

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Estudo da resposta à indução da ovulação em mulheres com diferentes genótipos (N680S e T307A) no gene do receptor do Hormônio Folículo Estimulante e (AMHR2 G>A) no gene do receptor do Hormônio Anti Mülleriano submetidas à fertilização *in vitro*

Autora: Vanessa Krebs Genro

Orientador: Prof. João Sabino Lahorgue da Cunha Filho

Orientador estrangeiro: Prof. Renato Fanchin

Tese de Doutorado

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Estudo da resposta à indução da ovulação em mulheres com diferentes genótipos (N680S e T307A) no gene do receptor do Hormônio Folículo Estimulante e (AMHR2 G>A) no gene do receptor do Hormônio Anti Mülleriano submetidas à fertilização *in vitro*

Autora: Vanessa Krebs Genro

Orientador: Prof. João Sabino Lahorgue da Cunha Filho

Orientador estrangeiro: Prof. Renato Fanchin

Tese de Doutorado

Porto Alegre, 2011

Agradecimentos:

No caminho que deu origem a esta tese incontáveis pessoas foram importantes para conclusão do meu trabalho aos quais agradeço.

Aos amigos e colegas do Grupo de Pesquisa em Endometriose e Ginecologia Minimamente Invasiva. Agradecimento especial a Emily De Conto pelas horas de trabalho no laboratório. À Professora Ursula Matte pelo suporte.

Aos colegas, enfermeiras e embriologistas do Hopital Antoine Béclère, Clamart, França pela ajuda na coleta de dados e pelo apoio no ano longe de casa. Ao Professor Renato Fanchin que permitiu e apoiou a realização da pesquisa.

Às Professoras Márcia Chaves e Tânia Furlaneto por acreditarem em mim e me apoiarem em um momento decisivo.

Aos colegas da Clínica Insemine e Instituto Willkok – Alberto Stein, Katia Delgado, Luciana Guedes da Luz e Carolina Andreoli pela presença constante.

Ao Professor João Sabino Lahorgue Cunha-Filho pela confiança e por, mais do que tudo, ter me ensinado uma nova forma de enfrentar desafios e encarar a vida.

À minha família:

Minha mãe, Sandra, por ter feito de mim quem eu sou.

Meu pai, Tarso, pela teimosia em me mostrar que o mundo é maior do que eu penso.

Luciana, irmã, amiga, ombro e acolhida em todas as horas.

Fernando pelo carinho e alegria.

Em especial ao meu marido, Carlos Souza, pelo apoio incondicional, carinho e paciência.

RESUMO EM PORTUGUÊS

A individualização do tratamento é o desafio atual no campo da reprodução assistida. Fatores prognósticos clássicos como idade ou testes de avaliação da reserva ovariana não são suficientes para prever completamente a resposta das pacientes à indução da ovulação. Essa tese investiga se polimorfismos do receptor do Hormônio Folículo Estimulante ou do receptor do Hormônio Anti-Mülleriano influenciam na resposta ovariana à administração de uma dose padrão de gonadotrofinas para Fertilização *In Vitro* numa população caucasiana francesa altamente selecionada. Para avaliação correta da resposta à indução da ovulação, usamos parâmetros clássicos como número de oócitos recuperados ou embriões obtidos e também a relação entre o número de folículos que atingem a maturidade ao final do ciclo de indução e o número basal de folículos antrais – taxa de maturação folicular. Como resultados, apresentamos que a presença do alelo G para o receptor do Hormônio Anti Mülleriano está associado com um número menor de oócitos recuperados na punção ovariana. Já o polimorfismo do receptor do FSH Ser 680, apesar de associado com um nível de FSH basal mais elevado, não altera a taxa de maturação folicular. Esses dados podem ajudar, no futuro, a escolha correta do melhor protocolo de indução da ovulação assim como a dose de gonadotrofina a ser utilizada.

RESUMO EM INGLÊS

Tailoring for a single patient the use of controlled ovarian stimulation is the next challenge in the field of reproductive technology. Classic prognostic factors such as age or ovarian reserve tests have shown to be limited to predict patient's response towards ovulation induction. This thesis searches to investigate if whether FSH or AMH receptor polymorphisms influence ovarian response to standard gonadotropins administration in a high selected French Caucasian population. In order to correctly evaluate the real ovarian response of each patient, we make use of classical parameters like the number of oocytes retrieved or number of embryos obtained at the end of an IVF cycle, and also the relationship between the number of follicles that reach maturity criteria and the total number of pre antral follicles – follicular output rate. Our results show that the presence of the G allele in the AMH receptor is associated with a lower number of oocytes retrieved. In addition, although FSHR Ser680 genotype is associated with higher basal FSH levels, this polymorphism as well as the Ala307 does not influence the follicular output rate. Our data can help to choose the best protocol and initial dose of gonadotrophin for ovulation induction in the future.

SUMÁRIO

1. Lista de Abreviaturas	7
2. Introdução	8
3. Revisão da Literatura	10
4. Justificativa	21
5. Objetivos	21
6. Hipótese Nula	22
7. Referências	23
8. Artigo: Anti-Müllerian hormone type II receptor polymorphism is associated with a reduction in the number of oocytes retrieved in controlled ovarian stimulation cycles.	31
9. Artigo: Follicle Stimulating Hormone Receptor Ser680 polymorphism affects day-3 FSH levels but do not modify the antral follicle responsiveness to exogenous gonadotropins	47
10. Considerações Gerais	69
11. Perspectivas	71
12. Anexos	72

1. LISTA DE ABREVIATURAS

AMH: *anti Müllerian Hormone* / Hormônio Anti Mülleriano

EFFORT: *exogenous follicle-stimulating hormone ovarian reserve test*

FIV: Fertilização *In Vitro*

FSH: *Follicle Stimulating Hormone* / Hormônio Folículo Estimulante

GAST: *gonadotrophin-releasin hormone agonist stimulation test*)

HMG: *Human Menopausal Gonadotrophin* / Gonadotrofina Menopáusica
Humana

HCG: *Human Corionic Gonadotrophin*/ Gonadotrofina Coriônica Humana

LH: *Lutheinizating Hormone* / Hormônio Luteinizante

SOP: Síndrome de Ovários Policísticos

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*/ Polimorfismo de Nucleotídeo Único

2. INTRODUÇÃO

A infertilidade atinge dez por cento das mulheres em idade fértil e pode ter diferentes origens como: obstrução tubária, endometriose, patologias ovulatórias, anormalidades espermáticas podendo também ter origem idiopática. As altas taxas de gestação obtidas com Fertilização *in vitro* (FIV) tornaram esse o procedimento viável para o tratamento de infertilidade de diferentes origens.

A indução da ovulação consiste na administração de gonadotrofinas exógenas sob controle ecográfico e hormonal com a finalidade de realização de procedimentos de reprodução assistida. Atualmente, o desafio na medicalização da reprodução humana é a individualização do tratamento. A busca de fatores prognósticos que auxiliem tanto na escolha do tipo de protocolo de indução mais adequado, quanto na dose inicial de gonadotrofina a ser administrada é cada vez mais importante. Para isso, deve-se, além de considerar fatores conhecidos como a causa da infertilidade, presença de endometriose, tabagismo e qualidade do sêmen, buscar elementos individuais que permitam ajustar o tratamento a cada caso específico.

Não há consenso sobre qual o parâmetro ideal para quantificação da resposta ovariana à estimulação, normalmente valores absolutos de folículos maduros ou oócitos recuperados são usados para classificar as pacientes como boas ou más respondedoras. O estabelecimento de valores arbitrários de folículos, oócitos ou mesmo embriões é sim importante, mas não leva em consideração a reserva ovariana inicial da paciente, não sendo capaz de medir corretamente a eficácia do tratamento administrado.

Ao mesmo tempo, a taxa de gestação é um desfecho suscetível à influência de diversos fatores, como por exemplo, a causa da infertilidade, idade da paciente,

qualidade do sêmen, também não sendo um parâmetro consistente para medir o efeito do tratamento de indução.

Portanto, propomos, além dos parâmetros usuais, um parâmetro inovador, já publicado, que chamamos de “Taxa de maturação folicular”. Esse novo valor será calculado levando-se em conta a relação entre o número de folículos maduros ao final da indução e o número de folículos antrais.

Além dos fatores prognósticos conhecidos, pesquisas recentes demonstraram que alterações dos genes do receptor do FSH, do receptor do hormônio AMH estão relacionadas com alterações de prognóstico reprodutivo e função ovulatória, tornando interessante a investigação da relação entre essas alterações e resposta à indução da ovulação. Recentemente, a individualização da resposta ao tratamento farmacológico é explicada pela expressão fenotípica diversa e os polimorfismos podem estar envolvidos na heterogeneidade dessa resposta.

Nosso principal objetivo é avaliar a relação entre essas alterações genéticas e a resposta ovariana a estimulação com gonadotrofinas exógenas através de parâmetros clássicos e da taxa de maturação folicular.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Estimulação Ovariana para Reprodução Assistida

As altas taxas de sucesso das técnicas de Fertilização *in vitro* (FIV) nos anos 90 determinaram que a indução da ovulação, anteriormente restrita às pacientes com infertilidade associada a patologias ovulatórias como Síndrome dos ovários policísticos (SOP), fosse uma técnica praticada diariamente para tratamento de infertilidade de diferentes causas (1). A estimulação ovariana consiste basicamente na administração de gonadotrofinas exógenas (FSH e LH) sob controle ecográfico e hormonal até que os folículos ovarianos atinjam um diâmetro de, no mínimo, 16 mm quando são considerados maduros para proceder à punção ovariana e coleta dos oócitos para posterior fertilização. Para o processo de estimulação ovariana, dispomos basicamente de três drogas: FSH recombinante, o LH recombinante e a gonadotrofina extraída de mulheres menopausadas (HMG) (2).

O primeiro bebê nascido de FIV foi resultado da coleta via laparoscópica de um oócito em ciclo espontâneo (3). As taxas de sucesso deste tipo de procedimento, inicialmente muito baixas, levaram ao uso do citrato de clomifeno associado com HMG para recrutamento de múltiplos folículos, e gonadotrofina coriônica humana (HCG) para maturação folicular final e ovulação (3).

O recrutamento de vários folículos causava a luteinização precoce que passou a ser o maior problema dos ciclos de reprodução assistida, comprometendo até 40% dos casos (4). A possibilidade de controle do ciclo e a simplificação do processo de FIV foi possível com a introdução dos agonistas do GnRH, substância esta que, após passado o período inicial de estímulo ou *flare-up*, causa uma dessensibilização pituitária, possibilitando o recrutamento de vários folículos e o controle do momento da

ovulação, melhorando significativamente as taxas de recuperação de oócitos na punção e, conseqüentemente, gestação (5;6). Já na década de 90, a manipulação da estrutura molecular do GnRH permitiu o uso comercial dos antagonistas desse hormônio. Essas moléculas atuam de forma quase imediata na secreção endógena de gonadotrofinas, diminuindo a produção de FSH e LH em um período de 8 horas (4).

Atualmente um grande arsenal terapêutico é disponibilizado ao clínico para indução da ovulação e diferentes protocolos foram testados. Diversos elementos foram estudados como fatores prognósticos para o sucesso do tratamento de FIV. Apesar disso, a busca de critérios prognósticos e dados que permitam a individualização do tratamento permanece sendo tópico de constante discussão na literatura.

3.2 Fatores Prognósticos

Diversos estudos identificaram fatores que estariam possivelmente associados com a chance de sucesso após um tratamento de FIV, como a causa da infertilidade, idade da mulher, número de tentativas prévias com resultado negativo, qualidade seminal, presença de endometriose e tabagismo, entre outros (7-11). Entretanto, os fatores identificados pelos estudos são variáveis assim como a interpretação do seu valor prognóstico. Os fatores prognósticos mais importantes para FIV serão descritos a seguir.

3.2.1 Idade

A idade tem sido tratada como o principal fator prognóstico para o sucesso do tratamento de reprodução assistida. Estudos realizados avaliaram o impacto da idade da mulher de formas diferentes, categorizando as pacientes como acima ou abaixo de 35 anos (12), dividindo a amostra em quatro categorias (13) ou considerando a idade como uma variável contínua (14). De qualquer forma, é consenso entre os estudos

que quanto maior a idade da mulher, menor é a chance de um desfecho reprodutivo favorável. Sabe-se que a chance de uma mulher de 40 anos gestar após um ciclo de FIV é de menos de 10%(10) e a explicação para esse dado está na redução da reserva ovariana, quantidade e qualidade oocitária e características endometriais (11).

3.2.2. Causa da Infertilidade

Pacientes cuja investigação é completamente normal e a causa da infertilidade não pode ser determinada – infertilidade idiopática- poderiam ser consideradas como tendo um melhor prognóstico reprodutivo. Em estudos em que essas pacientes foram usadas como categoria de referência, estas apresentaram maior chance de gestação quando comparadas às pacientes com endometriose ou fator masculino severo (14;15). Entretanto, outros estudos consideram que pacientes com infertilidade de origem tubária pura apresentariam maior chance de gestação quando submetidas à FIV (16).

A endometriose é um fator particularmente importante e pacientes portadoras dessa doença têm resposta significativamente pior em todos os marcadores de sucesso reprodutivo, sendo que a presença de endometriose diminui em 20% a taxa de gravidez quando comparadas com mulheres com outras indicações de FIV. Esses dados sugerem que a endometriose atua de forma negativa na reserva ovariana, na receptividade endometrial, na qualidade oocitária e embrionária (17).

3.2.3 Tabagismo

Uma metanálise recente reuniu vinte e três artigos que avaliaram o peso do tabagismo nos resultados de ciclos de FIV (18). Além de levarem um tempo significativamente maior para engravidar (19), pacientes usuárias de tabaco

demonstraram menores taxas de gestação clínica, e taxas maiores de abortamento e gestação ectópica (18;19). Estima-se que a chance de gestação clínica caia pela metade nas mulheres usuárias de tabaco (18).

3.2.4 Parâmetros de Reserva Ovariana

Diversos testes de rastreamento foram desenvolvidos para avaliação da reserva ovariana e sua resposta às gonadotrofinas exógenas e a predição da chance de gestação (20). Considerando a queda da fertilidade com a idade e o aumento progressivo dos níveis de FSH é lógico antecipar que os valores deste hormônio teriam algum valor prognóstico. De fato, a dosagem sérica do FSH de terceiro dia é o método mais simples e, ainda, o mais usado na clínica para avaliação de reserva ovariana. Diversos estudos investigaram a associação dos níveis de FSH e a relação FSH/LH para prever os resultados de procedimentos de reprodução assistida e, por serem marcadores indiretos da reserva ovariana, um valor normal desse hormônio não identifica corretamente pacientes com maior chance de gravidez (20).

A ultra-sonografia também foi estudada para prever reserva ovariana e o recrutamento folicular avançado no terceiro dia do ciclo é correspondente a níveis de FSH aumentados e está correlacionado com uma fase folicular mais curta em pacientes com idade avançada. Essa dominância folicular precoce está associada a níveis de estradiol no terceiro dia aumentados e esse achado foi correlacionado com má resposta a indução da ovulação (20). Esse recrutamento precoce pode inclusive alterar a confiabilidade de outros testes de reserva ovariana (21)

Testes de estímulo como a administração de agonista do GnRH (*GAST-gonadotrophin-releasin hormone agonist stimulation test*), a administração exógena de FSH (*EFORT- exogenous follicle-stimulating hormone ovarian reserve test*) (20) ou com a administração de citrato de clomifeno (22) foram estudados como forma de

avaliação da reserva ovariana. Entretanto, não estão associados com sucesso reprodutivo em ciclos de reprodução assistida (23).

Diversos artigos foram publicados sobre o uso da ultra-sonografia para prever resposta ovariana. Contagem de folículos antrais e volume ovariano parecem correlacionar-se com resposta a procedimentos de reprodução assistida (24). A avaliação da coorte folicular é descrita como a média da soma de folículos antrais nos dois ovários e a presença de menos que cinco folículos parece prever má resposta ovariana (25). O número de folículos antrais foi descrito como o melhor marcador em pacientes submetidas a FIV para prever má resposta ovariana quando comparado com FSH, estradiol e inibina B (26).

A inibina B é uma glicoproteína dimérica produzida pelas gônadas possuindo uma propriedade definida de supressão da secreção das gonadotrofinas, no entanto, seu papel na fisiologia do ciclo menstrual não foi totalmente esclarecida (27). Níveis séricos de inibina B se correlacionaram melhor que o FSH para prever cancelamento de ciclo e número de oócitos recuperados em estudos que compararam os dois testes (28;29), entretanto esses dados foram contestados por outros autores (30).

O hormônio anti-mülleriano (AMH) é um hormônio glicoproteico que pertence a superfamília do *Transforming Growth Factor β* , sendo essencialmente expresso por células fetais para dirigir a diferenciação sexual fetal (31). Em mulheres adultas, O AMH é produzido pelos folículos antrais e pré antrais e está envolvido na regulação da estereoidogênese, refletindo a atividade desses folículos que são independentes de FSH e fazendo deste marcador um método interessante de avaliação de reserva ovariana.

Estudos demonstraram que a dosagem sérica do AMH é capaz de prever resposta ovariana à estimulação, número de folículos maduros, número de oócitos recolhidos e até mesmo chance de cancelamento do ciclo devido à resposta insuficiente ou chance de hiperestímulo ovariano (31-36). Outros autores

demonstraram que a dosagem desse hormônio é mais precisa em avaliar a reserva ovariana que outros marcadores clássicos como a dosagem de FSH ou de inibina B (31) e está intimamente correlacionada com a contagem de folículos antrais (34;36) no início da fase folicular com a vantagem de não variar significativamente durante o ciclo menstrual (37).

Contagem folicular, volume ovariano e níveis séricos de inibina B correlacionam-se com número de oócitos estimulados ou recuperados (38;39). Entretanto apenas a dosagem sérica do AMH está correlacionada significativamente quando o desfecho avaliado é gestação (36).

Apesar de todos esses fatores conhecidos predizerem modestamente a resposta de uma paciente específica à indução da ovulação (34), estes devem ser considerados no momento da prescrição de um tratamento de reprodução assistida. A busca por novos fatores que estariam envolvidos nessa resposta é fundamental para particularizar protocolos e doses ao prescrever um tratamento de FIV.

3.3 Polimorfismos Genéticos

Polimorfismos genéticos são pequenas variações que ocorrem no genoma e que garantem as diferenças individuais. Por definição ocorrem em mais de 1% da população. A suscetibilidade a doenças e as características individuais, por exemplo, podem ser devido a essas pequenas alterações no genoma. A forma mais comum desta variação gênica acontece através da substituição de um único nucleotídeo por outro (*single nucleotide polymorphism* – SNP), que ocorre com uma frequência aproximada de 1 a cada 1000 pares de base (40).

O seqüenciamento do genoma humano e a busca de mutações em condições patológicas mostraram que SNPs são freqüentes e ocorrem em hormônios do eixo hipotálamo-hipófise assim como em seus receptores (41). Em geral a freqüência de polimorfismos varia entre 15 a 50% da população. Isso indica que essas alterações genéticas não têm efeito deletério pronunciado sobre a função reprodutiva, de outra

forma a evolução teria eliminado esses polimorfismos. Entretanto, os polimorfismos podem atingir a função através de, no mínimo, dois mecanismos: (i) mudança das propriedades bioquímicas do produto do gene; ou (ii) atuando na transcrição gênica para modificar a atividade do mesmo.

SNPs geram diversidade genética e complexidade inter espécie e podem estar ligados ao ajuste fino do *feed back* endócrino e da atividade hormonal. O resultado dessas pequenas alterações genéticas pode alterar o desempenho reprodutivo com um espectro que pode variar da funcionalidade completa à subfertilidade (41). Uma aplicação potencial do estudo dos polimorfismos é a da farmacogenética, que é o estudo das variações genéticas que podem levar a respostas individuais às drogas utilizadas.

3.3.1 Polimorfismos do Receptor do FSH

A interação entre o FSH e seu receptor é complexa e envolve mudanças conformacionais no hormônio que ocupa o domínio extracelular do receptor (42). O gene do receptor do FSH está localizado no cromossomo 2 e sua estrutura envolve 678 aminoácidos com sete domínios transmembrana (42). Até o presente momento, o *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* indica que existem 731 SNPs no gene do receptor do FSH, mas apenas 5 estão localizadas em regiões codificadoras do gene (éxon), sendo que essas mutações ocorrem no exon 10 nos códons 307, 329, 524, 665 e 680. Apesar de os polimorfismos Ala307Thr e Ser680Asn serem bem caracterizados quanto à frequência e distribuição étnica, não há informações disponíveis sobre os outros três polimorfismos.

O éxon 10 codifica a região terminal do domínio extracelular do receptor do FSH, assim como toda região transmembrana e o domínio intracelular e desempenha papel fundamental na transdução do sinal (43). Os dois SNPs mais comuns do éxon 10 correspondem às posições dos aminoácidos 307 e 680.

Estudos realizados em mulheres com função ovariana normal demonstraram que os SNPs no éxon 10 modulam a função do receptor e a resposta à indução com gonadotrofina exógena.

A função dos polimorfismos na variação à resposta à indução da ovulação foi demonstrada primeiramente através de um estudo retrospectivo que avaliou o polimorfismo Asn680 num grupo de mulheres submetidas à administração de gonadotrofina exógena para ciclos de reprodução assistida. Foi demonstrado que mulheres homozigotas para Asn680 necessitaram menor dose de FSH para atingir a maturidade folicular do que pacientes homozigotas para Ser680 ou heterozigotas (44;45). Isso sugere uma sensibilidade folicular menor ao FSH exógeno nas pacientes com genótipo Ser680.

Em uma análise do tipo caso controle, mulheres submetidas à indução da ovulação foram categorizadas como más respondedoras ou respondedoras normais de acordo com o número de folículos que atingiram a maturidade. O grupo de pacientes com polimorfismo Ser680 em homozigose teve um número maior de pacientes que responderam mal à indução e que tiveram seu ciclo cancelado por má resposta que o grupo selvagem para esse alelo (46).

Outros investigadores avaliaram 161 mulheres submetidas à indução da ovulação para FIV e, como desfechos, o número de folículos pré ovulatórios, número de oócitos recuperados e o nível de estradiol alcançado foi independente da presença de polimorfismos. Entretanto, pacientes com polimorfismo Ser680 tinham níveis de FSH levemente mais altos que pacientes heterozigotas ou homozigotas selvagens (44). Recentemente nosso grupo demonstrou que os dois polimorfismos do receptor do FSH estão fortemente associados, mas não estão completamente ligados ao contrário do que demonstrado em estudos anteriores (47).

3.3.2 Polimorfismo do AMH e seu receptor

Como descrito anteriormente, essa proteína é um excelente marcador de reserva ovariana, entretanto sua atuação como proteína intra-ovariana ainda é motivo de debate. Seu papel foi evocado na iniciação do crescimento folicular, já que existe uma depleção acelerada do estoque de folículos primordiais nos ratos AMH-deficientes em relação aos controles (48), assim como o crescimento folicular dependente de FSH (49) implicando essa proteína como um fator determinante da sensibilidade folicular ao FSH.

Em estudo clínico recente, nosso grupo também evidenciou que a dosagem sérica de AMH está inversamente correlacionada com a taxa de maturação folicular, indo ao encontro dos dados que sugerem que o AMH seria um fator limitante da sensibilidade folicular ao FSH (50). Por outro lado, McGee et AL. (51) demonstraram que o AMH promove o crescimento folicular pré antral, não provocando a diferenciação celular.

Os dados na literatura em relação ao papel do polimorfismo do receptor do AMH são escassos e confusos. Dois artigos correlacionam esse polimorfismo com dados que sugerem uma redução da reserva ovariana. Polimorfismos do gene do AMH e seu receptor AMHR2 foram identificados e associados com níveis mais altos de estradiol do início da fase folicular em mulheres normo-ovulatórias o que sugere, mais uma vez o papel dessa proteína na regulação da sensibilidade ovariana ao FSH (52). Outro estudo do mesmo grupo demonstrou que mulheres portadoras de um polimorfismo específicos do receptor do AMH (A>G – 482) iniciam a menopausa 2.8 anos mais cedo, mais uma vez sugerindo um papel sinalizador do AMH no uso do *pool* de folículos primordiais (53).

Esses dados em conjunto mostram que os polimorfismos do receptor do FSH e do AMH podem estar associados com uma sutil redução da reserva ovariana. O

esclarecimento do seu papel exato na função ovariana e na reposição ovariana a indução da ovulação pode ajudar a selecionar fatores importantes a serem contabilizados na individualização do tratamento de reprodução assistida.

3.4 Medidas de Resposta à Indução da Ovulação e Taxa de Maturação Folicular

A forma correta de quantificar a resposta ovariana ao estímulo com gonadotrofinas ainda é motivo de debate na literatura, não havendo uma definição clara de má ou boa respondedora.

Classicamente a resposta à indução da ovulação é quantificada pelo número de folículos pré-ovulatórios ao final do ciclo de indução ou pelo número de oócitos recuperados na punção ovariana. Na grande parte dos trabalhos, as pacientes que têm ao final da indução menos de quatro folículos maduros ou naquelas em que se obteve menos de quatro oócitos são consideradas más respondedoras (32;37;54;55). Parâmetros diferentes desses também já foram descritos (33;56) como número de embriões obtidos ou taxa de cancelamento de ciclos. Nenhum desses parâmetros leva em conta a reserva ovariana inicial, ou seja, a partir de quantos folículos capazes de responder ao estímulo a paciente inicia o ciclo de indução.

O ciclo de vida dos folículos ovarianos foi descrito por Gougeon (57) e sabemos que os folículos maiores de três milímetros são sensíveis a ação do FSH (58) e a contagem ecográfica desses folículos no início do ciclo menstrual é uma estabelecida forma de quantificarmos a reserva ovariana (59).

Dessa forma propusemos um parâmetro inovador para quantificar a resposta ovariana que chamamos de “Taxa de maturação folicular” ou “*Follicular Output Rate*”(60). Esse parâmetro será calculado pelo número de folículos pré-ovulatórios ao

final de um ciclo de indução e/ pelo número de folículos pré antrais (3-10 mm) contados antes do início da administração de gonadotrofinas, conforme demonstrado na Figura 1.

Além de avaliar os fatores em estudo de acordo com critérios usuais de avaliação da resposta ovariana à indução da ovulação, esse novo critério reflete a eficácia da resposta ovariana à administração de gonadotrofinas durante um ciclo de FIV e a sensibilidade dos folículos antrais às gonadotrofinas exógenas.

Dessa forma, o estudo dos polimorfismos dos receptores do FSH e AMH e a relação dos diferentes genótipos com a resposta à indução da ovulação medida por parâmetros clássicos e pela “Taxa de Maturação Folicular” pode permitir a individualização do tratamento em reprodução assistida. Essa individualização se refletirá na escolha do melhor protocolo de indução assim como a escolha da melhor dose inicial de gonadotrofina.

4. JUSTIFICATIVA

Considerando a importância da infertilidade pela sua alta prevalência e o uso da FIV como tratamento adequado para diversos tipos de infertilidade, é de extrema importância o estudo de fatores preditores de resposta ovariana à indução. Considerando os dados atuais da literatura que apontam que os polimorfismos dos receptores do FSH e AMH podem estar associados com uma redução da reserva ovariana, a correta determinação e quantificação desses fatores permitirá a individualização do tratamento e melhor avaliação prognóstica das pacientes.

5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivos Principais*

Avaliar a relação entre a presença dos polimorfismos do receptor do AMH (A>G – 482) e a resposta ovariana à indução da ovulação em pacientes submetidas à Fertilização *In vitro* medida por parâmetros clássicos.

Avaliar a relação entre a presença dos polimorfismos do receptor do FSH Ala307Thr e Ser680Asn e a resposta ovariana à indução da ovulação em pacientes submetidas à Fertilização *In vitro* medida por parâmetros clássicos e através da taxa de maturação folicular.

5.2 *Objetivos (Desfechos) secundários*

Avaliar se a relação entre a presença do polimorfismo do receptor do AMH (A>G – 482) influencia na dose total necessária de gonadotrofina necessária para indução da ovulação em pacientes submetidas à Fertilização *In Vitro*.

Avaliar se a relação entre a presença dos polimorfismos do receptor do FSH

Ala307Thr e Ser680Asn influencia na dose total necessária de gonadotrofina necessária para indução da ovulação em pacientes submetidas à Fertilização *In Vitro*.

Avaliar se relação entre a presença do polimorfismo do receptor do AMH (A>G – 482) e a dosagem sérica do AMH em mulheres inférteis.

Avaliar a relação entre a presença dos polimorfismos do receptor do FSH Ala307Thr e Ser680Asn e a dosagem sérica do AMH em mulheres inférteis.

Avaliar a relação entre a presença do polimorfismo do receptor do AMH (A>G – 482) e a dosagem de FSH em mulheres inférteis.

Avaliar a relação entre a presença dos polimorfismos do receptor do FSH Ala307Thr e Ser680Asn e a dosagem de FSH em mulheres inférteis.

Avaliar a relação entre a presença do polimorfismo do receptor do AMH (A>G – 482) e a contagem de folículos antrais em mulheres inférteis.

Avaliar a relação entre a presença dos polimorfismos do receptor do FSH Ala307Thr e Ser680Asn e a contagem de folículos antrais em mulheres inférteis.

6. HIPÓTESE NULA

A presença dos polimorfismos do receptor do FSH Ala307Thr e Ser680Asn e do receptor do AMH (A>G – 482) não influenciam a resposta ovariana à indução da ovulação em pacientes submetidas à Fertilização *In Vitro*.

7. Referências

1. Sperof.L, Fritz.M. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 7 ed. LWW, 2005.
2. Trounson AO, Leeton JF, Wood C, Webb J, Wood J. Pregnancies in humans by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. Science 1981; 212(4495):681-682.
3. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet 1978; 2(8085):366.
4. Reissmann T, Felberbaum R, Diedrich K, Engel J, Comaru-Schally AM, Schally AV. Development and applications of luteinizing hormone-releasing hormone antagonists in the treatment of infertility: an overview. Hum Reprod 1995; 10(8):1974-1981.
5. Edelstein MC, Brzyski RG, Jones GS, Oehninger S, Sieg SM, Muasher SJ. Ovarian stimulation for in vitro fertilization using pure follicle-stimulating hormone with and without gonadotropin-releasing hormone agonist in high-responder patients. J In Vitro Fert Embryo Transf 1990; 7(3):172-176.
6. Tan SL, Doyle P, Campbell S et al. Obstetric outcome of in vitro fertilization pregnancies compared with normally conceived pregnancies. Am J Obstet Gynecol 1992; 167(3):778-784.
7. Hughes EG, King C, Wood EC. A prospective study of prognostic factors in in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril 1989; 51(5):838-844.

8. Lintsen AM, Eijkemans MJ, Hunault CC et al. Predicting ongoing pregnancy chances after IVF and ICSI: a national prospective study. *Hum Reprod* 2007; 22(9):2455-2462.
9. Minaretzis D, Harris D, Alper MM, Mortola JF, Berger MJ, Power D. Multivariate analysis of factors predictive of successful live births in in vitro fertilization (IVF) suggests strategies to improve IVF outcome. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15(6):365-371.
10. Templeton A, Morris JK, Parslow W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet* 1996; 348(9039):1402-1406.
11. van Loendersloot LL, van Wely M, Limpens J, Bossuyt PM, Repping S, van d, V. Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010; 16(6):577-589.
12. Sharma V, Allgar V, Rajkhowa M. Factors influencing the cumulative conception rate and discontinuation of in vitro fertilization treatment for infertility. *Fertil Steril* 2002; 78(1):40-46.
13. Sabatini L, Zosmer A, Hennessy EM, Tozer A, Al Shawaf T. Relevance of basal serum FSH to IVF outcome varies with patient age. *Reprod Biomed Online* 2008; 17(1):10-19.
14. Bancsi LF, Huijs AM, den Ouden CT et al. Basal follicle-stimulating hormone levels are of limited value in predicting ongoing pregnancy rates after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2000; 73(3):552-557.
15. Ottosen LD, Kesmodel U, Hindkjaer J, Ingerslev HJ. Pregnancy prediction models and eSET criteria for IVF patients--do we need more information? *J Assist Reprod Genet* 2007; 24(1):29-36.

16. Hunault CC, Eijkemans MJ, Pieters MH et al. A prediction model for selecting patients undergoing in vitro fertilization for elective single embryo transfer. *Fertil Steril* 2002; 77(4):725-732.
17. Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002; 77(6):1148-1155.
18. Waylen AL, Metwally M, Jones GL, Wilkinson AJ, Ledger WL. Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2009; 15(1):31-44.
19. Augood C, Duckitt K, Templeton AA. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 1998; 13(6):1532-1539.
20. Bukman A, Heineman MJ. Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Hum Reprod Update* 2001; 7(6):581-590.
21. Grynberg M, Feyereisen E, Scheffer JB, Koutroubis P, Frydman R, Fanchin R. Early follicle development alters the relationship between antral follicle counts and inhibin B and follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3. *Fertil Steril* 2010; 93(3):894-899.
22. Navot D, Margalioth EJ, Laufer N, Brzezinski A, Birkenfeld A, Schenker JG. Periovulatory 17 beta-estradiol pattern in conceptional and nonconceptional cycles during menotropin treatment of anovulatory infertility. *Fertil Steril* 1987; 47(2):234-237.
23. Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, te Velde ER, Broekmans FJ. The clomiphene citrate challenge test for the prediction of poor ovarian response and nonpregnancy in patients undergoing in vitro fertilization: a systematic review. *Fertil Steril* 2006; 86(4):807-818.

24. Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002; 77(2):328-336.
25. Tinkanen H, Blauer M, Laippala P, Tuohimaa P, Kujansuu E. Prognostic factors in controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1999; 72(5):932-936.
26. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Looman CW et al. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod* 2003; 18(4):700-706.
27. Groome NP, Illingworth PJ, Brien O et al. - Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(4):1401-140555.
28. Seifer DB, Scott RT, Jr., Bergh PA et al. Women with declining ovarian reserve may demonstrate a decrease in day 3 serum inhibin B before a rise in day 3 follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 1999; 72(1):63-65.
29. Fawzy M, Lambert A, Harrison RF et al. Day 5 inhibin B levels in a treatment cycle are predictive of IVF outcome. *Hum Reprod* 2002; 17(6):1535-1543.
30. Creus M, Penarrubia J, Fabregues F et al. Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome. *Hum Reprod* 2000; 15(11):2341-2346.
31. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003; 18(2):323-327.

32. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. A prospective, comparative analysis of anti-Mullerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2010; 93(3):855-864.
33. Nardo LG, Gelbaya TA, Wilkinson H et al. Circulating basal anti-Mullerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2009; 92(5):1586-1593.
34. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006; 12(6):685-718.
35. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002; 77(2):357-362.
36. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER et al. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002; 17(12):3065-3071.
37. La Marca A, Giulini S, Tirelli A et al. Anti-Mullerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2007; 22(3):766-771.
38. Dumesic DA, Damario MA, Session DR et al. Ovarian morphology and serum hormone markers as predictors of ovarian follicle recruitment by gonadotropins for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(6):2538-2543.
39. Eldar-Geva T, Ben Chetrit A, Spitz IM et al. Dynamic assays of inhibin B, anti-Mullerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian

- ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod* 2005; 20(11):3178-3183.
40. Shastry BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 2002; 47(11):561-566.
 41. Gromoll J, Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16(8):368-373.
 42. Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature* 2005; 433(7023):269-277.
 43. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 1997; 18(6):739-773.
 44. Perez MM, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(9):3365-3369.
 45. Sudo S, Kudo M, Wada S, Sato O, Hsueh AJ, Fujimoto S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(10):893-899.
 46. de Castro F, Ruiz R, Montoro L et al. Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 2003; 80(3):571-576.
 47. Rodini GP, Genro VK, Matte U et al. There is no complete linkage between the polymorphisms N680S and T307A of the follicular stimulating hormone receptor gene in fertile women. *J Assist Reprod Genet* 2010.

48. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; 143(3):1076-1084.
49. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P et al. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001; 142(11):4891-4899.
50. Genro VK, Grynberg M, Scheffer JB, Roux I, Frydman R, Fanchin R. Serum anti-Mullerian hormone levels are negatively related to Follicular Output RaTe (FORT) in normo-cycling women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 2010.
51. McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJ. Mullerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biol Reprod* 2001; 64(1):293-298.
52. Kevenaar ME, Themmen AP, Laven JS et al. Anti-Mullerian hormone and anti-Mullerian hormone type II receptor polymorphisms are associated with follicular phase estradiol levels in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 2007; 22(6):1547-1554.
53. Kevenaar ME, Themmen AP, Rivadeneira F et al. A polymorphism in the AMH type II receptor gene is associated with age at menopause in interaction with parity. *Hum Reprod* 2007; 22(9):2382-2388.
54. Broer SL, Mol BW, Hendriks D, Broekmans FJ. The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril* 2009; 91(3):705-714.

55. Gnath C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Mullerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod* 2008; 23(6):1359-1365.
56. Shanbhag S, Aucott L, Bhattacharya S, Hamilton MA, McTavish AR. Interventions for 'poor responders' to controlled ovarian hyperstimulation (COH) in in-vitro fertilisation (IVF). *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(1):CD004379.
57. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17(2):121-155.
58. Gougeon A. Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas* 1998; 30(2):137-142.
59. Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002; 77(2):328-336.
60. Genro VK, Grynberg M, Scheffer JB, Roux I, Frydman R, Fanchin R. Serum anti-Mullerian hormone levels are negatively related to Follicular Output RaTe (FORT) in normo-cycling women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 2011; 26(3):671-677.

8. Artigo: Anti-Müllerian hormone type II receptor polymorphism is associated with a reduction in the number of oocytes retrieved in controlled ovarian stimulation cycles.

Artigo submetido à Revista Fertility and Sterility.

Running Title: AMH receptor polymorphism and IVF outcomes

Anti-Müllerian hormone type II receptor polymorphism is associated with a reduction in the number of oocytes retrieved in controlled ovarian stimulation cycles.

V. Genro, MD^{1,5*}; U. Matte, PhD^{2,*}; De Conto, E³, Fanchin, R⁴, J.S. Cunha-Filho, PhD^{1,*}

¹ *Postgraduate Program in Medical Clinics of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

² *Terapia Gênica Research Unit. Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil*³ *Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

³ *Graduate Student in Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

⁴*AP-HP, Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Hôpital Antoine Bécclère, Clamart, F-92141; Univ Paris-Sud, Clamart, F-92140; INSERM, U782, Clamart, F-92140*

^{*} *Authors' Current address: Department of Obstetrics and Gynecology of the University (UFRGS) Hospital das Clínicas de Porto Alegre, 11º Andar, Sala 1124, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

⁵ **Corresponding author:** Vanessa Krebs Genro. Nilo Peçanha, 2825/ 905. Porto Alegre, Brazil. vanessagenro@gmail.com 55 51 33881212

Financial support: This study was supported by a scholarship from the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and a grant from the Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS- Brazil.

Capsule:

A specific type of polymorphism of AMH type II receptor is associated with a reduction of oocytes retrieved in IVF cycles.

Abstract

Objective: to verify if the AMHR2-482 A>G polymorphisms is associated to fewer oocytes retrieved in controlled stimulation cycles in a highly selected population of infertile, Caucasian, European women.

Design: Prospective observational study

Setting: University Hospital; Human Reproduction service.

Patients: 47 Caucasian women with a diagnosis of male infertility.

Interventions: none

Main Outcome Measures: Allelic and genotype frequencies of AMHR2-482 A>G polymorphism and its association with number of oocytes retrieved, number of MII oocytes and number of embryos obtained after ovulation induction for IVF treatment.

Results: Carriers of the G allele in the AMHR2-482 A>G polymorphism produced fewer oocytes, fewer MII oocytes and fewer embryos in response to gonadotropin stimulation in IVF cycles. No difference was found in the clinical parameters of ovarian reserve between the genotype groups or in pregnancy rates

Conclusion: This finding is in accordance to previous studies that suggests a reduction in ovarian reserve of women carrying this polymorphism.

Key words: AMH, polymorphisms, ovarian response, IVF, infertility.

Introduction

Clinically, Anti-Müllerian Hormone (AMH) is nowadays considered the most accurate marker of ovarian response (1-3). It is robustly correlated to the number of early antral follicles and more sensible than other hormonal markers, like 3th day FSH measurement (2;3). In stimulated cycles for In Vitro Fertilization (IVF) it is predictive of gonadotrophin requirements, number of oocytes retrieved and number of embryos obtained (4). Furthermore, concentration of AMH in follicular fluid is a marker of embryo implantation success (5).

AMH, a glycoprotein that belongs to the transforming growth factor – β family, is expressed in the ovary from the onset of primordial recruitment onwards, similarly in women and mice (6). Studies performed in mice showed that AMH seems to inhibit initiation of primordial follicle growth, functioning as a inhibitory growth factor during early stages of folliculogenesis (7;8) possibly being an important element in determining the size of the future follicular pool, however opposite results have been shown by another group (7). Moreover, AMH is involved in the regulation of FSH sensitivity and follicular steroidogenesis via AMH type II receptors (8;9).

Lately, attention has been paid to the expression pattern of this glycoprotein and genetic variations of AMH and AMH type II Receptor (AMHR2) genes. Genetic polymorphisms are responsible for individual variations and are extremely variable from one population to others AMHR2-482 A>G (rs2002555) polymorphism have been identified and associated with elevated follicular phase estradiol levels in a cohort of normo-ovulatory women (10). Besides, the same group have described the association of the AMHR2 -482 A>G polymorphism with natural age at menopause (11). These data taken together, suggest that AMHR2 gene polymorphisms could be associated with a diminished ovarian reserve.

Therefore, it would be plausible to find different responses to ovulation induction in women depending on their genotype. If proven, determination of patient's genotype

would be of critical importance in choosing ovulation induction protocols or gonadotrophin doses before starting infertility treatments.

In the present study we searched to describe, for the first time, in a highly selected population of Caucasian infertile women, the frequency of AMHR2-482 A>G polymorphism and evaluated whether these polymorphisms influence the number of oocytes retrieved in a stimulated cycle of ovulation induction for an IVF procedure.

Material and Methods

Design

We performed a prospective observational study.

Subjects

We prospectively studied 47 Caucasian infertile women investigating infertility aged 24 to 42 years whose cause of infertility was determined to be male. All of them met the following inclusion criteria: 1) both ovaries present, deprived of morphological abnormalities (such as cysts, endometriomas, etc.), and adequately visualized in transvaginal ultrasound scans; 2) regular menstrual cycle lengths ranging between 25 and 35 days; 3) no current or past diseases affecting ovaries or gonadotropin or sex steroid secretion, clearance, or excretion; 4) no clinical signs of hyperandrogenism; 5) body mass indexes (BMI) ranging from 16 to 32 kg/m²; 6) absence of any clinical sign of genetic disorder, 7) Caucasian and French origins 8) absence of other infertility cause determined by standard investigation.

Patients were recruited after completing infertility investigation and before starting any treatment. Written informed consent was obtained from all patients included in the study. The Research Ethics Committees at *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil and at *Hopital Antoine Bécélère*, Paris, France approved the research protocol. Written consent and blood collection was performed in the consultation before starting gonadotrophin treatment.

Hormonal Measurements

Serum estradiol and FSH levels were determined in the 2nd to 4th cycle day by an automated multi-analysis system using a chemiluminescence technique (Advia-Centaur, Bayer Diagnostics, Puteaux, France). For estradiol, lower detection limit was 30 pg/mL, linearity up to 1,000 pg/mL, and intra- and interassay CV were 8% and 9%, respectively. For FSH, lower detection limit was 0.1 mIU/mL and intra- and interassay CV were 3% and 5%, respectively. AMH levels were determined using a “second generation” enzyme-linked immunosorbent assay (reference A16507; Immunotech Beckman Coulter Laboratories, Villepinte, France). Intra- and interassay coefficients of variation were <6% and <10%, respectively, lower detection limit at 0.13 ng/mL, and linearity up to 21 ng/mL for AMH.

Ultrasound Scans

Ovarian ultrasound scans were performed in beginning of menstrual cycle (from the 2nd to 4th cycle day) using a 5.0-9.0 MHz multi-frequency transvaginal probe (Voluson 730 Expert, General Electric Medical Systems, Paris, France) to evaluate the number and sizes of ovarian antral follicles by the same experienced observer.

We determined, at baseline, the number of all follicles which diameters ranged from 3-8 mm in both ovaries.

COH and IVF-ET Protocol

Within the 3 months preceding COH, serum FSH and estradiol levels were measured on cycle day 3. Between cycle days 1-3 of a subsequent menstrual cycle, they received a single-dose, time-release gonadotropin releasing-hormone (GnRH) agonist, triptorelin (3 mg, IM, Decapeptyl, Beaufour Ipsen Pharma, Paris, France). Three weeks later, complete pituitary desensitization was confirmed by the detection of low serum levels of progesterone, estradiol, and LH (baseline), presence of ovarian cysts was ruled out and endometrial thickness <5 mm was verified. Thereafter,

recombinant FSH therapy (Gonal-F, Serono Pharmaceuticals, Boulogne, France) was initiated, at a dosage of 300 IU/day for at least 5 days, and continued until the day of hCG (Gonadotrophine Chorionique "Endo", Organon Pharmaceuticals, Saint-Denis, France, 10,000 IU, IM) administration. From the 6th day of recombinant FSH therapy onwards, daily FSH doses were adjusted according to estradiol levels and/or the number of growing follicles. During the last days of COH, patients had frequent visits at our Institution for ultrasonographic and hormonal examinations to define the proper timing for hCG administration. Administration of hCG (day of hCG administration; dhCG) was performed as soon as ≥ 4 preovulatory follicles (16-22 mm in diameter) were observed and estradiol levels per preovulatory follicle were >200 pg/mL. Oocytes were retrieved 35 hours after hCG administration by transvaginal ultrasound-guided aspiration and ETs were performed 2 days after oocyte retrieval. Luteal phase was supported with micronized progesterone, 600 mg/day, administered continuously by vaginal route, starting on the evening of ET. Clinical pregnancy was defined as an embryo with heartbeat inside the uterine cavity.

AMH Polymorphisms

Genomic DNA was extracted from the QIAcards® using the QIAamp DNA microkit® (QIAGEN, Germany) as instructed by the manufacturer. AMHR2 -482 A>G was determined using Taqman allelic discrimination assays. For the AMHR2 – 482 A>G promoter SNP, we used an Assay-on-Demand (Applied Biosystems, The Netherlands). Reactions were performed as described previously (12;13).

Statistics

The statistical analysis was carried out using the SPSS 12.0 software. The measure of central tendency used was the mean and the measure of variability was the standard deviation (SD). Medians and minimum-maximum values were used when normality of data distribution could not be ascertained. Categorical variables in the 2

groups were compared using the 2-sided Pearson χ^2 test. Continuous variables were compared using the student t test. We considered $P < 5\%$ to be significant. Sample size was calculated based on previous study (10) aiming $P\beta = 0.8$ and $P\alpha = 0.05$. Genotype distribution was tested for Hardy–Weinberg equilibrium, and the difference in genotype frequencies between the samples was tested using a χ^2 -test for independence (13).

Results

Overall population characteristics

At the time of inclusion, women were aged 34.8 ± 3.5 years and presented BMI values at 22.0 ± 3.2 kg/m². They had 16.6 ± 6.3 antral follicles and serum AMH and FSH levels at 3.1 ± 1.6 ng/mL, 6.4 ± 1.7 mIU/mL, respectively. In response to ovarian stimulation with 2,603 \pm 620 IU of gonadotropins they had 11.4 ± 5.6 oocytes retrieved and 6.2 ± 3.3 embryos produced.

Genotype Distribution

The genotype frequency found in our sample is show in Table 1. When comparing our genotype distribution to HapMap European database, we found that the allelic distribution of AMHR2-482 A>G is very similar to the sample of 120 European women in the HapMap ($P = 0.55$) and the allelic distribution of this polymorphism in our sample is in the Hardy-Weinberg equilibrium.

Analysis AMHR2-482 A>G genotypes and IVF outcomes

Patient characteristics in the different genotype groups are summarized in Table 2. Homozygous and heterozygous carriers for the polymorphisms were combined for statistical reasons. No difference was detected in age, BMI or parameters of ovarian reserve, i.e. antral follicle count, AMH, 3th day FSH or estradiol levels.

As shown in table 2, carriers of the AMHR2-482 A>G polymorphism have produced fewer oocytes in response to ovulation induction, although they have received similar gonadotrophin dose. Consequently, fewer MII oocytes were retrieved in this group of patients, leading to fewer embryos available for transfer.

No differences were found in pregnancy rates.

Discussion

In the present study, we describe, for the first time, in a highly selected population of infertile Caucasian European women, that carriers of the G allele for the AMHR2 -482 A>G polymorphism have less oocytes retrieved and less embryos fertilized when submitted to IVF ovulation induction. However, we investigated that genetic variants in the AMHR are not related to alterations in clinical parameters of ovarian reserve. This finding is in accordance to previous studies that suggested a reduction of ovarian reserve in this group of patients(10, 12).

Although a recent study suggested that polymorphisms in the signaling AMH pathway are not capable of distinguishing high and low responders (14), we consider that the role of AMHR2 polymorphism is more subtle. As demonstrated by Kavenaar et al, the G allele is associated with a reduction of 2.6 years in natural age of menopause (12) when compared to homozygous women to the A allele. The same group demonstrated that both genotypes for this polymorphism have similar basal FSH and AMH levels, however G carriers have a subtle elevation of basal estradiol levels (10).

Polymorphisms are responsible for individual variations and are not responsible for extreme phenotypes or natural evolution would have banned this SNPs (15). Recently, new insights have been gained in the investigation of the variability in the gene that encodes hormones and receptors of human reproduction (16;17). These genetic variations are highly dependent and inconstant depending on the population investigated. We gathered the homozygous and heterozygous for the alleles of interest

since because of statistical reasons and to ease interpretation since previous papers have analyzed their data like that (10).

Response towards ovulation induction with gonadotropins can vary according to age of patients, ovarian reserve parameters – like AMH or AFC (2;18-20), and even depends on the cause of infertility (21). It can vary also depending on the type of stimulation protocol utilized and depends on the quantity of gonadotrophin prescribed (22). These were the reasons we chose to include in our sample only Caucasian, French women, with no abnormalities or other causes for infertility submitted to a specific protocol with standard initial dose. Besides, it is important to point that our groups were not different in terms of age or ovarian reserve clinical measures or total dose of gonadotrophin required during ovulation induction.

The number of patients required in the study was calculated according to our primary endpoint which was number of oocytes retrieved. We have included pregnancy rates in our results for informative reasons and it is tempting to extrapolate that if a larger number of patients were recruited a statistical difference could eventually come to light however our primary attempt was not to study this outcome. We did not find any statistical difference in terms of serum estradiol levels among those genotypes probably mainly due to the genetic heterogeneity of our subjects as compared to others authors.

Finally we have shown, for the first time that patients with the G allele in the AMHR2 -482 A>G polymorphism have a reduced efficiency in controlled ovarian stimulation cycles, producing fewer oocytes, MII oocytes, and consequently less embryos. This information may help clinicians choose individualized protocols and doses for these patients and joins the body of evidence that suggests the screening of specific polymorphisms previous to ovulation induction.

Reference List

1. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002; 77(2):357-362.
2. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003; 18(2):323-327.
3. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER et al. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002; 17(12):3065-3071.
4. Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002; 77(2):328-336.
5. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N et al. Anti-Mullerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(5):1796-1802.
6. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR et al. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(2):77-83.
7. McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJ. Mullerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biol Reprod* 2001; 64(1):293-298.
8. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; 143(3):1076-1084.
9. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P et al. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001; 142(11):4891-4899.
10. Kevenaar ME, Themmen AP, Laven JS et al. Anti-Mullerian hormone and anti-Mullerian hormone type II receptor polymorphisms are associated with follicular phase estradiol levels in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 2007; 22(6):1547-1554.
11. Kevenaar ME, Laven JS, Fong SL et al. A functional anti-mullerian hormone gene polymorphism is associated with follicle number and androgen levels in polycystic ovary syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(4):1310-1316.
12. Kevenaar ME, Themmen AP, Rivadeneira F et al. A polymorphism in the AMH type II receptor gene is associated with age at menopause in interaction with parity. *Hum Reprod* 2007; 22(9):2382-2388.

13. Little J, Higgins JP, Ioannidis JP et al. Strengthening the reporting of genetic association studies (STREGA): an extension of the strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement. *J Clin Epidemiol* 2009; 62(6):597-608.
14. Hanevik HI, Hilmarsen HT, Skjelbred CF, Tanbo T, Kahn JA. Single nucleotide polymorphisms in the anti-Mullerian hormone signalling pathway do not determine high or low response to ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online* 2010; 21(5):616-623.
15. Shastri BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 2002; 47(11):561-566.
16. Greb RR, Grieshaber K, Gromoll J et al. A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(8):4866-4872.
17. Shastri BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 2002; 47(11):561-566.
18. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006; 12(6):685-718.
19. Nardo LG, Gelbaya TA, Wilkinson H et al. Circulating basal anti-Mullerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008.
20. Tinkanen H, Blauer M, Laippala P, Tuohimaa P, Kujansuu E. Prognostic factors in controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1999; 72(5):932-936.
21. Cahill DJ, Wardle PG, Maile LA, Harlow CR, Hull MG. Ovarian dysfunction in endometriosis-associated and unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14(10):554-557.
22. Out HJ, Rutherford A, Fleming R et al. A randomized, double-blind, multicentre clinical trial comparing starting doses of 150 and 200 IU of recombinant FSH in women treated with the GnRH antagonist ganirelix for assisted reproduction. *Hum Reprod* 2004; 19(1):90-95.

TABLE 1: AMHR2 Genotype Frequencies

		N (%)	HapMap sample (%)
AMHR2 -482	A/A	24 (51.1)	66.7
	A/G	21 (44.7)	31.7
	G/G	2 (4.3)	1.7

Table 2: Baseline and IVF outcomes in AMHR2 genotype groups.

	AMHR2 AA	AMHR2 AG/GG	P
N	24	23	
Ages (years)	34.1 ± 3.0	35.5 ± 2.8	0.169
BMI (kg/m ²)	22.7 ± 3.0	21.2 ± 2.9	0.131
Duration of Infertility (Years)	4.5 ± 2.2	4.4 ± 1.9	0.889
Small antral follicle (3-10 mm) count	17.6 ± 6.3	16.0 ± 6.0	0.206
Day 3 FSH levels (mUI/L)	5.7±1.7	6.6±1.7	0.099
Day Estradiol levels (pmol/L)	132.1±66.5	159.2±102	0.304
Baseline AMH levels (ng/mL)	3.0 ± 1.5	3.2 ± 1.7	0.606
Total dose of Gonadotrophin (UI)	2554 ± 606	2662 ± 647	0.572
Number of oocytes retrieved	13.1 ± 6.1	9.3 ± 4.2	0.031
Number of MII oocytes	11.9 ± 4.8	8.0 ± 3.9	0.009
Number of embryos	7.8 ± 3.5	4.3 ± 1.8	>0.001
Pregnancy Rate (%)	50.0	34.8	0.380

9. Artigo: Follicle Stimulating Hormone Receptor Ser680 polymorphism affects day-3 FSH levels but do not modify the antral follicle responsiveness to exogenous gonadotropins.

Artigo submetido à Revista Fertility and Sterility

Running Title

FSH receptor polymorphisms do not modify FORT

Follicle Stimulating Hormone Receptor Ser680 polymorphism affects day-3 FSH levels but do not modify the antral follicle responsiveness to exogenous gonadotropins.

V. Genro, MD^{1,5*}; J.S. Cunha-Filho, PhD¹, *U. Matte, PhD^{2*}; De Conto, E³, Fanchin, R⁴,

¹ *Postgraduate Program in Medical Clinics of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

² *Terapia Genica Research Unit. Research Center of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil* ³ *Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

³ *Graduate Student in Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

⁴ *AP-HP, Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Hôpital Antoine Béchère, Clamart, F-92141; Univ Paris-Sud, Clamart, F-92140; INSERM, U782, Clamart, F-92140*

* *Authors' Current address: Department of Obstetrics and Gynecology of the University Hospital das Clínicas de Porto Alegre, 11º Andar, Sala 1124, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

⁵ **Corresponding author:** Vanessa Krebs Genro. Nilo Peçanha, 2825/ 905. Porto Alegre, Brazil. vanessagenro@gmail.com 55 51 33881212

Financial support: This study was supported by a scholarship from the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and a grant from the Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS- Brazil.

Capsule

This paper provides clinical evidence that FSH receptor polymorphisms Ser680 and Thr307 do not modify antral follicle responsiveness to gonadotropins.

Abstract

Objective: To verify whether responsiveness of antral follicles to FSH administration, as reflected by the follicular output rate (FORT), is altered by the presence of FSHR polymorphisms Ser680 and Thr307.

Design: Prospective observational study

Setting: University Hospital

Patients: 143 Caucasian infertile women submitted to ovulation induction with standard FSH doses.

Interventions: none

Main outcome measures: Allelic and genotype frequencies of Ser680 and Thr307 polymorphisms and association of these genotypes with FORT levels

Results: Carriers of the Ser680 allele have higher basal FSH levels. However, no difference was found in FORT levels. No difference was found in other IVF outcomes either.

Conclusions: Our findings demonstrate, for the first time, that antral follicle responsiveness to FSH, as far as it is measurable by FORT, is not influenced by the FSHR genotype. This paper also provides evidence that FSHR polymorphisms do not modify IVF outcomes in a highly selected population.

Key Words: FSHR polymorphisms, ovarian reserve, genetic polymorphisms, IVF outcomes

Introduction

Follicle Stimulating Hormone (FSH) and its receptor play a major role in human reproduction. FSH stimulates follicular growth, oocyte maturation and estradiol production by granulosa cells (1) and this molecule is widely used in assisted reproductive cycles for ovulation induction. The perfect interaction between FSH and its receptor is essential for the occurrence of normal folliculogenesis (2). FSH receptor (FSHR) is a G-protein-coupled receptor with an N-terminal extracellular domain, seven transmembrane domains and an intracellular C-terminal tail (3).

Due to the substantial importance of FSH action in gametogenesis, attention has been paid for changes that could impair FSH function, especially genetic alterations that could interfere in its interaction with the receptor (4;5). During the screening process of such mutations, two single nucleotide polymorphisms (SNP) have been identified: one in the extracellular domain in position 307, occupied either by Alanine (Ala) or Threonine (Thr); and a second located in position 680, occupied by Asparagine (Asn) or Serine (Ser) (6).

Perez-Mayorca et al. and Sudo et al. have identified in different populations that carriers of the Serine allele in position 680 have a higher basal FSH levels and need a higher gonadotrophin dose for ovulation induction (7;8). In both papers the two polymorphisms studied were in complete linkage disequilibrium (7;8) which was not confirmed by another paper (9). In another paper, homozygous women for serine allele in position 680 undergoing controlled ovarian stimulation reached lower estradiol levels when compared to women with the wild type allele, however this effect was overcome by a higher dose of gonadotrophin (10).

The most suitable way of ascertain patients response to controlled ovarian stimulation is still under discussion. Some investigators have attempted to address this

issue by merely analyzing the number of follicles in the end of an stimulation cycle, number of oocytes retrieved or number of embryos obtained (11-14). Unfortunately, none of these parameters is a reliable reflection of antral follicle sensitivity to FSH and the true patient's potential of ovarian response because all of these parameters do not consider patients initial ovarian reserve.

In an effort to objectively evaluate antral follicle responsiveness to exogenous FSH, we assessed the ratio between the number of preovulatory follicles obtained in response to FSH and the preexisting pool of small antral follicles. This innovative index, called Follicular Output RaTe (FORT), benefits, by design, from being independent of the size of pretreatment cohort of small antral follicles (15). Therefore, the present paper aimed at investigating for the first time if FSHR genotypes in codons 307 and 680 influence the antral follicle responsiveness to FSH.

Materials and Methods

Subjects

We prospectively studied 143 women in evaluation process for IVF-ET (In vitro Fertilization-Embryo Transfer), in the *Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Hôpital Antoine Bécclère, Clamart, France*. All of them met the following inclusion criteria: 1) both ovaries present, deprived of morphological abnormalities (such as cysts, endometriomas, etc.), and adequately visualized in transvaginal ultrasound scans; 2) no current or past diseases affecting ovaries or gonadotropin or sex steroid secretion, clearance, or excretion; 3) no clinical signs of hyperandrogenism. Patients were in the evaluation process for infertility, so they were all submitted to hormonal measurements. Blood collection in the QIAcard (QIAcard FTA Four Spots®, QIAGEN, Hilden, Allemagne) was performed in the day of hormonal measurements. Protocol was approved by the review board of both institutions –

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil and Hôpital Antoine Bécélère, Clamart, France (IRB equivalent).

Hormonal Measurements

Serum progesterone, estradiol, LH, and FSH levels were determined by an automated multi-analysis system using a chemiluminescence technique (Advia-Centaur, Bayer Diagnostics, Puteaux, France). For progesterone, lower detection limit was 0.10 ng/mL, linearity up to 60 ng/mL, and intra- and interassay coefficients of variation (CV) were 8% and 9%, respectively. For estradiol, lower detection limit was 30 pg/mL, linearity up to 1,000 pg/mL, and intra- and interassay CV were 8% and 9%, respectively. For LH and FSH, lower detection limit was 0.1 mIU/mL and intra- and interassay CV were 3% and 5%, respectively. AMH levels were determined using a “second generation” enzyme-linked immunosorbent assay (reference A16507; Immunotech Beckman Coulter Laboratories, Villepinte, France). Intra- and interassay coefficients of variation were <6% and <10%, respectively, lower detection limit at 0.13 ng/mL, and linearity up to 21 ng/mL for AMH.

Ultrasound Scans

Ovarian ultrasound scans were performed in the 2nd to 4th cycle day using a 5.0-9.0 MHz multi-frequency transvaginal probe (Voluson 730 Expert, General Electric Medical Systems, Paris, France) before the start of gonadotropins to evaluate the number and sizes of ovarian antral follicles by the same experienced observer. We determined, at baseline, the number of all follicles which diameters ranged from 3-8 mm in both ovaries.

COH and IVF-ET Protocol

Within the 3 months preceding COH, serum FSH and estradiol levels were measured on cycle day 3 (basal levels). Between cycle days 1-3 of a subsequent menstrual cycle, they received a single-dose, time-release gonadotropin releasing-

hormone (GnRH) agonist, triptorelin (3 mg, IM, Decapeptyl®, Beaufour Ipsen Pharma, Paris, France). Three weeks later, complete pituitary desensitization was confirmed by the detection of low serum levels of progesterone, estradiol, and LH (baseline), presence of ovarian cysts was ruled out and endometrial thickness <5 mm was verified. Thereafter, recombinant FSH therapy (Gonal-F®, Serono Pharmaceuticals, Boulogne, France) was initiated, at a dosage of 300 IU/day for at least 5 days, and continued until the day of hCG (Gonadotrophine Chorionique "Endo"®, Organon Pharmaceuticals, Saint-Denis, France, 10,000 IU, IM) administration. From the 6th day of recombinant FSH therapy onwards, daily FSH doses were adjusted according to estradiol levels and/or the number of growing follicles. During the last days of COH, patients had frequent visits for ultrasonographic and hormonal examinations to define the proper timing for hCG administration. Administration of hCG (day of hCG administration; dhCG) was performed as soon as ≥ 4 preovulatory follicles (≥ 17 mm in diameter) were observed and estradiol levels per preovulatory follicle were >200 pg/mL. Oocytes were retrieved 35 hours after hCG administration by transvaginal ultrasound-guided aspiration and ETs were performed 2 days after oocyte retrieval. Luteal phase was supported with micronized progesterone, 600 mg/day, administered continuously by vaginal route, starting on the evening of ET. Clinical pregnancy was defined as an embryo with heartbeat.

FORT was calculated by the ratio between preovulatory follicle (≥ 17 mm in diameter) count on dhCG $\times 100$ /small antral follicle (3-8 mm in diameter) count at baseline as describes elsewhere (15).

FSHR Polymorphisms

DNA Isolation and Detection of the Polymorphisms T307A and N680S

Genomic DNA was extracted from the QIAcards® according to the manufacturer's instructions. Methods are described below according to STREGA rules (16).

The general conditions, described by Sudo et al., used for both polymorphisms were: 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 1X KCl buffer, 1U Taq DNA Polymerase, 20 pmols of each primer and 100 ng of DNA, in a final volume of 50 µL (24). All reagents were purchased from Invitrogen (Invitrogen, USA). All the polymerase chain reaction (PCR) reactions were performed in an Eppendorf Personal Cyclor Thermocycler (Eppendorf, Germany).

RFLP analysis of the T307A variant

The T307A variant, in exon 10 of the FSH receptor gene, was detected by the nested PCR–RFLP (PCR–restriction fragment length polymorphism) method. First, a 657 bp fragment of the FSH receptor gene was amplified by PCR, using a set of primers (5_-TCTGAGCTTCATCCAATTTGCA-3_ and 5_-GGGAAAGAGGGCA GCTGCAA-3_) at 58°C. This PCR product (1 µL) was further amplified by a second PCR, using another set of primers (5_-CAAATCTATTTTAAGGCAAGAAGTTGATTATATGCCTCAG-3_ and 5_-GTAGATTCCAATGCAGAGATCA-3_), also at 58°C. The amplified fragment of 364 bp was digested with *Bsu36I* (New England Biolabs, USA) restriction enzyme. A mismatch nucleotide was introduced in the second PCR. This mismatch and the A to G transition create a *Bsu36I* restriction site, so that the second PCR fragment following *Bsu36I* digestion and 2.5% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide reveals three different patterns. Based on this RFLP analysis, patients were classified into three groups: *TT* (307Thr/Thr), *TA* (307Thr/Ala) and *AA* (307Ala/Ala) (Figure 1).

RFLP analysis of the N680S variant

The FSH receptor gene was amplified by PCR using genomic DNA as the template and a set of primers (5_-TTTGTGGTCATCTGTGGCTGC-3_ and 5_-CAAAGGCAAGGACTGAATTATCATT-3_), which amplified a DNA fragment of 520 bp at an annealing temperature of 60°C. Since the A to G transition creates an endonuclease *BsrI* recognition site, the PCR fragment following *BsrI* digestion and 2.5% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide reveals three different patterns. Based on this RFLP analysis, patients were classified into three groups, *NN* (680Asn/Asn), *NS* (680Asn/Ser) and *SS* (680Ser/Ser).

Statistics

The statistical analysis was carried out using the SPSS 12.0 software. The measure of central tendency used was the mean and the measure of variability was the standard deviation (SD). Medians and minimum-maximum values were used when normality of data distribution could not be ascertained. Categorical variables in the 2 groups were compared using the 2-sided Pearson χ^2 test. Continuous variables were compared using the student t test. We considered $P < 5\%$ to be significant. Sample size was calculated based on previous study (17) aiming $P\beta = 0.8$ and $P\alpha = 0.05$ (110 patients). Genotype distribution was tested for Hardy–Weinberg equilibrium, and the difference in genotype frequencies between the samples was tested using a Chi square-test for independence (16).

Results

Overall population and COH characteristics

At the time of inclusion, women were aged 34.8 ± 3.8 years and presented BMI values at 22.0 ± 3.9 kg/m². At baseline, they had 16.5 ± 6.2 antral follicles and serum AMH, FSH and estradiol levels at 3.1 ± 1.6 ng/mL, 6.4 ± 1.8 mIU/mL and 38.6 ± 22.1 pg/mL, respectively. Baseline data of population characteristics and indications for

IVF-ET are shown on table 1. On dhCG, the total number of preovulatory follicles obtained was 6.6 ± 2.9 and serum progesterone, estradiol, and LH levels were 0.85 ± 0.48 ng/mL, $2,211 \pm 1001$ pg/mL, and 1.5 ± 1.0 mIU/mL, respectively. Controlled ovarian stimulation lasted 12.1 ± 0.1 days and required a total dose of $2,730 \pm 621$ IU of recombinant FSH. Overall, follicular output rate was $41.1 \pm 20.8\%$ (range, 5.0 - 91.6).

Frequency of the allelic variants of the FSH receptor gene

FSH genotype analysis was possible in 128 patients for the FSH 680 polymorphism and 124 patients for the FSH 307 polymorphism (16) Figure 1 represents genotype distribution of both polymorphisms. Both allelic distributions were in the Hardy-Weinberg Equilibrium (16) Thr307/Asn680 and Ala307/Ser680 were not in linkage disequilibrium in our sample since 8 patients were Ala307/Asn680. Homozygous and heterozygous carriers for the polymorphisms were combined for statistical reasons, as done in previous papers (7;8).

Analysis of Asn680Ser and Thr307Ala genotypes and IVF outcomes

Patient characteristics and COH data in the all genotype groups are summarized in Table 2. Age, BMIs, serum AMH levels and antral follicle count were comparable in all groups. Further, indications for IVF-ET were also not different between groups (data not shown). We observed a significant increase in baseline FSH levels for carriers of the Ser allele for the FSH 680 polymorphism, paralleled by a non-significant difference for the Ala carriers in the FSH 307 polymorphism. Concerning IVF-ET cycle data no differences were found in any of the parameters studied.

As shown in table 2 analysis of FORT was no different between groups when analyzed with the student t test. To make the interpretation of the possible relationship between FSHR genotype and follicle responsiveness to COH easier, we decided to sort our population into 2 distinct groups. The 2 groups were chosen

according to FORT levels were under the 50th percentile (Low FORT) or above it (High FORT). We have analyzed the genotype distribution in codon 307 and 680 inside these groups. The distribution was not statistically different (data not shown).

Discussion

The present investigation tested the hypothesis that FSHR genotype may influence the antral follicle responsiveness to exogenous FSH in adult women. In this model, we elected to administer similar high recombinant FSH doses to pituitary-desensitized patients. To quantify follicle responsiveness to FSH, instead of using the number of follicles undergoing preovulatory maturation or the number of oocytes retrieved, we used the FORT, an innovative measure that has the advantage of being independent from the pre-treatment mass of FSH-sensitive follicles. The present results showed, for the first time, that, FSHR genotype does not influence FORT.

Polymorphisms are little genetic changes that are responsible for individual variations and, recently, new insights have been gained in the investigation of the variability in the gene that encodes hormones and receptors of human reproduction (18;19). Our main hypothesis was that a part of patients' particular response to gonadotropins could be attributable to Ser680 or Thr307 FSHR polymorphism. Several factors influence patients response towards ovulation induction (20), thus to investigate our hypothesis we followed STREGA rules (16) and chose to select an uniform group of good prognostic patients that were submitted to IVF treatment with the same protocol (long agonist protocol) and with an initial high standardized dose of gonadotropin. This choice was made to make the ovulation induction protocol as equal as possible and assure the recruitment of as many follicles as possible. Our choice allowed us to isolate the polymorphism factor; however it can be seen as a limitation of our study since it precludes us from extrapolating our results to different populations.

Although we have found a subtle elevation of basal FSH levels in patients carrying the Ser680 allele, like other authors, we found absolutely no difference in others outcomes like number of mature preovulatory follicles, number of oocytes retrieved, number of embryos (7) or, finally, FORT values. We chose FORT as a primary outcome because we believe this measure is a demonstration of the real individual potential of one's response since it is independent from the basal number of pre antral follicles and it has been shown to predict IVF-ET outcome (21). Moreover, FORT levels can be taken as a mensuration of follicle responsiveness to gonadotropins (15;21).

Sudo et al in a retrospective analysis of 58 Japanese patients found that carriers of the Ser680 allele required a higher dose of gonadotropins for ovulation induction and they had lower estradiol levels in the HCG day (8). In this paper the ovulation induction protocol is not described, however, when compared to our results the total amount of gonadotropins utilized was lower in all groups. De Castro et al categorized 102 Caucasian women according to the number of matured follicles achieved in the end of an IVF cycle in poor responders (≤ 3) and normal responders (>3) (22). A higher number of homozygous women for the Serine allele were found in the poor responder group. A very well designed paper randomized Ser/Ser women into two different doses and showed that these patients had lower estradiol levels in HCG day but this effect was overcome by a higher gonadotropins administration (10). The differences between our results and previous papers may be attributable to our highly selected patients submitted to ovulation induction with a high dose of gonadotropins.

In addition, complete linkage between these two polymorphisms has been reported, suggesting that only one needs to be tested (as a TAG SNP). However, homogeneity of the studied populations have raised questions about the complete relationship of these polymorphisms (7;8;22). Our group has already demonstrated in a group of Brazilian fertile women that the complete association of these two alleles is

not present in the totality of patients (9). The present data, a research in a French infertile population, is another contribution for the fact that the complete association of these alleles should be seen with care. Furthermore, both of the studied alleles are in the Hardy-Weinberg equilibrium (16).

In conclusion, the present findings indicate, unprecedentedly, that antral follicle responsiveness to FSH, as far as it is measurable by FORT, and IVF outcomes represented by FORT, number of mature follicles, oocytes retrieved and embryos are not influenced by the FSHR genotype. This research should be replicated in different populations.

Reference List

1. Gougeon A. Some aspects of the dynamics of ovarian follicular growth in the human. *Acta Eur Fertil* 1989; 20(4):185-192.
2. Gromoll J, Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16(8):368-373.
3. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 1997; 18(6):739-773.
4. Aittomaki K, Lucena JL, Pakarinen P et al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995; 82(6):959-968.
5. Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. An activating mutation of the follicle-stimulating hormone receptor autonomously sustains spermatogenesis in a hypophysectomized man. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(4):1367-1370.

6. Simoni M, Gromoll J, Hoppner W et al. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(2):751-755.
7. Perez MM, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(9):3365-3369.
8. Sudo S, Kudo M, Wada S, Sato O, Hsueh AJ, Fujimoto S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(10):893-899.
9. Rodini GP, Genro VK, Matte U et al. There is no complete linkage between the polymorphisms N680S and T307A of the follicular stimulating hormone receptor gene in fertile women. *J Assist Reprod Genet* 2010.
10. Behre HM, Greb RR, Mempel A et al. Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: a pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15(7):451-456.
11. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006; 12(6):685-718.
12. Carrera-Rotllan J, Estrada-Garcia L, Sarquella-Ventura J. Prediction of pregnancy in IVF cycles on the fourth day of ovarian stimulation. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24(9):387-394.

13. Sharma V, Allgar V, Rajkhowa M. Factors influencing the cumulative conception rate and discontinuation of in vitro fertilization treatment for infertility. *Fertil Steril* 2002; 78(1):40-46.
14. Tinkanen H, Blauer M, Laippala P, Tuohimaa P, Kujansuu E. Prognostic factors in controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1999; 72(5):932-936.
15. Genro VK, Grynberg M, Scheffer JB, Roux I, Frydman R, Fanchin R. Serum anti-Mullerian hormone levels are negatively related to Follicular Output RaTe (FORT) in normo-cycling women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 2010.
16. Little J, Higgins JP, Ioannidis JP et al. Strengthening the reporting of genetic association studies (STREGA): an extension of the strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement. *J Clin Epidemiol* 2009; 62(6):597-608.
17. Kevenaar ME, Themmen AP, Laven JS et al. Anti-Mullerian hormone and anti-Mullerian hormone type II receptor polymorphisms are associated with follicular phase estradiol levels in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 2007; 22(6):1547-1554.
18. Greb RR, Grieshaber K, Gromoll J et al. A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(8):4866-4872.
19. Shastry BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 2002; 47(11):561-566.

20. van Loendersloot LL, van Wely M, Limpens J, Bossuyt PM, Repping S, van d, V. Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010; 16(6):577-589.
21. Gallot V, Bervanger da Silva A, Genro VK, Grynberg M, Frydman N, Fanchin R. Antral follicle responsiveness to follicle-stimulation hormone administration assessed by the follicular output rate predicts in vitro fertilization-embryo transfer outcome. *Fertil Steril*. In press.
22. de Castro F, Ruiz R, Montoro L et al. Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 2003; 80(3):571-576.

Legends

Figure 1: Genotype Frequencies for FSH receptor polymorphisms.

TABLE 1. Overall Patient characteristics

	Mean (SD)
Ages (years)	34.8 ± 3.8
BMI (kg/m ²)	22.0 ± 3.9
Indications for IVF-ET:	
Male (%)	35.2
Tubal (%)	10.2
Idiopathic (%)	28.9
Endometriosis (%)	7.8
Other (%)	17.9
Small antral follicle (3-10 mm) count	16.5 ± 6.2
Baseline AMH levels (ng/mL) ^a	3.1 ± 1.6
Baseline FSH levels (mUI/L)	6.4 ± 1.8

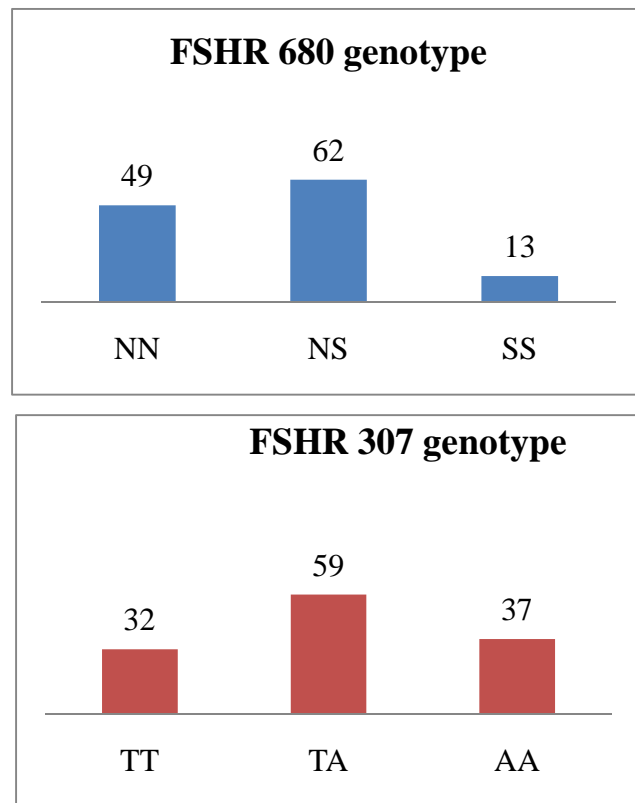
Table 2: Comparison between genotype groups

	680NN	680NS/SS	<i>P</i>	307TT	307TA/AA	<i>P</i>
N	49	75		32	96	
Ages (years)	35.0 ± 3.3	34.7 ± 3.9	0.669	35.3 ± 3.7	34.7 ± 3.9	0.548
BMI (kg/m ²)	21.5 ± 4.4	22.5 ± 5.3	0.593	21.1 ± 4.9	22.1 ± 5.1	0.343
Serum Day-3 FSH levels (UI/mL)	5.9 ± 1.8	6.7 ± 2.0	0.049	6.1 ± 1.8	6.8 ± 1.8	0.265
Serum Day-3 E ₂ levels (pg/mL)	35.5 ± 20.7	41.1 ± 22.8	0.188	39.3 ± 22.5	39.0 ± 21.4	0.959
Serum AMH levels (ng/mL)	3.0 ± 1.4	3.2 ± 1.8	0.539	2.9 ± 1.0	3.0 ± 1.6	0.857
AFC at baseline ^a	16.3 ± 6.2	15.8 ± 5.9	0.608	16.2 ± 5.5	16.4 ± 5.9	0.908
Total dose of Gonadotropin (IU)	2,695 ± 642	2,720 ± 611	0.841	2,822 ± 621	2,692 ± 591	0.319
Number of oocytes retrieved	11.5 ± 5.9	10.7 ± 5.3	0.526	12.4 ± 6.5	10.3 ± 4.9	0.091
Number of MII oocytes	10.4 ± 5.7	9.7 ± 4.7	0.595	10.5 ± 6.2	9.4 ± 4.3	0.287
Number of embryos	6.9 ± 4.5	6.4 ± 3.1	0.488	7.4 ± 4.9	6.0 ± 2.7	0.770
Number of top-morphology	1.8 ± 1.9	1.6 ± 1.7	0.586	1.9 ± 2.2	1.5 ± 1.4	0.309
Fertilization Rate (%)	64.2 ± 18.0	67.5 ± 20.2	0.419	64.7 ± 17.3	65.4 ± 19.5	0.877
FORT (%) ^b	41.8±22.8	41.0±20.2	0.858	45.3 ± 23.2	39.6 ± 19.6	0.206
Pregnancy Rate (%)	40.8	35.1	0.571	34.4	35.8	0.885

a) Antral follicle count : follicles measuring 3-10 mm

b) Follicular output rate defined as preovulatory follicle (≥ 17 mm) count x 100/small antral follicle (3-10 mm) count

FIGURE 1:



10. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Mulheres que carregam o alelo G para o polimorfismo do receptor do AMH tipo II apresentam uma redução no rendimento da estimulação ovariana com gonadotrofinas exógenas, já que produzem menos oócitos quando submetidas à indução da ovulação com doses semelhantes de gonadotrofina.

Mulheres portadoras do genótipo ser680 do gene do receptor do FSH, apesar de apresentarem uma sutil elevação do nível de FSH basal, não apresentam diferenças na taxa de maturação folicular ao final de um ciclo de indução da ovulação para FIV.

O polimorfismo do receptor do AMH (A>G – 482) não influencia na dose total necessária de gonadotrofina necessária para indução da ovulação em pacientes submetidas à Fertilização *InVitro*.

Os polimorfismos do receptor do FSH Ala307Thr e Ser680Asn não influenciam na dose total necessária de gonadotrofina necessária para indução da ovulação em pacientes submetidas à Fertilização *InVitro*.

O polimorfismo do receptor do AMH (A>G – 482) não altera a dosagem sérica do AMH em mulheres inférteis.

Os polimorfismos do receptor do FSH Ala307Thr e Ser680Asn não alteram a dosagem sérica do AMH em mulheres inférteis.

O polimorfismo do receptor do AMH (A>G – 482) não altera a dosagem sérica de FSH em mulheres inférteis.

O genótipo Ser680 está associado com uma elevação na dosagem sérica de FSH em mulheres inférteis.

O polimorfismo do receptor do AMH (A>G – 482) não altera a contagem de folículos

antrais em mulheres inférteis.

Os polimorfismos do receptor do FSH Ala307Thr e Ser680Asn não alteram a contagem de folículos antrais em mulheres inférteis.

11. PERSPECTIVAS

Nosso estudo precisa ser replicado em populações geneticamente distintas já que a frequência desses polimorfismos é extremamente variável de acordo com a etnia.

Seria interessante verificar se o uso de doses mais altas de gonadotrofinas ou o uso de um protocolo específico de indução da ovulação em mulheres portadoras do alelo G para o AMHII seria capaz de compensar o efeito negativo desse genótipo. Nossos achados permitem imaginar uma aplicação clínica da investigação desse polimorfismo, permitindo que a farmacogenética seja utilizada para determinar protocolos e doses de indução.

A investigação *in vitro* da sensibilidade folicular às gonadotrofinas em pacientes com diferentes genótipos para o receptor do FSH seria fundamental para comprovação laboratorial do achado clínico que obtivemos com nosso estudo.

O cultivo de células da granulosa com expressão gênica de fatores que possam estar relacionados com o desenvolvimento oocitário como o GDF-9 e BMP-15 em pacientes com diferentes genótipos relacionados aos polimorfismos pode também contribuir para esclarecer diferenças fenotípicas relacionadas à resposta à indução da ovulação.

9. Anexos

Figura 1: Taxa de Maturação Folicular ou “*Follicular Output Rate*”

$$\frac{\text{Número de Folículos Pré Ovulatórios}}{\text{Número de Folículos Antrais}} \times 100$$

Figura 2: Gel de agarose com eletroforese 680

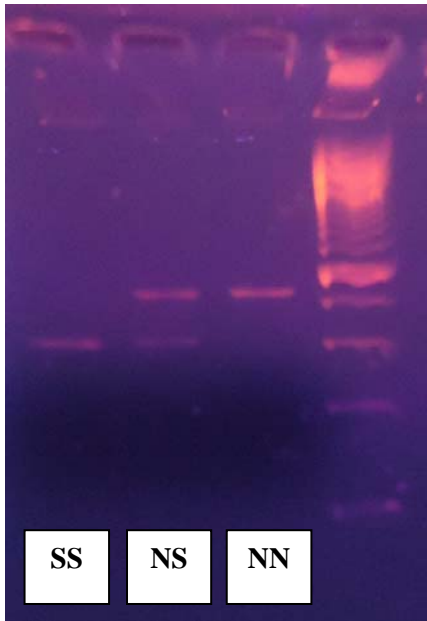


Figura 3: Gel de agarose com eletroforese 307

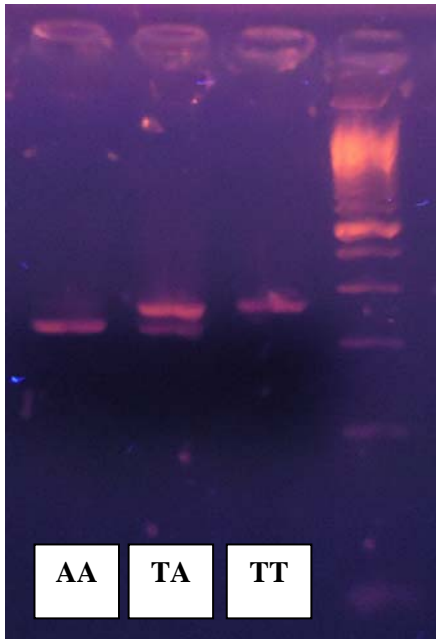


Figura 4: Curvas Taqman para o polimorfismo do receptor do AMH tipo II

