da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso (ISBN 978-85-98416-94-6). A amostra de sangue periférico para realização do HAM foi coletada em tubo sem anticoagulante e após 10 minutos a temperatura ambiente o tubo foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro. O soro foi alíquotado em tubo plástico com tampa, resistente a baixas temperaturas, e armazenado em freezer a -20°C até o momento do envio ao CPDP. A amostra de sangue periférico para a realização da extração do DNA genômico e posterior genotipagem foi coletada em tubo com anticoagulante EDTA e armazenada em geladeira (4°C) por no máximo 48 horas até o momento do envio ao CPDP. As amostras foram transportadas em conformidade com as regulamentações da IATA 2016 e Resolução 420/ANTT de 12/12/2004 do Ministério dos Transportes. Todas as análises foram realizadas no CPDP.

2.5 Ensaio Imunoenzimático

As dosagens do Hormônio Anti-Mulleriano (HAM) foram realizadas utilizando o kit *AMH Gen II ELISA* (Beckman Coulter Inc ref. A73818) seguindo as instruções do fabricante (Figura 2). Os equipamentos necessários para a realização desse exame são Leitora e Lavadora de *ELISA* automatizados. Esses equipamentos estão no descritivo do material permanente do CPDP.

Para minimizar as chances de erro nesse ensaio, um mesmo operador realizou todos os testes. Em todas as reações foram incluídas curva de calibração e controles (Ref. A73819) com a finalidade de garantir a precisão dos resultados. Na validação desse teste, foram calculados os valores médios dos coeficientes de variação intra e inter-ensaios desse exame. Os valores obtidos foram 3.3% e 6.5% respectivamente. Nesse kit, o valor mínimo detectado do HAM é 0.01 ng/mL.

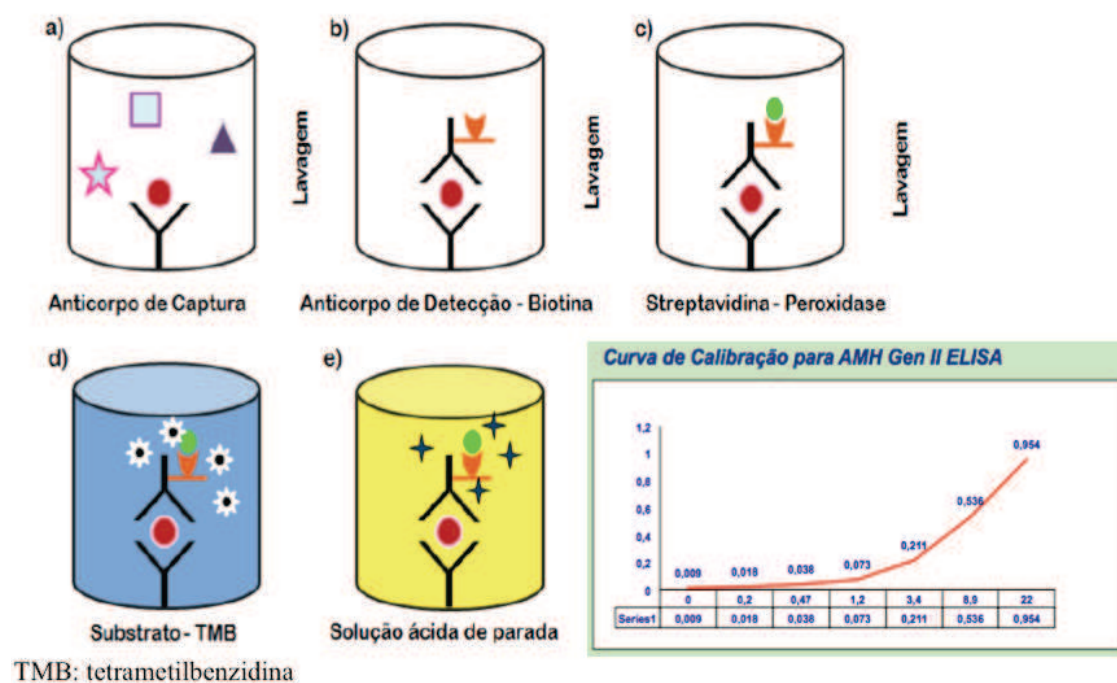


Figura 2. Representação esquemática da reação *ELISA*

2.6 Genotipagem dos alelos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real

Desde que fatores genéticos sozinhos ou combinados podem afetar a reserva ovariana, 4 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram escolhidos para esse estudo (Tabela 1). Esses polimorfismos estão localizados em genes relacionados a reprodução humana e foram pré-selecionados através de outra pesquisa realizada pelo nosso grupo intitulada “*Genetic biomarkers to predict pregnancy outcomes*” – (GFI MerckSerono 2014-2016).

Tabela 1: Descrição dos genes e SNPs incluídos no estudo.

Gene	SNP	Classe Funcional	Posição (GRCh38.p12)	Alelos	MAF	Alteração na proteína
TP53	rs1625895	<i>Intron</i>	chr17:7674797	T>C	T (14%)	-
TP73	rs3765730	<i>Intron</i>	chr1:3690956	G>A	A (31%)	-
MMP9	rs17576	<i>Missense</i>	chr20:46011586	A>G	G (39%)	Gln>Arg
MTHFR	rs868014	<i>3 Prime UTR</i>	chr1:11789390	A>G	A (1,2%)	-

DNA genômico de todas as pacientes foram extraídos no CPDP seguindo as orientações do fabricante do kit de extração *QIAamp DNA blood mini kit* (Qiagen – Ref. 51106) (Figura 3).

A localização de cada polimorfismo estudado (TP53/rs1625895, TP73/rs3765730, MMP9/rs17576 e MTHFR/rs868014) está representada na figura 4 (4a, 4b, 4c e 4d) conforme a referência GRCh38.p12.

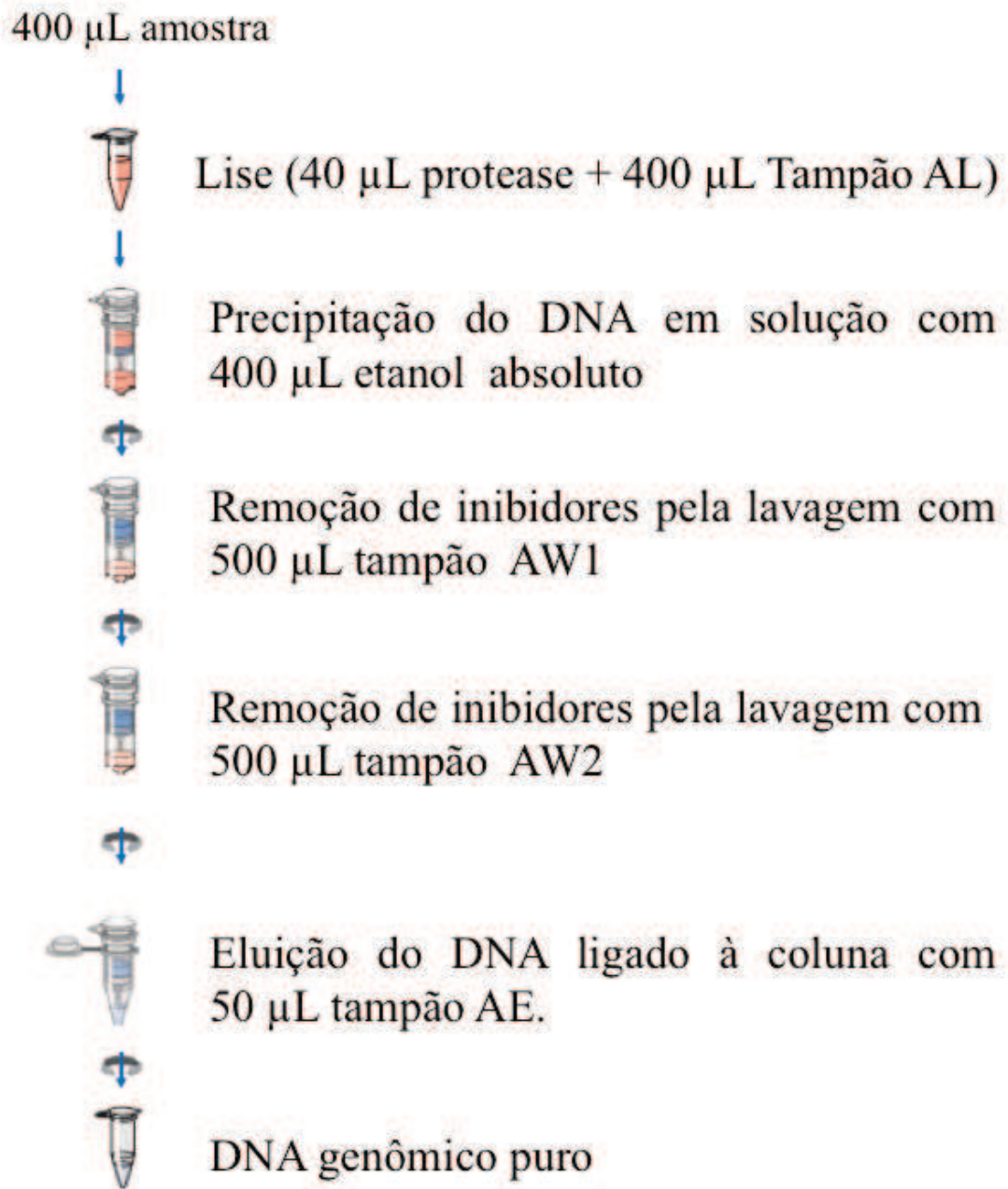


Figura 3: Representação esquemática da extração de DNA genômico

4a) TP53 (rs1625895)



4b) TP73 (rs3765730)



4c) MMP9 (rs17576)

The screenshot displays the NCBI genome browser interface for the MMP9 gene. At the top, the browser title is "Homo sapiens: GRCh38.p12 (GCF_000001405.38) Chr 20 (NC_000020.11): 46,011,565 - 46,011,607". Below the title, there are navigation options: "Read", "Share this page", "FAQ", "Help", and "Version 3.1.4". A "Sign in to NCBI" link is in the top right corner. The main content area shows the gene structure with exons represented by black boxes and introns by lines. A blue box highlights the MMP9 gene, with coordinates 46,011,570 to 46,011,590. Below the gene structure, the sequence is shown: "C G C C C A G G A C T C T A C A C C C A G G A C G G C C A T G C C T G A T G G G A A A G C G G G G T C C C T G A G A T G T G G G T C C C T G C C G T A C G A C T A C C C T T". The sequence is flanked by coordinates 46,011,570 and 46,011,590. A "Tools" menu is visible in the top right, with "Download" and "Tracks" options. The bottom of the page shows "NC_000020.11: 46,011,565 - 46,011,607 (43 nt)" and "Tracks shown: 2/634".

4d) MTHFR (rs868014)

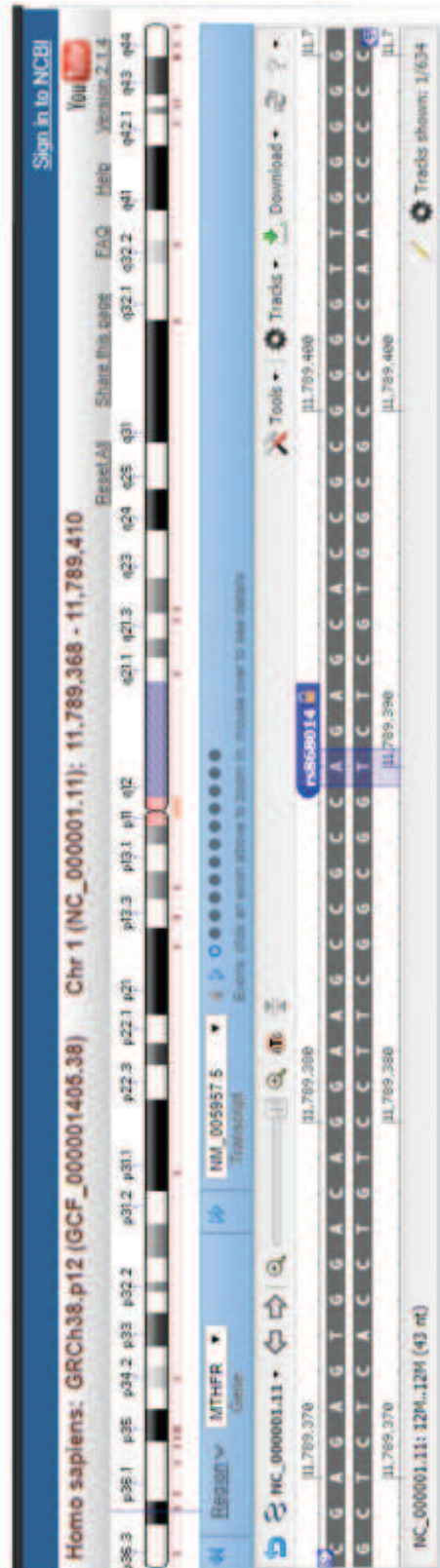


Figura 4: Representação esquemática da localização dos SNPs estudados: TP53/rs1625895 (4a), TP73/rs3765730 (4b), MMP9/rs17576 (4c) e MTHFR/rs868014 (4d).
 Fonte: *The National Center for Biotechnology Information (NCBI).*

Os SNPs foram genotipados através da técnica de PCR em tempo real utilizando ensaios *TaqMan*[®] – *ThermoFisher Scientific* (Número de catálogo: 4351379). Cada ensaio tem um ID de referência, para o TP53 (rs1625895) o ID é C__8727782_20, para o TP73 (rs3765730) é C__26892206_20, MMP9 (rs17576) é C__11655953_10 e para o MTHFR (rs868014) é o C__8861306_10. Este ensaio, além das frequências alélicas, determina se as amostras são homozigotas para o alelo comum, homozigotas para o alelo raro ou heterozigotas. Cada ensaio *TaqMan*[®] pré-desenhado para genotipagem de SNPs inclui duas sondas *TaqMan*[®] MGB específicas para cada alelo, contendo corantes fluorescentes distintos (VIC e FAM) e um par de iniciadores de PCR para detectar alvos específicos de cada SNP. Este conjunto de sondas e iniciadores *TaqMan*[®] alinham-se unicamente com o genoma proporcionando uma alta especificidade para o alelo de interesse. O mix para reação de PCR em tempo real teve a seguinte composição: 1µL de DNA genômico (10 ng/µL), 5µL de *Master Mix TaqPath[™] ProAmp[™]* (*Applied Biosystems[™]*), 0,5µL *TaqMan[®] SNP Genotyping assay* (*Applied Biosystems[™]*) e 3,5µL de água DNase free. A configuração das condições de ciclagem foi: 60°C por 30 segundos (pré-leitura), acompanhado de uma denaturação inicial a 95°C por 5 minutos para ativação da enzima. Após esse estágio inicial, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (denaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão). O equipamento utilizado foi o *StepOnePlus[™] Real Time PCR* (*Applied Biosystems[™]*) que faz parte do material permanente do CPDP. Os produtos de PCR foram analisados pelo software *TaqMan Genotyper v1.3* (*Applied Biosystems[™]*).

2.7 Análise estatística dos resultados

Tamanho amostral

Seguindo a fórmula $N=10*k/p$, onde k é o número de variáveis preditoras do modelo e p é a proporção do menor grupo na amostra temos o tamanho amostral (N) desejável. Estudamos 4 polimorfismos, portanto consideramos k igual a 4. A proporção do menor grupo foi igual a 0,407, assim temos que $N= 4*(10/0,407)$, ou seja, um tamanho amostral desejável de 98.

Análise dos dados

Todos os dados foram analisados usando o software estatístico StatsDirect versão 2.7.9 (Cheshire, UK). Os seguintes parâmetros foram avaliados para caracterizar a população estudada: idade, HAM, CFA, duração e causa da infertilidade. Para cada polimorfismo estudado analisamos a frequência dos genótipos e dos alelos, bem como a chance de cada genótipo estar presente em cada grupo. Para comparar as médias das variáveis contínuas quando não estão distribuídas normalmente foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e para as variáveis contínuas distribuídas normalmente foi utilizado o teste t de Student. Esses resultados estão expressos como a média aritmética \pm desvio padrão (DP). Para as variáveis categóricas, foi utilizado o teste exato de Fisher e os resultados expressos em percentagens. Além disso, a análise de razão de chance (*odds ratio*) foi utilizada para determinar a associação de cada polimorfismo na predição da reserva ovariana baixa. Todos os testes estatísticos foram considerados significativos em um nível de $P < 0,05$.

2.8 Considerações éticas

Esse trabalho é um sub-projeto do plano de pesquisa “Polimorfismos de DNA - Detecção de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) relacionados à infertilidade” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher (CRSM) parecer no 045/11 de 26/10/2011. (Anexo III).

Esse projeto foi submetido para análise no Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FAMERP (CEP/FAMERP) com parecer favorável (Anexo IV). Foi garantido a confidencialidade das informações prestadas a todos os participantes, ou seja, as respostas das pacientes foram tratadas de forma anônima e confidencial, isto é, em nenhum momento foi divulgado o seu nome em qualquer fase do estudo.

O consentimento informado livre e esclarecido (Anexo V) foi assinado no ato da consulta após todos os esclarecimentos sobre a pesquisa.

3.RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Características gerais

As principais características das participantes envolvidas no estudo estão apresentadas na Tabela 2. Não houve diferença significativa entre as variáveis idade, duração e causa da infertilidade. Por outro lado, os parâmetros que caracterizam a reserva ovariana (HAM e CFA) mostraram diferença significativa, evidenciando dois grupos populacionais: 86 mulheres foram classificadas como reserva ovariana baixa (RB) ($\text{HAM} < 1\text{ng/mL} + \text{CFA} \leq 9$) e 59 mulheres foram classificadas como reserva ovariana normal (RN) ($\text{HAM} > 2\text{ng/mL} + \text{CFA} \geq 15$).

Tabela 2. Caracterização da população

	Total	Reserva ovariana normal	Reserva ovariana baixa	P	
N	145	59	86		
Idade (anos)*	33,3±2,6 (25-37)	32,9±2,8 (26-37)	33,6±2,4 (25-37)	0,11	
HAM (ng/mL)*	2,3±3,2 (0,01-20,8)	4,9±3,8 (2,1±20,8)	0,4±0,29 (0,01-0,99)	<0,0001	
Contagem Folículo Antral (n)*	13,8±10,8 (0-66)	24,6±8,8 (15-66)	6,3±2,3 (0-9)	<0,0001	
Duração da infertilidade (anos)*	3,8±2,7 (1-13)	3,5±2,7 (1-12)	4,0±2,8 (1-13)	0,16	
Etiologia	Masculino	46,9%(68/145)	47,4%(28/59)	46,5%(40/86)	0,63
	Idiopático	28,9%(42/145)	27,1%(16/59)	30,2%(26/86)	
	Endometriose	11,7%(17/145)	8,5%(5/59)	14,0%(12/86)	
	Tuboperitoneal	9,0%(13/145)	11,9%(7/59)	7,0%(6/86)	
	Masculino + Endometriose	2,8%(4/145)	3,4%(2/59)	2,3%(2/86)	
Masculino + tuboperitoneal	0,7%(1/145)	1,7%(1/59)	0		
Infertilidade	Primária	83,4%(121/145)	86,4%(51/59)	81,4%(70/86)	0,49
	Secundária	16,6%(24/145)	13,6%(8/59)	18,6%(16/86)	

*Valores representados pela média ± desvio padrão (valor mínimo e máximo).

3.2 Genotipagem dos SNPs e associação com reserva ovariana

A distribuição da frequência dos genótipos e dos alelos de cada polimorfismo estudado (TP53 rs1625895, TP73 rs3765730, MMP9 rs17576 e MTHFR rs868014) está demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição da frequência dos genótipos e alelos nos grupos reserva ovariana baixa e reserva ovariana normal

			Reserva ovariana baixa (n=86)	Reserva ovariana normal (n=59)	P
TP53 (rs1625895)	<i>Genótipo</i>	TT	36 (41,8%)	10 (17,0%)	0,005
		TC	17 (19,8%)	15 (25,4%)	
		CC	33 (38,4%)	34 (57,6%)	
	<i>Alelo</i>	T	89 (51,7%)	35 (29,7%)	0,0003
		C	83 (48,3%)	83 (70,3%)	
TP73 (rs3765730)	<i>Genótipo</i>	GG	54 (62,8%)	24 (40,7%)	0,04
		GA	24 (27,9%)	26 (44,1%)	
		AA	08 (9,3%)	09 (15,2%)	
	<i>Alelo</i>	G	132 (76,7%)	74 (62,7%)	0,01
		A	40 (23,3%)	44 (37,3%)	
MMP9 (rs17576)*	<i>Genótipo</i>	Gln/Gln	60 (70,6%)	26 (44,1%)	0,005
		Gln/Arg	18 (21,2%)	26 (44,1%)	
		Arg/Arg	07 (8,2%)	07 (11,8%)	
	<i>Alelo</i>	Gln	138 (81,2%)	78 (66,1%)	0,006
		Arg	32 (18,8%)	40 (33,9%)	
MTHFR (rs868014)	<i>Genótipo</i>	AA	25 (29,1%)	06 (10,2%)	0,008
		AG	37 (43,0%)	25 (42,4%)	
		GG	24 (27,9%)	28 (47,4%)	
	<i>Alelo</i>	A	87 (50,6%)	37 (31,4%)	0,002
		G	85 (49,4%)	81 (68,6%)	

* n=85

A frequência do genótipo TP53-T/T foi significativamente maior no grupo RB do que no grupo RN. Por outro lado, o genótipo TP53-C/C foi significativamente maior nas pacientes com reserva ovariana normal. Essa associação foi confirmada pela frequência dos alelos, onde a presença do alelo T foi significativamente maior nas pacientes que apresentaram reserva ovariana baixa ($P = 0,0003$). A frequência do genótipo TP73-G/G se mostrou mais evidente no grupo RB. Embora a frequência do alelo G tenha sido significativamente maior no grupo RB ($P = 0,01$) a presença do genótipo TP73-AA não foi significativamente maior nas pacientes com RN. Para o gene MMP9 tivemos uma prevalência da frequência do genótipo Gln/Gln no grupo RB. Apesar da presença do genótipo Arg/Arg não ter demonstrado diferença significativa entre os grupos, o genótipo Gln/Arg se mostrou prevalente no grupo RN, indicando que a presença do alelo Arg é significativamente maior na RN ($P = 0,006$). A frequência do genótipo MTHFR-A/A foi significativamente maior no grupo RB e a frequência do genótipo MTHFR-GG foi significativamente maior no grupo RN evidenciando uma associação em homozigose, já que a presença do genótipo MTHFR-AG não apresentou diferença significativa. A presença do alelo A foi significativamente superior no grupo RB ($P = 0,002$).

3.3 Análise da razão de chance de identificar RB

A Tabela 4 evidencia a chance da mulher apresentar reserva ovariana baixa através da análise do odds ratio de cada genótipo. As mulheres que possuem o genótipo TP53-T/T; TP73-G/G; MMP9-Gln/Gln e MTHFR-A/A tem respectivamente 3,5X; 2,5X; 3,1X e 3,6X mais chance de apresentar RB. Por outro lado, as mulheres que apresentam o genótipo TP53-C/C; MMP9-Gln/Arg e MTHFR-G/G tem respectivamente 54%; 66% e 57% de chance de não serem incluídas no grupo RB.

Tabela 4. Genótipo X chance de apresentar reserva ovariana baixa.

SNPs	Genótipo	Odds Ratio	IC 95%	P
TP53 (rs1625895)	TT	3,53	1,50-8,80	0,002
	TC	0,72	0,30-1,73	0,42
	CC	0,46	0,22-0,95	0,03
TP73 (rs3765730)	GG	2,46	1,18-5,14	0,01
	GA	0,49	0,23-1,05	0,05
	AA	0,57	0,17-1,79	0,30
MMP9 (rs17576)	Gln/Gln	3,05	1,44-6,47	0,002
	Gln/Arg	0,34	0,15-0,75	0,006
	Arg/Arg	0,67	0,19-2,38	0,57
MTHFR (rs868014)	AA	3,62	1,31-11,53	0,007
	AG	1,03	0,50-2,12	>0,99
	GG	0,43	0,20-0,91	0,02

IC: intervalo de confiança.

3.4 Análise da combinação dos polimorfismos na predição da RB

Quando esses quatro polimorfismos foram usados em combinação, identificamos que a associação dos genótipos TP53/TT+TP73/GG aumentou em 4,7 vezes a chance das mulheres serem incluídas no grupo RB quando comparadas com as RN (Tabela 5). Diferentes combinações de genótipos entre esses quatro polimorfismos estudados não mostraram significância estatística.

Tabela 5. Associação entre os polimorfismos TP53 (rs1625895) e TP73 (rs3765730) na predição da reserva ovariana baixa.

	TP53-T/T + TP73-G/G (n=26)	Outras combinações de genótipos (n=119)	P	Odds ratio	IC 95%
Reserva ovariana baixa (n=86)	22 (84,6%)	64 (53,8%)	0,004	4,73	1,47-19,83
Reserva ovariana normal (n=59)	04 (15,4%)	55 (46,2%)			

4.DISSCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Os membros da família p53 (TP53, TP63 e TP73) estão envolvidos na regulação do ciclo celular, trans-ativação e apoptose em resposta a danos no DNA. Estudos indicam que o TP73 assegura a mitose normal durante o desenvolvimento do blastocisto e o TP53 regula a implantação do embrião através do LIF.⁽⁵⁰⁾ Além disso, os membros da família p53 também foram descritos como reguladores de processos relacionados à reprodução humana, mantendo a integridade das células germinativas^(51,52)

Estudos mostraram que variações nos genes TP63 e TP73 são importantes na manutenção do tamanho do pool folicular, na estabilidade genômica através da checagem do fuso mitótico (em inglês *spindle assembly checkpoint* -SAC) e na qualidade do oócito.^(45,46) Embora seja esperado que pequenas variações nos genes da família p53 possam influenciar a função ovariana, pouco se sabe sobre a ação de polimorfismos nesses genes e sua influência na reserva ovariana das mulheres inférteis.

Nesse estudo, houve uma associação significativa dos níveis de HAM e CFA com dois polimorfismos da família p53 (TP53 rs1625895 e TP73 rs3765730). Os genótipos TP53/TT e TP73/GG estão associados com reserva ovariana baixa. Embora o polimorfismo TP73 rs3765730 não tenha sido descrito até o momento, o TP53 rs1625895 já foi estudado em diferentes populações, mas nenhum trabalho descreveu a avaliação desse polimorfismo com a reserva ovariana. Schildkraut e colaboradores (2009)⁽⁵³⁾ analisaram esse polimorfismo em pacientes com câncer de ovário invasivos serosos e Pineda e colaboradores (2014)⁽⁵⁴⁾ avaliaram o risco desse polimorfismo em pacientes com câncer de bexiga, porém, ambos estudos não demonstraram correlação significativa desse polimorfismo com a população avaliada. Por outro lado, Voropaeva

e colaboradores (2015)⁽⁵⁵⁾ apontaram o impacto desse polimorfismo em pacientes com linfoma.

Proteínas da família das metaloproteinases de matriz (MMP) estão envolvidas na quebra da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, como desenvolvimento embrionário, reprodução e remodelação tecidual, bem como em processos de doenças, como artrite e metástase. A maioria das MMPs são secretadas como pró-proteínas inativas que são ativadas quando clivadas por proteinases extracelulares. A enzima codificada por este gene degrada colágenos tipo IV e V. Estudos sugerem que a expressão da matriz metaloproteinase-9 (MMP-9) esteja envolvida em diferentes estágios da reprodução feminina, como ciclo menstrual, ovulação, implantação, parto e involução das glândulas mamárias após a lactação.^(56,57)

O papel das MMPs extracelulares na remodelação do tecido ovariano durante o tempo de vida do folículo tem sido documentado em numerosos estudos. Foi demonstrado a expressão de MMP-1, -2, -3 e -9 nos ovários de mamíferos^(58,59) e a expressão de MMP-2 e MMP-9 nas células da granulosa em humanos.⁽⁶⁰⁾

Luddi e colaboradores (2018)⁽⁴⁸⁾ demonstraram que MMP-9 é expressa somente em células da granulosa. Embora seja amplamente documentado que a expressão de MMP-9 é importante para gerar a atividade proteolítica necessária no momento da ovulação, pouco se sabe sobre a relação entre polimorfismos no gene MMP-9 e a reserva ovariana. Embora nossos achados tenham evidenciado uma associação do genótipo MMP9-Gln/Gln e RB, outros estudos não identificaram essa relação. Kim e colaboradores (2015)⁽⁶¹⁾ estudaram a associação dos polimorfismos na matriz metaloproteinase e o risco de insuficiência ovariana primária, concluindo que o polimorfismo no gene MMP-2 (rs 243865) pode contribuir para o aumento de

insuficiência ovariana primária na população estudada, mas não encontraram correlação com o MMP-9 rs17576. Barišić e colaboradores (2018)⁽⁶²⁾ apresentaram uma revisão com diversos polimorfismos nas MMPs que estariam correlacionados com infertilidade e complicações na gestação. Esses autores concluíram que novas pesquisas são necessárias nessa linha devido às associações modestas desses polimorfismos e resultados conflitantes entre os estudos analisados.

A enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) desempenha um papel central em muitos processos biológicos considerados importantes para divisão e desenvolvimento embrionário. Esta enzima regula a transferência de unidades de um carbono entre a síntese de DNA e reações de metilação, esse processo é responsável pela conversão irreversível do 5,10 metilenotetrahidrofolato à 5-metiltetra-hidrofolato, que é um co-substrato para remetilação da homocisteína à metionina.⁽⁶³⁾ Mehahed e Taher (2004)⁽⁶⁴⁾ estudaram os níveis de folato e homocisteína na gravidez e identificaram que um polimorfismo no gene MTHFR C677T (rs1801133) que causa a substituição da alanina por valina promove alterações nas reações de metilação que são essenciais para o crescimento embrionário e a regulação da expressão gênica, bem como níveis elevados de homocisteína que poderiam prejudicar a foliculogênese através do aumento do estresse oxidativo.

Em 2005, Ferrara e colaboradores⁽⁶⁵⁾ relataram um caso de síndrome de hiperestimulação ovariana associado aos dois polimorfismos no gene MTHFR: C677T e A1298C. Por outro lado, Rosen e colaboradores (2007)⁽⁴⁹⁾ mostraram que a enzima MTHFR está presente em oócitos humanos e em embriões no estágio de pré-implantação e que somente o polimorfismo MTHFR A1298C, mas não o polimorfismo C677T, está associado a altos níveis basais de FSH e pode ser um determinante da

resposta à estimulação ovariana, sugerindo que somente o MTHFR A1298C seria o modulador da foliculogênese. Além de controversos, há poucos estudos mostrando a influência dos polimorfismos no gene MTHFR nos ciclos de FIV e nenhuma pesquisa até o momento, tinha analisado o polimorfismo MTHFR (rs868014) nas pacientes inférteis.

Em 2017, He e colaboradores⁽⁶⁶⁾ identificaram pela primeira vez esse polimorfismo e concluíram que o polimorfismo no MTHFR (rs868014) está associado ao risco aumentado no desenvolvimento de acidente vascular cerebral isquêmico (AVC). Além dessa associação, os autores identificaram através da análise do desequilíbrio de ligação que o SNP (rs868014) está fortemente ligado ao polimorfismo MTHFR A1298C, que tem um papel importante na variabilidade da atividade folicular ovariana após a estimulação ovariana.

Nas últimas décadas, avanços científicos no campo da medicina reprodutiva melhoraram tanto a gestão quanto a segurança das pacientes submetidas a FIV/*ICSI*. Apesar desses avanços, ainda não está totalmente definido todos os fatores que influenciam os níveis de Hormônio Anti-Mulheriano e a contagem dos folículos antrais.

Considerando a importância e as limitações dessas duas ferramentas (HAM e CFA) na escolha do melhor protocolo de estimulação ovariana a ser utilizado nas pacientes submetidas a tratamentos de infertilidade, é crucial definir outros fatores (moleculares, genéticos e ambientais) que possam ser utilizados como uma ferramenta adicional no diagnóstico da reserva ovariana em pacientes submetidas a FIV/*ICSI*.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Nesse estudo, demonstrou-se que a presença dos genótipos TP53-T/T, TP73-G/G, MMP9-Gln/Gln e MTHFR-A/A aumenta, respectivamente, em 3,5 / 2,5 / 3,1 e 3,6 vezes a chance da mulher apresentar RB. Por outro lado, as mulheres que apresentam o genótipo TP53-C/C; MMP9-Gln/Arg e MTHFR-G/G tem respectivamente 54%; 66% e 57% de chance de não serem incluídas no grupo RB.

Adicionalmente, foi demonstrado que a presença da combinação dos genótipos TP53-T/T+TP73-G/G aumenta em 4,7 vezes a chance da mulher apresentar reserva ovariana baixa. Baseado nesses achados, podemos concluir que os polimorfismos TP53 T>C (rs1625895), TP73 G>A (rs3765730), MMP9 Gln>Arg (rs17576) e MTHFR A>G (rs868014) podem ser utilizados como uma ferramenta na classificação da reserva ovariana em pacientes inférteis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Howie R, Kay V. Controlled ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Br J Hosp Med (Lond)* 2018;79:194-199.
2. Zech NH, Zech M, Baldauf S, Comploj G, Murtinger M, Spitzer D, et al. Ovarian stimulation in ART - Unwinding pressing issues. *Minerva Ginecol* 2015;67:127-47.
3. Haahr T, Esteves SC, Humaidan P. Individualized controlled ovarian stimulation in expected poor-responders: an update. *Reprod Biol Endocrinol* 2018;16:20.
4. La Marca A, Ferraretti AP, Palermo R, Ubaldi FM. The use of ovarian reserve markers in IVF clinical practice: a national consensus. *Gynecol Endocrinol* 2016;32:1-5.
5. Vollenhoven, Beverley, and Sarah Hunt. "Ovarian ageing and the impact on female fertility." *F1000Research* 2018
6. Grisendi V, La Marca A. Individualization of controlled ovarian stimulation in vitro fertilization using ovarian reserve markers. *Minerva Ginecol* 2017;69:250-258.
7. Kučera M, Štěpán Ml J, Štelcl M. Possibilities and real meaning of assessment of ovarian reserve. *Ceska Gynekol* 2018;83:307–311.
8. Grisendi V, Mastellari E, La Marca A. Ovarian Reserve Markers to Identify Poor Responders in the Context of Poseidon Classification. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:281.
9. Jamil Z, Fatima SS, Ahmed K, Malik R. Anti-Mullerian Hormone: Above and Beyond Conventional Ovarian Reserve Markers. *Dis Markers*. 2016;1-9.
10. Alborzi, S., Madadi, G., Samsami, A., Soheil, P., Azizi, M., Alborzi, M., et al. Decreased ovarian reserve: any new hope? *Minerva ginecologica* 2015;67:149–167.

11. Lensen, S. F., Wilkinson, J., Leijdekkers, J. A., La Marca, A., Mol, B., Marjoribanks, J., et al. Individualised gonadotropin dose selection using markers of ovarian reserve for women undergoing in vitro fertilisation plus intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI). *The Cochrane database of systematic reviews* 2018 2(2), CD012693.
12. La Marca, A., Minasi, M. G., Sighinolfi, G., Greco, P., Argento, C., Grisendi, V., et al. Female age, serum antimüllerian hormone level, and number of oocytes affect the rate and number of euploid blastocysts in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility* 2017;108:777–783.
13. La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update* 2014;20:124–140.
14. Podfigurna, A., Lukaszuk, K., Czyzyk, A., Kunicki, M., Maciejewska-Jeske, M., Jakiel, G, et al. Testing ovarian reserve in pre-menopausal women: why, whom and how? *Maturitas* 2018;109:112–117.
15. Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide. *Am J Obstet Gynecol* 2017;217:129-140.
16. Victoria M, Labrosse J, Krief F, Cédric-Durnerin I, Comtet M, Grynberg M. Anti Müllerian Hormone: More than a biomarker of female reproductive function. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2019;48:19–24.
17. Pankhurst MW. A putative role for anti-Müllerian hormone (AMH) in optimising ovarian reserve expenditure. *J Endocrinol* 2017;233:R1–R13.

18. Iwase A, Osuka S, Goto M, Murase T, Nakamura T, Takikawa S, Kikkawa F. Clinical application of serum anti-Müllerian hormone as an ovarian reserve marker: A review of recent studies. *J Obstet Gynaecol Res* 2018;44:998-1006.
19. Gracia, C. R., Shin, S. S., Prewitt, M., Chamberlin, J. S., Lofaro, L. R., Jones, K., et al. Multi-center clinical evaluation of the Access AMH assay to determine AMH levels in reproductive age women during normal menstrual cycles. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2018;35:777–783.
20. Köninger A, Koch L, Enekwe A, Birdir C, Kasimir-Bauer S, Kimmig R, et al. Change of anti-Mullerian-hormone levels during follicular phase in PCOS patients. *Gynecol Endocrinol* 2015;31:26-30.
21. Bungum L, Tagevi J, Jokubkiene L, Bungum M, Giwercman A, Macklon N, et al. The Impact of the Biological Variability or Assay Performance on AMH Measurements: A Prospective Cohort Study With AMH Tested on Three Analytical Assay-Platforms. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;09:603.
22. Melado L, Lawrenz B, Sibal J, Abu E, Coughlan C, Navarro AT, et al. Anti-müllerian Hormone During Natural Cycle Presents Significant Intra and Intercycle Variations When Measured With Fully Automated Assay. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;09:686.
23. Fleming R, Seifer DB, Frattarelli JL, Ruman J. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reprod Biomed Online* 2015;31:486–496.
24. Humaidan P, Alviggi C, Fischer R, Esteves SC. The novel POSEIDON stratification of 'Low prognosis patients in Assisted Reproductive Technology' and its proposed marker of successful outcome. *F1000Res.* 2016;5:2911.

25. Mavrelou D, Al Chami A, Talaulikar V, et al. Variation in antral follicle counts at different times in the menstrual cycle: does it matter? *Reprod Biomed Online* 2016;33:174-179.
26. Nelson SM, Klein BM, Arce JC. Comparison of antimüllerian hormone levels and antral follicle count as predictor of ovarian response to controlled ovarian stimulation in good-prognosis patients at individual fertility clinics in two multicenter trials. *Fertil Steril* 2015;103:923-930.
27. Younis JS, Ben-Ami M, Ben-Shlomo I. The Bologna criteria for poor ovarian response: a contemporary critical appraisal. *J Ovarian Res* 2015;8:76.
28. Oliveira JB, Baruffi RL, Petersen CG, Mauri AL, Nascimento AM, Vagnini L, et al. A new ovarian response prediction index (ORPI): implications for individualised controlled ovarian stimulation. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;10:94.
29. Cheng R, Xiong W, Luo X, Ma Y, Nie Y, Qiao X, et al. Association of gene polymorphisms in the anti-Müllerian hormone signalling pathway with ovarian function: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2019;39:513-521.
30. Papanikolaou IG, Giannelou P, Anagnostou E, Mavrogianni D, Drakakis P, Loutradis D. Combined study on the single nucleotide polymorphisms in the follicle-stimulating hormone receptor (Ser680Asn) and anti-Müllerian hormone receptor type II (-482A>G) as genetic markers in assisted reproduction. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2019;38(1)
31. Grynberg M, Labrosse J. Understanding Follicular Output Rate (FORT) and its Implications for POSEIDON Criteria. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:246.

32. Peluso C, Fonseca FL, Gastaldo GG, Christofolini DM, Cordts EB, Barbosa CP, et al. AMH and AMHR2 polymorphisms and AMH serum level can predict assisted reproduction outcomes: a cross-sectional study. *Cell Physiol Biochem* 2015;35:1401-12.
33. Borgbo T, Klučková H, Macek M Sr, Chrudimska J, Kristensen SG, Hansen LL, et al. The Common Follicle-Stimulating Hormone Receptor (FSHR) Promoter Polymorphism FSHR -29G > A Affects Androgen Production in Normal Human Small Antral Follicles. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8:122.
34. Yang X, Touraine P, Desai S, Humphreys G, Jiang H, Yatsenko A, et al. Gene variants identified by whole-exome sequencing in 33 French women with premature ovarian insufficiency. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36:39-45.
35. Čuš M, Vlaisavljević V, Repnik K, Potočnik U, Kovačič B. Could polymorphisms of some hormonal receptor genes, involved in folliculogenesis help in predicting patient response to controlled ovarian stimulation? *J Assist Reprod Genet* 2019;36:47-55.
36. Boudjenah R, Molina-Gomes D, Torre A, Bergere M, Bailly M, Boitrelle F, et al. Genetic polymorphisms influence the ovarian response to rFSH stimulation in patients undergoing in vitro fertilization programs with ICSI. *PLoS One.* 2012;7(6):e38700.
37. Abir R, Fisch B. Invited commentary: a single nucleotide polymorphism in BMP15 is associated with high response to controlled ovarian hyperstimulation. *Reprod Biomed Online* 2011;23:77–80.
38. Lazaros LA, Hatzi EG, Xita NV, Makrydimas GV, Kaponis AI, Takenaka A, Kosmas IP, Sofikitis NV, Stefos TI, Zikopoulos KA, Georgiou IA. Aromatase

- (CYP19) gene variants influence ovarian response to standard gonadotrophin stimulation. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:203-9.
39. La Marca A, Sighinolfi G, Argento C, Grisendi V, Casarini L, Volpe A, et al. Polymorphisms in gonadotropin and gonadotropin receptor genes as markers of ovarian reserve and response in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2013;99:970-8.e1.
40. Klinkert ER, te Velde ER, Weima S, van Zandvoort PM, Hanssen RG, Nilsson PR, et al. FSH receptor genotype is associated with pregnancy but not with ovarian response in IVF. *Reprod Biomed Online* 2006;13:687-95.
41. Mohiyiddeen L, Newman WG, McBurney H, Mulugeta B, Roberts SA, Nardo LG. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphisms are not associated with ovarian reserve markers. *Fertil Steril* 2012;97:677-81.
42. Mohiyiddeen L, Newman WG, Cerra C, McBurney H, Mulugeta B, Roberts SA, et al. A common Asn680Ser polymorphism in the follicle-stimulating hormone receptor gene is not associated with ovarian response to gonadotropin stimulation in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2013;99:149-55.
43. Vagnini LD, Renzi A, Oliveira-Pelegrin GR, Canas Mdo C, Petersen CG, Mauri AL, Oliveira JB, Baruffi RL, Cavagna M, Franco Junior JG. The TP73 gene polymorphism (rs4648551, A>G) is associated with diminished ovarian reserve. *PLoS One* 2015;10:e0120048.
44. Verberg MF, Eijkemans MJ, Heijnen EM, Broekmans FJ, de Klerk C, Fauser BC, et al. Why do couples drop-out from IVF treatment? A prospective cohort study. *Hum Reprod* 2008;23:2050-5.

45. Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, et al. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev* 2008;22:2677-91.
46. Feng Z, Zhang C, Kang HJ, Sun Y, Wang H, Naqvi A, et al. Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J* 2011;25:2245-55.
47. Curry TE Jr, Osteen KG. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev* 2003;24:428-65.
48. Luddi A, Gori M, Marrocco C, Capaldo A, Pavone V, Bianchi L, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human cumulus and granulosa cells as biomarkers for oocyte quality estimation. *Fertil Steril* 2018;109:930-939.
49. Rosen MP, Shen S, McCulloch CE, Rinaudo PF, Cedars MI, Dobson AT. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with ovarian follicular activity. *Fertil Steril* 2007;88:632-638.
50. Levine AJ, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW, Melino G. The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:259-65.
51. Hu W. The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1:a001073.
52. Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a004887.
53. Schildkraut JM, Goode EL, Clyde MA, Iversen ES, Moorman PG, Berchuck A, et al; Australian Ovarian Cancer Study Group. Single nucleotide polymorphisms in the TP53 region and susceptibility to invasive epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 2009;69:2349-57.

54. Pineda S, Milne RL, Calle ML, Rothman N, López de Maturana E, Herranz J, et al. Genetic variation in the TP53 pathway and bladder cancer risk. a comprehensive analysis. *PLoS One*. 2014;9:e89952.
55. Voropaeva EN, Voevoda MI, Pospelova TI, Maksimov VN. Prognostic impact of the TP53 rs1625895 polymorphism in DLBCL patients. *Br J Haematol*. 2015;169:32-5.
56. Jeziorska M, Nagase H, Salamonsen LA, Woolley DE. Immunolocalization of the matrix metalloproteinases gelatinase B and stromelysin 1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Reprod Fertil*. 1996;107:43-51.
57. Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, et al. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol*. 1995;146:148-56.
58. Cossins J, Dudgeon TJ, Catlin G, Gearing AJ, Clements JM. Identification of MMP-18, a putative novel human matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;228:494-8.
59. Nikolettos N, Asimakopoulos B, Tentes L, Schöpfer B, al-Hasani S. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in follicular fluids of patients undergoing controlled ovarian stimulation for ICSI/ET. *In Vivo*. 2003;17:201-4.
60. Aston KE, Stamouli A, Thomas EJ, Vyas S, Iredale JP, Arthur MJ, et al. Effect of gonadotrophin on cell and matrix retention and expression of metalloproteinases and their inhibitor in cultured human granulosa cells modelling corpus luteum function. *Mol Hum Reprod*. 1996;2:26-30.

61. Kim YR, Jeon YJ, Kim HS, Kim JO, Moon MJ, Ahn EH, et al. Association study of five functional polymorphisms in matrix metalloproteinase-2, -3, and -9 genes with risk of primary ovarian insufficiency in Korean women. *Maturitas*. 2015;80:192-7.
62. Barišić A, Dević Pavlić S, Ostojić S, Pereza N. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases gene polymorphisms in disorders that influence fertility and pregnancy complications: A systematic review and meta-analysis. *Gene*. 2018;647:48-60.
63. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22:195-201.
64. Megahed MA, Taher IM. Folate and homocysteine levels in pregnancy. *Br J Biomed Sci*. 2004;61:84-7.
65. Ferrara F, Meli F, Amato C, Cospite V, Raimondi F, Novo S. A case of ovarian hyperstimulation syndrome associated with the methylenetetrahydrofolate reductase mutation gene. *Fertil Steril*. 2005;84:218.e17–218.e18.
66. He W, Lu M, Li G, Sun Z, Liu D, Gu L. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) rs868014 Polymorphism Regulated by miR-1203 Associates with Risk and Short Term Outcome of Ischemic Stroke. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41:701-710.

7. ANEXOS

7. ANEXOS

Anexo I: Ficha de Anamnese

ANAMNESE – FATOR FEMININO				
Nome:	Profissão:	Prontuário:		
Data de Nascimento:	Idade:	Est. Civil:	Cor:	Categoria:
Profissão:				
Endereço:	Cidade:		Fone:	
Data:				
Episódio marcante:				
Primária:	Secundária:	Duração:	Aborto habitual:	
Tratamentos anteriores:				
Antecedentes familiares				
Tb ()	Diabete ()	Câncer ()	Mal-formações ()	Epilepsia ()
Consanguinidade ()	Esterilidade familiar ()		Outros ()	
Antecedentes pessoais				
DIP ()	Cirurgia ()	Lues ()	Tb ()	Tireóidopatia ()
Drogas ()	Diabete ()	Outros ()	Consanguinidade ()	
Antecedentes menstruais				
Menarca:	Duração:	Intervalo:	Quantidade:	
Modificações:				
Dismenorréia:	Mastodínia:		Tensão pré-menstrual:	
DUM:	Dor meio do ciclo:		Mucorréia:	
Sangramento inter-menstrual:				
Antecedentes obstétricos				
1º coito:	Total gestações:		Nativos de termo:	
Nativos prematuros:	Natimortos:	Partos normais:	Fórceps:	
Cesária:	Puerpério:	Infectado	Hemorrágico	Lactação
Aborto espontâneo:	Provocado:	Infectado:	Completo:	
Curagem:	Curetagem:		Circlagem:	
Observações:	Filhos com outros parceiros:			
Antecedentes sexuais				
Número de relações por semana:		Dispareunia:	Orgasmo:	
Líbido:	Penetração:	Duchas pós-coito:		
Observações:				
Anticoncepção prévia:	Pílula	Diafragma	Preservativo	
Ducha	Natural Coito interrompido	Tempo de uso	DIU	
Observações:				
Antecedentes cirúrgicos				
Exame físico				
Pressão arterial:	Pulso:	Temperatura:	Peso:	Altura:
Cabeça:	Coração:	Pulmões:	Pescoço:	Abdome:
Distribuição de pêlos:		IMC:		

Anexo II: Ficha clínica

FICHA CLÍNICA																																																								
Nome: _____	Data: _____																																																							
Consulta Ginecológica Periódica: _____																																																								
Prevenção Câncer: _____																																																								
Mamas: _____																																																								
Cariótipo: _____																																																								
Consulta Urológica: _____																																																								
Exames Laboratoriais: _____																																																								
Diagnóstico: _____																																																								
HSG: _____																																																								
USG: _____																																																								
Aval. Cardiológica: _____																																																								
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>Hormônios:</td> <td>T3 _____</td> <td>T4 _____</td> <td>TSH _____</td> <td>ITL _____</td> </tr> <tr> <td></td> <td>PRL _____</td> <td>FSH _____</td> <td>LH _____</td> <td>E2 _____</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>P4 _____</td> <td>HAM _____</td> <td>Testosterona _____</td> </tr> <tr> <td>Imunologia</td> <td colspan="4">SDHEA _____</td> </tr> <tr> <td>ABO</td> <td colspan="4">HTLV I e II _____</td> </tr> <tr> <td>Glicemia</td> <td colspan="4">HIV _____</td> </tr> <tr> <td>Insulina</td> <td colspan="4">Hepatite _____</td> </tr> <tr> <td>IRI</td> <td colspan="4">VDRL _____</td> </tr> <tr> <td>Espermograma</td> <td colspan="4">Rubéola _____</td> </tr> <tr> <td>Citomegalovirus</td> <td colspan="4">Toxoplasmose _____</td> </tr> <tr> <td>Zika Vírus</td> <td colspan="4">Chagas _____</td> </tr> </table>		Hormônios:	T3 _____	T4 _____	TSH _____	ITL _____		PRL _____	FSH _____	LH _____	E2 _____			P4 _____	HAM _____	Testosterona _____	Imunologia	SDHEA _____				ABO	HTLV I e II _____				Glicemia	HIV _____				Insulina	Hepatite _____				IRI	VDRL _____				Espermograma	Rubéola _____				Citomegalovirus	Toxoplasmose _____				Zika Vírus	Chagas _____			
Hormônios:	T3 _____	T4 _____	TSH _____	ITL _____																																																				
	PRL _____	FSH _____	LH _____	E2 _____																																																				
		P4 _____	HAM _____	Testosterona _____																																																				
Imunologia	SDHEA _____																																																							
ABO	HTLV I e II _____																																																							
Glicemia	HIV _____																																																							
Insulina	Hepatite _____																																																							
IRI	VDRL _____																																																							
Espermograma	Rubéola _____																																																							
Citomegalovirus	Toxoplasmose _____																																																							
Zika Vírus	Chagas _____																																																							
Laparoscopia: _____																																																								
Histeroscopia: _____																																																								
Outros: _____																																																								
Diagnóstico: _____																																																								

Anexo III. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa -CRSM



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 31 de outubro de 2011.

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DATA DA APROVAÇÃO: 26/10/2011


Protocolo nº: 045/11

TÍTULO DO ESTUDO: "Polimorfismos de DNA- Detecção de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) relacionados à infertilidade".


NOME DO INVESTIGADOR PRINCIPAL: Adriana Mendes do Nascimento

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido tendo as referidas aprovações constado em ata.



Dr. Jorge Yoshinori Shida
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do CRSM

Anexo IV. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - FAMERP

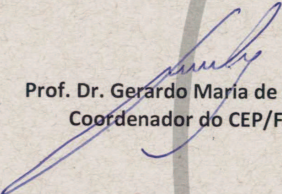
Parecer nº 2.040.131

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa CAAE 60245216.0.0000.5415 sob a responsabilidade de **Laura Diniz Vagnini** com o título "Avaliação do Uso Combinado dos Exames Ecográfico, Imunoenzimático e Molecular na Classificação da Reserva Ovariana em Pacientes Inférteis Submetidas a Fertilização in Vitro" está de acordo com a resolução do CNS 466/12 e foi **aprovado por esse CEP**.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos e também da notificação da data de inclusão do primeiro participante de pesquisa, para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 02 de maio de 2017.


Prof. Dr. Gerardo Maria de Araujo Filho
Coordenador do CEP/FAMERP

17 3201 5813
cepfamerp@famerp.br
Av. Brigadeiro Faria Lima 5416 | Vila São Pedro
15090-000 | São José do Rio Preto SP
www.famerp.br/cep

Anexo V. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Modelo em acordo com a Resolução nº 466/12 – Conselho Nacional de Saúde)

1. Você está sendo convidado para participar da pesquisa Classificação da reserva ovariana em pacientes inférteis submetidas a fertilização in vitro através da combinação dos exames ecográfico, imunoenzimático e molecular.
2. Você foi selecionado por ter idade ≤ 37 anos, ciclo menstrual regular, presença de ambos ovários avaliado pelo ultrassom, sem história de cirurgia ovariana, sem história de endometriose e sem hidrossalpinge, infecções ou problemas endócrinos e sua participação não é obrigatória.
3. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento.
4. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.
5. O objetivo deste estudo é classificar a reserva ovariana em pacientes inférteis submetidas a FIV/ICSI utilizando de modo combinado os resultados dos exames de sangue e a ultrassonografia.
6. Sua participação nesta pesquisa consistirá em coletar amostra de sangue periférico (10 mL) para análise de marcadores moleculares (genotipagem) e também fornecer os dados dos exames rotineiramente realizados no tratamento de FIV/ICSI (dosagem do hormônio anti-mulleriano e contagem dos folículos antrais). O sangue coletado será conservado a -20°C e nenhum uso comercial do referido material poderá ser feito
7. Os riscos relacionados com sua participação são os inerentes à coleta de sangue periférico: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta de sangue. Em casos raros, essa coleta de sangue pode causar desmaio.
8. É possível que você não receba o benefício ao participar deste estudo, porém sua participação irá contribuir para que o médico tenha mais informações para escolher o protocolo de estimulação ovariana mais adequado para cada paciente. Tanto a alta quanto a baixa resposta ovariana são prejudiciais ao sucesso do tratamento de FIV.
9. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a

possibilitar sua identificação. No ato da coleta de sangue e da realização da ultrassonografia será gerado um número que identificará cada participante da pesquisa.

10. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o e-mail do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre esse Projeto de Pesquisa, agora ou a qualquer momento.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Laura Diniz Vagnini
Pesquisador Responsável
(16) 39118987
vagninilaura@cpdp.com.br

Prof. Dr. Antonio Hélio Oliani
Orientador

Participante da Pesquisa ou Responsável (nome e assinatura)

RG:

_____, ____ de _____ de _____