

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Avaliação da maturidade endometrial em ciclo espontâneo e estimulado com
citrato de clomifeno: uma coorte pareada.**

Ivan Sereno Montenegro

Porto Alegre, 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

Avaliação da maturidade endometrial em ciclo espontâneo e estimulado com citrato de clomifeno: uma coorte pareada.

Ivan Sereno Montenegro

Orientador:
Prof. Dr. Eduardo Pandolfi Passos

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Montenegro, Ivan Sereno
Avaliação da maturidade endometrial em ciclo espontâneo e estimulado com citrato de clomifeno: uma coorte pareada. / Ivan Sereno Montenegro. -- 2018. 97 f.
Orientador: Eduardo Pandolfi Passos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Receptividade Endometrial. 2. Maturidade Endometrial. 3. FIV. 4. Técnicas de Reprodução Assistida. 5. Estimulação Ovariana Controlada. I. Passos, Eduardo Pandolfi, orient. II. Título.

“O ventre é o campo da geração, e se este campo for corrompido, é em vão esperar que algum fruto seja tão bem semeado.”

Aristóteles (384-322 AEC).

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese à minha esposa Cristiana e a minha filha Rafaela.

AGRADECIMENTOS

Sou grato aos alunos, residentes, contratados, professores e colaboradores do serviço de Ginecologia e Obstetrícia, da Zona 6, do Centro Cirúrgico Ambulatorial, da Unidade de Bioestatística, do Programa de Pós Graduação em Ginecologia e Obstetrícia. E, aos professores da Faculdade de Medicina da Universidade federal do Rio Grande do Sul, que de alguma forma puderam colaborar com minha formação.

Agradeço a ajuda da obstinada enfermeira Suzana, sempre disposta a colaborar para o que fosse necessário. Não posso me esquecer de agradecer à Professora Raquel Camara Rivero, pela ajuda com as análises das lâminas de patologia e pelo conhecimento transmitido durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, coordenado pela Professora Elizabeth Obino Cirne Lima e pelo Professor Eduardo Pandolfi Passos, através dos quais estendo meu fraternal abraço a todos os profissionais, pós-graduandos e alunos de iniciação científica que por ali passaram. Registro um agradecimento especial para Paula e Isabel, sempre presentes em todos os momentos dessa caminhada.

Agradeço a oportunidade e confiança do meu orientador, professor Eduardo Pandolfi Passos.

Gostaria de agradecer à minha família pelo suporte e paciência com este trabalho. Não foi fácil para vocês abdicar de noites, finais de semanas e viagens para que eu pudesse terminar essa tese.

Meu agradecimento aos meus sogros, Professor Gabriel e Dra. Isabel.

Aos meus pais, Ivan e Bernadete.

À minha esposa Cristiana e à minha filha Rafaela.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	17
1. Metodologia para Revisão da Literatura	18
2. Mapa Conceitual Esquemático	20
3. Revisão da Literatura	21
3.1. Estado Atual das Técnicas de Reprodução Assistida.....	21
3.2. Taxas de Sucesso de Reprodução Assistida.....	22
3.3. Fatores Limitantes das Taxas de Sucesso em Reprodução Assistida	31
4. JUSTIFICATIVA.....	61
5. HIPÓTESES	63
5.1. Hipótese Nula.....	63
5.2. Hipótese Alternativa	63
6. OBJETIVOS.....	64
6.1. Objetivos Principais	64
6.2. Objetivos Específicos	64
REFERÊNCIAS	65
ARTIGO EM INGLÊS	78
CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
PERSPECTIVAS	95

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ART - Assisted Reproduction Techniques
- ASEBIR - Spanish Association for the Study of Reproductive Biology (Associação Espanhola para o Estudos de Biologia Reprodutiva)
- ASRM - American Society for Reproductive Medicine (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva)
- BCTGs - Bancos de Células e Tecidos Germinativos
- BS1- First Blood Sample
- BS2 - Second Blood Sample
- BS3 - Third Blood Sample
- BS4 - Fourth Blood Sample
- CC - Clomiphene Citrate
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention
- COS - Controlled Ovarian Stimulation
- DNA - Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
- EOC - Estimulação Ovariana Controlada
- ERA - Endometrial Receptivity Array (Teste para Receptividade Endometrial)
- ER - Estrogen Receptors
- ESRHE - European Society of Human Reproduction and Embryology (Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia)
- EUA - Estados Unidos da América
- FIV - Fertilização In-Vitro
- hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

ICSI - Intracytoplasmic Sperm Injection (Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides)

IFN- γ - Interferon- γ

IGF - Insulin-like Growth Factor (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina)

IGFBP - Insulin-like Growth Factor-Binding Protein (Proteína de Ligação do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina)

IL - Interleucina

IMQ - Imunohistoquímica

IVF - In Vitro Fertilization

LH - Hormônio Luteinizante

LIF - Fator Inibidor de Leucemia

MMP-2 - Matrix Metalloproteinase-2 (Metaloproteinases de Matriz-2)

miRNA - microRNA

OPN - Osteopontina

PG - Prostaglandina

PGD - Preimplantation Genetic Diagnosis (Diagnóstico Genético Pré-Implantacional)

PGS - Preimplantation Genetic Screening (Rastreio Genético Pré-Implantacional)

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

REDLARA - Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (Rede Latino-Americana de Reprodução Assistida)

RLA - Registro Latino-Americano de Reprodução Assistida

RNA - Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

RNAm - RNA mensageiro

SART - Society for Assisted Reproductive Technology (Sociedade para Tecnologia de Reprodução Assistida)

SisEmbrio - Sistema Nacional de Produção de Embriões

TGF- β - Transforming Growth Factor Beta - Fator de Transformação do Crescimento β

TNF- α - Tumor Necrosis Factor α (Fator de Necrose Tumoral α)

TRA - Técnicas de Reprodução Assistida

TV – Transvaginal

US – Ultrassonografia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resultados de busca por palavras-chave	19
Figura 2: Mapa Conceitual	20
Figura 3: Evolução do Número de Ciclos nos EUA.....	23
Figura 4: Resultados de Tratamentos de Reprodução Assistida nos EUA.....	24
Figura 5: Evolução do Número de Ciclos na Europa	25
Figura 6: Resultados de Tratamentos de Reprodução Assistida na Europa.....	25
Figura 7: Evolução do Número de Ciclos na América Latina	27
Figura 8: Resultados de Tratamentos de RA na América Latina	27
Figura 9: Número de centros de reprodução assistida no Brasil que reportaram dados para ANVISA	29
Figura 10: Evolução do número de ciclos no Brasil	29
Figura 11: Taxas de fertilização e clivagem no Brasil	29
Figura 12: Número de centros de reprodução assistida no Brasil que reportaram dados para ANVISA	30
Figura 13: Estágios do Desenvolvimento Embrionário.....	33
Figura 14: Pinopodos no Endométrio Receptivo	40
Figura 15: Técnicas Biologia Molecular.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos Embriões Precoces	35
Tabela 2: Classificação dos Embriões em Estágio de Mórula	35
Tabela 3: Classificação de Blastocitos	36
Tabela 4: Critérios de Noyes	39

RESUMO

Introdução: Apesar dos recentes avanços nas técnicas de reprodução assistida, as taxas de implantação e nascimento permanecem baixas. Embora a qualidade embrionária seja considerada o principal determinante do sucesso da implantação, a maturidade e a receptividade endometrial também são fatores importantes a serem considerados. Contudo, o que precisamente constitui um endométrio receptivo permanece incerto.

Objetivo: O objetivo deste estudo é investigar se o citrato de clomifeno altera a maturidade endometrial em pacientes inférteis.

Métodos: Em uma coorte prospectiva e pareada acompanhamos um ciclo espontâneo e um ciclo estimulado com citrato de clomifeno através de ultrassonografias transvaginais para determinar o dia da ovulação. Em ambos os ciclos, quatro amostras de sangue foram coletadas para determinar as concentrações séricas de FSH, LH, Estradiol e Progesterona (BS1 - na fase proliferativa inicial, BS2 - na fase proliferativa média, BS3 - após a ovulação, e BS4 - na fase lútea média). Uma biópsia endometrial foi realizada cinco dias após a ovulação em ambos os ciclos e enviada ao laboratório de anatomia patológica para análise e classificação de acordo com os critérios de Noyes.

Resultados: Vinte e duas participantes completaram o protocolo do estudo. Houve diferenças significativas no BS3 de FSH ($p = 0,001$), no BS3 e no BS4 de LH ($p < 0,001$ e $p = 0,049$, respectivamente), no BS2, BS3 e BS4 de estradiol ($p < 0,001$, $p = 0,024$ e $p < 0,001$, respectivamente) e no BS3 e BS4 de progesterona ($p = 0,028$ e $p < 0,001$, respectivamente). Considerando os critérios de Noyes, houve um atraso de um dia na comparação do ciclo estimulado com o ciclo espontâneo ($p = 0,004$) e um atraso de dois dias na comparação do ciclo estimulado com o dia da biópsia.

Conclusão: Este estudo indica que a estimulação ovariana com citrato de clomifeno retarda a maturidade endometrial, podendo prejudicar os processos de implantação embrionária. Os efeitos antiestrogênicos do citrato de clomifeno no endométrio podem ser responsáveis por essa diferença e, para evitar esse efeito, sugerimos considerar a estratégia *freeze-all* ao utilizar citrato de clomifeno para estimulação ovariana controlada, a fim de minimizar a assincronia endometrial.

Palavras-chave: Receptividade Endometrial; Maturidade Endometrial; Critérios de Noyes; Técnicas de Reprodução Assistida; Estimulação Ovariana Controlada; FIV; ICSI

ABSTRACT

Introduction: Despite recent advances in assisted reproduction techniques, implantation and birth rates remain low. Although embryo quality is considered the main determinant of implantation success, maturity and endometrial receptivity are also important factors to consider. However, what precisely constitutes a receptive endometrium remains uncertain. The objective of this study is to investigate if clomiphene citrate alters the endometrial maturation in infertile patients.

Methods: In a prospective cohort study, the ovulation of women was evaluated in spontaneous and stimulated cycles with clomiphene citrate. Subjects were submitted to transvaginal ultrasounds to follow the cycle and to determine the day of ovulation. In both cycles, four blood samples (BS1 - at early proliferative phase, BS2 - at mid proliferative phase, BS3 - after ovulation and BS4 - at mid luteal phase) were taken to determine the serum concentrations of FSH, LH, estradiol and progesterone. An endometrial biopsy was performed five days after ovulation in both cycles and sent to Hospital de Clínicas de Porto Alegre pathology lab for analysis and classification according to Noyes criteria.

Results: Twenty-two participants completed the study protocol. There were significant differences in FSH BS3 ($p = 0.001$), in LH BS3 and BS4 ($p < 0.001$ and $p = 0.049$, respectively), in estradiol BS2, BS3 and BS4 ($p < 0.001$, $p = 0.024$ and $p < 0.001$, respectively) and in progesterone BS3 and BS4 ($p = 0.028$ and $p < 0.001$, respectively). Considering Noyes criteria, there was a one-day delay when comparing the stimulated cycle with the spontaneous cycle ($p = 0.004$), and a two-day delay when comparing the stimulated cycle with the biopsy day.

Discussion: This study indicates that the ovarian stimulation with clomiphene citrate delays the endometrial maturity, and could possibly impair the implantation process.

The antiestrogenic effects of clomiphene citrate in the endometrium may be responsible for this difference and, to avoid this effect, it is suggested to consider the freeze-all strategy when using clomiphene citrate for controlled ovarian stimulation, in order to minimize the endometrial asynchrony.

Keywords: Endometrial Receptivity; Endometrial Maturity; Noyes Criteria; Assisted Reproduction Techniques; Controlled Ovarian Stimulation; IVF; ICSI

INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços nas Técnicas de Reprodução Assistida (TRA), as taxas de implantação permanecem baixas após os tratamentos com fertilização in vitro (FIV), Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI) e Estimulação Ovariana Controlada (EOC) [1]. A falha de implantação embrionária continua sendo o maior limitante do sucesso do TRA [2], e, apesar de, a qualidade embrionária ser considerada o principal determinante do sucesso da implantação, a maturidade e a receptividade endometrial também são importantes fatores a serem considerados. A implantação embrionária seguida de gestação dependem de: um embrião viável e de qualidade; um endométrio receptivo; e um “diálogo” molecular entre eles. Entretanto, o que precisamente constitui um endométrio receptivo continua incerto [3].

O processo de implantação em humanos é complicado e depende de múltiplas e sucessivas interações entre o embrião e o endométrio, e somente obtêm sucesso quando ocorre em um período específico durante a fase secretora do ciclo menstrual, chamado de “janela de implantação” [3]. A duração deste período é determinada pelos esteróides sexuais estrogênio e progesterona. Esses hormônios atuam através de seus receptores nucleares para ativar a atividade transcricional dos compartimentos do endométrio, governando a proliferação e diferenciação dos compartimentos do mesmo através de um intrincado mecanismo de interação parácrina, definindo, a partir daí, o momento no qual o útero é permissivo para a implantação do embrião [4].

1. Metodologia para Revisão da Literatura

A revisão sistemática da literatura foi realizada no dia 03/04/2018 a partir das bases de dados on-line LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), SciELO (Scientific Electronic Library Online) e PubMed (U.S. National Library of Medicine, U.S. National Institutes of Health). Foram utilizadas as seguintes palavras-chave em inglês: “endometrial receptivity”, “endometrial estrogen receptor”, “endometrial progesterone receptor”, “endometrial Ki67”, “window of receptivity”, “window of implantation” e “Noyes criteria”, sendo adicionados os filtros de seleção de língua de publicação (inglês e português).

A revisão foi ampliada por meio de busca à referências bibliográficas de revisões sistemáticas e estudos relevantes, solicitação de estudos publicados (ou não) à especialistas, e buscas em outras fontes. O total de artigos resultantes da busca conforme as palavras-chave utilizadas para cada base de dados, (Figura 1).

Os estudos foram selecionados em um processo de duas etapas, conforme detalhado a seguir. Em primeiro lugar, os títulos e resumos de pesquisas eletrônicas foram analisados por um revisor (ISM) e foram obtidos os artigos completos de todas as citações que eram susceptíveis de satisfazer os seguintes critérios de seleção: serem artigos de pesquisa originais; ensaios clínicos randomizados; revisões, revisões sistemáticas ou metanálises; possuir como desfecho primário a avaliação de marcadores de receptividade endometrial.

Em segundo lugar, as decisões de inclusão ou exclusão final foram feitas após a leitura dos artigos completos. Em caso de publicação duplicada, selecionaram-se as versões mais antigas ou mais completas.

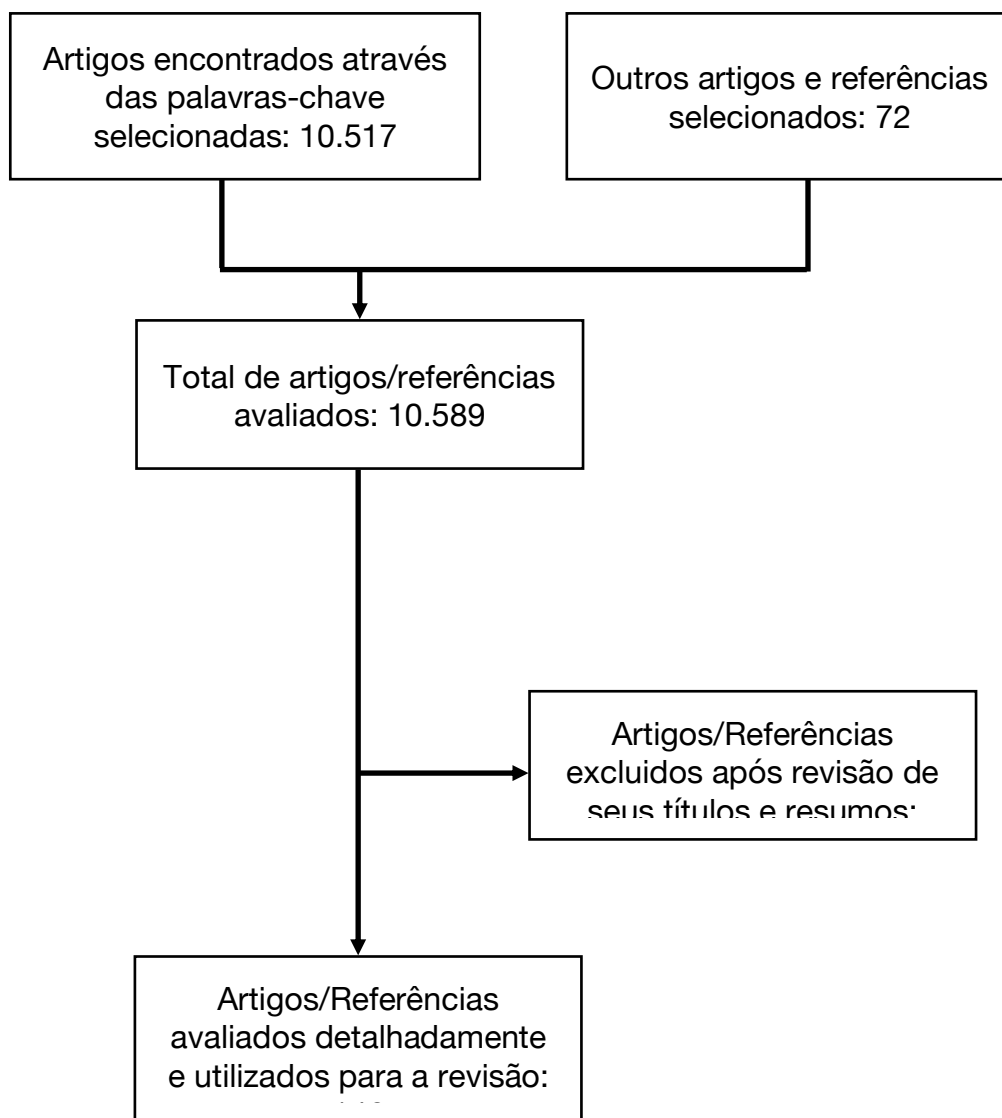


Figura 1: Resultados da busca por palavras-chave.

2. Mapa Conceitual Esquemático

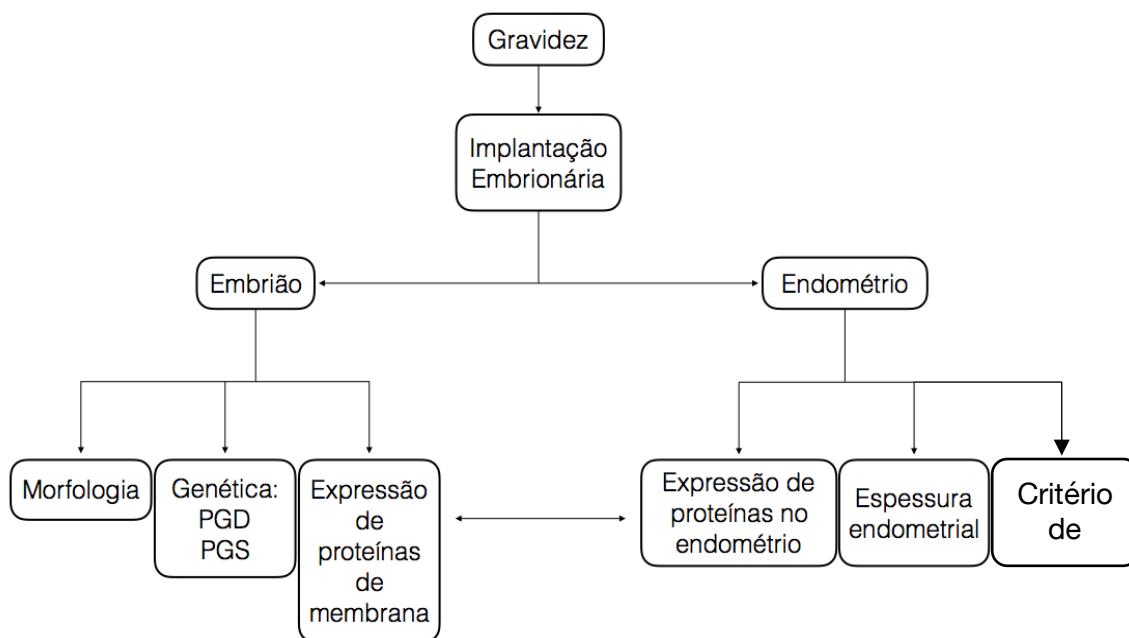


Figura 2: Mapa conceitual

3. Revisão da Literatura

3.1. Estado Atual das Técnicas de Reprodução Assistida

As TRA's englobam uma grande variedade de tratamentos clínicos e procedimentos de laboratório que incluem o manuseio de oócitos, espermatozoides e embriões, com a intenção de estabelecer uma gestação. Estão incluídos nestes procedimentos (porém não limitados a estes) a EOC, o coito programado, a inseminação intrauterina, a FIV, a ICSI, a biópsia de embrião, testes genéticos pré-implantacionais, criopreservação de gametas e embriões, doação de gametas e embriões, e a gestação substitutiva [5].

Apesar da constante melhora nos procedimentos de laboratório e sistemas de cultura e inclusão de novas tecnologias, as taxas de nascimento têm se mantido relativamente estáveis ao longo da última década. Por outro lado, com o objetivo específico de diminuir a incidência de gestações múltiplas decorrentes de técnicas de reprodução assistida, estão em voga discussões sobre a reconsideração do número de embriões a serem transferidos nos tratamentos de reprodução assistida [6].

O desenvolvimento e a disseminação dos tratamentos de reprodução assistida proporcionaram um maior acesso às técnicas e tratamentos, o que pode ser evidenciado através da quantidade crescente de ciclos de reprodução assistida que são iniciados todos os anos e divulgados pelas diversas sociedades de especialistas, nacionalmente e internacionalmente. Destacando-se, entre essas entidades: a Sociedade Americana para Medicina Reprodutiva (American Society for Reproductive Medicine - ASRM); a Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (European Society of Human Reproduction and Embryology - ESRHE); o Centers for Disease Control and Prevention (CDC); órgão regulador da saúde dos

Estados Unidos da América (EUA); a Rede Latino-Americana de Reprodução Assistida (Red Latinoamericana de Reproducción Asistida - REDLARA) na América Latina; a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil.

Apesar do aumento crescente no número de ciclos iniciados, não se observa uma melhora significativa no resultado dos tratamentos por ciclo iniciado (dado não avaliado estatisticamente).

3.2. Taxas de sucesso nos tratamentos de reprodução assistida

As taxas de sucesso podem ser relatadas de várias maneiras e os aspectos estatísticos destas taxas podem ser difíceis de interpretar [7]. Os diversos serviços, sociedades de especialistas e os principais periódicos da área de reprodução assistida e medicina reprodutiva divulgam suas estatísticas sem um consenso sobre a uniformidade dos dados apresentados, o que dificulta a interpretação pelos profissionais da área e pelas pessoas em busca de informações ou de tratamento de reprodução assistida.

No entanto, é notório o esforço destas entidades na direção de tentar uma uniformização para divulgação de dados dos diversos serviços e no compromisso de divulgação desses dados a partir de relatórios produzidos anualmente que disponibilizem informações de qualidade sobre o tema [8].

Nos EUA, a Sociedade para Tecnologia de Reprodução Assistida (Society for Assisted Reproductive Technology - SART) publica anualmente um relatório com as taxas de sucesso das clínicas que oferecem tratamento de reprodução assistida desde 1991 [9]. E o CDC, desde 1997, após aprovação da lei americana de certificação de taxas de sucesso de clínicas de fertilidade em 1995. As publicações incluem os dados de 1989 até 2015 pelo SART, e de 1995 até 2015 pelo CDC [7].

No último relatório foram coletados dados de 464 serviços no ano de 2015 com informações de 186.157 ciclos de tratamento de reprodução assistida. Nele, o CDC alerta para a dificuldade de se estabelecer um critério único e válido para avaliação dos serviços de reprodução assistida, já que diversos fatores podem influenciar os resultados obtidos em um determinado serviço, como a idade da mulher ou a causa da infertilidade [8].

Nos dados divulgados pelo SART e pelo CDC, após um período de crescimento no número de ciclos iniciados nos primeiros quatro anos, observamos uma tendência à diminuição na quantidade de ciclos nos últimos sete anos (Figura 3).

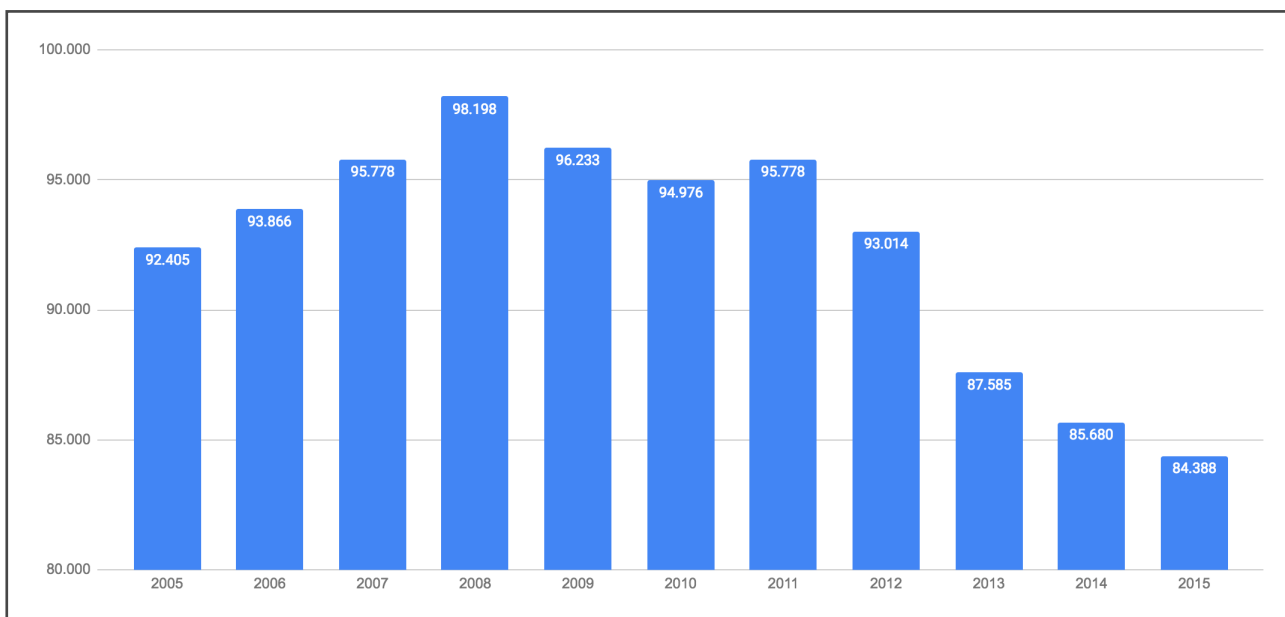


Figura 3: Evolução do número de ciclos nos EUA.

Com relação aos resultados dos tratamentos de reprodução assistida, não houve uma diferença importante nas taxas de parto (com pelo menos um nascido vivo) por ciclo iniciado e nos casos de ovodação. No entanto houve uma melhora importante nas taxas de parto (com pelo menos um nascido vivo) por transferência de embrião congelado (Figura 4) [9-19].

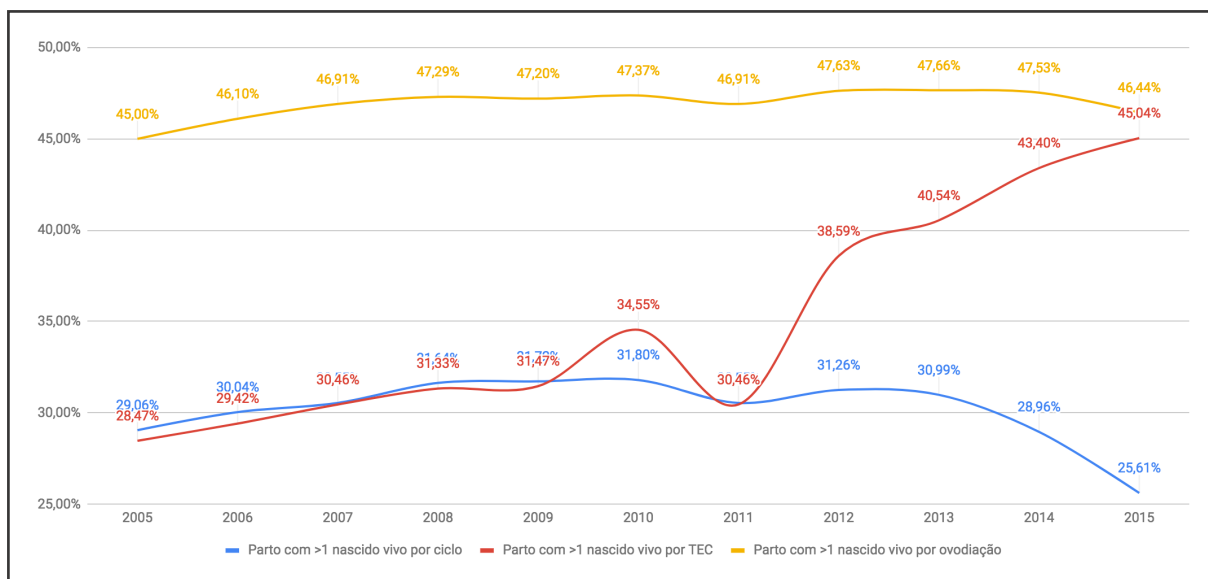


Figura 4: Resultado de tratamentos de reprodução assistida nos EUA.

Na Europa, a ESHRE é a responsável pela publicação das taxas de sucesso de clínicas filiadas a ela. Neste caso, os dados são publicados há 18 anos e desde 2001 já foram publicados 17 relatórios das atividades das clínicas de reprodução assistida europeias, compreendendo ciclos realizados entre 1997 e 2013 [20].

Em seu último relatório, referente aos ciclos de tratamento de reprodução assistida do ano de 2013, foram compilados dados de 38 dos 51 países europeus, com um total de 1.369 serviços de reprodução assistida e 686.271 ciclos de tratamento [20]. Nos dados apresentados pela ESHRE na Europa, por outro lado, conseguimos observar aumento crescente e constante no número de ciclos de reprodução assistida iniciados. Olhando para as taxas de parto (com pelo menos um nascido vivo), assim como nos EUA, não conseguimos observar um aumento nos últimos anos por ciclo iniciado, mas podemos observar uma melhora nas taxas de nascimento por transferência de embrião congelado (Figuras 5 e 6) [20-32].

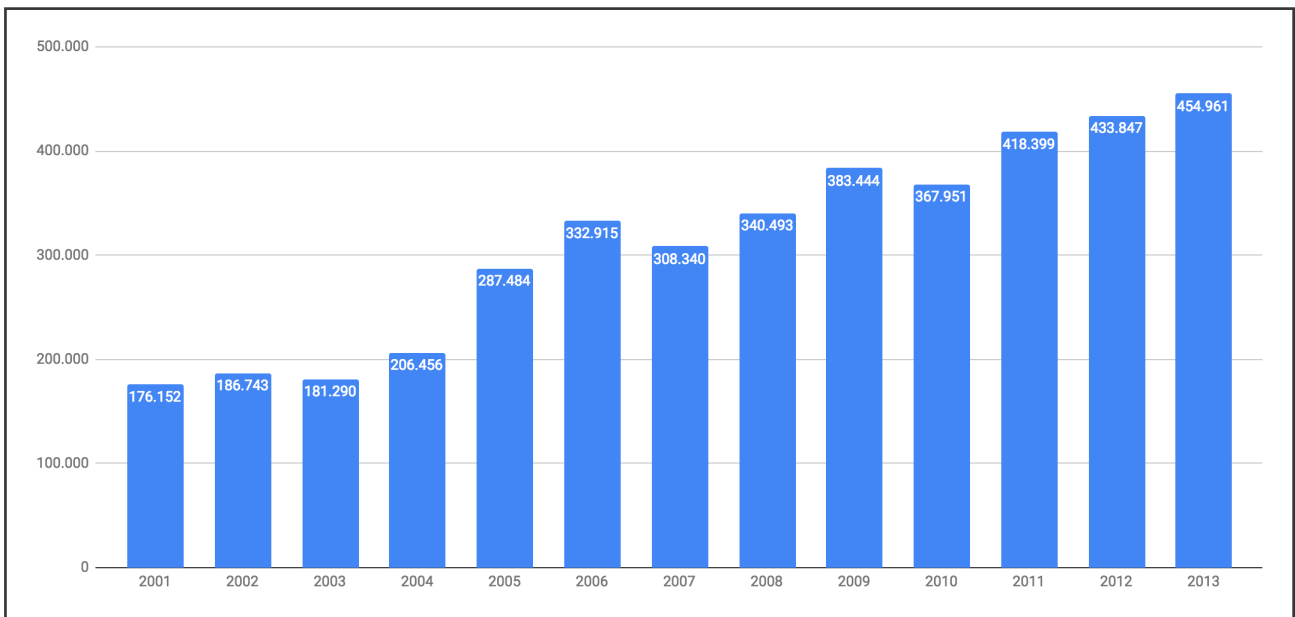


Figura 5: Evolução do número de ciclos na Europa.

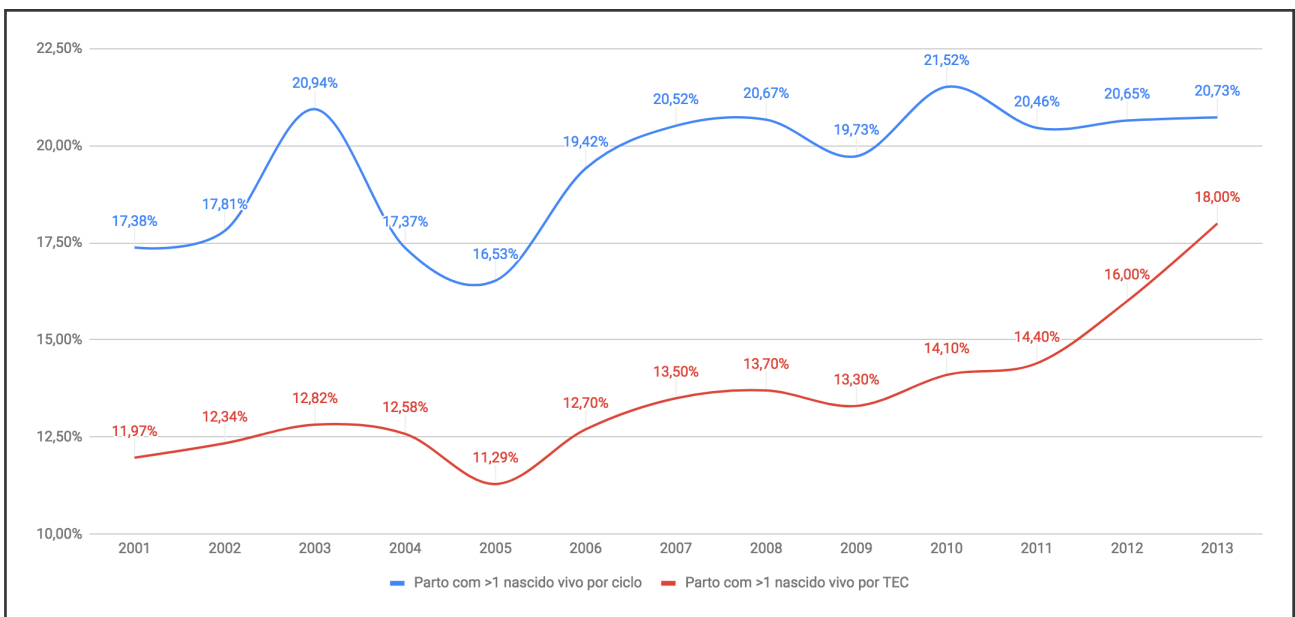


Figura 6: Resultado de tratamentos de reprodução assistida na Europa

Na America Latina, incluindo o Brasil, os relatórios com resultados dos procedimentos de reprodução assistida são publicados anualmente pela REDLARA desde 1990. Já foram publicados 26 relatórios, sendo o atual (o vigésimo sexto), compreendendo os resultados de 159 instituições associadas de 15 países e 65.534 ciclos de tratamento de reprodução assistida, desde o México, ao norte, até o Chile, ao Sul [33].

No relatório, o Brasil aparece contribuindo como o país com maior número de instituições que colaboraram com dados para elaboração deste relatório e, também, como o país com o maior número de casos reportados, com total de 27.269 ciclos de tratamento de reprodução assistida, correspondendo a 133,4 ciclos por milhões de habitantes no país [33].

O relatório é chamado de Registro Latino-Americano de Reprodução Assistida (RLA) e tem o objetivo de [33]:

1. Divulgar informações sobre os procedimentos de reprodução assistida realizados na América Latina, servindo como um controle de qualidade externo a ser utilizado por instituições que realizam esses procedimentos na região e para outras regiões do mundo;

2. Monitorar os resultados, bem como as tendências de segurança e eficácia. O monitoramento dessas duas variáveis contribui para o desenvolvimento de melhores intervenções de saúde e para o desenvolvimento de políticas públicas apropriadas;

3. Capacitar e orientar casais inférteis e ajudar a avaliar riscos e benefícios ao solicitar tratamentos de reprodução assistida;

4. Desenvolver um banco de dados robusto para estudos epidemiológicos.

Nos dados divulgados pelo registro Latino Americano, também conseguimos observar um aumento crescente no número de ciclos iniciados (Figura 7).

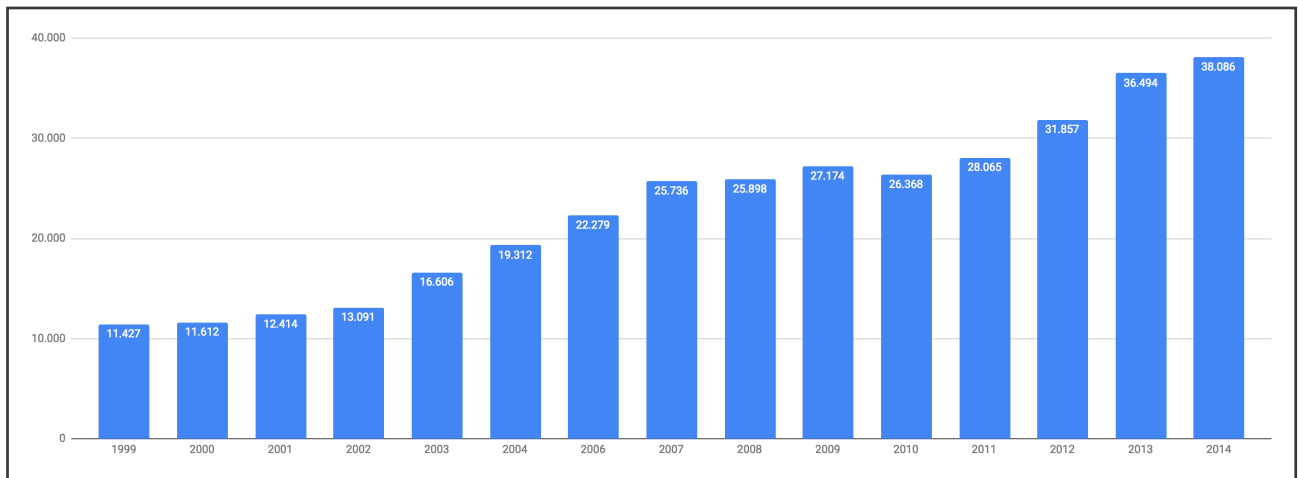


Figura 7: Evolução do número de ciclos na América Latina

As taxas de nascimento (com pelo menos um nascido vivo) por ciclo iniciado também não apresentam um incremento importante. Já as taxas de nascimento (com pelo menos um nascido vivo) por transferência de embrião congelado e por ovulação aumentaram 115% e 43%, respectivamente, nos últimos 16 anos de dados divulgados (Figura 8) [33-47].

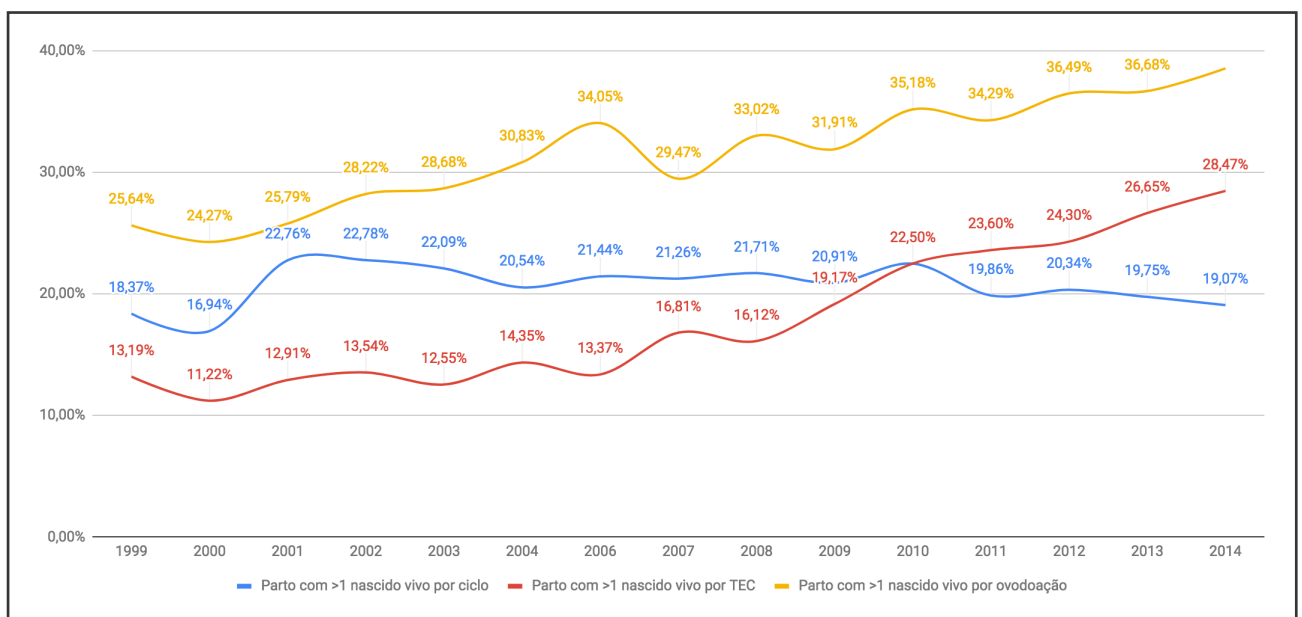


Figura 8: Resultado de tratamentos de reprodução assistida na América Latina

Ainda no Brasil, a ANVISA, através do Sistema Nacional de Produção de Embriões (SisEmbrio), criado pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC)/ANVISA nº 29, de 12 de maio de 2008, e atualizado pela RDC 23/2011, solicita as instituições que oferecem tratamento de reprodução assistida que enviem seus dados de produção com o objetivo de [48]:

1. Conhecer o número de embriões humanos produzidos pelas técnicas de Fertilização In Vitro criopreservados (congelados) nos Bancos de Células e Tecidos Germinativos (BCTGs), mais conhecidos como clínicas de Reprodução Humana Assistida;

2. Atualizar as informações sobre embriões doados para pesquisas com células tronco embrionárias, conforme demanda da Lei nº 11.105/2005 (Lei de Biossegurança) e Decreto nº 5.591/2005;

3. Divulgar informações relacionadas à produção de células e tecidos germinativos (oócitos e embriões) no Brasil, como: número de ciclos de FIV realizados, número de oócitos produzidos, número de oócitos inseminados, número de oócitos com dois pronúcleos, número de embriões clivados, número de embriões transferidos, bem como o número de embriões descartados por ausência de viabilidade;

4. Divulgar os indicadores de qualidade dos BCTGs, para promover a melhoria contínua do controle de qualidade, auxiliar os inspetores sanitários a avaliar/inspecionar os BCTGs, bem como possibilitar o acesso à população aos indicadores de qualidade dos serviços.

A partir do relatório, é possível observar que o número de centros de reprodução assistida no país vem aumentando, assim como o número de ciclos de tratamento de reprodução assistida. As taxas de fertilização e clivagem (dados

indiretos que podem refletir a qualidade dos laboratórios de reprodução assistida) mantêm-se estáveis em todo o período avaliado (Figuras 9, 10 e 11).

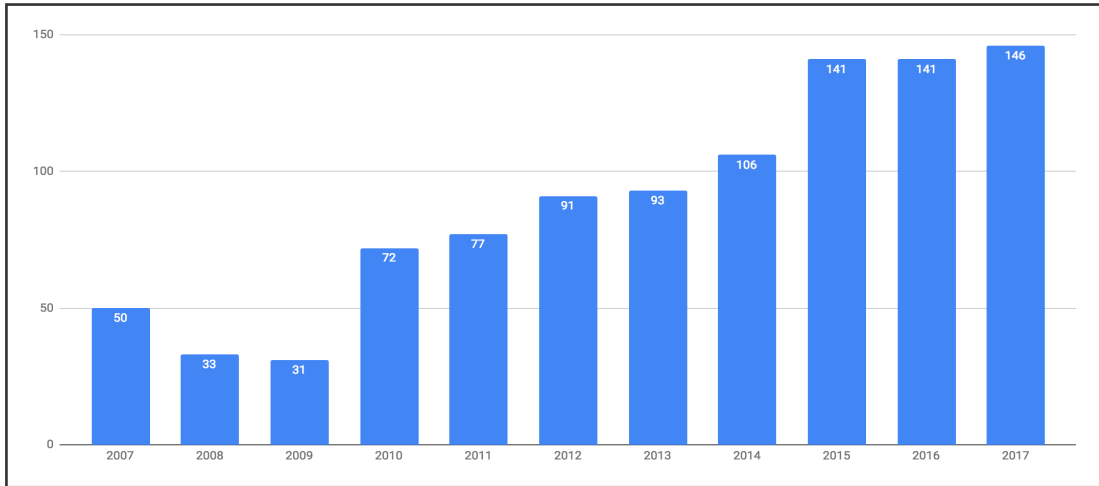


Figura 9: Número de centros de reprodução assistida no Brasil que reportaram dados para ANVISA

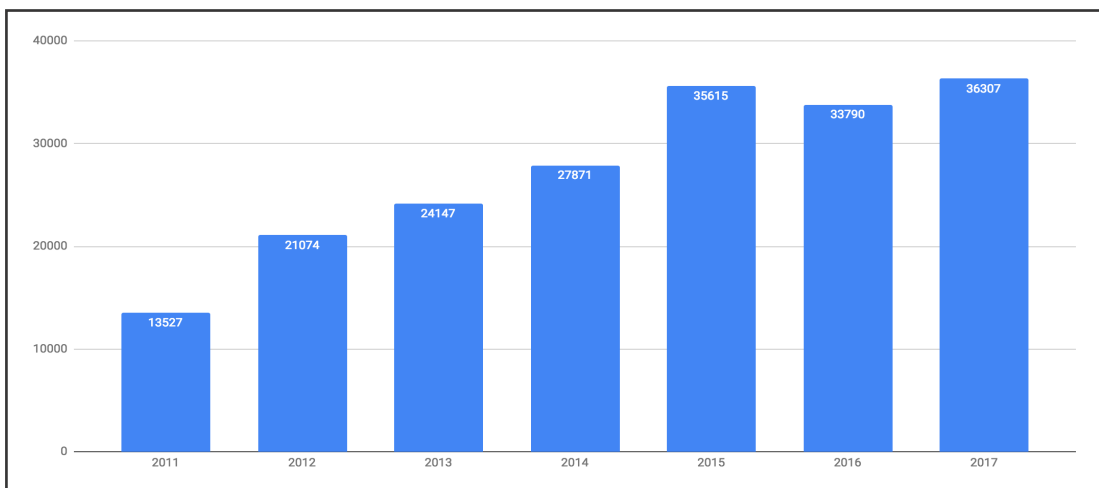


Figura 10: Evolução do número de ciclos no Brasil

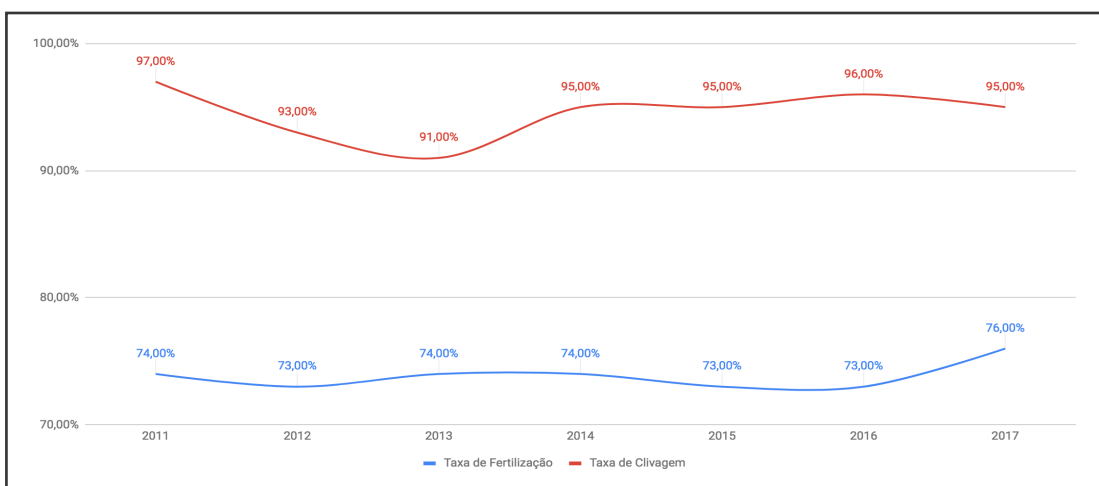


Figura 11: Taxas de fertilização e clivagem no Brasil

Neste mesmo período também observamos o número crescente de embriões transferidos e de embriões criopreservados (Figura 12) [49-59].

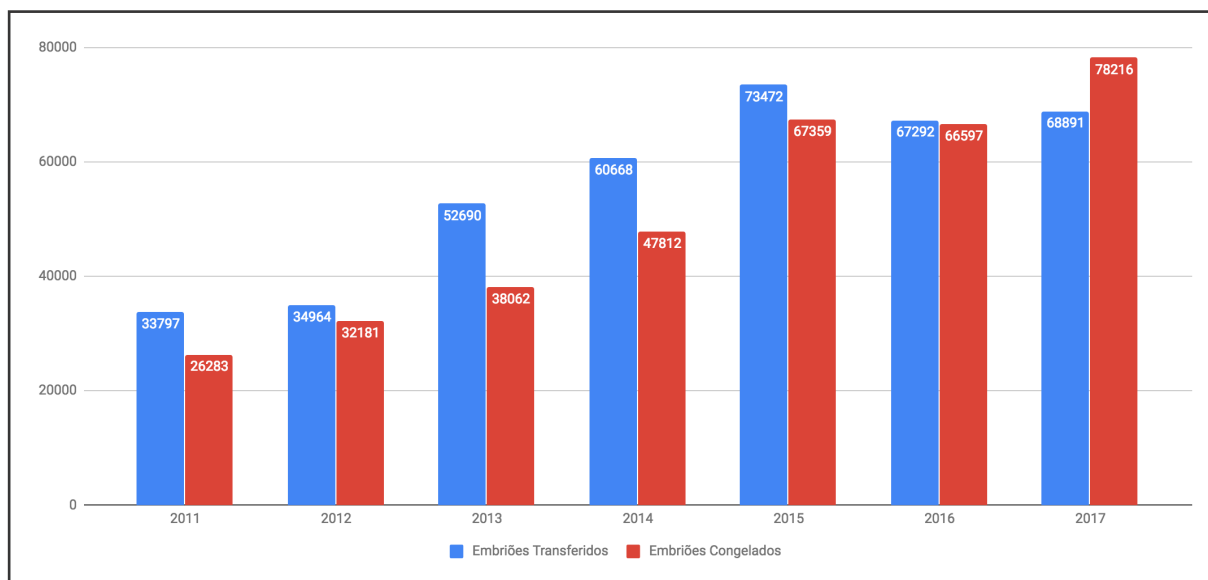


Figura 12: Quantidade de embriões transferidos e congelados no Brasil

- **Resultados de tratamento de reprodução assistida após avaliação genética do embrião**

Em uma metanálise de 2015 [60] que analisou o desfecho de nascimento, contendo um ensaio clínico randomizado com 155 pacientes, houve uma taxa de nascidos vivos 26% maior no grupo que realizou o *screening* genético pré-implantacional (PGS) (61/72) em comparação com o grupo controle (que não fez PGS) (56/83) (RR 1,26, IC 95% 1,05-1,50). Na mesma metanálise, quando avaliados os resultados de 3 estudos de coorte agrupados, com um total de 601 pacientes, nenhuma diferença significativa na taxa de nascidos vivos foi observada entre o grupo que realizou o PGS e o grupo controle (RR 1,35, IC 95% 0,85 –2.13).

- **Resultados de tratamento de reprodução assistida após teste para receptividade endometrial (endometrial receptivity array - ERA)**

O ERA foi inicialmente proposto para ser utilizado em pacientes que apresentaram falha de implantação em tratamentos de FIV/ICSI anteriores (pelo menos três transferências de embriões com boa/excelente qualidade morfológica

sem sucesso). O desenvolvedor, fabricante e distribuidor do teste divulga taxas de gravidez de até 88% após realização do teste [61], mas analisando detalhadamente as referências listadas no website da empresa, não é possível encontrar essa informação com a clareza necessária para considerar essa taxa como sendo real [62-66].

O mesmo grupo de pesquisadores em resultado preliminar de ensaio clínico randomizado, estendendo o uso do ERA para todas as pacientes em tratamento de FIV, não conseguiu demonstrar até o presente momento um aumento na taxas de nascimento com o uso do teste em transferência de embrião personalizada, comparando-o com outros dois grupos (transferência de embrião fresco e transferência de embriões criopreservados) [67]. Outros grupos não relacionados com o desenvolvimento e comercialização do teste também não conseguiram demonstrar um melhor resultado de taxas de gravidez em curso quando comparam as pacientes que foram submetidas e as que não foram submetidas ao ERA antes da transferência do embrião [68, 69]

3.3. Fatores limitantes das taxas de sucesso em RA

A evolução tecnológica dos últimos 10 anos na área da reprodução assistida não resultou em uma melhora dos resultados dessa modalidade de tratamento [70]. Esses avanços levaram à possibilidade de cultivar embriões de boa qualidade [1] e, mesmo considerando a característica do embrião como principal determinante para o êxito da implantação, a maturidade e a receptividade endometrial também são condições relevantes a serem levadas em conta e, hoje, consideramos a falha de implantação embrionária como sendo o maior fator limitante do sucesso do TRA [1, 2].

Assim, o entendimento de quando a implantação ocorre, expôs a importância da sincronia entre o embrião e o endométrio como um componente crítico da gravidez bem-sucedida [71]. A implantação embrionária evoluindo para gravidez depende de um embrião viável e de qualidade, de um endométrio em seu momento receptivo, e de uma interação entre eles. Entretanto, o que precisamente constitui o endométrio receptivo segue desconhecido [3].

- **O embrião**

O embrião é uma estrutura originária da fertilização de um oócito (gameta feminino) por um espermatozóide (gameta masculino) que acontece, naturalmente, na tuba uterina. Logo após a fertilização, a estrutura gerada passa a ser chamada de zigoto e, em seguida, começa a dividir-se em várias células [72]. O processo que ocorre após a formação do zigoto é denominado de divisão celular ou clivagem e tem início cerca de 30 horas após a fertilização, sendo formadas, a partir desse processo, as células embrionárias chamadas de blastômeros (Figura 13).

Decorridas 45 horas da fertilização, atinge-se o estágio de quatro blastômeros e, em cerca de três dias após, é atingido o estágio de 12 a 16 blastômeros. O crescimento por divisão mitótica do número de blastômeros no embrião não se reflete no aumento do volume do mesmo, que então passa a formar uma massa compacta de células, chamada de mórula [73].

Durante a clivagem, o embrião desce pela tuba uterina até chegar ao útero. Após atingir o útero, a mórula começa a receber fluidos uterinos, começando a surgir, em seu interior, pequenos espaços cheios de líquidos. Nesse momento, começa a haver um rearranjo das células, formando um aglomerado em forma de botão e, no interior, será formada uma cavidade cheia de líquido. Nesta fase, o embrião passa a ser chamado de blastocisto, onde as células periféricas irão formar

o trofoblasto, o botão polar forma o embrioblasto, enquanto a cavidade repleta de líquido forma a blastocele. O trofoblasto contribuirá para a formação de parte da placenta e o embrioblasto irá originar o embrião. Entre o quinto e o sexto dia, o blastocisto estabelece contato com o epitélio endometrial e, ao final da primeira semana, há a implantação superficial deste no endométrio uterino [73].

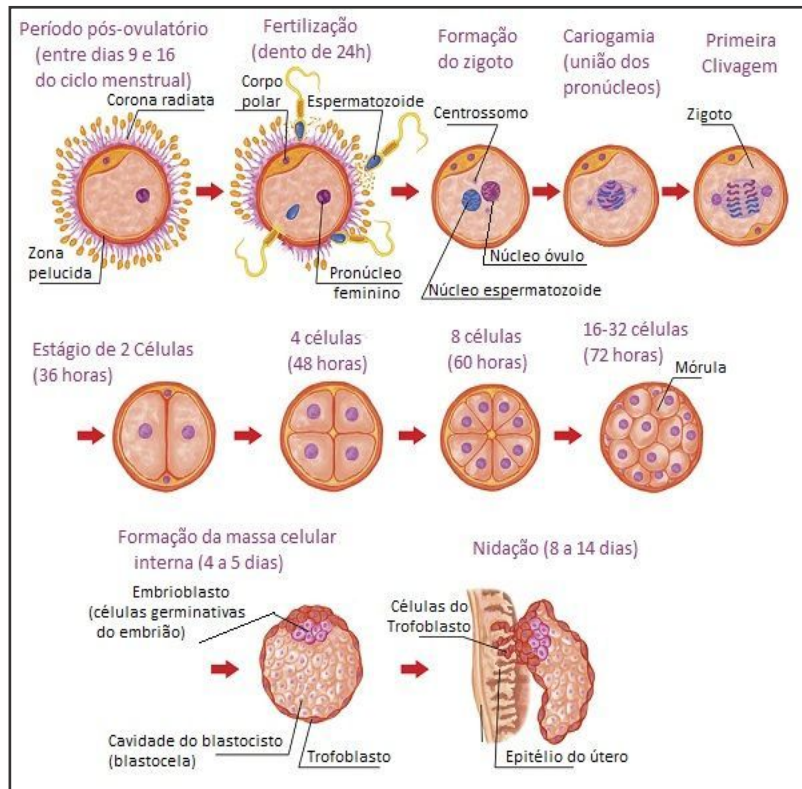


Figura 13: Estágios do desenvolvimento embrionário

Na fertilização in-vitro, a seleção dos gametas (oócitos e espermatozoides), a fertilização do oócito, e o desenvolvimento inicial até a fase de blastocisto são realizadas dentro do laboratório de reprodução assistida e, mesmo com a grande evolução dos procedimentos e tratamentos de reprodução assistida, a seleção de embriões continua baseada principalmente em critérios morfológicos [74].

Com a consciência de que apenas a morfologia não reflete a fisiologia do embrião, testes não invasivos têm sido propostos para identificar marcadores de viabilidade nos embriões individualmente [6].

- **Métodos de avaliação embrionária - Morfologia**

A classificação embrionária com base em critérios morfológicos utiliza os parâmetros estruturais do embrião em cada estágio de seu desenvolvimento qualificando-os em um sistema de classificação por categorias e estabelecendo sua relação com o potencial de implantação embrionária [74].

Diversos sistemas de classificação foram desenvolvidos, um dos mais utilizados para fins de avaliação laboratorial e para apresentação em artigos científicos são os critérios da Associação Espanhola para o Estudo de Biologia Reprodutiva (Spanish Association for the Study of Reproductive Biology - ASEBIR) que leva em consideração a avaliação do oócito (não detalhada), do embrião e do blastocisto, descritos brevemente a seguir [74]:

- **Zigoto (dia 1)**: entre 16 e 18 horas após a inseminação dos oócitos (por FIV ou ICSI) é possível observar os pró-núcleos e os corpúsculos polares. Na fertilização adequada o zigoto apresenta dois pró-núcleos e dois corpúsculos polares. As alterações nas quantidades numéricas, tanto de pró-núcleos, quanto de corpúsculos polares são consideradas erros nos processos de fertilização e, nesses casos, é recomendado o descarte desse zigoto.

Entre 25 e 27 horas após a inseminação é possível observar a primeira clivagem mitótica, a similaridade dos blastômeros, a fragmentação e os casos de multinucleação.

- **Embriões iniciais (dias 2 e 3)**: quatro categorias são definidas quanto ao potencial de implantação do embrião, sendo "A" a categoria com maior potencial de implantação, "B" e "C" intermediária e "D" a menor. Os embriões são enquadrados nas categorias conforme: avaliação da quantidade de blastômeros e taxa de clivagem; tamanho dos blastômeros; fragmentação celular; visualização do nucléolo

e multinucleação vacuolização, avaliação da zona pelúcida e outras anormalidades (Tabela 1).

Classificação	Dia	Número de células ("→" do dia 2 para o dia 3)	% de Fragmentação	Simetria	Multinucleação	Outros
A	2	4	< 10%	Blastômeros simétricos	não	normal
	3	8				
B	2	5	> 10 - 25%	Blastômeros simétricos	não	≤ 50% dos blastômeros com pequenos vacúolos ou zona pelúcida
	3	5 → 7 - 10 4 → 7, 9, 10				
C	2	2, 3, 6	> 25 - 25%	Blastômeros assimétricos	Uma célula binucleada com demais características de Grau A ou até 2 células	≤ 50% dos blastômeros com grandes vacúolos
	3	2, 3, 5 6 → 8 - 10 6, 11, 12				
D	2	3 (sem estágio específico) > 6	> 35%	Blastômeros assimétricos	Multinucleação	> 50% dos blastômeros com vacúolos ou anormalidades citoplasmáticas severas
	3	3 - 5, uma célula a mais que no dia 2				

Tabela 1: Classificação dos Embriões Precoces (Class 2 e 3)
Fonte: Adaptado de Saiz, IC., et al, 2018.

- **Mórula (dia 4):** Os parâmetros avaliados neste dia são as divisões mitóticas, a adesão, compactação celular e as anomalias morfológicas de mau prognóstico (fragmentação, vacuolização e cavitação intracelular) (Tabela 2).

Dia 3	Características morfológicas no dia 4	Dia 4
A	Cavitação precoce	A
	Compactação total e mais de 8 blastômeros	B
	Compactação parcial (1-2 células excluídas)	B
	Compactação parcial (>2 células excluídas) Sem compactação (>8 blastômeros)	C
B	Cavitação precoce	B
	Compactação total e mais de 8 blastômeros	B
	Compactação parcial (1-2 células excluídas)	B
	Compactação parcial (>2 células excluídas) Sem compactação (>8 blastômeros)	C
C	Cavitação precoce	C
	Compactação total e mais de 8 blastômeros	C
D	Compactação parcial	D
	Sem compactação	
D	Qualquer característica	D
	Embriões no dia 4 com as seguintes características: > 35% de fragmentação Vacúolos muito difundidos < 50% de compactação ≤ 8 blastômeros sem compactação	D

Tabela 2: Classificação dos Embriões no Estágio de Mórula (Dia 4)
Fonte: Adaptado de Saiz, IC., et al, 2018.

- **Blastocisto (dias 5 e 6):** Nesse estágio, os parâmetros levados em consideração são: o grau de expansão da blastocele, as características do trofoectoderma e da massa celular interna (Tabela 3).

Massa celular interna (MCI)			Trofoectoderma	
Classificação	Tamanho da MCI (µm)	Aspecto da MCI	Classificação	Aspecto do Trofoectoderma
A	3500-1920	Compacto	A	Homogêneo, coeso com muitas células
B	3500-1900	Frouxa	B	Homogêneo, sem muitas células
C	1500		C	Fraças células
D	Em degeneração		D	Em degeneração
Excluído	Necróticos	Qualquer	Excluído	Necróticos

Diário	Parâmetro	Diário	MCI	Trofoectoderma	Classificação final
Dia 4	Grau de expansão	Mémula compacta	DE: Expandido inicial Para: Hatching	A	A
				B	B
Dia 4	Grau de expansão	Mémula não compacta	DE: Expandido inicial Para: Hatching	C	C
				D	D
Dia 4	Grau de expansão	Mémula não compacta	DE: Expandido inicial Para: Hatching	A	A
				B	B
Dia 4	Grau de expansão	Mémula não compacta	DE: Expandido inicial Para: Hatching	C	C
				D	D
Dia 4	Grau de expansão	Mémula não compacta	DE: Expandido inicial Para: Hatching	A, B, C ou D	D
					C
Dia 4	Grau de expansão	Mémula não compacta	DE: Expandido inicial Para: Hatching		D
					D
Dia 5	Grau de expansão	Mémula compacta	DE: Expandido inicial Para: Hatching	A	B
				B	B
Dia 5	Grau de expansão	Mémula não compacta	DE: Expandido inicial Para: Hatching	C	C
				D	D
Dia 5	Grau de expansão	Mémula não compacta	DE: Expandido inicial Para: Hatching	A	B
				B	B
Dia 5	Grau de expansão	Mémula não compacta	DE: Expandido inicial Para: Hatching	C	C
				D	D
Dia 5	Grau de expansão	Mémula não compacta	DE: Expandido inicial Para: Hatching	A, B, C ou D	D
					D
Dia 5	Grau de expansão	Mémula não compacta	DE: Expandido inicial Para: Hatching		D
					D

Tabela 3: Classificação de Blastocistos
 Fonte: Adaptado de Saiz, IC., et al, 2018.

- **Métodos de avaliação embrionária - métodos genéticos**

O teste genético pré-implantacional pode ser realizado em células retiradas de embriões precoces antes da transferência para o útero para fins de diagnóstico genético pré-implantacional (PGD - Preimplantation Genetic Diagnosis) ou rastreio genético pré-implantacional (PGS - Preimplantation Genetic Screening). O PGD remete à detecção de condições conhecidas, tais como mutações específicas ou rearranjos cromossômicos em embriões, quando um ou ambos os pais carregam uma mutação ou rearranjo gênico. Já o PGS aborda o rastreamento de aneuploidias

cromossômicas, particularmente em pacientes com idade materna avançada ou com história de perda recorrente de gravidez [75].

- **O endométrio**

O endométrio é a camada interna, mucosa do útero que normalmente sofre proliferação e descamação durante o ciclo menstrual [76] e pode ser considerada uma das mais dinâmicas partes do corpo humano [77].

Assim, o endométrio é o único entre os tecidos adultos na extensão do remodelamento que sofre durante cada ciclo menstrual. A camada externa funcional é eliminada durante a menstruação, enquanto que, paralelamente, a superfície desnudada é rapidamente reepitelizada. Durante a fase proliferativa, sob a influência do estrogênio, todos os compartimentos celulares e suas matrizes extracelulares de suporte são restaurados. Após a ovulação, e impulsionado pelo aumento dos níveis de progesterona, os vários tipos de células se diferenciam em preparação para implantação, caso ocorra a concepção [78].

- **Receptividade Endometrial e Janela de Implantação**

O processo de implantação em humanos é complicado e depende de múltiplas e sucessivas interações entre o embrião e o endométrio, e somente obtêm sucesso quando ocorre num período específico durante a fase secretora do ciclo menstrual, chamado de "janela de implantação" [3, 79, 80]. Podemos afirmar que durante a maior parte do ciclo menstrual, o endométrio não é receptivo para um embrião se implantar. De fato, pelo menos em parte do tempo, especificamente na fase proliferativa, este parece ser ativamente hostil ao embrião [78]. A duração deste período é determinada pelos esteróides sexuais estrogênio e progesterona. Esses hormônios atuam através de seus receptores nucleares para ativar a atividade

transcricional dos compartimentos do endométrio, governando a proliferação e diferenciação dos compartimentos do endométrio através de um intrincado mecanismo de interação parácrina, definindo, a partir daí, o momento no qual o útero é permissivo para a implantação do embrião [4]. Nas mulheres, esta "fase receptiva" é de aproximadamente 4 dias de duração, ocorrendo em cerca de 5 a 10 dias após o aumento do hormônio luteinizante (LH) [78].

Assim, temos que a receptividade endometrial refere-se à capacidade do útero de aceitar e acomodar um embrião, resultando em uma gravidez bem sucedida [71]. Um outro conceito relacionado ao anterior é o que se refere a uma janela de implantação, que define o período de receptividade endometrial, quando as interações entre endométrio e embrião podem ocorrer [71].

Com esses dois conceitos em mente, podemos enxergar o endométrio como um guardião, permitindo que os embriões se conectem apenas sob condições ótimas e o conceito de um mecanismo mediado por um receptor de ligação e invasão de embriões forneceu uma estratégia para a escolha de biomarcadores biologicamente relevantes para o estudo da receptividade endometrial. Embora o marcador perfeito seja funcionalmente importante para o processo de implantação, o consenso sobre quais biomarcadores usar para avaliar a receptividade endometrial ainda não foi estabelecido [71].

- **Métodos de Avaliação Endometrial – Patologia**

- **Critérios de Noyes**

A avaliação da maturidade endometrial remonta ao trabalho clássico de Noyes nos anos 1950 [81]. Seu artigo original descreve detalhadamente as

informações sobre as características morfológicas do endométrio (Tabela 4) nas diferentes fases do ciclo menstrual [1].

Fase/dia do ciclo	Características histopatológicas do endométrio
Fase proliferativa	As glândulas se tornam mais tortuosas devido à proliferação epitelial, em resposta à produção de estrogênio e aos receptores de estrogênio ativados no epitélio.
Fase proliferativa precoce (4 a 7 dias)	Apresenta epitélio de superfície delgada, glândulas curtas e retas, estroma compacto, atividade mitótica mínima e núcleos grandes.
Fase proliferativa média (dias 8 - 10)	Apresenta epitélio de superfície colunar; glândulas curvas mais longas, edema estromal variável e numerosas figuras mitóticas.
Fase proliferativa tardia (dias 11 - 14)	Apresenta epitélio superficial ondulante, glândulas tortuosas com atividade mitótica proeminente e pseudoestratificação; Estroma denso, vacúolos subnucleares em menos de 50% das glândulas.
Ovulação	A presença de vacúolos subnucleares em 50% das glândulas evidencia a ovulação.
Fase secretora / lútea	A secreção de progesterona inibe a atividade proliferativa do endométrio e induz a atividade secretora. O endométrio secretor é exuberante e polipoide, sem necrose; pode ser hemorrágico se próximo do dia 28.
Dia 15	Não apresenta alterações em relação ao endométrio proliferativo tardio. A presença de vacúolos nucleares dispersos NÃO é específica para a ovulação (deve ser de 50% ou mais).
Dia 16	Apresenta aparência de "tecla de piano" com vacúolos subnucleares.
Dia 17	Apresenta aparência de "tecla de piano" com vacúolos ao nível dos núcleos.
Dia 18	Apresenta vacúolos luminiais com tamanho menor e os núcleos se aproximam da base da células.
Dia 19	Presença de secreção intraluminal; poucos vacúolos; ausência de mitoses e pseudo estratificação.
Dias 20 - 21	Pico de secreção; início de edema estromal; raros vacúolos; núcleos redondos e localizados na base da célula.
Dia 22	O edema estromal é máximo.
Dia 23	As arteríolas espirais são proeminentes com paredes espessadas, enrolamento e proliferação endotelial.

Dia 24	Nota-se predecidualização perivascular, com hipertrofia das células do estroma, com acumulação eosinofílica citoplasmática; as glândulas ficam serrilhadas e tortuosas.
Dia 25	Apresenta predecidualização abaixo do endométrio de superfície.
Dia 26	Observa-se confluência de tecido predecidual e granulócitos estromais.
Dia 27	Os granulócitos estromais estão mais proeminentes; observa-se necrose focal e hemorragia.
Dia 28	Observa-se o derramamento, também chamado de colapso glandular e estromal; necrose e hemorragia proeminentes; poeira nuclear na base do epitélio glandular; estroma condensado com alteração papilar-sincicial sobrejacente; trombos de fibrina intravascular; granulócitos estromais.

Tabela 4: Critérios de Noyes

Adaptado de Noyes, R.W., A.T. Hertig, and J. Rock, Dating the endometrial biopsy. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 1950. 5(4)

○ Pinopodos

Outro potencial marcador para receptividade endometrial é a presença de pinopodos no endométrio secretor. Os pinopodos são pequenas protuberâncias, tipo balão no epitélio luminal endometrial, com alguns micrômetros de largura, podem ser avaliados através de microscopia eletrônica de varredura (Figura 14). Possivelmente, a formação e o desaparecimento de pinopodos marcam temporariamente a janela de implantação e, no local onde eles aparecem, o melhor local para implantação no endométrio [1].

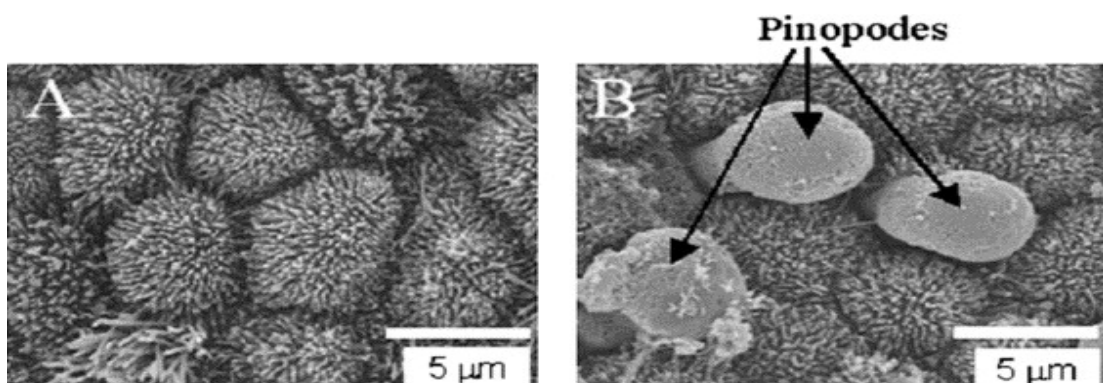


Figura 14: Pinopodos no endométrio receptivo. (A) Ausência de pinipodos; (B) demonstração de pinopodos no endométrio.

Fonte: Quinn, C. et al., The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. *Fertility and Sterility* 2007. 87 (5)

- **Imunohistoquímica**

A imunohistoquímica (IHQ) é um método de localização de antígenos, como proteínas, por exemplo, em tecidos, explorando o princípio da ligação específica entre anticorpos e antígenos no tecido biológico. A coloração IMQ é amplamente utilizada no diagnóstico de células anormais, tais como aquelas encontradas em neoplasias. A IHQ é também amplamente utilizada em pesquisas para compreender a distribuição e localização de biomarcadores e proteínas diferentemente expressas em diferentes partes de um tecido biológico. A visualização de uma interação antígeno anticorpo pode ser obtida de diversas formas. Na situação mais comum, um anticorpo é conjugado à uma enzima que provocará uma reação seguida de uma coloração visível por microscopia [82].

- **Receptores de Estrogênio**

O hormônio estrogênio age através de seu receptor nuclear homônimo, em especial na primeira fase do ciclo menstrual, chamada de fase proliferativa [4]. A ativação dos receptores de estrogênio sinaliza, a nível nuclear, a necessidade de indução de proliferação celular no compartimento endometrial, determinando o crescimento da camada basal do endométrio pelo mecanismo de mitoses múltiplas das células tronco existente na camada basal endometrial [4].

O receptor de estrogênio ativado promove a proliferação endometrial, determinando a transcrição de proteínas relacionadas à mitose celular, como a proteína Ki67, e também sinaliza as células para expressão de receptores de progesterona. Ao mesmo tempo, o próprio estrogênio se autorregula através de um efeito de feedback negativo nas células endometriais para expressão dos seus receptores [4].

Um estudo clássico de IMQ demonstrou que a concentração e a distribuição dos receptores mudaram marcadamente durante o ciclo menstrual normal. Essas mudanças foram distribuídas em três fases características. Na fase I, correspondendo ao período folicular médio (entre os dias 7 e 8 do ciclo menstrual), a coloração do receptor de estrogênio foi mais intensa e mais frequente (aproximadamente 50% das células). Na fase II, que incluiu os períodos proliferativos tardios e lúteos iniciais (entre os dias 9-19 do ciclo menstrual), a coloração do receptor de estrogênio estava presente em cerca de metade das células glandulares e estromais. Já na fase III, compreendendo o período lúteo médio e tardio (entre os dias 21-27 do ciclo menstrual), observou-se o desaparecimento da coloração dos receptores de estrogênio nas células glandulares, embora tenha sido encontrada fraca coloração dos mesmos nas células estromais [83].

- **Ki67**

A proteína Ki67 é uma proteína expressa em células em fase ativa de replicação celular. É muito utilizada como marcador de replicação celular em tumores malignos, pois quantifica o número de mitoses ocorrendo nos tumores estudados [84]. Já está bem estabelecida sua correlação com o prognóstico de doença em cânceres de próstata e de mama [84].

Sua expressão, porém, acontece no núcleo de todas as células em divisão mitótica, normais ou cancerosas, sendo, assim, um importante marcador de atividade da replicação celular [84].

- **Progesterona**

Os efeitos da progesterona nas células endometriais são mediados pelos receptores de progesterona, cuja função é ativada pela ligação do próprio hormônio.

A progesterona induz decidualização das células estromais. Nesse processo, que se inicia antes da implantação, e é independente da presença de um blastocisto, as células estromais do endométrio proliferam, ficam arredondadas e acumulam glicogênio citoplasmático [84].

O receptor de progesterona é expresso no epitélio endometrial imediatamente antes da implantação do blastocisto, mas diminui acentuadamente durante o processo de implantação. Ao mesmo tempo a expressão do receptor de progesterona no estroma das células aumenta e permanece alta durante o processo de decidualização [84].

De acordo com o estudo de Garcia *et al*, 1988, já citado anteriormente, a intensidade e a expressividade dos receptores de progesterona mudam de maneira acentuada durante o ciclo menstrual normal. Essas mudanças foram descritas em três fases, também já citadas acima: na fase I, uma pequena proporção (25%) de células estromais e glandulares corou positivamente para o receptor de progesterona; a fase II, apresentou uma marcada coloração de receptores de progesterona na maioria das células glandulares (75%) e coloração menos abundante e menos frequente nas células estromais (50%); e na fase III, houve o desaparecimento da coloração dos receptores de progesterona nas células glandulares, embora tenha sido encontrada fraca coloração nas células estromais [83].

▪ Integrina $\alpha\beta3$

Um dos biomarcadores endometriais mais bem caracterizados relacionados à fertilidade é a integrina $\alpha\beta3$. As integrinas são uma classe de moléculas de adesão celular, que são ancoradas na membrana plasmática e servem para múltiplas funções dentro das células [85]. A integrina $\alpha\beta3$ aparece no ápice das superfícies

lúминаl e das células glandulares, coincidindo com a abertura da janela de implantação. Seguindo esta lógica, foi observado a correlação entre a histologia e a expressão da integrina $\alpha\beta3$, e sua expressão persiste, durante a gestação, com expansão para a decídua [71]. O aparecimento da integrina $\alpha\beta3$ na superfície apical decorre de sua presença nos grânulos secretores subnucleares que normalmente completam seu trânsito por dia de ciclo, 19 a 20 [81].

▪ **Citocinas e fatores de crescimento**

Várias citocinas e fatores de crescimento estão envolvidos nas interações entre o endométrio e o embrião. Uma classe de citocinas, que desempenham um papel importante na implantação, é a superfamília da interleucina (IL) 6. Esta família consiste em numerosas citocinas, incluindo o fator inibidor de leucemia (LIF), a IL-6 e a IL-11 [86].

O **LIF** é expresso no epitélio luminal do endométrio na fase secretora intermediária e tardia, e tem um papel no processo de implantação. Ainda, durante a fase secretora do ciclo menstrual, o receptor de LIF pode ser encontrado no epitélio luminal do endométrio e, nesta fase, ele é produzido pelas células estromais e deciduais. Essa citocina possui várias funções no endométrio, entre elas, controla a quantidade e as proporções das células relacionadas à imunidade do endométrio no momento da implantação [86].

O LIF não afeta apenas o endométrio, algumas evidências demonstram que ele afeta também o blastocisto, entretanto, esta função ainda não é amplamente conhecida. A hipótese é de que o LIF faz a mediação entre os sinais emitidos pelas células do sistema imune no endométrio decidualizado, e o trofoblasto. O blastocisto também produz LIF, que exerce controle sobre o endométrio e regula a produção endometrial dessa citocina através de um sistema de feedback positivo, em que a

gonadotrofina coriônica humana (hCG) produzida pelo blastocisto influencia na expressão LIF produzido pelo endométrio. Esta comunicação dá ao blastocisto a oportunidade de influenciar o status receptivo do endométrio [86].

Alguns estudos que comparam mulheres com e sem problemas de fertilidade indicam que o LIF é necessário para uma implantação bem-sucedida, outros, que analisam o efeito de mutações funcionais no gene LIF, indicam que a ausência de LIF em humanos leva à redução da fertilidade [87]. Por outro lado, já se demonstrou que a presença de altos níveis de LIF no lavado endometrial são prejudiciais para o sucesso da implantação [88], e, a pesquisa de LIF no sangue periférico de pacientes submetidas a FIV não estava relacionado com as taxas de gravidez [86, 88, 89].

Podemos supor, então, que o LIF tem um grande número de funções (dependentes de sua concentração) no processo de implantação endometrial e a precisão de sua influência na fertilidade necessita ser mais bem conhecida [86].

A **IL-6** é uma citocina pró-inflamatória produzida (principalmente) de maneira cíclica pelo epitélio endometrial e pelas células estromais no momento da implantação, tendo os seus níveis mais elevados durante a janela de implantação e sendo regulada positivamente, pelos níveis de esteróides séricos, especialmente o estrogênio e da IL-1 e, negativamente, pela ação do hCG e do fator de transformação do crescimento β (TGF- β - Transforming Growth Factor Beta). A sua ligação aos seus receptores específicos na membrana das células endometriais e do trofoblasto determinam a sua ação e ativação [86]. Estudos mostram que tanto o excesso quanto o déficit de IL-6 pode levar a resultados adversos de implantação. Assim, sugere-se que a IL-6 desempenha uma função importante no período peri-implantacional [86, 90, 91].

A **IL-11** é uma citocina multifuncional com propriedades anti-inflamatórias produzida pelas células estromais e epiteliais do endométrio com o seu pico máximo de produção ocorrendo durante a decidualização, sendo regulada pela ação dos hormônios esteróides e por fatores locais, como a relaxina e a prostaglandina E2 (PGE2). O receptor para IL-11 é expresso nos epitélios luminal e glandular, não havendo variação cíclica em sua expressão, assim, toda variação no nível de atividade é mediada pela produção e pelos níveis locais de IL-11 e nenhum receptor para IL-11 foi encontrado, até agora, no embrião humano [86]. A IL-11 atua na estimulação da decidualização, possivelmente agindo nas células estromais e regula negativamente a produção de fator de necrose tumoral α (TNF- α - Tumor Necrosis Factor α) pelas células epiteliais do endométrio [86].

A **IL-1** possui várias funções na janela de implantação como estimular a produção de LIF pelo endométrio, estimular a produção de leptina e de seu receptor, aumentar a expressão da subunidade da integrina β_3 , uma molécula de adesão que desempenha um papel importante na aposição e na adesão do embrião no endométrio, além de, possivelmente, ter uma função importante na decidualização [86]. No blastocisto a IL-1 estimula a liberação de hCG. Além disso, o embrião também produz a própria IL-1 e usa esse sistema para se comunicar com os tecidos maternos e influenciar as condições endometriais, tendo uma função na "viagem" do embrião através das trompas de falópio e na invasão trofoblástica [86].

Outra molécula que tem sido apresentada como um importante modulador da comunicação embrião-blastocisto é a **leptina**, que foi descoberta inicialmente como um regulador da ingestão de alimentos, mas agora tem sido caracterizada como uma molécula que está presente em todo o corpo. A leptina media a interação entre estado nutricional e reprodução, influenciando o eixo hipotálamo-hipófise-ovário e no

ovário diretamente, fornecendo um meio para ajustar o status reprodutivo a possíveis problemas nutricionais [86]. A influência da leptina em TRA foi avaliada em um estudo recente de nosso grupo, onde um grupo de mulheres obesas obteve uma maior quantidade de oócitos, quando submetidas a tratamento de reprodução assistida após dieta, do que as pacientes do grupo controle, com diminuição significativa nos níveis séricos de leptina [92].

O sistema **IGF/IGFBP** (IGF -Insulin-like Growth Factor - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina; IGFBP - Insulin-like Growth Factor Binding Protein - Proteína de Ligação do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina) também desempenha um papel na comunicação entre o embrião e o endométrio. O IGF-1, secretado durante a fase proliferativa, media os efeitos do estrogênio na proliferação do endométrio, já o IGF-2, produzido principalmente na fase secretora, regula os efeitos da progesterona durante a fase secretora do ciclo, e a IGFBP-1, produzida pelas células do estroma durante a decidualização, antagoniza os efeitos da IGF-2 inibindo sua ação. Assim, sugere-se que o IGF-2 estimula a implantação e a invasão, enquanto a IGFBP-1 neutraliza este efeito inibindo a ação do IGF-2. Essa hipótese foi confirmada com a evidência de que níveis elevados de IGFBP-1 levam à falha de implantação (como resultado de uma falta de invasão), e níveis aumentados de IGF-2 estão associados ao desenvolvimento de tumor [86].

A **glicodelina**, uma glicoproteína que pertence à família das lipocalinas, foi descrita como um imunomodulador durante a janela de implantação. É produzida pelas células epiteliais do endométrio, especialmente no decorrer da fase secretora e na gravidez precoce. Sua ação parece ser de efeito supressão na reação imune materna ao aloenxerto fetal, agindo como um mediador para estabelecer uma tolerância ao embrião semialogênico [86].

A Osteopontina (**OPN**) é produzida pelas glândulas endometriais e células decíduais no período próximo da janela de implantação, estimulada por IL-1, TGF- β , TNF- α , interferon- γ (IFN- γ), estrogênio e progesterona, ente outros. Exerce funções como molécula de adesão, mediando a ligação célula-célula e a comunicação, sendo considerado importante para a ligação entre as integrinas do endométrio humano e o trofoblasto. Também tem funções de citocina com propriedades pró e anti-inflamatórias, recrutando e ativando macrófagos e linfócitos e inibindo a produção de óxido nítrico e de metaloproteinases de matriz-2 (MMP-2 - Matrix Metalloproteinase-2) [86].

- **HOXA10**

O Hoxa10 é um fator de transcrição que regula a proliferação, diferenciação e decidualização do endométrio, podendo afetar a expressão de mediadores de receptividade uterina, como pinopodos, integrinas, receptor de estrogênio, integrina $\alpha\beta 3$, IGFBP-1 e receptores de prostaglandinas. Possui um importante papel no desenvolvimento dos pinopodos durante a implantação, e, sua concentração diminuída resulta em um número reduzido de pinopodos, assim como sua concentração aumentada está associada a um aumento no desenvolvimento dessa estrutura [93].

- **Métodos de avaliação endometrial - Ultrassonografia**

A ultrassonografia (US) é, atualmente, a forma mais simples de se tentar avaliar clinicamente a receptividade endometrial e oferece muitas vantagens, já que ela não é invasiva e também é de fácil realização [1]. Diversos parâmetros ultrassonográficos já foram propostos como preditores de receptividade endometrial

e gravidez [94] e, resumidamente, especificaremos alguns destes parâmetros abaixo.

- **Espessura endometrial**

O endométrio pode ser facilmente identificado durante a realização da US transvaginal (TV) e sua espessura é medida no eixo longitudinal do útero, a partir da visualização da linha que delimita a separação do miométrio e do endométrio anterior, até o mesmo plano no lado posterior [95]. É exatamente pela facilidade de avaliação da espessura endometrial, que esse parâmetro é largamente utilizado na tentativa de prever a possibilidade de gravidez durante os ciclos de tratamento de reprodução assistida.

Uma metanálise de 2011 [94], concluiu que a média da espessura endometrial foi significativamente maior nas pacientes que engravidaram após tratamento de reprodução assistida, do que nas pacientes que não engravidaram. Entretanto, apesar de significativo, o resultado parece não ser clinicamente relevante, uma vez que a diferença da média da espessura endometrial foi de aproximadamente 0,4 mm, entre as pacientes que engravidaram e as que não engravidaram.

Outro problema com a utilização desse parâmetro enquanto marcador de receptividade endometrial, é a dificuldade de se estabelecer um valor de *cut-off* da medida da espessura endometrial capaz de auxiliar aos clínicos na orientação de seus pacientes durante o tratamento de reprodução assistida [95].

No mesmo espectro de investigação, tem-se uma metanálise com o objetivo de avaliar o significado clínico da espessura endometrial nos desfechos de tratamentos de reprodução assistida que observou que, em endométrios com espessura menor que 7 mm, as taxas de gravidez em curso e de nascidos vivos

foram menores [OR 0,38 (IC 95% 0,09-1,5)], e que a probabilidade de gravidez clínica para uma espessura endometrial menor que 7 mm foi significativamente menor em comparação com casos com espessura endometrial maior que 7 mm [23,3% versus 48,1%, OR 0,42 (IC 95% 0,27-0,67)] [96]. Os mesmos autores concluem, neste trabalho, que, os dados atuais indicam que a medida da espessura endometrial tem uma capacidade limitada para identificar mulheres que têm pouca chance de conceber após a fertilização in vitro, e que o ponto de corte de 7 mm está relacionado à menor chance de gravidez, mas ocorre com pouca frequência nos tratamentos de reprodução assistida.

- **Padrão endometrial**

De acordo com as imagens de US da mucosa endometrial durante o ciclo menstrual, foi possível associá-las com a respectiva fase do ciclo e classificá-las de acordo com sua aparência sonográfica em: basal, trilaminar e secretora. Correlacionando-as com os resultados obtidos nos tratamentos de reprodução assistida.

O padrão trilaminar do endométrio no dia da ovulação ou no dia da aplicação do hCG tem sido correlacionado com um melhor resultado nos tratamentos de reprodução assistida do que o endométrio secretor (hiperecogênico/homogêneo) [95]. Friedler, em 1996, mostrou que, se considerarmos a avaliação do endométrio no dia da aplicação do hCG, o padrão secretor tem um valor preditivo negativo para chance de gravidez de 87,5%, entretanto, o padrão trilaminar tem apenas 13,7% de especificidade e 33,1% de valor preditivo positivo para chance de gravidez [97].

É interessante, ao observar os estudos que avaliam o padrão e a espessura endometrial, que as medidas são sempre realizadas fora do momento que chamamos de janela de implantação. Assim sendo, o resultado obtido com a

avaliação do padrão endometrial (e também da espessura), pode não refletir a real avaliação do endométrio no período de maior receptividade ao embrião (janela de implantação), já que as principais avaliações são realizadas fora desse período [95].

- **Doppler**

O Doppler foi estudado e proposto como método para avaliar o fluxo sanguíneo das artérias uterinas, de seus ramos e da vascularização endometrial e subendometrial com o objetivo de determinar sua contribuição para a implantação. A metodologia de obtenção das imagens e gráficos é considerada fácil tecnicamente, podendo ser útil para obter as medidas de velocidades absolutas dos fluxos sanguíneos dos locais avaliados [95].

Quando insonadas as artérias uterinas ou seus ramos, as ondas de fluxo apresentando alta resistência estão associadas ao insucesso do tratamento. Assim, índices de pulsatilidade máxima altos foram propostos como maus preditores para o sucesso da TRA. Por outro lado, a presença de fluxo diastólico na artéria uterina durante o meio da fase lútea ou na fase lútea inicial está associada ao sucesso dos tratamentos de reprodução assistida, assim como, o sucesso reprodutivo é reduzido quando o fluxo sanguíneo diastólico está ausente ou diminuído [95].

No compartimento endometrial, a simples observação da presença do fluxo nas áreas endometrial e subendometrial correlaciona-se positivamente com as taxas de gravidez em fertilização in vitro, e, ao contrário, a ausência de fluxo nesse compartimento correlaciona-se com uma probabilidade muito baixa de gravidez [95].

- **US 3D/4D**

A US 3D é uma técnica que se refere à renderização volumétrica de dados de ultrassom (também conhecida como US convencional ou 2D), também é chamado

de 4D (3 dimensões espaciais mais 1 dimensão de tempo) quando envolve uma série de volumes 3D coletados ao longo do tempo. É uma tecnologia especialmente útil na medicina para medição de volumes e para identificação de morfologia e estruturas de órgãos internos do corpo humano [98].

Esse avanço permitiu o desenvolvimento de diversas aplicações em saúde com destaque para algumas que possuem potencial de aplicação em TRA. Assim, essa metodologia permitiu a observação, pela primeira vez, de todo o útero, juntamente com a mucosa endometrial. Atualmente este sistema é especialmente útil para estudar a morfologia endometrial, malformações müllerianas, patologias endometriais benignas como síndrome de Asherman, hiperplasias, pólipos e miomas [95].

Ainda mais recente, é a utilização da tecnologia Doppler em 3D/4D para avaliação do fluxo sanguíneo endometrial e subendometrial nos TRA. Bonilla e Col., em uma revisão de 2013, afirma que a presença de fluxo sanguíneo dentro e ao redor do endométrio está correlacionada com predição das taxas de implantação e gestação nos TRA. A detecção de vascularização abundante com baixo fluxo de resistência reflete em um aumento de até 70% nas taxas de implantação [95], porém, estes mesmos achados não foram confirmados por outros autores em outra revisão do ano anterior [99]. Nesse caso, é interessante notar que, apesar das divergências referentes às taxas de implantação e gestação, ambos os autores afirmam que não houve gestação na ausência de fluxo sanguíneo no compartimento endometrial. [95, 99].

A tecnologia de US 3D/4D também permite calcular o volume do endométrio com maior precisão que a tecnologia em duas dimensões. Esse parâmetro indica uma menor ocorrência de gravidez quando o volume endometrial estimado for

menor que 2,5 ml, independentemente da medida da espessura endometrial encontrada [95, 99-101].

- **Métodos de avaliação endometrial - Biologia Molecular**

O neologismo "omics", derivado da língua inglesa e aplicado no português, refere-se, em biologia a um campo de estudo em que os nomes das “áreas de conhecimento” terminam em “-ômica”, como genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica, lipidômica, entre outros (Figura 15). Esse campo de atuação e pesquisa visa a caracterização e quantificação de moléculas biológicas que se traduzem na estrutura, função e dinâmica de um organismo ou organismos [102].

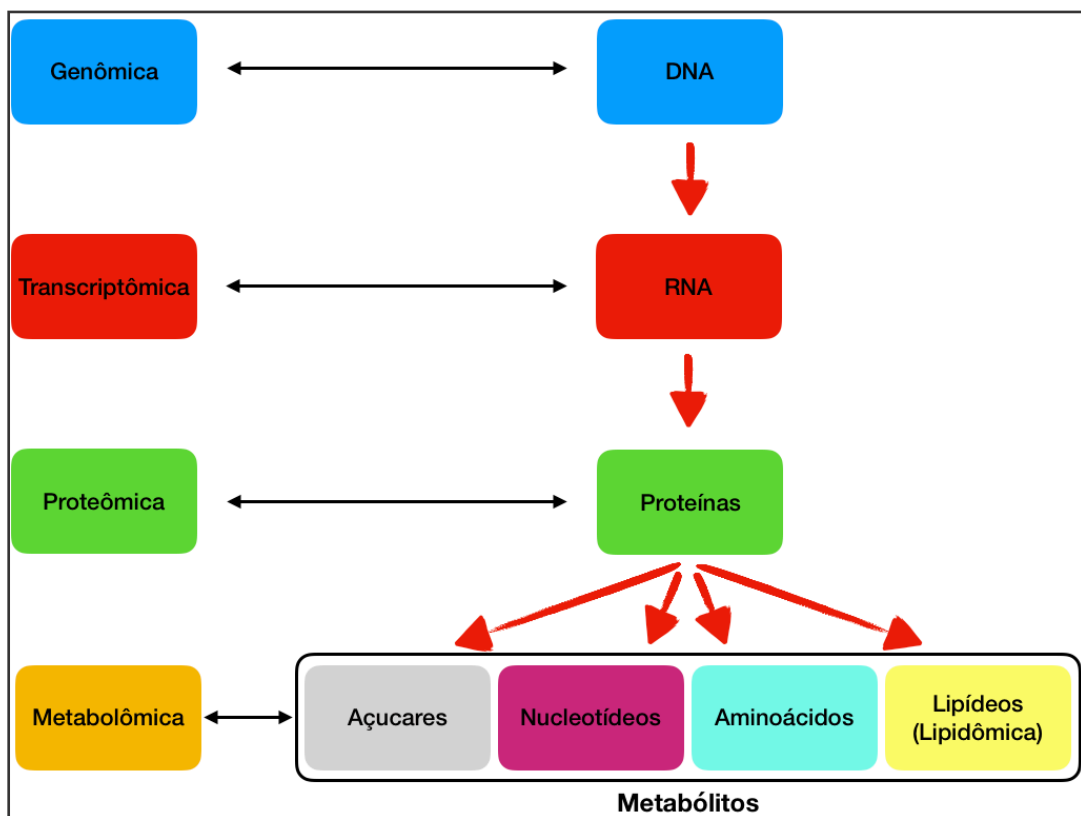


Figura 15: Técnicas Biologia Molecular

Os desafios para aplicar com precisão e confiabilidade este conhecimento às rotinas clínicas em clínicas de infertilidade é uma tarefa promissora. Um repertório ideal seria aquele com especificidade celular definida, mostrando expressão

consistente, alta reprodutibilidade, confiabilidade e viabilidade para uso clínico durante a janela de implantação [1].

- **Genômica**

A genômica é um campo interdisciplinar da ciência com foco na estrutura, função, evolução, mapeamento e edição de genomas, que por sua vez, é o conjunto completo dos ácidos desoxirribonucleico (DNA - Deoxyribonucleic Acid) de um organismo, incluindo todos os seus genes [103]. Sua diferença para a genética, que se refere ao estudo de genes individuais e seus papéis na herança, é que a genômica, visa à caracterização coletiva e quantificação de genes que se direcionam à produção de proteínas com o auxílio de enzimas e moléculas mensageiras. O genoma de cada indivíduo é formado a partir do resultado de rearranjos cromossômicos complexos que ocorrem durante a fertilização. Ele é estático e idêntico em todas as células de um mesmo organismo [80].

O conhecimento e o entendimento do genoma podem ajudar no desenvolvimento de técnicas e testes que, futuramente, podem identificar as melhores características da janela de implantação endometrial e o momento ideal para a transferência de um embrião, aumentando, assim, as chances de gravidez.

Os estudos iniciais dessa área focaram no perfil genético global de todo o endométrio, e apresentaram limitações na tradução do conhecimento obtido para a prática clínica devido às variações inerentes na coleta de tecido endometrial, à heterogeneidade das amostras de biópsia endometrial, ao agrupamento de dados, e, mais importante, devido à variação dos resultados [1].

- **Trasncryptômica**

Transcriptômica é o estudo da soma de todas as transcrições dos ácidos ribonucleicos (RNA - ribonucleic acid) de um organismo num determinado momento. Como o conteúdo informacional de um organismo é registrado no DNA de seu genoma e expresso através da transcrição, o RNA mensageiro (RNAm) serve como uma molécula intermediária transitória na rede de informação, enquanto os RNAs não-codificadores realizam diversas funções adicionais. Um transcriptoma captura uma “imagem”, instantânea no tempo, do total de transcrições presentes em uma célula. Resumidamente, as tecnologias de transcriptômica fornecem uma ampla explicação de quais processos celulares estão ativos e quais estão inativos [104].

Assim, os perfis transcriptômicos são dinâmicos e dependem de muitos fatores, incluindo o tipo de célula, o status do ciclo, as influências ambientais e a regulação hormonal daquela célula, tecido, órgão ou sistema [80].

Vários grupos têm investigado o perfil transcriptômico do endométrio durante a janela de implantação com o objetivo de encontrar uma assinatura molecular característica de um endométrio receptivo e obter informações sobre o processo de implantação embrionária. As metodologias dos diversos trabalhos analisados foram diferentes e, alguns artigos compararam o endométrio receptivo com o pré-receptivo [63, 105-110], outros o endométrio secretor com o proliferativo [111-113] e, outras diferentes amostras na fase secretora [110, 114]. Os estudos também apresentam variações nos diversos parâmetros utilizados como: número de pacientes, amostras do mesmo paciente ou não, dias do ciclo em que as amostras são coletadas ou tipos de análise de dados [115-118]. Apesar dessas diferenças todos concordam com a existência de um perfil transcriptômico típico da janela de implantação. No entanto, e talvez devido a diferenças nos desenhos dos estudos, não houve consenso sobre quais os genes que compõem esta assinatura transcriptômica [119].

- **Ensaio de Receptividade Endometrial - Endometrial**

- Receptivity Array - ERA**

O ERA é um teste de microensaio de expressão personalizado que identifica uma assinatura transcriptômica da janela de implantação. O ERA pode determinar o estado de receptividade endometrial de um paciente analisando o perfil transcricional de uma amostra em ciclo espontâneo, ou endométrios medicamente preparados para transferência de embrião. O ERA avalia 238 genes expressos e estas diferenças de expressão são analisadas em um preditor computadorizado que diagnostica objetivamente a janela de implantação personalizada da paciente. O resultado do teste classifica os endométrios como "receptivos" quando o endométrio está pronto para adesão embrionária, e "não receptivo" quando não está. Neste último caso, também nos fornece informações sobre o status "pré-recetivo" ou "pós-receptivo" [80].

- **Micro RNA**

O micro RNAs ou miRNA é um RNA monocatenário com um comprimento de entre 21 e 25 nucleótidos, cuja principal função é atuar como silenciadores pós-transcricionais, pois pareiam-se com mRNAs específicos e regulam sua estabilidade e tradução. São pequenos RNAs não codificantes. Cada miRNA pode ter centenas ou milhares de alvos, e um mRNA pode ser inibido por diferentes miRNAs [120]. Os miRNAs praticam, principalmente, o controle negativo direcionando o mRNA para a degradação ou mediando sua supressão [1].

A expressão do miRNA está diretamente relacionada com a variação cíclica dos hormônios sexuais. Essa propriedade promove o aumento, ou a diminuição, da concentração de miRNA no compartimento endometrial ao longo do ciclo menstrual, e foi correlacionada com a receptividade endometrial [113]. Outros artigos

mostraram diferença na expressão de miRNA quando comparados o período ovulatório com o meio da fase lútea [121]; quando comparados ciclos espontâneos com ciclos estimulados para TRA [122]; em pacientes com níveis séricos normais e aumentados de progesterona no dia da aplicação do hCG [123]; em pacientes com falha de implantação [124]; e em pacientes com endometriose [125].

A validação do papel regulador do miRNA nesses processos foi confirmada através da demonstração de que níveis alterados (para cima ou para baixo) de miRNAs específicos contribuem para a diminuição das taxas de sucesso em TRA. Essa desregulação da expressão do miRNA endometrial tem como consequência a diminuição da fertilidade e as pesquisas têm demonstrado o importante do papel do miRNA na receptividade endometrial [113].

- **Proteômica**

A proteômica é o estudo em larga escala de proteínas e seu objeto de estudo é o proteoma: o conjunto de proteínas que são produzidas ou modificadas por um organismo ou sistema. Muitas vezes a proteômica refere-se à análise experimental, em grande escala, de proteínas e é, freqüentemente, usada para se referir à purificação de proteínas ou à espectrometria de massa [126-128].

Alguns estudos nessa área têm sido conduzidos tentando identificar proteínas relacionadas à implantação embrionária em biópsias, no fluido ou no lavado do endometrial [1,78]. A secreção endometrial é composta de uma mistura de proteínas transudadas do sangue, de secreções das células epiteliais do endométrio, de glândulas e de componentes de fluido tubário [1, 78].

O aspirado do fluido endometrial ou o lavado endometrial têm sido considerados métodos menos invasivos para avaliar a receptividade endometrial. Assim, as proteínas identificadas e analisadas a partir dessas técnicas começaram a

chamar atenção. Embora até 90% do conteúdo proteico no fluido endometrial tenha sido atribuído a uma origem sérica, as proteínas oriundas de secreções endometriais ainda podem ser estudadas [1, 129].

Alguns estudos iniciais e com pequeno número de participantes, obtiveram sucesso ao tentar identificar proteínas relacionadas com a implantação embrionária e conseguiram demonstrar: (1) que é possível identificar proteínas relacionadas com a implantação [130], (2) a identificação de citocinas, fatores de crescimento no dia da transferência de embrião, sem prejudicar os resultados finais do tratamento [131]; (3) diferenças no padrão de composição proteica em diferentes fases do ciclo menstrual [132, 133]; (4) diferenças na composição proteica do fluido endometrial entre mulheres férteis e infértéis. [133].

Diversas proteínas relacionadas à implantação endometrial já foram identificadas, por diferentes técnicas de análise de proteômica, e, posteriormente, foram validadas [134].

- **Metabolômica (metabólitos)**

Metabolômica é o estudo dos metabólitos, que são produtos do metabolismo (de células, de tecidos, de órgãos ou de organismos), ou seja, a metabolômica é o estudo sistemático das impressões digitais únicas que processos celulares específicos deixam para trás [135, 136]. O metaboloma representa o conjunto completo de metabólitos, que são os produtos finais dos processos celulares [137], que representam um aspecto da função celular. Assim, o perfil metabólico pode fornecer uma imagem instantânea da fisiologia dessa célula e a metabolômica fornece uma leitura funcional do estado fisiológico direto de um organismo [138].

Uma metanálise recente não encontrou ensaios clínicos randomizados que abordassem a avaliação da metabolômica da receptividade endometrial [139],

assim, não temos evidências suficientes que suportem esse tipo de avaliação da receptividade endometrial.

▪ **Lipidômica**

Lipidômica é o estudo das vias e conexões dos lipídios celulares nos sistemas biológicos. A palavra lipodôma é usada para descrever o perfil lipídico completo dentro de uma célula, tecido, organismo ou ecossistema e é um subconjunto do metaboloma [140, 141].

Em modelos animais, o papel de compostos lipídicos como prostaglandinas, endocanabinóides e ácido lisofosfatídico na receptividade endometrial tem sido amplamente estudado. As conclusões sugerem que esses compostos lipídicos são de fato importantes reguladores da receptividade endometrial nos modelos animais estudados. Já o papel dos compostos lipídicos na receptividade do endométrio humano não foi estudado na mesma extensão [1].

As pesquisas realizadas até o momento indicam, em pacientes com falha de implantação, uma redução da prostaglandina $PLA_{2\alpha}$ e da Cicloxigenase-2 em comparação à controles férteis saudáveis [142]. Ainda neste campo de estudo, a avaliação da lipidômica no fluido endometrial demonstrou um aumento significativo de PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ durante a janela de implantação e, os demais lipídeos estudados (N-araquidonoil etanolamina, N-palmitoil etanolamina, N-oleoil etanolamina, 2-araquidonoil glicerol, N-estearoil etanolamina, N-linoleoil etanolamina e $PGF_{1\alpha}$), não apresentaram alterações significativas durante o ciclo menstrual [143, 144].

• **Métodos de avaliação endometrial - Marcadores Bioquímicos Séricos**

Atualmente, a maioria dos potenciais biomarcadores pesquisados de receptividade endometrial, é produzida ou detectada localmente, o que pode limitar

sua presença no soro, plasma ou urina. Considerando que muito poucos ou até mesmo nenhum dos mediadores identificados, sejam específicos do endométrio e que a maioria age de maneira parácrina ou autócrina, é muito provável que mudanças no endométrio receptivo sejam indetectáveis com a tecnologia disponível atualmente ou, estejam sujeitas à interferência de muitos eventos fisiológicos ou patológicos, incluindo, até mesmo, inflamações leves [134].

Neste caso, nos resta à lembrança, os sucessos em outras áreas clínicas, que indicam possibilidades de encontrar biomarcadores relevantes para o status endometrial no plasma sanguíneo, a partir de pesquisas e desenvolvimento tecnológico [80].

4. JUSTIFICATIVA

Nas TRAs a EOC é usada para promover a coleta de múltiplos oócitos e produzir múltiplos embriões por ciclo de tratamento. Apesar deste procedimento permitir a seleção de embriões de alta qualidade, a EOC resulta em níveis suprafisiológicos de estrogênio e progesterona. Esses níveis elevados de esteróides sexuais podem prejudicar a receptividade endometrial [2].

Com efeito, o endométrio é longe de ser normal durante os ciclos de fertilização in vitro, como resultado da estimulação do ovário. Os protocolos de estimulação ovariana têm um efeito marcante na diferenciação endometrial, pelo menos em parte, devido aos níveis elevados de progesterona e aos altos níveis prematuros de hCG, que é administrada no lugar do LH como um estímulo da ovulação. Além disso, há evidências crescentes de que as taxas de gravidez de fertilização in vitro são melhores em ciclos não estimulados para transferência de embriões criopreservados em comparação com a transferência de embriões a fresco. Assim sendo, a incapacidade do endométrio de oferecer receptividade após uma estimulação ovariana, é uma provável razão para o fracasso de alguns tratamentos de fertilização in vitro.

Nossas ferramentas e protocolos atuais não permitem que mulheres submetidas à procedimentos de reprodução assistida obtenham um diagnóstico rápido e eficiente da sua receptividade endometrial [80], e, ainda, de acordo com o que temos disponível, as pacientes devem ser submetidas a um teste invasivo, que apresenta um resultado demorado, e não pode ser aproveitado no mesmo ciclo em que foi realizado necessitando ainda de uma maior comprovação e validação. O nosso conhecimento sobre o processo de implantação do blastocisto é muito restrito e uma ferramenta que sirva para avaliar rapidamente a receptividade endometrial,

seja durante a avaliação inicial ou imediatamente antes da transferência do embrião, pode se tornar fundamental para especialistas em reprodução, auxiliando a tomada de decisão sobre o momento e a realização da transferência de embriões. Com isso, entendemos que a compreensão dos eventos que precedem a implantação embrionária no compartimento endometrial pode ajudar na formatação de terapias ou estratégias para alcançar maiores índices de sucesso nos tratamentos de reprodução assistida, e, a identificação de marcadores de receptividade são urgentemente necessários se quisermos caracterizar prontamente a causa subjacente da infertilidade em muitas mulheres, melhorar a taxa de sucesso da FIV e, por fim, tratar a infertilidade de origem endometrial.

5. HIPÓTESES

5.1. Hipótese Nula (H_0)

Não existe diferença na datação endometrial, comparando pacientes em ciclo espontâneo e pacientes submetidas à indução da ovulação com citrato de clomifeno.

5.2. Hipótese Alternativa (H_1)

Existe diferença na datação endometrial, comparando pacientes em ciclo espontâneo e pacientes submetidas a indução da ovulação com citrato de clomifeno.

6. OBJETIVOS

6.1. Principal

Comparar, utilizando os critério de Noyes, a datação histológica do endometrio de pacientes que serão submetdas a tratamento de indução da ovulação, em ciclo espontâneo e em cico estimulado com citrato de clomifeno.

6.2. Secundários

Comparação entre as dosagens séricas de FSH, LH, Estradiol e Progesterona nos ciclos espontâneo e estimulado com citrato de clomifeno.

Concatenar os achados histológicos com as dosagens sérias de FSH, LH, Estradiol e Progesterona.

REFERÊNCIAS

1. Grothusen, C., et al., Recent Advances in Understanding Endometrial Receptivity: Molecular Basis and Clinical Applications. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2014. **72** (2): p. 148-157.
2. Van der Gaast, M.H., et al., Impact of ovarian stimulation on mid-luteal endometrial tissue and secretion markers of receptivity. *Reprod Biomed Online*, 2008. **17**(4): p. 553-63.
3. Li, M.Q. and L.P. Jin, Ovarian stimulation for in vitro fertilization alters the protein profile expression in endometrial secretion. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013. **6**(10): p. 1964-71.
4. Vasquez, Y.M. and F.J. DeMayo, Role of nuclear receptors in blastocyst implantation. *Semin Cell Dev Biol*, 2013. **24**(10-12): p. 724-35.
5. Practice Committee of the American Society for Reproductive, M., et al., Revised minimum standards for practices offering assisted reproductive technologies: a committee opinion. *Fertil Steril*, 2014. **102**(3): p. 682-6.
6. Gianaroli, L., et al., Best practices of ASRM and ESHRE: a journey through reproductive medicine. *Fertil Steril*, 2012. **98**(6): p. 1380-94.
7. Sunderam, S., et al., Assisted Reproductive Technology Surveillance - United States, 2015. *MMWR Surveill Summ*, 2018. **67**(3): p. 1-28.
8. Patient's own eggs. Final Cumulative Outcome per egg retrieval cycle. In: *National Summary Report*. 2018. Available from: https://www.sartcorsonline.com/rptCSR_PublicMultYear.aspx?reportingYear=2015.
9. Prevention, C.f.D.C.a., A.S.f.R. Medicine, and S.f.A.R. Technology, 2015 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National and Fertility Clinics Reports. 2017.
10. Prevention, C.f.D.C.a., A.S.f.R. Medicine, and S.f.A.R. Technology, 2005 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National and Fertility Clinics Reports. 2007.
11. Prevention, C.f.D.C.a., A.S.f.R. Medicine, and S.f.A.R. Technology, 2006 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National and Fertility Clinics Reports. 2008.

12. Prevention, C.f.D.C.a., A.S.f.R. Medicine, and S.f.A.R. Technology, 2007 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National and Fertility Clinics Reports. 2009.
13. Prevention, C.f.D.C.a., A.S.f.R. Medicine, and S.f.A.R. Technology, 2008 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National and Fertility Clinics Reports. 2010.
14. Prevention, C.f.D.C.a., A.S.f.R. Medicine, and S.f.A.R. Technology, 2009 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National and Fertility Clinics Reports. 2011.
15. Prevention, C.f.D.C.a., A.S.f.R. Medicine, and S.f.A.R. Technology, 2010 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National and Fertility Clinics Reports. 2012.
16. Prevention, C.f.D.C.a., A.S.f.R. Medicine, and S.f.A.R. Technology, 2011 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National and Fertility Clinics Reports. 2013.
17. Prevention, C.f.D.C.a., A.S.f.R. Medicine, and S.f.A.R. Technology, 2012 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National and Fertility Clinics Reports. 2014.
18. Prevention, C.f.D.C.a., A.S.f.R. Medicine, and S.f.A.R. Technology, 2013 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National and Fertility Clinics Reports. 2015.
19. Prevention, C.f.D.C.a., A.S.f.R. Medicine, and S.f.A.R. Technology, 2014 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National and Fertility Clinics Reports. 2016.
20. European, I.V.F.m.C., et al., Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*, 2017. **32**(10): p. 1957-1973.
21. European IVF-monitoring programme , f.t.E.S.o.H.R. and Embryology, Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. *Human reproduction*, 2005. **20**(5): p. 1158-1176.
22. Reproduction, E.S.o.H. and E.T.E.I.-m. programme, Assisted reproductive technology in Europe, 2002. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, 2006. **21**(7): p. 1680-1697.

23. Andersen, A.N., et al., Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, 2007. **22**(6): p. 1513-1525.
24. Nyboe Andersen, A., et al., Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, 2008. **23**(4): p. 756-771.
25. Nyboe Andersen, A., et al., Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE: ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Human Reproduction*, 2009. **24**(6): p. 1267-1287.
26. De Mouzon, J., et al., Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Human reproduction*, 2010. **25**(8): p. 1851-1862.
27. De Mouzon, J., et al., Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, 2012. **27**(4): p. 954-966.
28. Ferraretti, A., et al., Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE. *Human reproduction*, 2012. **27**(9): p. 2571-2584.
29. Ferraretti, A.P., et al., Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, 2013. **28**(9): p. 2318-2331.
30. Kupka, M., et al., Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE. *Human reproduction*, 2014. **29**(10): p. 2099-2113.
31. Reproduction, E.I.-M.C.f.t.E.S.o.H., et al., Assisted reproductive technology in Europe, 2012: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, 2016. **31**(8): p. 1638-1652.
32. Consortium, E.I.-M., et al., Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE. *Human reproduction*, 2016. **31**(2): p. 233-248.
33. Zegers-Hochschild, F., et al., Assisted reproductive techniques in Latin America: The Latin American Registry, 2014. *JBRA Assist Reprod*, 2017. **21**(3): p. 164-175.

34. Redlara. *Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida 2003*. Available from:
http://www.redlara.com/aa_portugues/registro_anual.asp?categoria=Registros%20Anuais&cadastroid=27.
35. Riera, J.B., V. Galdames, and F. Zegers-Hochschild. *Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida 2000*. Available from:
http://www.redlara.com/aa_portugues/registro_anual.asp?categoria=Registros%20Anuais&cadastroid=24.
36. Zegers-Hochschild, F.S.J.E.C.J.A.M.C. *Assisted reproductive technologies in Latin America: the Latin American Registry, 2009*. Available from:
http://www.redlara.com/aa_portugues/registro_anual.asp?categoria=Registros%20Anuais&cadastroid=316.
37. Zegers-Hochschild, F. and V. Galdames. *Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida 2002*. Available from:
http://www.redlara.com/aa_portugues/registro_anual.asp?categoria=Registros%20Anuais&cadastroid=26.
38. Zegers-Hochschild, F. and V. Galdames. *Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida 2001*. Available from:
http://www.redlara.com/aa_portugues/registro_anual.asp?categoria=Registros%20Anuais&cadastroid=25.
39. Zegers-Hochschild, F., V. Galdames, and J. Balmacieda. *Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida 1999*. Available from:
http://www.redlara.com/aa_portugues/registro_anual.asp?categoria=Registros%20Anuais&cadastroid=23.
40. Zegers-Hochschild, F., V. Galdames, and J.E. Schwarze. *Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida 2007*. Available from:
http://www.redlara.com/aa_portugues/registro_anual.asp?categoria=Registros%20Anuais&cadastroid=31.
41. Zegers-Hochschild, F., V. Galdames, and J.E. Schwarze. *Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida 2006*. Available from:
http://www.redlara.com/aa_portugues/registro_anual.asp?categoria=Registros%20Anuais&cadastroid=30.
42. Zegers-Hochschild, F., J.E. Schwarze, and V. Galdames. *Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida 2008*. Available from:

http://www.redlara.com/aa_portugues/registro_anual.asp?categoria=Registros%20Anuais&cadastroid=32.

43. Zegers-Hochschild, F., J.E. Schwarze, and V. Galdames. Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida 2003-2004. Available from:

http://www.redlara.com/aa_portugues/registro_anual.asp?categoria=Registros%20Anuais&cadastroid=28.

44. Zegers-Hochschild, F., et al., Assisted reproductive technologies in Latin America: the Latin American Registry, 2010. JBRA Assist Reprod, 2012. **16**(6): p. 9.

45. Zegers-Hochschild, F., et al., Assisted reproductive technologies in Latin America: the Latin American Registry, 2011. JBRA Assist Reprod, 2013. **17**(4): p. 7.

46. Zegers-Hochschild, F., et al., Assisted reproductive technologies in Latin America: the Latin American Registry, 2012. Reproductive biomedicine online, 2015. **30**(1): p. 43-51.

47. Zegers-Hochschild, F., et al., Assisted reproductive techniques in Latin America: the Latin American Registry, 2013. Reproductive biomedicine online, 2016. **32**(6): p. 614-625.

48. ANVISA, A.N.d.V.S. Publicações Anvisa 2018. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/sangue/publicacoes?p_p_id=anvisabuscaavancada_WAR_anvisabuscaavancadaportlet&keywords=&assetCategoryId=&dataInicial=&dataFinal=&tagNames=sisembrio.

49. ANVISA, A.N.d.V.S. *7º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões - SisEmbrio*. 2015. Available from:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2817584/7%C2%BA+Relat%C3%B3rio+do+Sistema+Nacional+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+de+Embri%C3%B5es+%E2%80%93+SisEmbrio/48b24acb-f204-400d-afea-0c709ea0b268>.

50. ANVISA, A.N.d.V.S. *6º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões - SisEmbrio*. 2015. Available from:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2817584/6%C2%BA+Relat%C3%B3rio+do+Sistema+Nacional+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+de+Embri%C3%B5es+%E2%80%93+SisEmbrio%29/c4816d0f-6928-4a67-a804-a3c5b22c202d>.

51. ANVISA, A.N.d.V.S. *5º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões - SisEmbrio*. 2015. Available from:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2817584/5%C2%BA+Relat%C3%B3rio+do+Sistema+Nacional+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+de+Embri%C3%B5es+%28SisEmbrio%29/71f74ad9-c007-417b-a834-0785013acfed>.

52. ANVISA, A.N.d.V.S. *4º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões - SisEmbrio*. 2015. Available from:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2817584/4%C2%B0+Relat%C3%B3rio+do+Sistema+Nacional+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+de+Embri%C3%B5es+%E2%80%93+SisEmbrio/6f78e687-24cd-40a4-a697-3ded3a348e7d>.

53. ANVISA, A.N.d.V.S. *3º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões - SisEmbrio*. 2015. Available from:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2817584/3%C2%B0+Relat%C3%B3rio+do+Sistema+Nacional+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+de+Embri%C3%B5es+%E2%80%93+SisEmbrio/f6561118-2e8d-42a0-aab8-b63cb15332c6>.

54. ANVISA, A.N.d.V.S. *2º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões - SisEmbrio*. 2015. Available from:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2817584/2%C2%B0+Relat%C3%B3rio+do+Sistema+Nacional+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+de+Embri%C3%B5es+%E2%80%93+SisEmbrio/c13f4e47-bfa2-45e6-a337-8172e5e8967d>.

55. ANVISA, A.N.d.V.S. *1º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões - SisEmbrio*. 2015. Available from:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2817584/1%C2%B0+Relat%C3%B3rio+do+Sistema+Nacional+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+de+Embri%C3%B5es+%E2%80%93+SisEmbrio/0b7bdd27-f5f8-4b0d-85b3-fbd252aad2cf>.

56. ANVISA, A.N.d.V.S. *9º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões - SisEmbrio*. 2016. Available from:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2817584/9%C2%BA+Relat%C3%B3rio+do+Sistema+Nacional+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+de+Embri%C3%B5es++SisEmbrio/94d6467b-0a32-4277-8933-36c701900314>.

57. ANVISA, A.N.d.V.S. *8º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões - SisEmbrio*. 2016. Available from:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2817584/8%C2%B0+Relat%C3%B3rio+do+Sistema+Nacional+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+de+Embri%C3%B5es+%E2%80%93+SisEmbrio/d562e471-1e9a-4684-b510-e93de29a5bd5>.

58. ANVISA, A.N.d.V.S. *10º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões - SisEmbrio*. 2017. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2817584/10%C2%BA+Relat%C3%B3rio+do+Sistema+Nacional+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+de+Embri%C3%B5es+-+SisEmbrio/1121df4c-ab05-47e9-bae0-8dc283f36fbc>.
59. ANVISA, A.N.d.V.S. *11º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões - SisEmbrio*. 2018. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2817584/11%C2%BA+Relat%C3%B3rio+do+Sistema+Nacional+de+Produ%C3%A7%C3%A3o+de+Embri%C3%B5es+-+SisEmbrio/7b02586e-afc8-4f96-b988-adb51650f68b>.
60. Chen, M., et al., Can Comprehensive Chromosome Screening Technology Improve IVF/ICSI Outcomes? A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 2015. **10**(10): p. e0140779.
61. Igenomix. *ERA - Teste de Receptividade Endometrial*. 2018; Available from: <http://www.igenomix.com.br/teste-de-receptividade-endometrial-para-especialistas>.
62. Comstock, I.A., et al., Does an increased body mass index affect endometrial gene expression patterns in infertile patients? A functional genomics analysis. (1556-5653 (Electronic)).
63. Diaz-Gimeno, P., et al., A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril*, 2011. **95**(1): p. 50-60, 60 e1-15.
64. Diaz-Gimeno, P., et al., The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. *Fertil Steril*, 2013. **99**(2): p. 508-17.
65. Ruiz-Alonso, M., et al., The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril*, 2013. **100**(3): p. 818-24.
66. Ruiz-Alonso, M., et al., What a difference two days make: "personalized" embryo transfer (pET) paradigm: a case report and pilot study. *Hum Reprod*, 2014. **29**(6): p. 1244-7.
67. Simon, C., et al., Prospective, randomized study of the endometrial receptivity analysis (ERA) test in the infertility work-up to guide personalized embryo transfer versus fresh transfer or deferred embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 2016. **106**(3): p. e46-e47.

68. Mahajan, N., Endometrial receptivity array: Clinical application. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 2015. **8**(3): p. 121-129.
69. Bassil, R., et al., Does the endometrial receptivity array really provide personalized embryo transfer? *J Assist Reprod Genet*, 2018.
70. Zhang, S., et al., Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular aspects of medicine*, 2013. **34**(5): p. 939-980.
71. Lessey, B.A., Assessment of endometrial receptivity. *Fertility and Sterility*, 2011. **96**(3): p. 522-529.
72. Ambartsumyan, G. and A.T. Clark, Aneuploidy and early human embryo development. *Human Molecular Genetics*, 2008. **17**(R1): p. R10-R15.
73. Carlson, B.M., *Human embryology and developmental biology*. 2014, Elsevier/Saunders.
74. Cuevas Saiz, I., et al., The Embryology Interest Group: updating ASEBIR's morphological scoring system for early embryos, morulae and blastocysts. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*, 2018. **5**(1): p. 42-54.
75. Sullivan-Pyke, C. and A. Dokras, Preimplantation Genetic Screening and Preimplantation Genetic Diagnosis. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 2018. **45**(1): p. 113-125.
76. Townsley, C., *Endometrial Cancer*, in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, S.J. Enna and D.B. Bylund, Editors. 2007, Elsevier: New York. p. 1-4.
77. Patel, S.D., *Chapter 6 - Response of the Uterus to Medication: Hysteroscopic Implications*, in *Hysteroscopy*, L.D. Bradley and T. Falcone, Editors. 2009, Mosby: Philadelphia. p. 49-56.
78. Salamonsen, L.A., et al., Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. *Fertility and sterility*, 2013. **99**(4): p. 1086-1092.
79. Van der Gaast, M.H., et al., The feasibility of a less invasive method to assess endometrial maturation--comparison of simultaneously obtained uterine secretion and tissue biopsy. *BJOG*, 2009. **116**(2): p. 304-12.
80. Miravet-Valenciano, J.A., et al., Understanding and improving endometrial receptivity. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2015. **27**(3): p. 187-92.
81. Noyes, R.W., A.T. Hertig, and J. Rock, *Dating the endometrial biopsy*. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 1950. **5**(4): p. 4.

82. Ramos-Vara, J.A., Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 2005. **42**(4): p. 405-26.
83. Garcia, E., et al., Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988. **67**(1): p. 80-7.
84. Scholzen, T. and J. Gerdes, The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
85. Palomino, W.A., et al., Differential expression of endometrial integrins and progesterone receptor during the window of implantation in normo-ovulatory women treated with clomiphene citrate. *Fertil Steril*, 2005. **83**(3): p. 587-93.
86. Van Mourik, M.S., N.S. Macklon, and C.J. Heijnen, Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol*, 2009. **85**(1): p. 4-19.
87. Kralickova, M., et al., Leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women are not restricted to nulligravid patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2006. **127**(2): p. 231-5.
88. Ledee-Bataille, N., et al., Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod*, 2002. **17**(1): p. 213-8.
89. Thum, M.Y., et al., The effect of serum concentration of leukaemia inhibitory factor on in vitro fertilization treatment outcome. *Am J Reprod Immunol*, 2006. **55**(1): p. 76-80.
90. Dimitriadis, E., et al., Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update*, 2005. **11**(6): p. 613-30.
91. Jasper, M.J., K.P. Tremellen, and S.A. Robertson, Reduced expression of IL-6 and IL-1alpha mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol*, 2007. **73**(1): p. 74-84.
92. Becker, G.F., E.P. Passos, and C.C. Moulin, Short-term effects of a hypocaloric diet with low glycemic index and low glycemic load on body adiposity, metabolic variables, ghrelin, leptin, and pregnancy rate in overweight and obese infertile women: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 2015. **102**(6): p. 1365-72.
93. Rarani, F.Z., F. Borhani, and B. Rashidi, Endometrial pinopode biomarkers: Molecules and microRNAs. *J Cell Physiol*, 2018.

94. Momeni, M., M.H. Rahbar, and E. Kovanci, A meta-analysis of the relationship between endometrial thickness and outcome of in vitro fertilization cycles. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 2011. **4**(3): p. 130-137.
95. Bonilla-Musoles, F., et al., Endometrial receptivity: evaluation with ultrasound. *Ultrasound Q*, 2013. **29**(1): p. 3-20.
96. Kasius, A., et al., Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis. (1460-2369 (Electronic)).
97. Friedler, S., et al., The role of ultrasonography in the evaluation of endometrial receptivity following assisted reproductive treatments: a critical review. *Hum Reprod Update*, 1996. **2**(4): p. 323-35.
98. Woo, J., A short history of the development of ultrasound in obstetrics and gynecology. *Ob-ultrasound. net*, 2002.
99. Yaman, C. and R. Mayer, Three-dimensional ultrasound as a predictor of pregnancy in patients undergoing ART. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 2012. **13**(2): p. 128-134.
100. Ledee, N., Uterine receptivity and the two and three dimensions of ultrasound. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*, 2005. **26**(7): p. 695-698.
101. Ng, E.H.Y., W.S.B. Yeung, and P.C. Ho, Endometrial and subendometrial vascularity are significantly lower in patients with endometrial volume 2.5 ml or less. *Reproductive biomedicine online*, 2009. **18**(2): p. 262-268.
102. Egea, R.R., et al., OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology. *J Hum Reprod Sci*, 2014. **7**(2): p. 73-92.
103. Gibson, G. and S.V. Muse, *A primer of genome science*. Vol. 1. 2002: Sinauer Sunderland.
104. Passos, G.A., *Transcriptomics in Health and Disease*. 2015: Springer.
105. Carson, D.D., et al., Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 2002. **8**(9): p. 871-879.
106. Riesewijk, A., et al., Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod*, 2003. **9**(5): p. 253-64.

107. Mirkin, S., et al., In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod*, 2005. **20**(8): p. 2104-17.
108. Franchi, A., et al., Expression of immunomodulatory genes, their protein products and specific ligands/receptors during the window of implantation in the human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 2008. **14**(7): p. 413-21.
109. Haouzi, D., et al., Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Hum Reprod*, 2009. **24**(6): p. 1436-45.
110. Tseng, L.H., et al., Genome-based expression profiling as a single standardized microarray platform for the diagnosis of endometrial disorder: an array of 126-gene model. *Fertil Steril*, 2010. **94**(1): p. 114-9.
111. Kao, L.C., et al., Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, 2002. **143**(6): p. 2119-38.
112. Borthwick, J.M., et al., Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 2003. **9**(1): p. 19-33.
113. Kuokkanen, S., et al., Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biology of reproduction*, 2010. **82**(4): p. 791-801.
114. Critchley, H.O., et al., Gene expression profiling of mid to late secretory phase endometrial biopsies from women with menstrual complaint. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. **195**(2): p. 406 e1-16.
115. Horcajadas, J.A., et al., Determinants of endometrial receptivity. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1034**: p. 166-75.
116. Giudice, L.C., Application of functional genomics to primate endometrium: insights into biological processes. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006. **4 Suppl 1**: p. S4.
117. Simmen, F.A. and R.C. Simmen, Orchestrating the menstrual cycle: discerning the music from the noise. *Endocrinology*, 2006. **147**(3): p. 1094-6.
118. Haouzi, D., et al., Transcriptome analysis reveals dialogues between human trophectoderm and endometrial cells during the implantation period. *Hum Reprod*, 2011. **26**(6): p. 1440-9.
119. Ruiz-Alonso, M., D. Blesa, and C. Simón, *The genomics of the human endometrium*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2012. **1822**(12): p. 1931-1942.

120. Prodromaki, E., et al., Expression of the microRNA regulators Drosha, Dicer and Ago2 in non-small cell lung carcinomas. *Cell Oncol (Dordr)*, 2015. **38**(4): p. 307-17.
121. Altmäe, S., et al., MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reproductive sciences*, 2013. **20**(3): p. 308-317.
122. Sha, A.-G., et al., Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertility and sterility*, 2011. **96**(1): p. 150-155. e5.
123. Li, R., et al., MicroRNA array and microarray evaluation of endometrial receptivity in patients with high serum progesterone levels on the day of hCG administration. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2011. **9**(1): p. 29.
124. Revel, A., et al., MicroRNAs are associated with human embryo implantation defects. *Human reproduction*, 2011. **26**(10): p. 2830-2840.
125. Petracco, R., et al., *MicroRNA 135 regulates HOXA10 expression in endometriosis*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2011. **96**(12): p. E1925-E1933.
126. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 1998. **19**(11): p. 1853-61.
127. Blackstock, W.P. and M.P. Weir, Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*, 1999. **17**(3): p. 121-7.
128. Anderson, J.D., et al., Comprehensive Proteomic Analysis of Mesenchymal Stem Cell Exosomes Reveals Modulation of Angiogenesis via Nuclear Factor-KappaB Signaling. *Stem Cells*, 2016. **34**(3): p. 601-13.
129. Hannan, N.J., et al., Depletion of high-abundance serum proteins from human uterine lavages enhances detection of lower-abundance proteins. *Journal of proteome research*, 2008. **8**(2): p. 1099-1103.
130. Casado-Vela, J., et al., Comprehensive proteomic analysis of human endometrial fluid aspirate. *Journal of proteome research*, 2009. **8**(10): p. 4622-4632.
131. Boomsma, C., et al., Cytokine profiling in endometrial secretions: a non-invasive window on endometrial receptivity. *Reproductive biomedicine online*, 2009. **18**(1): p. 85-94.
132. Scotchie, J.G., et al., Proteomic analysis of the luteal endometrial secretome. *Reproductive Sciences*, 2009. **16**(9): p. 883-893.

133. Hannan, N.J., et al., 2D-DiGE analysis of the human endometrial secretome reveals differences between receptive and nonreceptive states in fertile and infertile women. *Journal of proteome research*, 2010. **9**(12): p. 6256-6264.
134. Edgell, T.A., L.J.F. Rombauts, and L.A. Salamonsen, Assessing receptivity in the endometrium: the need for a rapid, non-invasive test. *Reproductive BioMedicine Online*, 2013. **27**(5): p. 486-496.
135. Daviss, B., Growing pains for metabolomics: the newest'omic science is producing results--and more data than researchers know what to do with. *The Scientist*, 2005. **19**(8): p. 25-29.
136. Dunn, W.B., et al., Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev*, 2011. **40**(1): p. 387-426.
137. Jordan, K.W., et al., Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. *Dis Colon Rectum*, 2009. **52**(3): p. 520-5.
138. Hollywood, K., D.R. Brison, and R. Goodacre, Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics*, 2006. **6**(17): p. 4716-4723.
139. Siristatidis, C.S., et al., Metabolomics for improving pregnancy outcomes in women undergoing assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018. **3**: p. CD011872.
140. Wenk, M.R., The emerging field of lipidomics. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(7): p. 594-610.
141. Watson, A.D., Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *J Lipid Res*, 2006. **47**(10): p. 2101-11.
142. Achache, H., et al., Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2010. **94**(4): p. 1271-8.
143. Berlanga, O., et al., How endometrial secretomics can help in predicting implantation. *Placenta*, 2011. **32**: p. S271-S275.
144. Vilella, F., L.B. Ramirez, and C. Simón, Lipidomics as an emerging tool to predict endometrial receptivity. *Fertility and sterility*, 2013. **99**(4): p. 1100-1106.

ARTIGO EM INGLÊS

Title: Use of clomiphene citrate protocol for controlled ovarian stimulation impairs endometrial maturity.

Authors: Ivan Sereno Montenegro; Cristiana Palma Kuhl; Maryane Monteiro Estrella; Raquel Schneider; Deborah Beltrami Gomez; Suzana de Azevedo Zachia; Laiza Quadro; Isabel Cirne Lima de Oliveira Durlí; Paula Barros Terraciano; Raquel Camara Rivero; Eduardo Pandolfi Passos

Introduction: Despite recent advances in assisted reproduction techniques, implantation and birth rates remain low. Although embryo quality is considered the main determinant of implantation success, maturity and endometrial receptivity are also important factors to consider. However, what precisely constitutes a receptive endometrium remains uncertain. The objective of this study is to investigate if clomiphene citrate alters the endometrial maturation in infertile patients.

Methods: In a prospective cohort study, the ovulation of women was evaluated in spontaneous and stimulated cycles (with clomiphene citrate). Subjects were submitted to transvaginal ultrasounds to follow the cycle and to determine the day of ovulation. In both cycles, four blood samples (BS1 - at early proliferative phase, BS2 - at mid proliferative phase, BS3 - after ovulation and BS4 - at mid luteal phase) were taken to determine the serum concentrations of FSH, LH, estradiol and progesterone. An endometrial biopsy was performed five days after ovulation in both cycles and sent to Hospital de Clínicas de Porto Alegre pathology lab for analysis and classification according to Noyes criteria.

Results: Twenty-two participants completed the study protocol. There were significant differences in FSH BS3 ($p = 0.001$), in LH BS3 and BS4 ($p < 0.001$ and $p = 0.049$, respectively), in estradiol BS2, BS3 and BS4 ($p < 0.001$, $p = 0.024$ and $p < 0.001$, respectively) and in progesterone BS3 and BS4 ($p = 0.028$ and $p < 0.001$, respectively). Considering Noyes criteria, there was a one-day delay when comparing the stimulated cycle with the spontaneous cycle ($p = 0.004$), and a two-day delay when comparing the stimulated cycle with the biopsy day.

Discussion: This study indicates that the ovarian stimulation with clomiphene citrate delays the endometrial maturity, and could possibly impair the implantation process. The antiestrogenic effects of clomiphene citrate in the endometrium may be responsible for this difference and, to avoid this effect, it is suggested to consider the freeze-all strategy when using clomiphene citrate for controlled ovarian stimulation, in order to minimize the endometrial asynchrony.

Keywords: endometrial receptivity; endometrial maturity; Noyes criteria; assisted reproduction techniques; controlled ovarian stimulation; IVF; ICSI

Introduction

Despite recent advances in assisted reproduction techniques (ART), implantation rates remain low after controlled ovarian stimulation (COS) for in vitro fertilization (IVF), and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatments [1]. Embryonic implantation failure remains the major limitation of ART success [1], and although embryo quality is considered the main determinant of implantation success, maturity and endometrial receptivity are also important factors to consider. Embryo implantation followed by gestation depends on a viable and high quality embryo, receptive endometrium and molecular "dialogue" between them. However, what

precisely constitutes a receptive endometrium remains uncertain [2, 3]. The implantation process in humans is complex and depends on multiple and successive interactions between the embryo and the endometrium and only succeed when it occurs at a specific time, during the secretory phase of the menstrual cycle, called "window of implantation" [2, 3].

Recently, research in this area has focused on finding a viable marker of endometrial receptivity that may help to identify the best moment to perform embryo transfer [4-6]. Histologically, endometrial maturity can be classified using the Noyes criteria [7], which characterizes the endometrium into its phases.

Clomiphene citrate (CC), commonly used in COS, is a selective estrogen receptor modulator (SERM) that has been the first-line treatment of patients with anovulation or oligomenorrhea for more than 40 years with estrogenic and antiestrogenic effects [8]. It binds to estrogen receptors (ER), leading to the misinterpretation of the estradiol feedback mechanism at hypothalamic level. The administration of this drug results in increased pituitary gonadotropin release and enhanced follicular development and ovarian response [8, 9].

An important issue of CC use is the low pregnancy rates notwithstanding high ovulation rates. This phenomenon is partially explained by the antiestrogenic effect on the cervical mucus and the endometrium, causing abnormal endometrial maturation [10]. It is therefore, tempting to hypothesize that long-lasting ER occupancy by CC might alter the endometrial cell function, thus affecting the window of implantation [9].

To investigate possible changes caused by CC in the pattern of endometrial receptivity, endometrial samples were obtained during the midsecretory phase from ovulatory women in a spontaneous cycle and in a CC stimulated cycle.

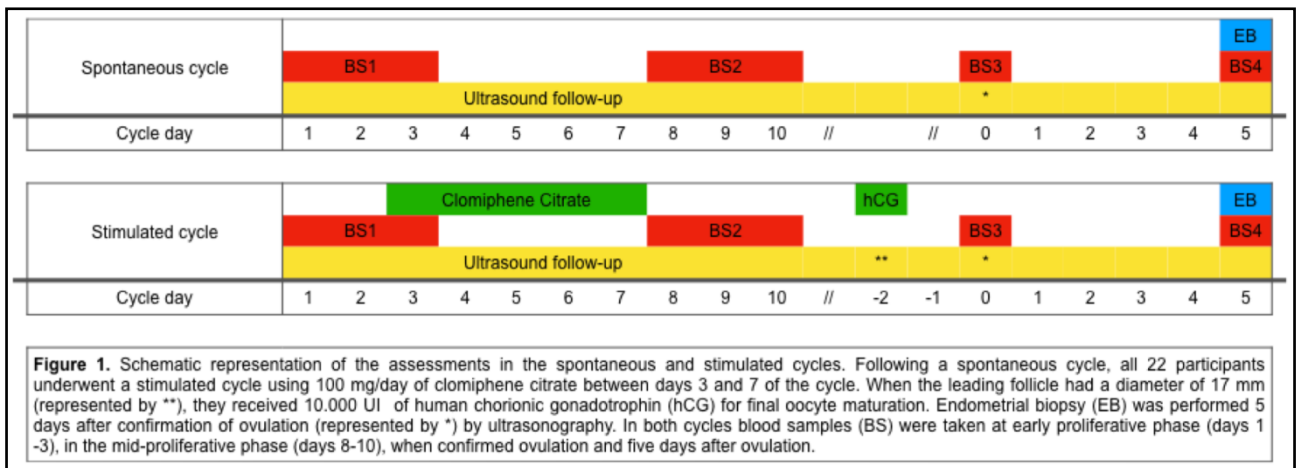
Methods

The study is a matched prospective cohort, developed in accordance with international laws on procedures for dealing with human tissue and STROBE's publication guidelines [11]. It was submitted and approved by the ethics committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (CAAE 67010017.0.0000.5327 and GPPG 1701800) and all participants signed an informed consent.

Ovulatory women, with IVF indication, were recruited between the ages of 18 and 35 years, body mass index between 18 and 30 kg/m², and with tubal obstruction or male infertility. Women with anovulation, endometriosis and uterine abnormalities were excluded.

The participants were followed throughout two menstrual cycles. The first one, spontaneous and the second, stimulated using a daily dose of 100 mg of clomiphene citrate (Clomid[®], Sanofi, Brazil), for 5 days, initiated on the third day of the cycle. The follicular growth was followed by transvaginal ultrasound, from the second day of the cycle, until sonographic determination of ovulation. During the stimulated cycle, when a follicle with 17 mm of diameter was identified, the participant received 10.000 UI of chorionic gonadotrophin (Choriomon M[®], Meizler UCB Biopharma S.A., Bruxelles, Bélgica), to promote final maturation and ovulation (figure 1).

In both cycles, blood samples were collected from all participants to analyze the serum FSH, LH, estradiol and progesterone: first blood sample (BS1), at initial



proliferative phase (days 1-3 of the cycle); second blood sample (BS2), at mid proliferative phase (days 8-10 of the cycle); third blood sample (BS3), after determination of ovulation by ultrasound; fourth blood sample (BS4), five days after ovulation determination by ultrasound. All hormone assays were performed using electrochemiluminescent immunoassay in Roche Cobas e602 analyzer according to correspondent kits for FSH, LH, estradiol and progesterone (FSH Elecsys and cobas e analyzers, Roche Diagnostics, USA; LH Elecsys and cobas e analyzers, Roche Diagnostics, USA; Estradiol II Elecsys and cobas e analyzers, Roche Diagnostics, USA; Progesterone III Elecsys and cobas e analyzers, Roche Diagnostics, USA).

The participants were submitted to an endometrial biopsy five days after the determination of ovulation, in both cycles, with a Pipelle curette (Pipelle[®] de Cornier for endometrial biopsy, Laboratoire C.C.D., France). The biopsy samples were fixed in neutral formalin buffered 3.7% and sent to HCPA's pathology lab. The specimens were dehydrated with increasing concentration of ethanol before being embedded in paraffin. A portion of endometrial tissue was routinely cut, assembled and stained with hematoxylin for histological dating by Noyes criteria [7]. All slides were evaluated by the same observer (RCR), an expert in gynecological pathology at HCPA, and the result was expressed in whole numbers, using as a reference, a standard menstrual

cycle of 28 days of duration and ovulation occurring on the 14th day of the cycle (figure 1).

FSH, LH, estradiol and progesterone samples were compared using a Generalized Estimating Equation (GEE) model concerning values between collections, cycles and interaction (collection x cycle). The data were presented by mean \pm standard error. For the calculation model, the following parameters were established: unstructured working correlation matrix, robust estimator covariance matrix, and normal distributions with identity function. When significant, Bonferroni post-hoc test was used to ascertain which blood samples were different. The histopathological results of Noyes criteria were analyzed using the Wilcoxon test for related samples, which compares the distribution of the data obtained from the histopathological analysis of the endometrial matched samples. These data were expressed by median (25-75). For all tests a $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Thirty-six patients were recruited and, of these, 22 completed the two assessment cycles and were included for analysis of the data collected, description (presented in the table 1 and figure 2) and statistical evaluation.

Table 1: Participant demographic data (n=22)

Data	Mean \pm SD
Age (years)	31.5 \pm 3.5
Weight (Kg)	64.5 \pm 6.93
Height (m)	1.62 \pm 0.06
Body mass index (Kg/m)	24.53 \pm 3.02

SD - Standard deviation

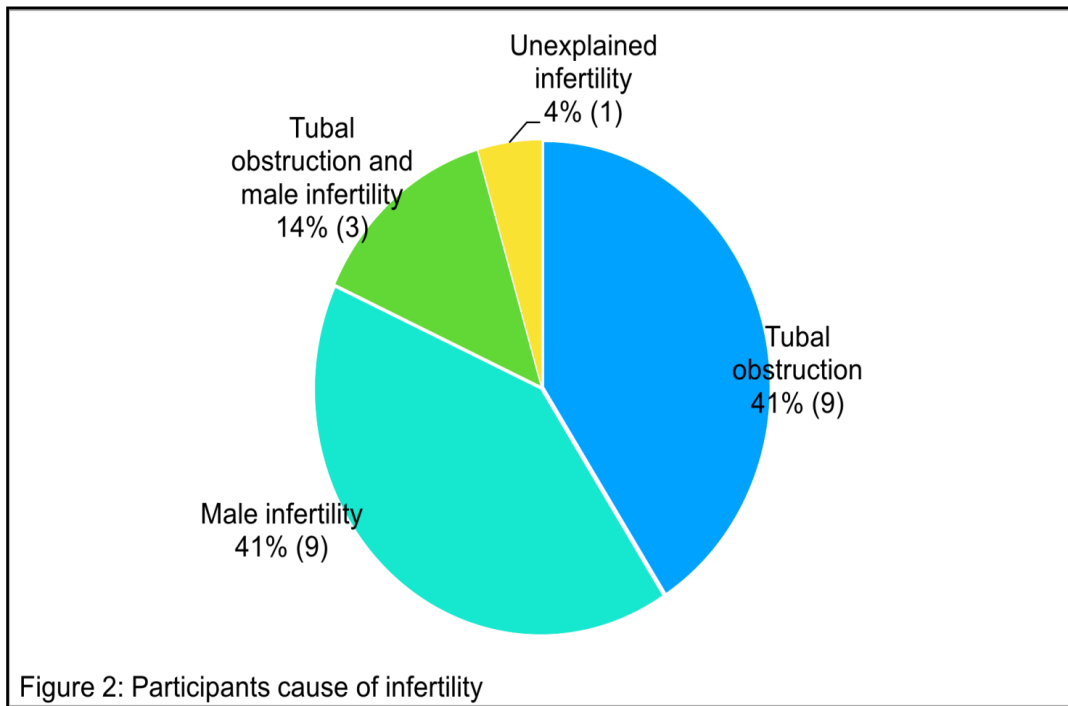


Table 2: Comparison of hormonal dosages

		Spontaneous	Stimulated	Total	p _{Cycle}
		Mean (SE)	Mean (SE)	Mean (SE)	
FSH	Sample 1	7.62 (0.51)	7.02 (0.41)	7.32 (0.41)	0.24
	Sample 2	6.21 (0.56)	6.69 (0.74)	6.45 (0.62)	
	Sample 3	6.83a (0.62)	9.75b (0.82)	8.29 (0.58)	
	Sample 4	3.64 (0.22)	3.90 (0.36)	3.77 (0.21)	
	Total	6.08 (0.30)	6.84 (0.42)		
LH	Sample 1	6.26 (0.66)	6.27 (0.59)	6.26 (0.60)	<0.001
	Sample 2	8.85 (0.96)	9.97 (0.84)	9.41 (0.80)	
	Sample 3	12.50a (1.99)	22.26b (2.50)	17.38 (1.89)	
	Sample 4	6.68a (0.65)	8.33b (1.06)	7.50 (0.77)	
	Total	8.57 (0.79)	11.71 (0.92)		
Estradiol	Sample 1	40.10 (5.31)	38.90 (2.37)	39.50 (3.39)	<0.001
	Sample 2	127.08a (14.17)	480.87b (54.13)	303.97 (29.56)	
	Sample 3	111.43a (13.05)	163.97b (16.31)	137.70 (9.15)	
	Sample 4	155.03a (14.76)	481.22b (41.30)	318.13 (21.81)	
	Total	108.41 (6.65)	291.24 (23.25)		
Progesterone	Sample 1	0.65 (0.19)	0.49 (0.12)	0.57 (0.12)	0.002
	Sample 2	0.44 (0.07)	0.35 (0.06)	0.39 (0.05)	
	Sample 3	4.87a (0.79)	2.99b (0.43)	3.93 (0.47)	
	Sample 4	13.37a (0.78)	25.86b (2.75)	19.62 (1.42)	
	Total	4.83 (0.32)	7.42 (0.76)		

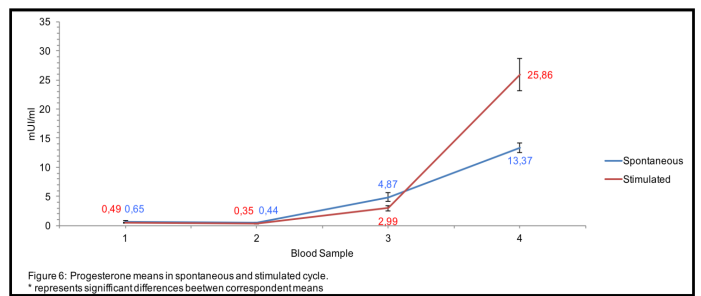
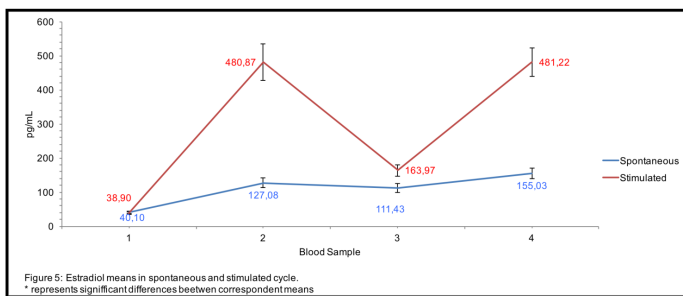
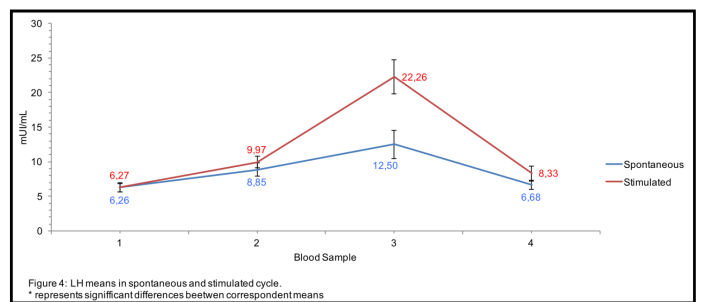
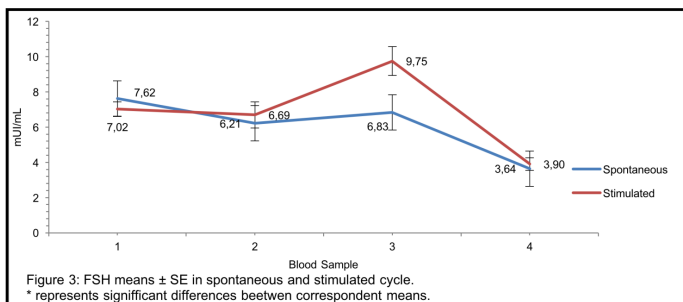
SE - standard error

* Distinct letters represent statistically different means

** Generalized Estimating Equation Model (GEE)

The mean serum levels of the hormones FSH, LH, estradiol and progesterone

are shown in table 2 and in figures 3, 4, 5 and 6. When comparing means between the corresponding samples for each cycle, there were differences in the FSH dosage comparisons of BS3 ($p = 0.001$); in LH, of BS3 ($p < 0.001$) and BS4 ($p = 0.049$); in estradiol of BS2 ($p < 0.001$), BS3 ($p = 0.024$) and BS4 ($p < 0.001$); and in progesterone, of BS3 ($p = 0.028$) and BS4 ($p < 0.001$).



Eighteen endometrial matched samples were evaluated by Noyes criteria tissue analysis (figure 7). Four pairs of samples were withdrawn due to results that showed, at east in one slide, a stromal-glandular dissociation (2 slides), a basal endometrium (1 slide) or could not be evaluated (1 slide). The comparison between the median results of the endometrial biopsy from both cycles expressed a difference ($p < 0.004$) of one day (figure 8).

Discussion

This research was the first to study endometrium matched samples in spontaneous and stimulated cycles from the same infertile women. It was found a one-day delay in the CC stimulated cycle, when analyzing the endometrium by

Noyes criteria. These data support the idea of asynchrony between the endometrium in the spontaneous and stimulated cycles. Concerning the day of blastocyst transfer, in other words, 5 days after ovulation, there was a 2-day delay, which could explain even lower implantation rates when performing a transfer on this day in cycles using CC.

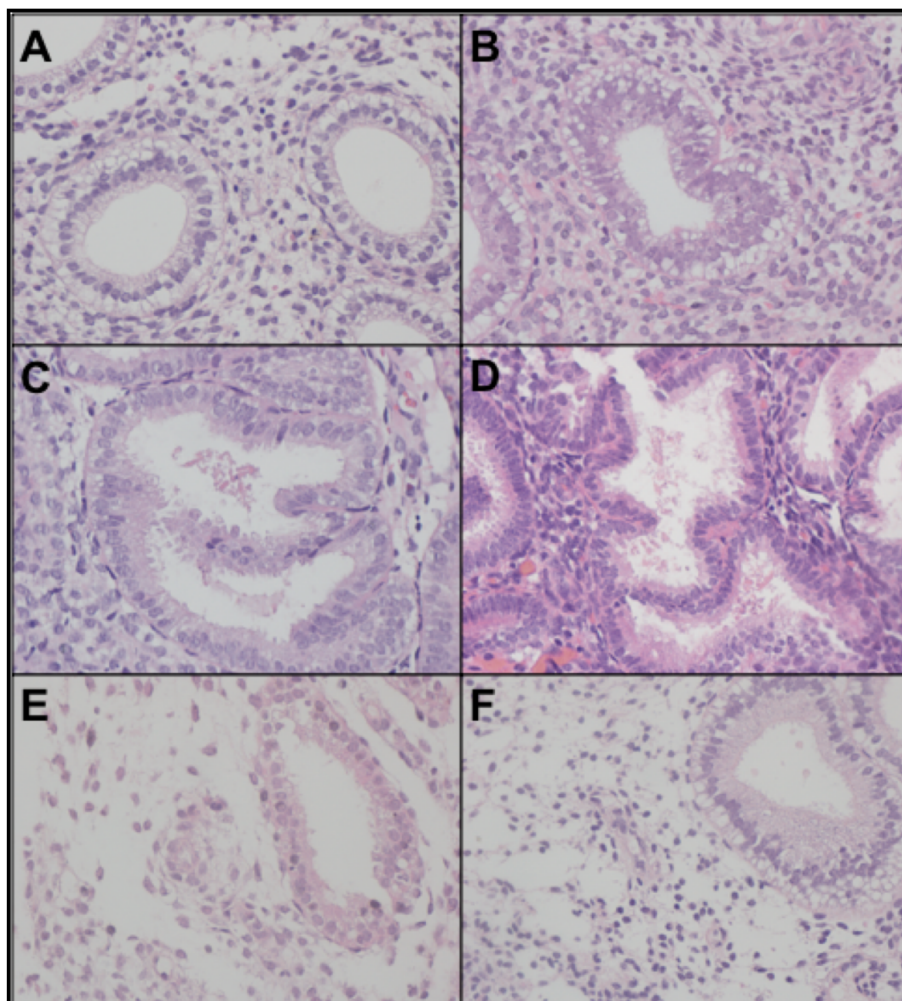


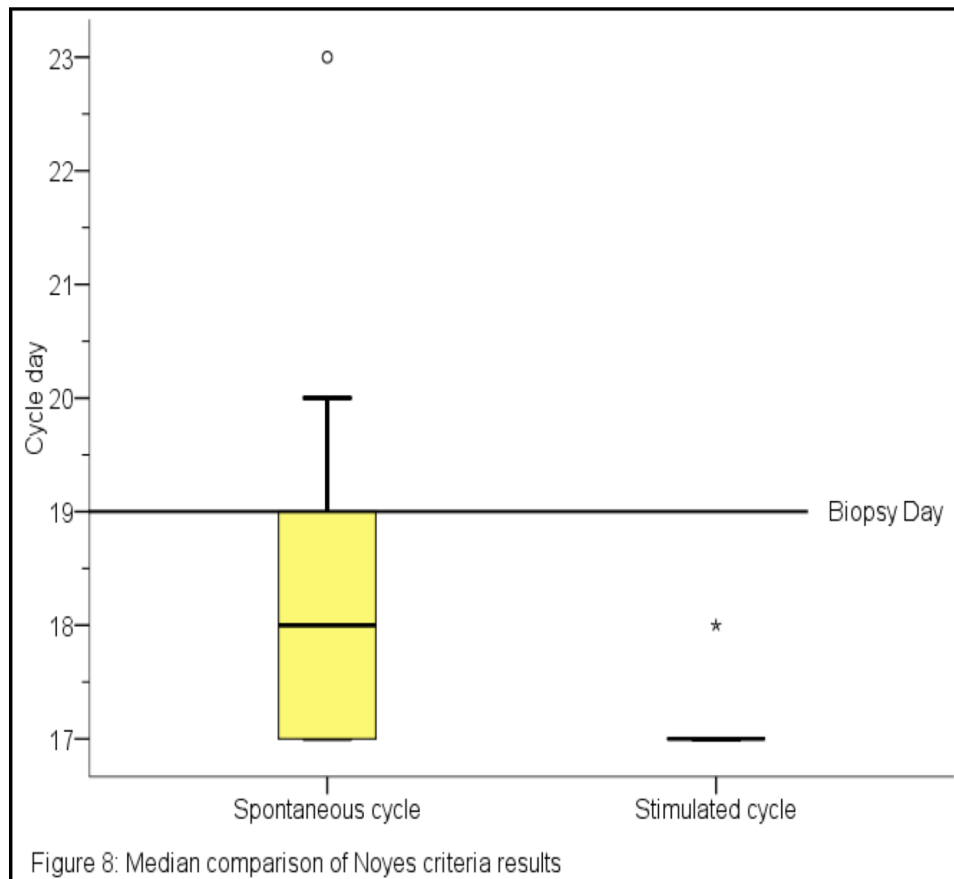
Figure 7: Endometrial cycle dating based on Noyes et al.'s criteria (200x): (A) Day 17: "piano key" appearance of glandular epithelium with vacuoles at nuclei level; (B) Day 18: luminal vacuoles with smaller size and the nuclei approach the base of glandular cell; (C) Day 19: presence of intraluminal secretion with few vacuoles on cellular cytoplasm, absence of mitosis and pseudo stratification; (D) Days 20: the peak of intraluminal secretion with stromal edema onset, presence of rare vacuoles and round nuclei located at the base of the glandular cell.; (E) Day 23: presence of prominent spiral arterioles with thickened walls, coiling and endothelial proliferation; (F) stromal-glandular dissociation - gland on day 17 with decidualized stroma.

Some investigators report about the lack of correlation between the cycle day and endometrial dating by Noyes criteria. In 2004, Murray et al. concluded that histologic endometrial dating does not have the accuracy or the precision necessary to provide a valid method for the diagnosis of luteal phase deficiency {Murray, 2004 #246} and, Coutifaris, that the endometrial biopsy followed by histological dating provides no clinic useful information as screening test for infertility {Coutifaris, 2004 #247}. Garrido-Gómez et al., in 2015, said that biochemical markers are ideal as alternatives to classic Noyes criteria and suggest that the definition of a genomic signature of human endometrial receptivity can be used as a strategy to overcome subjectivity problems caused by the inter and intracycle variations in Noyes endometrial receptivity dating {Garrido-Gomez, 2013 #248}. In 2018, Basil et al., found no concordance between the endometrial receptivity array (ERA) and the Noyes histologic criteria {Bassil, 2018 #249}. Despite these relevant findings, they used different methods to reach this conclusion (none of them using the same participant in a spontaneous and in a stimulated cycle) and there are no other validated markers or clinically useful endometrial evaluation methods.

It should be noted that our participants are diagnosed with infertility and with indication of IVF, however, the ones with anovulation, uterine abnormalities and endometriosis were carefully excluded to minimize possible selection bias, as it is considered that these pathologies may modify the endometrial decidualization process. Yet, all participants were biopsied in the spontaneous cycle and in a cycle stimulated with CC, minimizing other types of selection biases.

The significant increases in FSH, LH, estradiol and progesterone dosage confirm that participants correctly used the medication provided. As known, CC mechanism is by competitive binding to estrogen receptors in the hypothalamus and

pituitary, reducing signaling of estrogen via receptors and interfering with the feedback mechanism of endogenous estrogen, resulting in an increase of FSH and LH secretions to stimulate ovarian follicular production, and a consequent increase in estradiol and progesterone [12].



Considering the 22 matched samples of endometrial biopsies, four pairs were excluded from the statistical calculation, two histological results demonstrated a stromal-glandular dissociation and another one a basal endometrium. These findings confirm that CC use for COS causes asynchrony and delayed endometrial development, although it was not used for analysis.

Bonhoff et al., in 1996, described the same asynchrony effect in patients undergoing COS with CC for artificial insemination, comparing them with fertile

controls [13]. In 2001, Gonzalez et. al., also reported an endometrial asynchrony and integrins alteration in CC stimulated cycles and intrauterine device users, when compared to fertile controls [14].

Looking at these results, it is possible to hypothesize that the antiestrogenic effects of CC on the endometrium impairs endometrial proliferation in the proliferative phase of the cycle, which reflects a delayed endometrial maturation in the luteal phase. This finding is confirmed by several studies which concluded that ovulation induction with CC might result in lower endometrial thickness [12] and, despite the high rate of ovulation, pregnancy rates are low when using CC [10].

Clomiphene citrate is still very useful in ART and is usually prescribed for COS in timed intercourse, intrauterine insemination and IVF, for mild ovarian stimulation, poor responder patients or patients with very low anti-Müllerian hormone (AMH) levels [15, 16]. In poor responder patients, controlled ovarian stimulation strategies with CC have shown similar pregnancy outcomes to a higher gonadotropin dose in GnRH agonist [15] and antagonist protocols [17], despite the potential detrimental effect on endometrium. Therefore, the use of CC for IVF in poor responders has been recommended and is, apparently, more cost effective than the use of gonadotropins.

The freeze-all strategy is well established for patients with a high risk of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), after the use of GnRH agonist for final maturation of oocytes [18]. This protocol was developed to avoid the harmful effects of GnRH agonists on follicle luteinization and, consequently, on endometrial decidualization, as a result of low levels of serum progesterone [19]. The recent vitrification technique advances also contribute to the dissemination of this strategy,

as the same or even better results with after frozen-thawed embryo transfer [20, 21] can be obtained.

There are few limitations in our study. These findings were not compared to implantation, pregnancy and birth rates, as we consider these outcomes the best predictors for any developed endometrial receptivity test. Despite the small sample of this study, our results show a significant difference in endometrial maturity comparing the spontaneous and stimulated cycle with CC. Regardless of the Noyes criteria limits, there are no other validated test to assess endometrial maturity, so that we use the same test, performed by the same observer, in samples of same participant in order to minimize this bias.

In conclusion, for poor responders or decreased serum AMH patients, the low live birth rate per cycle can be directly associated with a low oocyte recovery or a poor oocyte quality [17]. It is important to emphasize that considering the evolution of cryopreservation techniques [22], the higher pregnancy and birth rates after frozen-thawed embryo transfer [21] and the research results, when using a CC protocol, for this group of patients, it is of utmost importance to use the freeze-all protocol as a routine. This strategy minimizes the endometrial asynchrony found in this study, which showed a one-day endometrial maturity delay compared to the spontaneous cycle, and two days, when compared to the day of blastocyst transfer. Also, further large prospective studies are needed to elucidate the endometrial asynchrony caused by COS with CC on others ovulation inducers.

References

1. Van der Gaast, M.H., et al., Impact of ovarian stimulation on mid-luteal endometrial tissue and secretion markers of receptivity. *Reprod Biomed Online*, 2008. **17**(4): p. 553-63.

2. Li, M.Q. and L.P. Jin, Ovarian stimulation for in vitro fertilization alters the protein profile expression in endometrial secretion. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013. **6**(10): p. 1964-71.
3. Bassil, R., et al., Does the endometrial receptivity array really provide personalized embryo transfer? *J Assist Reprod Genet*, 2018.
4. Edgell, T.A., L.J.F. Rombauts, and L.A. Salamonsen, Assessing receptivity in the endometrium: the need for a rapid, non-invasive test. *Reproductive BioMedicine Online*, 2013. **27**(5): p. 486-496.
5. Miravet-Valenciano, J.A., et al., Understanding and improving endometrial receptivity. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2015. **27**(3): p. 187-92.
6. Siristatidis, C.S., et al., Metabolomics for improving pregnancy outcomes in women undergoing assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018. **3**: p. CD011872.
7. Noyes, R.W., A.T. Hertig, and J. Rock, *Dating the endometrial biopsy*. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 1950. **5**(4): p. 4.
8. Lindheim, S.R., et al., Ovulation Induction for the General Gynecologist. *J Obstet Gynaecol India*, 2018. **68**(4): p. 242-252.
9. Palomino, W.A., et al., Differential expression of endometrial integrins and progesterone receptor during the window of implantation in normo-ovulatory women treated with clomiphene citrate. *Fertil Steril*, 2005. **83**(3): p. 587-93.
10. Jie, L., et al., Tamoxifen versus clomiphene citrate for ovulation induction in infertile women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2018. **228**: p. 57-64.
11. Vandembroucke, J.P., et al., Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *Int J Surg*, 2014. **12**(12): p. 1500-24.
12. Gadalla, M.A., et al., Effect of clomiphene citrate on endometrial thickness, ovulation, pregnancy and live birth in anovulatory women: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2018. **51**(1): p. 64-76.
13. Bonhoff, A.J., O.G. Naether, and E. Johannisson, Effects of clomiphene citrate stimulation on endometrial structure in infertile women. *Hum Reprod*, 1996. **11**(4): p. 844-9.
14. Gonzalez, R.R., et al., Abnormal pattern of integrin expression at the implantation window in endometrium from fertile women treated with clomiphene citrate and users of intrauterine device. *Early Pregnancy*, 2001. **5**(2): p. 132-43.

15. Fan, Y., et al., Effectiveness of mild ovarian stimulation versus GnRH agonist protocol in women undergoing assisted reproductive technology: a meta-analysis. *Gynecol Endocrinol*, 2017. **33**(10): p. 746-756.
16. Mourad, S., J. Brown, and C. Farquhar, Interventions for the prevention of OHSS in ART cycles: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017. **1**: p. CD012103.
17. Roman, R., N. Mussarat, and L. Detti, Ovarian Stimulation in Poor Responders: Have We Made Progress? *Curr Pharm Biotechnol*, 2017. **18**(8): p. 614-618.
18. Davenport, M.J., B. Vollenhoven, and A.J. Talmor, Gonadotropin-Releasing Hormone-Agonist Triggering and a Freeze-All Approach: The Final Step in Eliminating Ovarian Hyperstimulation Syndrome? *Obstet Gynecol Surv*, 2017. **72**(5): p. 296-308.
19. Dieamant, F.C., et al., Fresh embryos versus freeze-all embryos - transfer strategies: Nuances of a meta-analysis. *JBRA Assist Reprod*, 2017. **21**(3): p. 260-272.
20. Roque, M., et al., Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer. *Fertil Steril*, 2015. **103**(5): p. 1190-3.
21. Zhang, W., et al., Clinical outcomes of frozen embryo versus fresh embryo transfer following in vitro fertilization: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Gynecol Obstet*, 2018.
22. Rienzi, L., et al., Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*, 2017. **23**(2): p. 139-155.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descoberta dos marcadores de implantação endometrial e o desenvolvimento de técnicas para sua avaliação estão sendo amplamente pesquisados e, possivelmente, serão próximos grandes avanços na área da reprodução assistida. Não é provável que um único biomarcador seja suficiente para identificar o endométrio receptivo devido à complexidade da infertilidade e da individualidade. É mais provável que uma abordagem contendo um painel com múltiplos marcadores surja e ofereça assim, tratamento personalizado para mulheres nos serviços de reprodução assistida. Consideramos que, para isso, diversas etapas, ainda no campo da pesquisa, necessitam de serem cumpridas, entre elas:

- 1) A identificação dos marcadores confiáveis de implantação endometrial;
- 2) A confirmação e validação desses marcadores e sua correlação com a ocorrência de gestação;
- 3) O desenvolvimento de técnicas para aferir e quantificar esses marcadores.

Essa técnica deve, preferencialmente

- a) não ser invasiva;
- b) não causar dano ao endométrio;
- c) possibilitar um resultado rápido e confiável;
- d) permitir a transferência de embrião no mesmo ciclo da avaliação.

Os testes comerciais existentes atualmente não permitem a transferência de embrião no mesmo ciclo em que ele é aplicado. Assim, temos dificuldade em afirmar que o endométrio, em mês subsequente ao teste, possui as mesmas características

da amostra testada, já que este tecido tem como característica uma grande capacidade de regeneração e remodelamento cíclico.

Em nossa pesquisa escolhemos avaliar o endométrio no quinto dia após a ovulação pois é nesse dia que a maioria dos embriões são transferidos para o útero, já na fase de blastocisto. Acreditamos que é neste período que os marcadores devem ser identificados e os testes desenvolvidos, por possibilitar uma avaliação próxima ao procedimento de transferência embrionária.

O resultado prático de nossos achados será aplicado no atendimento às pacientes, no nosso setor de reprodução assistida do serviço de ginecologia e obstetrícia do HCPA. À partir desse entendimento, após uso de CC para EOC em TRA, passamos a adotar o congelamento de todos os embriões para transferência em ciclo posterior, evitando os efeitos indesejados do CC sobre o endométrio das mulheres em tratamento.

PERSPECTIVAS

Levando em consideração as propostas contidas no projeto de pesquisa original, ainda temos algumas amostras e análises a serem realizadas:

- 1) Avaliação da concordância dos critérios de Noyes entre os resultados da rotina do laboratório do serviço de patologia do HCPA e da RCR, expert em patologia ginecológica do HCPA e docente da faculdade de medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);
- 2) Produção de lâminas de imunohistoquímica para receptores de estrogênio, receptores de progesterona e proteína Ki67 pelo laboratório do serviço de patologia do HCPA. Leitura das lâminas por RCR, expert em patologia ginecológica do HCPA e docente da faculdade de medicina da UFRGS. Análise estatística dos resultados;
- 3) Padronização, leitura automatizada e análise das lâminas de imunohistoquímica por programa computadorizado;
- 4) Avaliação da concordância entre os resultados da imunohistoquímica fornecidos por RCR, expert em patologia ginecológica do HCPA e docente da faculdade de medicina da UFRGS, e os resultados do programa de leitura de lâminas computadorizada.

Nosso grupo seguirá com pesquisas nesta linha, iniciadas com este primeiro projeto e, neste sentido, já temos projetos aprovados, e também projetos sendo desenvolvidos:

- 1) Desenvolvimento de projeto aprovado: análise endometrial de receptores de estrogênio, progesterona e proteína ki67 de pacientes inférteis submetidas a tratamento com reprodução assistida: uma coorte pareada. Essa proposta foi submetida ao edital universal do CNPq, recebendo verba para custeio, além de bolsa de produtividade em pesquisa e bolsa de iniciação científica;
- 2) Desenvolvimento de projeto aprovado: viabilização do protocolo de extração, cultura e caracterização de células-tronco endometriais humanas.
- 3) Projeto em elaboração: Cultivo de *Chlamydia trachomatis* e seus efeitos no endométrio.
- 4) Projeto em elaboração: análise comparativa da proteômica endometrial na janela de implantação, em pacientes em tratamento de TRA.

No que se refere a avaliação da receptividade endometrial, as pesquisas devem ser direcionadas para alguns pontos críticos no assunto para elucidar questões ainda não resolvidas, entre elas:

- 1) Identificação de marcadores de implantação endometrial que sejam viáveis (tecnicamente e economicamente) para aferição em larga escala e clinicamente aplicáveis;
- 2) Validação dos marcadores descobertos: vários potenciais marcadores de receptividade endometrial foram identificados e foram fornecidas evidências de sua expressão endometrial na forma de imunohistoquímica, cultura celular e, em alguns casos, imunoensaio de pequenas coortes de indivíduos. Embora isso forneça alguma evidência para continuar a perseguir esses marcadores, eles carecem de avaliação em extensas coortes de mulheres bem definidas;

3) Desenvolvimento de teste para aferição dos marcadores identificados e validados. O teste deverá, preferencialmente, ter alta sensibilidade e especificidade; não ser invasivo, implicando em um procedimento indolor para o paciente, que evite as complicações e desconfortos presente nos métodos atuais; deve fornecer resultado rápido, permitindo que a transferência de embriões seja realizada no mesmo dia ou dentro de 24 horas após a realização do teste;

4) A grande maioria dos potenciais marcadores de receptividade endometriais foram detectados localmente, o que pode limitar sua presença no soro ou plasma, entretanto, o sucesso em outras áreas clínicas incentivam a pesquisa de marcadores bioquímicos relevantes para o status endometrial;

5) O melhor conhecimento sobre a receptividade endometrial não só ajudará a melhorar o diagnóstico e o tratamento da infertilidade, mas também dará a possibilidade de desenvolver novos métodos contraceptivos mais eficazes, incluindo métodos não hormonais, direcionados ao endométrio.