

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
Programa de pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ESTUDO DOS GENES REGULADORES DO DESENVOLVIMENTO  
OOCITÁRIO E CRESCIMENTO FOLICULAR (LH, AMH, BMP15, GDF9 e  
RECEPTORES DO FSH, LH E AMH) EM MULHERES SUBMETIDAS À  
FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

Arivaldo José Conceição Meireles

Belém, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
Programa de pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ESTUDO DOS GENES REGULADORES DO DESENVOLVIMENTO  
OOCITÁRIO E CRESCIMENTO FOLICULAR (LH, AMH, BMP15, GDF9 e  
RECEPTORES DO FSH, LH E AMH) EM MULHERES SUBMETIDAS À  
FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

Arivaldo José Conceição Meireles

Orientador:

Prof.Dr. João Sabino Lahorgue da Cunha- Filho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como  
requisito para obtenção do título de Doutor.

Belém, 2014

À minha **família**, meu porto seguro, onde não somente posso ancorar, mas sempre contar com uma receptividade recheada de amor, representada por meus pais **Lúcio** e **Maria Arcângela**, meus irmãos **Ivaldo**, **Dacivaldo** e **Francivaldo**, minhas irmãs **Telma** e **Lúcia**, meus amados **sobrinhos**, e ao meu companheiro **Paulo**, por todo o incentivo, a compreensão, a valorização e o auxílio constantes, sobretudo nos árduos momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

A todos que sonharam, planejaram e foram, a cada dia, fundamentais na conclusão desta tese.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS** e à **Universidade Federal do Pará – UFPA**, pela possibilidade de realizar o Doutorado Institucional, oportunidade única.

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas – PPGCM**, aos funcionários, aos queridos professores que atravessaram o País e dedicaram alguns dias preciosos e fundamentais para tornar-nos capazes.

Ao **Professor Wolnei Caumo**, por ter sido incansável em lutar, a cada momento, pela viabilização do DINTER, por sua forma especial em despertar o interesse pela pesquisa, pela infinita dedicação e compreensão, pelo incentivo e apoio, mas, sobretudo, por acreditar em nossa capacidade de poder avançar. Obrigado, Mestre.

Aos **colegas do DINTER, Maria Francisca, Alessandra, Sônia, Nazaré, Angely, Paulo, Sônia, Edna, Carmen Andrea, Nádia, Rose e Jorge**, por compartilharem todos os momentos, os quais, inesquecíveis, foram fundamentais no fortalecimento de nossa amizade.

Ao **Professor João Sabino Lahorgue Cunha-Filho**, por me ter acolhido como aluno, pela forma responsável como me orientou em todos os passos desta jornada. Seu exemplo sempre será uma fonte de incentivo na busca de novas conquistas.

Aos **colegas do grupo de pesquisa** coordenado pelo Professor João Sabino Lahorgue Cunha-Filho, pela ajuda sempre disponível.

Um agradecimento especial a **Emily de Conto**, por seu auxílio e atenção e pelas horas dedicadas no laboratório de Biologia Molecular. Obrigado por tudo, e especialmente por sua forma carinhosa de ajudar.

Ao amigo **João Paolo Bilibio**, um agradecimento mais do que especial por seu empenho, auxílio e atenção incansáveis em todos os momentos, por sua humilde forma de ensinar, mas, sobretudo, por sua amizade.

A todas **as pacientes** e aos **colaboradores** do **Centro de Medicina Reprodutiva – PRONATUS**, pelo auxílio em viabilizar esta pesquisa.

Aos meus **familiares** e **amigos** pela compreensão, pelo carinho e incentivo fundamentais a cada dia dedicados a esta tese.

## RESUMO

**Introdução:** Considerando a prevalência, a importância social dos tratamentos de alta complexidade de mulheres inférteis e o contexto atual da literatura que atribui relevância aos polimorfismos dos genes reguladores do desenvolvimento inicial e crescimento folicular, entre eles o FSHR, LH, LHR, AMH, AMHR, BMP15 e GDF9; torna-se imprescindível o melhor conhecimento e a quantificação desses fatores. Com isso poderemos individualizar e abordar de forma mais racional a investigação e o tratamento destas mulheres submetidas à fertilização *in vitro* (FIV).

**Objetivos:** Avaliar se os polimorfismos dos genes do LH (Trp8Arg e Ile15Thr), AMH (Ile49Ser), BMP15 (673C/T, 9C/G, IVSI+905A/G), GDF9 (546G>A, 398C>G, 447C>T e 646G>A), e dos receptores do FSH (Ser680Asn), do LH (18isnILQ) e do AMH (Ile49Ser), estão relacionados a diferentes desfechos reprodutivos em pacientes submetidas à fertilização *in vitro*.

**Métodos:** Realizamos dois estudos em mulheres submetidas à indução ovulatória para FIV: (1) um estudo caso-controle entre pacientes normo respondedoras e má respondedoras, (2) um estudo transversal em pacientes jovens submetidas à indução ovulatória para fertilização *in vitro* (FIV). Foi extraído DNA das pacientes submetidas à indução ovulatória para FIV a partir do sangue periférico para realização de *polymerase chain reaction*, com o objetivo de detectar os polimorfismos dos referidos genes e as respectivas relações com os resultados obtidos na estimulação ovariana, no Laboratório de Terapia Gênica do HCPA/UFRGS

**Resultados:** Foi evidenciado que a presença do polimorfismo 398C>G no gene GDF9 está associada à má resposta em pacientes inférteis submetidas à estimulação ovariana para fertilização *in vitro* (68% em má respondedoras *versus* 23% normo respondedoras, OR: 4.01, 95% IC:1.52-10.60). Além disso, o genótipo mutante para o polimorfismo

G447C>T no gene do GDF9 foi encontrado em 50% nas pacientes má respondedoras versus 19% nas pacientes normo respondedoras (OR: 2.88, 95% IC:1.19-6.04), evidenciando uma forte associação destes polimorfismos com a má resposta ovariana à estimulação.

Encontramos, também, que as mulheres portadoras do alelo mutante do gene 447C>T do GDF9 tiveram um número menor de folículos entre 12-14 mm no dia do hCG (1,62 versus 2,46,  $P = 0,007$ ). As mulheres com o alelo mutante do gene do GDF9 398C>G tiveram um menor número de folículos maiores que 17 mm no dia do hCG (4,33 versus 6,49,  $P = 0,001$ ), menor número de folículos entre 12 e 14 milímetros no dia do hCG (1,42 versus 2,25,  $P = 0,017$ ), um menor número de folículos no dia do hCG (7,33 versus 10,11 versus,  $P = 0,007$ ), e redução total de oócitos MII coletados (5,38 versus 8,84  $P = 0,017$ ).

**Conclusão:** Concluimos que polimorfismos no gene do GDF9 têm uma influência significativa no desenvolvimento do oócito, uma vez que a presença dos alelos mutantes 447C>T e 398C>G diminui o número total de folículos maduros e o número total de oócitos coletados de tais pacientes, além deste último estar associado à má resposta ovariana em pacientes submetidas à indução da ovulação para fertilização *in vitro*. Isso mostra que este membro da família TGF $\beta$  além de atuar nas fases iniciais da foliculogênese também tem influência importante sobre a fase final do desenvolvimento do oócito.

**Palavras chave:** má responderdora, polimorfismos, reserva ovariana, fertilização *in vitro*, LH, AMH, BMP15, GDF9, FSHR, LHR, AMHR, oócito e aspiração folicular.

## ABSTRACT

**Introduction:** Given the prevalence, the social importance of high complexity treatments of infertile women and the current context of the literature assigns relevance to polymorphisms of genes regulating early follicle growth and development, including LH, AMH, BMP15, GDF9, FSHR, LHR and AMHR; become essential to better understanding and quantification of these factors. With this we can individualize and address more rationally research and treatment of these women undergoing IVF.

**Objectives:** Evaluate the relationship of polymorphisms of LH (Trp8Arg and Ile15Thr), AMH (Ile49Ser), BMP15 ( 673C/T, 9C/ G, IVSI+905A/ G) and GDF9 (546G>A, 398C>G, 447C>T and 646G>A) genes, and FSH (Ser680Asn), LH (18isnILQ) and AMH (Ile49Ser) receptors genes, related to different reproductive outcomes in patients undergoing IVF.

**Methods:** Our study consisted of two phases: the first conducted a case-control study among patients with normal responders and poor responders, and the second a cross-sectional study in young patients undergoing ovulation induction for in vitro fertilization. DNA was extracted from peripheral blood for performing polymerase chain reaction (PCR) and analyzed at the Laboratory of Gene Therapy HCPA/UFRGS, with the objective of detecting polymorphisms of these genes and their relationships to the results obtained in ovarian stimulation.

**Results:** It was shown that the presence of polymorphism 398C>G in GDF9 gene is associated with poor response in infertile patients undergoing controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization (68% in poor responders versus 23% in normal responders). Furthermore, the genotype GDF9 447C>T mutant polymorphism was found in 50% and 19%, respectively, in poor and normal responders patients, showing a strong association with this polymorphism and a poor response in ovarian stimulation.

Women carrying the GDF9 398C>G mutant allele had a smaller number of follicles between 12-14 mm on the day of r-hCG (1.62 vs. 2.46, respectively  $P=0.007$ ). Women with GDF9 398C>G mutant allele had a smaller number of follicles larger than 17 mm on the r-hCG day (4.33 vs. 6.49,  $P=0.001$ ), a smaller number of follicles between 12 and 14mm on the r-hCG day (1.42 vs. 2.25,  $P=0.017$ ), a smaller number of follicles on the r-hCG day (7.33 vs. 10.11,  $P=0.007$ ), and a reduced overall number of MII oocytes collected (5.38 vs. 8.84 , $P=0.017$ ).

**Conclusion:** We conclude that GDF9 polymorphisms in the gene have a significant influence on the development of the oocytes, since the presence of the mutant alleles 447C>T and 398C>G decreases the total number of mature follicles, total number of oocytes collected, and are associated a poor ovarian response in patients undergoing ovulation induction for in vitro fertilization. This shows that this member of the TGF $\beta$  family besides acting in the early stages of folliculogenesis also has important influence on the final stage of oocytes development.

**Key words:** poor response, polymorphisms, ovarian reserve, *in vitro* fertilization , LH, AMH, BMP15, GDF9, FSHR, LHR, AMHR gene polymorphisms, oocyte, oocyte retrieval

## LISTA DE ABREVIATURAS

A - adenina

Arg- Arginina

ALK6-*Bone morph genetic protein*R1B

ANOVA – Analysis of variance

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

AMH –*Antimullerianhormone*

ASRM - *American Society for Reproductive Medicine*

BMP15- *Bone morph genetic protein*15

C- Citosina

DNA- *Deoxyribonucleicacid*

EDT - Endometriose

ELISA - *Enzyme-linkedimmunosorbentassay*

FIV - Fertilização *in vitro*

FSH – *Follicle stimulating hormone*

FSHR - *Follicle-stimulating hormone receptor*

G - Guanina

GnRH - Hormônio liberador das gonadotrofinas

HCG- *Human chorionic Gonadotropin*

HOC - Hiperestimulação ovariana controlada

His – Histidina 11

IC – Intervalo de confiança

IUI - Inseminação intra-uterina

IL- Interleucina

Ile- Isoleucina

IMC - Índice de massa corporal

IVF- *In vitro fertilization*

LH- *Luteinizing hormone*

LHR- *Luteinizing hormone receptor*

M2 – *Mature oocyte*

PCR –*Polymerase chain reaction*

POF- *Precocious ovarian failure*

PR- *Poor response*

SAAF - Síndrome anticorpo antifosfolipídio

SNP - *Single-nucleotide polymorphism*

T- Timina

Tr- Tirosina

Thr- Treonina

TGF- $\beta$  – *Transform growth factor- $\beta$*

VEGF- *Vascular endothelial growth factor*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
2.1. Avaliação da reserva ovariana	15
2.2 Biomarcadores genéticos	18
2.3 Polimorfismos do receptor do FSH:	19
2.4 Polimorfismo do AMH e seu receptor	20
2.5 Polimorfismo do LH e seu receptor	23
2.6 Polimorfismos da Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP 15)	26
2.7 Fator de Crescimento e Desenvolvimento – 9 (GDF9)	27
2.8 Polimorfismos e FIV	29
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	<b>30</b>
<b>4. JUSTIFICATIVA</b>	<b>32</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>6. HIPÓTESE NULA</b>	<b>35</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO</b>	<b>36</b>
<b>8. ARTIGO 1: Association of LH,AMH,BMP15,GDF9,FSHR, LHR, and AMHR genetic polymorphisms with poor responses in patients undergoing in vitro fertilization</b>	<b>42</b>
<b>9. ARTIGO 2: Influence of GDF9 polymorphisms in follicular dynamics in patients undergoing in vitro fertilization</b>	<b>65</b>
<b>10. CONSIDERAÇÕES FINAIS (CONCLUSÕES)</b>	<b>87</b>
<b>11. PERSPECTIVAS</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Infertilidade afeta 10 a 15% dos casais em idade reprodutiva, no momento em que vivemos um notável aumento na demanda por assistência médica especializada. Nas duas últimas décadas, três importantes mudanças contribuíram para esse fato: em primeiro lugar, houve a introdução das técnicas de reprodução assistida às quais deram aos casais, possibilidade de tratamentos efetivos. Seguindo-se do destaque dado pelos órgãos de comunicação às referidas técnicas, possibilitando ao público em geral o conhecimento de tais tratamentos e conseqüente, aumento nas consultas em infertilidade. Finalmente um aumento no número de mulheres inférteis com idade superior a 35 anos, reflexo da união conjugal em idade mais tardia e postergação da gravidez quer por escolha pessoal ou pela necessidade da realização profissional(1-2).

Os elevados índices de gravidez, possibilitados pela fertilização *in vitro* (FIV), e suas variantes técnicas credenciaram esta terapêutica como alternativa de escolha para a infertilidade em suas diferentes causas(1-2). Apesar da realização da FIV em ciclos naturais e minimamente induzidos, a hiperestimulação ovariana controlada realizada com gonadotrofinas, hormônios agonista e antagonista do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), tem sido a técnica de indução ovulatória universalmente utilizada nos serviços de medicina reprodutiva.

A hiperestimulação ovariana controlada é um passo crucial para o sucesso da FIV e objetiva, de forma segura, a obtenção de um bom número de oócitos maduros. Esses oócitos, depois de fertilizados, evoluirão até a fase de embrião, possibilitando, portanto a transferência ao útero para a implantação ou a criopreservação para futuros ciclos de tratamento. Sendo que os resultados da FIV estão sob forte influência de fatores qualitativos e quantitativos na produção de oócitos maduros(1-2).

Existe uma substancial variabilidade na resposta ovariana durante a utilização das gonadotrofinas em mulheres submetidas à estimulação ovariana para FIV, a qual pode oscilar desde uma resposta pobre, resultando em cancelamento do ciclo, a uma resposta excessiva caracterizando a síndrome da hiperestimulação ovariana. A identificação de fatores preditivos relacionados à resposta ovariana é de grande importância na busca da individualização do tratamento, que traz como consequência uma maior eficácia e segurança no uso dos protocolos de indução ovulatória (3).

Fatores clínicos epidemiológicos como, idade, causa da infertilidade, história de tabagismo, patologias do tecido ovariano (endometriose, por exemplo), são pouco colaborativos na busca pela individualização do tratamento suscitando, portanto a busca de fatores prognósticos de maior sensibilidade (2, 4-7).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Avaliação da reserva ovariana

Não há consenso a respeito do parâmetro ideal para a quantificação da resposta ovariana. Valor absoluto do número de folículos com diâmetro  $\geq 17$  mm, número e grau de maturação dos oócitos recuperados, número e qualidade oocitária e embrionária são fatores relevantes, mas não leva em consideração a reserva ovariana inicial da paciente, portanto não são capazes de medir corretamente a eficácia da prescrição utilizada no tratamento (7).

Vários testes foram desenvolvidos para a avaliação da reserva ovariana e sua resposta ao uso das gonadotrofinas exógenas e a predição da chance de gravidez. A dosagem sérica do FSH, relação FSH/LH e Estradiol no 3º dia do ciclo, são marcadores indiretos da reserva ovariana, que uma vez normais nem sempre predizem corretamente pacientes com maior chance de gravidez (8). Níveis séricos de inibina B demonstraram melhor correlação que o FSH em prever cancelamento de ciclos e número de oócitos recuperados em estudos que compararam os dois testes (9-10), entretanto esses dados foram contestados por outros autores (11).

A ultrasonografia como preditora da reserva ovariana, foi largamente estudada. A contagem de folículos antrais e o volume ovariano parecem correlacionar-se com a resposta à indução ovulatória nos procedimentos em reprodução assistida (12). O número de folículos antrais foi descrito como melhor marcador em prever má resposta ovariana em pacientes submetidas à FIV, se comparado aos níveis de FSH, estradiol e inibina B(13).

O hormônio anti-mülleriano (AMH), em mulheres adultas é produzido pelos folículos antrais e pré-antrais e está envolvido na regulação da esteroidogênese em uma fase independente da ação do FSH. Isso o caracteriza como método interessante para a avaliação da reserva ovariana, sendo capaz de prever a resposta ovariana à estimulação, número de folículos maduros, oócitos recuperados e até mesmo a chance de cancelamento do ciclo por resposta insuficiente ou chance de hiperestímulo (14-19). Outros estudos demonstraram que a dosagem do AMH é mais precisa em avaliar a reserva ovariana que outros marcadores clássicos como o FSH e inibina B(14) e está intimamente correlacionada com a contagem de folículos antrais(17-18), com a vantagem de não variar significativamente durante o ciclo menstrual.

Foi demonstrado que a contagem de folículos antrais, o volume ovariano e os níveis séricos de inibina B correlacionam-se com o número de folículos estimulados e oócitos recuperados. Entretanto, apenas a dosagem sérica do AMH está correlacionada significativamente quando o desfecho avaliado é gestação (18).

Um estudo prospectivo envolvendo 316 pacientes usuárias de agonista do GnRH, no protocolo de estimulação ovariana em que o valor de corte do AMH  $\leq 1,26$  ng/ml foi usado para prever a resposta ovariana à indução ovulatória, demonstrou ter uma sensibilidade de 97% na predição de pobre respondedora (< 4 oócitos recuperados) e 98% de acurácia em prever uma resposta normal à hiperestimulação ovariana controlada. Estes achados indicam que os níveis sanguíneos do AMH podem ser um bom indicador da reserva ovariana, tendo uma elevada correlação com a resposta ovariana à indução ovulatória nos ciclos de FIV (20).

Um fator limitante ao uso do AMH como biomarcador é a variabilidade vista entre os kits comercializados e a variação nos resultados relatados por diferentes laboratórios (20). Esta variabilidade pode ser uma das razões para a ausência de

consenso nos valores de corte do AMH quando na decisão de realizar ou não um ciclo de FIV.

Apesar de todos os avanços no tratamento da paciente, ainda existe a necessidade de individualizar e otimizar protocolos de estimulação, reduzir a possibilidade de uma resposta inadequada, e assim aumentar a probabilidade de um nascimento. Uma estratégia complementar tem sido o estudo da farmacogenética dos fatores envolvidos na resposta ovariana à hiperestimulação.

Vários estudos em farmacogenética identificaram *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) que estão relacionados à resposta ovariana. A maioria deles afeta os níveis de mRNA ou a seqüência protéica e desta forma promovem variações protéicas quantitativas e funcionais as quais estão associadas pela variabilidade inter-individual na resposta ovariana às drogas indutoras da ovulação. Vários polimorfismos foram associados à alteração da reserva ovariana, dentre eles polimorfismos do receptor do FSH, que afeta os níveis basais de FSH e aumenta a necessidade de gonadotrofina durante a hiperestimulação ovariana controlada (HOC) (21-22). Além disso, polimorfismos do receptor do estradiol demonstrou correlacionar-se com um pequeno número de oócitos captados ao término da indução ovulatória(23). Polimorfismos do AMH foram associados com variações nos níveis de estradiol e na modulação da sensibilidade ao FSH (24)(25). Polimorfismos do FSHR demonstraram estar associados a uma baixa resposta ao FSH durante a HOC (23). Nos últimos anos, considerável atenção tem sido dada à superfamília dos fatores de transformação do crescimento, beta (TGF- $\beta$ ) e seu papel de destaque como reguladores locais da função ovariana e conseqüentemente da fertilidade. Em parte, este interesse cresceu a partir da publicação de vários estudos mostrando que polimorfismos nos dos genes do fator de transformação do crescimento – 9 (GDF9) e/ou da proteína morfogenética óssea – 15

(BMP15) têm importante participação na determinação de padrões da resposta ovariana(3, 26-28).

Diante da necessidade de termos parâmetros melhores na avaliação da resposta ovariana ao estímulo e o papel dos polimorfismos genéticos nos receptores e hormônios que participam da evolução e crescimento oocitário, nosso principal objetivo é avaliar a relação entre a presença dos polimorfismos genéticos em todas as fases do crescimento folicular e desenvolvimento oocitário, incluindo o polimorfismo no gene do receptor do FSH (Ser680Asn), no gene do LH (Trp8Arg e Ile15Thr), no gene do receptor do LH (18insLQ), nos genes do AMH (Ile49Ser), receptor do AMH (482A>G), no gene da BMP15 (673C/T, 9C/G, IVSI+905A/G), e no gene do GDF9 (546G>A, 398C>G, 447C>T e 646G>A), em pacientes submetidas à fertilização *in vitro*.

## 2.2 Biomarcadores genéticos

Como vimos, as variações genéticas podem influenciar a resposta ovariana e estarem associadas à má resposta ovariana ao estímulo. A forma mais comum destas variações gênicas acontecem através da substituição de um único nucleotídeo por outro (*single nucleotide polymorphism* – SNP) que ocorre em uma frequência de um a cada 1000 pares da base (29). O sequenciamento do genoma humano e a busca de mutações em condições patológicas mostram que SNPs são frequentes e ocorrem em hormônios do eixo hipotálamo-hipófise, assim como em seus receptores. Em geral a frequência dos polimorfismos varia entre 15% a 50% da população. Isso significa que estas alterações genéticas não têm efeito deletério pronunciado sobre a função reprodutiva, de outra forma teria eliminado tais polimorfismos. Entretanto, os polimorfismos podem interferir na função através de pelo menos 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 *feedback* 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 (30). 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. Neste sentido, está bem difundido o estudo dos polimorfismos dos genes do FSH, do LH, AMH e seus respectivos receptores e mais recentemente tem sido estudado o papel dos polimorfismos de fatores de crescimento produzidos localmente e que têm papel determinante no desenvolvimento oocitário ainda na fase pré-antral, entre eles a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e o fator de desenvolvimento folicular 9 (GDF-9).

### 2.3 Polimorfismos do receptor do FSH:

O FSH e seu receptor desempenham papéis essenciais na regulação da proliferação e esteroidogênese folicular na estimulação ovariana(5, 7). O receptor do FSH é uma proteína transmembrana que consiste de domínios intra e extracelulares em células da granulosa (31-33). É sintetizado por um gene de cópia única e está localizado no cromossomo 2, e sua estrutura envolve 678 aminoácidos com sete domínios transmembrana (34-35). A interação do FSH e seu receptor são complexos e envolvem mudanças conformacionais no hormônio que ocupa o domínio extracelular do receptor (35). Existem mais de 900 SNPs no gene do receptor do FSH, mas apenas 5 estão localizados na região codificadora do gene (éxon), sendo que essas mutações ocorrem

no éxon 10, nos códons 307, 329, 524, 665 e 680. Os dois SNPs mais comuns do éxon 10 correspondem às posições dos aminoácidos 307 e 680 (36). Estes polimorfismos causam, respectivamente, a mudança da treonina pela alanina na posição 307 (Thr307Ala) e asparagina por serina na posição 680 (Asn680Ser) (14). A maioria dos estudos está relacionado à posição 680 a qual é localizada na região intracelular enquanto que o polimorfismo na posição 307 foi raramente estudado (15).

Foi demonstrado que mulheres homozigotas para Asn680 necessitam menor dose de FSH para atingir a maturidade folicular do que pacientes homozigotas para Ser680 ou heterozigotas, sugerindo uma sensibilidade maior ao FSH exógeno nas pacientes com genótipo Asn680 (37-38). Em um estudo caso controle, no grupo de pacientes com polimorfismo Ser680 em homozigose, foi encontrado maior número de pacientes com má resposta à indução da ovulação, e conseqüentemente seu ciclo cancelado, quando comparado ao grupo de pacientes selvagem para este alelo (21). Outros investigadores avaliaram 161 mulheres submetidas à indução ovulatória para FIV, nas quais o número de folículos pré-ovulatórios, número de oócitos recuperados e a concentração de estradiol alcançada não tiveram correlação com a presença deste polimorfismo. Entretanto, pacientes com polimorfismo Ser680, tinham níveis de FSH levemente mais altos que pacientes heterozigotas ou homozigotas selvagens (38). Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa, demonstrou que os dois polimorfismos do receptor do FSH estão fortemente associados, mas não completamente ligados ao contrário do que demonstrado em estudos anteriores (39).

#### *2.4 Polimorfismo do AMH e seu receptor*

O hormônio anti-mulleriano (AMH) é uma proteína dimérica, membro da superfamília dos fatores de transformação do crescimento  $\beta$ , envolvido no crescimento e

diferenciação folicular (40-41). Os níveis séricos de AMH são baixos, quase indetectáveis antes da puberdade (8). Após a puberdade atingem a concentração máxima e, em seguida tais concentrações séricas de AMH diminuem gradualmente como um sinal de esgotamento da reserva folicular ao longo da vida reprodutiva, chegando a níveis indetectáveis na menopausa (42). As células da granulosa de pequenos folículos antrais secretam AMH tanto no fluido folicular como na circulação (43).

O efeito do AMH na atividade ovariana parece ser complexo, cujo mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado (44). Acredita-se que o AMH participe na liberação dos folículos primordiais, coordenando o ritmo de reinício da meiose e retorno ao desenvolvimento oocitário (45). A circulação periférica exhibe níveis pouco ou não flutuantes na concentração de AMH ao longo do ciclo menstrual, uma vez que o AMH não é secretado pelo folículo dominante e pelo corpo lúteo. Este fato dá ao AMH uma vantagem sobre outros marcadores de reserva ovariana com a inibina B e o FSH. O AMH mostra menor variação intraindividual que a contagem de folículos antrais tanto no mesmo como entre os ciclos. Concordando com esta citação, foi relatado que a contagem de folículo varia minimamente ao longo do ciclo e, portanto, não há nenhuma vantagem evidente em realizar a contagem de folículos antrais em apenas um determinado momento do ciclo (46).

A concentração sérica do AMH como preditor da resposta ovariana à indução medicamentosa tem sido cada vez mais utilizada (47). Em geral uma baixa concentração sérica de AMH antes da indução ovulatória prediz uma baixa resposta ovariana (48)(49). Alguns autores referem que em mulheres o AMH é secretado pelas células da granulosa de folículos ovarianos antrais em desenvolvimento (50) e inibe o recrutamento dos folículos primordiais e a mitose nas células da camada granulosa e, por conseguinte pode ocasionar diminuição na sensibilidade ao FSH (45).

Os genes que codificam o AMH e o AMHR estão respectivamente localizados na posição 19p13.3 e 12q13(24). O AMH exerce seu efeito através do receptor AMHR2 (51). Em mulheres, este receptor está presente nas células da teca e granulosa (51) e em ratos o AMH inibe a atividade da aromatase e a expressão dos receptores de LH nas células da granulosa durante a estimulação ovariana (51). AMH também tem um papel co-regulador da esteroidogênese nas células da camada granulosa (52)(53). Portanto, o aumento na sinalização do complexo AMHR poderia levar a uma baixa resposta à indução ovulatória.

Foi relatado que a concentração do AMH tem o mesmo nível de acurácia e valor clínico que a contagem de folículos antrais, para a predição da má resposta, mas não de gravidez (47), entretanto o AMH é melhor que a dosagem do FSH basal na predição a má resposta à estimulação ovariana (47). Tem sido relatado que o AMH é um melhor preditor da resposta ovariana excessiva se comparado a outros fatores como idade, índice de massa corpórea, FSH basal e inibina B, de forma que a sua concentração pré-FIV foi proposta como parâmetro usado na adequação da dose da medicalização, independente da idade e do IMC (54-55). Valores de AMH  $\geq 3,5$  ng/ml tem sido utilizados na predição de hiper-resposta/síndrome da hiperestimulação ovariana e desta forma reduzindo o risco destes eventos, otimizando o tratamento e as taxas de gravidez (16, 56). O AMH é de fato o marcador mais precoce da diminuição da reserva ovariana e seus níveis séricos diminuem bem antes do aumento do FSH basal (57). Um nível sanguíneo de 1,05 ng/ml foi descrito como um bom preditor de chances de parto em mulheres com reserva ovariana diminuída, entretanto há ocorrência de partos mesmo quando os níveis de AMH estão indetectáveis (58).

Variações genéticas na função do AMH têm motivado vários estudos, entre eles a avaliação de SNPs no gene e no receptor do AMH em mulheres normogonadotrópicas,

onde foi evidenciado aumento dos níveis de estradiol durante todo o ciclo menstrual, o que pode representar uma avaliação indireta do aumento da sensibilidade folicular ao FSH. Também foi demonstrado a presença deste SNP em aproximadamente 19% das mulheres, motivo pelo qual se justificaria a verificação da presença deste polimorfismo neste grupo de mulheres como forma de completar a avaliação da reserva ovariana e poder juntamente com a avaliação do AMH termos um melhor fator preditivo da resposta ovariana à indução para FIV (24). Se este SNP inibitório não for detectado antes da realização, um número significativo de pacientes poderá ter um maior número de folículos recrutados em cada ciclo, maior do que o previsto pelas concentrações séricas do AMH, fato que pode associar-se ao aumento do risco de uma hiper-resposta. De outra forma se o SNP aumentar a bioatividade do AMH2, pacientes portadoras deste polimorfismo, poderão apresentar uma baixa resposta à estimulação ovariana, apesar das concentrações séricas normais do AMH. Foi demonstrado que mulheres portadoras de um polimorfismo específico do receptor do AMH (A>G – 482) iniciaram a menopausa 2,8 anos mais cedo, novamente sugerindo um papel sinalizador do AMH no pool de folículos primordiais (24).

Esses dados em conjunto mostram que os polimorfismos 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 resposta ovariana à indução da ovulação pode ajudar a selecionar fatores importantes a serem contabilizados na individualização do tratamento em reprodução assistida.

## *2.5 Polimorfismo do LH e seu receptor*

O LH é uma glicoproteína heterodimérica composta de duas subunidades, a  $\alpha$  e a  $\beta$ . A cadeia polipeptídica  $\beta$  (LH $\beta$ ) codifica a subunidade  $\beta$  do hormônio. O FSH e o LH

dividem a subunidade  $\alpha$ , enquanto que a subunidade  $\beta$  é hormônio específico e inclui o domínio de ligação do receptor. O LH estimula a produção de androgênios os quais são o substrato para a síntese do estrogênio. O LH colabora com o FSH na esteroidogênese e desenvolvimento folicular, maturação, ovulação e luteinização do folículo líder (59). O gene do LHB está localizado na região 11p13 e possui 3 éxons. Foram identificados 179 SNPs ([www.snpper.chip.org](http://www.snpper.chip.org)) e 3 polimorfismos na área de codificação do LH que são responsáveis pela diminuição na atividade do LH (60).

Uma variante genética comum de LH (v- $\beta$ LH) que ocorre devido a dois polimorfismos com trocas de base no gene da subunidade  $\beta$ , alterando a sequência de aminoácidos Trp8Arg e Ile15Thr foi descrita como uma forma imunológica anômala de LH (61-62). O v- $\beta$ LH elevou bioatividade *in vitro*, mas com uma meia vida significativamente mais curta (26 min), quando comparada com o tipo selvagem de LH (w-LH) (48 min) (60). A frequência de pulso v- $\beta$ LH é normal, isso resulta em uma ação funcional do LH, que é mais potente no local do receptor, mas com uma menor duração *in vivo*. O v- $\beta$ LH é comum em todo o mundo, com uma frequência variando entre 0% a 52% em vários grupos étnicos (63). Desde a descoberta desta variante, seu papel tem sido investigado, e foi associado a abortos recorrentes (62), irregularidades menstruais causando infertilidade (61) entre as portadoras de resistência ovariana ao FSH recombinante as quais requerem altas doses de FSH recombinante ao ter um pequeno número de oócitos recuperados (64). Esta variante do LH de curta duração parece ser menos efetiva, e com capacidade reduzida para sustentar múltiplos folículos em desenvolvimento durante a estimulação ovariana.

Pode-se deduzir que a presença da v- $\beta$ LH parece ser menos eficiente do que w-LH apesar de sua forte potência *invitro*. Com base nisso, serão necessários mais estudos com maior número de indivíduos e em diferentes populações para esclarecer se o

polimorfismo Tr8Arg-Ile5Thr poderá representar um marcador de estimulação ovariana ao destacar subgrupos de mulheres que poderão ser beneficiadas pela suplementação de LH exógeno. Fato este já sugerido por um estudo anterior que obteve melhora na resposta ovariana quando foi associado LH em pacientes que requeriam alta dose de FSH recombinante (65).

O LH exerce suas ações através da ligação ao seu receptor de superfície celular, o LHR (também conhecidos como LHCGR) pelo fato de o hCG ligar-se ao mesmo receptor. Os receptores do LH localizam-se nas células da teca, assim como na granulosa e sua presença deve-se à indução pelo FSH. Estes receptores são importantes na esteroidogênese ovariana, na luteinização e, por conseguinte na síntese de progesterona (25). O LHR é crítico para a manutenção funcional da teca, maturação dos folículos e no processo ovulatório. Um estudo encontrou um aumento na expressão do gene do LHR em má respondedoras cerca de duas vezes maior que nas pacientes com resposta ovariana normal. Este aumento pode ser explicado pela luteinização prematura com consequente aumento de LHR nas células foliculares, o que pode ocorrer com as pacientes má respondedoras dado o aumento do FSH na fase folicular. É também possível que o aumento na expressão do gene do LHR poderá ter sido um resultado das altas doses de FSH administrados durante a fase de indução ovulatória (66). O gene LHR está localizado na região 2p21, composta de 11 éxons e vários polimorfismos comuns foram identificados (mais de 520 SNPs de acordo com a base de dados [www.snpper.chip.org](http://www.snpper.chip.org)). Os polimorfismos 18insLeuGln, Asn291Ser e Ser31Asn no gene do LHR tem estado associado com aumento na atividade do receptor (67-68). Outros autores analisaram o polimorfismo 18insLeuGln na região codificadora do LHR em um grupo relativamente pequeno de pacientes com síndrome de hiperestimulação ovariana e não encontraram associação entre estas variantes e o desenvolvimento de

hiperestímulo durante a indução ovulatória para FIV (69). Em função do pequeno número de estudos sobre a relação dos polimorfismos do LHR em mulheres submetidas à FIV, julga-se necessário a realização de outras pesquisas que venham a desvencilhar o papel destes polimorfismos nas diferentes respostas à estimulação ovariana para FIV.

## *2.6 Polimorfismos da Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP15)*

A proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) é um membro da superfamília de fatores de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e considerada importante fator de crescimento intra-ovariano em mamíferos. É secretada pelo oócito e apresenta um significativo papel mitogênico sobre as células da granulosa, contribuindo positivamente para o desenvolvimento folicular durante as fases iniciais e finais da foliculogênese (70). Um estudo recente em folículos primordiais humanos encontrou a BMP15 em oócitos e seu RNAm nas células da camada granulosa (29). Este fato destacou o possível papel da BMP 15 no recrutamento dos folículos primordiais. A BMP15 age através da ligação aos receptores BMPR-IA, BMPR-1B e BMPR-II (71). Durante sua ação biológica na célula, a BMP15 se liga primariamente ao receptor ALK-6 e, em seguida, promove o recrutamento do receptor BMPR-II para o complexo pré-formado (72). Este último receptor, por conseguinte, induz à fosforilação do ALK-6 já previamente ligado à proteína, determinando a fosforilação de moléculas de sinalização intracelular denominada Smads. Essas moléculas, classificadas como Smads1, 5 e 8, interagem com outra molécula (Smad4), resultando na formação de um complexo sinalizador que é translocado para o núcleo a fim de regular a transcrição de genes-alvo e deste modo, determinar a ação da proteína (73). A BMP15 tem sido reconhecida ainda como um importante inibidor da expressão do receptor de FSH em células da granulosa,

determinando o bloqueio da síntese de progesterona induzida pelo FSH e inibindo também a expressão de proteínas (StAR e P450<sub>scc</sub>) envolvidas na esteroidogênese e estimuladas por esta gonadotrofina. Essa característica tem sido intrinsecamente relacionada à habilidade da BMP15 em induzir à inibição do processo de luteinização precoce (74). A BMP15 exerce uma gama de efeitos nas células da granulosa (75) entre eles a diminuição da expressão do FSHR na superfície das células da granulosa (76). Um SNP no gene codificador da BMP15 que torne a proteína menos bioativa ou iniba a sua secreção poderá teoricamente aumentar a sensibilidade dos folículos ao FSH e um SNP ativador poderá desencadear efeito oposto e desta forma relacionar-se a dois desfechos clínicos importantes; baixa ou alta resposta, durante a estimulação ovariana para FIV.

Quatro polimorfismos do gene da BMP15 foram estudados, quanto aos respectivos efeitos na resposta ovariana durante a indução ovulatória em ciclos de FIV. Variantes alélicas da BMP15, 673C>T, 9C>G e IVSI + 905 A>G estiveram associados à alta resposta (27, 64). Embora tais polimorfismos não tenham mostrado uma forte associação com o risco de síndrome do hiperestímulo, os haplotipos TGAA (- 673, - 9, IVS + 905), Asn103Ser foram um fator de risco e os haplotipos CCAA conferiram proteção à síndrome de hiperestímulo (62). Em uma recente publicação foi evidenciado uma associação entre o alelo - 9 G e uma alta resposta a estimulação ovariana (27).

## *2.7 Fator de Crescimento e Desenvolvimento – 9 (GDF9)*

O GDF9 assim como a BMP15 é expresso no oócito desde a fase inicial do desenvolvimento folicular (27). Ambos desempenham um papel importante no desenvolvimento folicular e na ovulação. O gene que codifica o GDF9 está localizado

na região cromossômica 5q31. 1. Em humanos os polimorfismos do GDF9 estão associados à fecundidade e a um aumento na incidência de gêmeos dizigóticos (77) e à falência ovariana prematura (78).

No estágio pré-antral, o GDF9 tem mostrado ser efetivo em estimular o crescimento das células foliculares. Na transição para o estágio antral, parece que o GDF9 atua no crescimento folicular suprimindo a apoptose e a atresia folicular. Isto se deve em parte pela capacidade de o GDF9 estimular a expressão do FSHR como adequar os níveis de FSHR nas células da granulosa, passos fundamentais ao crescimento folicular na fase dependente da ação do FSH (79-80).

O GDF9 exerce também um importante papel na fase final do desenvolvimento folicular prévia a ovulação. Fornece suporte metabólico na biossíntese dos esteróides antes do desencadeamento do pico de LH. Além de regular o metabolismo das células do *cúmulus*, o GDF9 regula a expressão gênica durante o estágio pré ovulatório (79-80).

Recentemente algumas variantes genéticas do GDF9 foram identificadas e sua correlação com a resposta ovariana e os desfechos reprodutivos em FIV têm sido avaliados (28, 81). Três polimorfismos, 169G>A, 447C>A e 546G>A até o presente momento têm sido mais frequentemente estudados. Em 2010 um estudo rastreou os polimorfismos anteriormente citados em 106 chinesas com reserva ovariana diminuída e comparou com um grupo de mulheres com resposta normal, concluíram que existe uma correlação entre o genótipo GDF9 546G>A e uma reserva ovariana diminuída. Ao examinar a correlação entre os polimorfismos e os desfechos em FIV entre mulheres com resposta diminuída e mulheres com resposta normal foi observado que as portadoras do alelo GDF9 546G>A (genótipo GA/AA) tiveram uma alta prevalência de resposta ovariana pobre e apesar de receberem uma maior dose de FSH recombinante continuaram tendo poucos oócitos MII, baixa taxa de fertilização poucos embriões com

boa qualidade e baixo índice de gravidez. Em contraste, nos controles os parâmetros observados no genótipo GA/AA não diferiram daquelas com genótipo GG. Contudo não foi detectada correlação entre o polimorfismo 169G>A e 477C>T e desfechos em FIV (26, 28, 81). Estes resultados mostram que as variantes genéticas do GDF9 pelo menos, em parte podem estar relacionadas à piores resultados em FIV em mulheres com resposta ovariana diminuída. Concluem, entretanto que mais estudos serão necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nos efeitos dos polimorfismos do GDF9 na função ovariana.

## 2.8 Polimorfismos e FIV

Após constatarmos a importância, prevalência e a importância social e epidemiológica dos tratamentos de alta complexidade de mulheres inférteis e a influência dos polimorfismos dos genes reguladores do desenvolvimento inicial e crescimento folicular em que podemos destacar o FSH, LH, HAM, BMP15 e GDF9, torna-se imprescindível o melhor conhecimento e quantificação desses fatores na resposta à estimulação oocitária em pacientes realizando FIV, o que permitirá a individualização do tratamento, a melhor avaliação prognóstica como também a otimização dos desfechos reprodutivos em mulheres submetidas à fertilização *in vitro*.

### 3. MARCO TEÓRICO

Como vimos, existe uma substancial variabilidade na resposta ovariana durante a estimulação com a utilização das gonadotrofinas em mulheres submetidas à estimulação ovariana para FIV, a qual pode oscilar desde uma resposta pobre, resultando em cancelamento do ciclo, a uma resposta excessiva caracterizando a síndrome da hiperestimulação ovariana. Além disso, podemos constatar que a identificação de fatores preditivos relacionados à resposta ovariana apesar de ser um passo importante no tratamento ainda carecem de melhor acurácia na determinação de um correto diagnóstico.

Percebemos também que não há consenso a respeito do parâmetro ideal para a quantificação da resposta ovariana, seja a utilização da avaliação hormonal pré indução, contagem de folículos antrais, valor absoluto do número de folículos com diâmetro  $\geq 17$  mm, número e grau de maturação dos oócitos recuperados, número e qualidade oocitária e embrionária. Todavia, fatores intrínsecos ovarianos e de crescimento folicular ainda são desconhecidos e, portanto não somos capazes de medir corretamente a eficácia da prescrição utilizada no tratamento.

Neste contexto, com a descoberta de SNPs relacionados à resposta ovariana, sendo que o primeiro SNP estudado foi o polimorfismo do receptor do FSH Asn680Ser, o qual afeta os níveis basais de FSH e aumenta a necessidade de gonadotrofina durante a hiperestimulação ovariana controlada (HOC), percebemos então a necessidade de investigar com maior precisão todos os fatores envolvidos no desenvolvimento oocitário, e em especial, os hormônios, fatores de crescimento e receptores que estejam diretamente ligados a este mecanismo.

A partir deste marco, estudar todos os fatores envolvidos na foliculogênese: oocitários, foliculares e extra foliculares, compreendendo o GDF9, BMP15, HAM, FSH e LH, tornam-se cruciais, pois sabemos que possíveis alterações em SNPs nestes fatores podem afetar os níveis de mRNA ou a sequência protéica e desta forma promover variações protéicas quantitativas e funcionais as quais estão associadas à variabilidade inter-individual na resposta ovariana e qualidade oocitária.

#### 4. JUSTIFICATIVA

Considerando a prevalência e importância social e epidemiológica dos tratamentos de alta complexidade de mulheres inférteis e o contexto atual da literatura, a presença de polimorfismos genéticos podem influenciar a regulação, desenvolvimento e crescimento folicular.

Destacam-se como potenciais reguladores destes mecanismos os polimorfismos dos genes do FSH e seu receptor, LH e seu receptor, HAM e seu receptor, BMP15 e GDF9. Possíveis polimorfismos nestes locais poderiam causar repercussões nos fatores autócrinos e parácrinos, desta forma, torna-se imprescindível o melhor conhecimento e quantificação desses fatores, o que permitirá a individualização do tratamento, a melhor avaliação prognóstica, como também a otimização dos desfechos reprodutivos em mulheres submetidas à fertilização *in vitro*.

## 5. OBJETIVOS

Avaliar a relação entre a presença dos polimorfismos no genes do LH (Trp8Arg e Ile15Thr), AMH (Ile49Ser), BMP15 (673C>T, 9C>G, IVSI+905A>G), GDF9 (546G>A, 398C>G, 447C>T e 646G>A), e dos receptores do FSH (Ser680Asn), do LH (18isnILQ) e do AMH (Ile49Ser), no número de oócitos recuperados em estágio MII em pacientes pobres respondedoras comparadas com pacientes normo respondedoras submetidas à fertilização *in vitro*.

Avaliar a relação entre a presença do polimorfismo no gene do receptor do FSH (Ser680Asn) no número de oócitos recuperados em estágio MII em pacientes pobres respondedoras comparadas com pacientes normo respondedoras submetidas à fertilização *in vitro*.

Avaliar a relação entre a presença dos polimorfismos no gene do receptor do LH (Trp8Arg e Ile15Thr) no número de oócitos recuperados em estágio MII em pacientes pobres respondedoras comparadas com pacientes normo respondedoras submetidas à fertilização *in vitro*.

Avaliar a relação entre a presença do polimorfismo no gene do receptor do gene do receptor do LH (18isnILQ) no número de oócitos recuperados em estágio MII em pacientes pobres respondedoras comparadas com pacientes normo respondedoras submetidas à fertilização *in vitro*.

Avaliar a relação entre a presença do polimorfismo no gene do receptor do gene do AMH (Ile49Ser) no número de oócitos recuperados em estágio MII em pacientes pobres respondedoras comparadas com pacientes normo respondedoras submetidas à fertilização *in vitro*.

Avaliar a relação entre a presença do polimorfismo no gene do receptor do gene do receptor do AMH (482A>G) no número de oócitos recuperados em estágio MII em pacientes pobres respondedoras comparadas com pacientes normo respondedoras submetidas à fertilização *in vitro*.

Avaliar a relação entre a presença dos polimorfismos no gene do receptor do dos genes da BMP15 ( 673C/T, 9C/G, IVSI+905A/G) no número de oócitos recuperados em estágio MII em pacientes pobres respondedoras comparadas com pacientes normo respondedoras submetidas à fertilização *in vitro*.

Avaliar a influência dos polimorfismos nos genes do GDF9 (546G>A, 398C>G, 447C>T e 646G>A) nos parâmetros hormonais em mulheres submetidas à fertilização *in vitro*.

Avaliar a influência dos polimorfismos nos genes do GDF9 (546G>A, 398C>G, 447C>T e 646G>A) na reserva ovariana em mulheres submetidas à fertilização *in vitro*.

Avaliar a influência dos polimorfismos nos genes do GDF9 (546G>A, 398C>G, 447C>T e 646G>A) no número e qualidade de oócitos recuperados em mulheres submetidas à fertilização *in vitro*.

## 6. HIPÓTESE NULA

Os SNPs dos seguintes genes: do LH (Trp8Arg e Ile15Thr), AMH (Ile49Ser), BMP15 (673C/T, 9C/G, IVSI+905A/G), GDF9 (546G>A, 398C>G, 447C>T e 646G>A), e dos receptores do FSH (Ser680Asn), do LH (18isnILQ) e do AMH (482A>G), não interferem no número de oócitos em estágio MII recuperados em mulheres submetidas à hiper-estimulação ovariana com gonadotrofina exógena para fertilização *in vitro*.

Os SNPs dos seguintes genes do GDF9 (546G>A, 398C>G, 447C>T e 646G>A) não interferem na dinâmica folicular, nos parâmetros hormonais, de reserva ovariana, no número e qualidade de oócitos recuperados em mulheres jovens submetidas à hiper-estimulação ovariana com gonadotrofina exógena para fertilização *in vitro*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

1. Sperof L. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 7 ed. LWW. 2005.
2. van Loendersloot LL, van Wely M, Limpens J, Bossuyt PM, Repping S, van der Veen F. Predictive factors in in vitro fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2010 Nov-Dec;16(6):577-89.
3. Fauser BC, Diedrich K, Devroey P. Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Hum Reprod Update*. 2008 Jan-Feb;14(1):1-14.
4. 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 Jul;17(1):10-9.
5. Bancsi LF, Huijs AM, den Ouden CT, Broekmans FJ, Looman CW, Blankenstein MA, et al. Basal follicle-stimulating hormone levels are of limited value in predicting ongoing pregnancy rates after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2000 Mar;73(3):552-7.
6. Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2002 Jun;77(6):1148-55.
7. Templeton A, Morris JK, Parslow W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet*. 1996 Nov 23;348(9039):1402-6.
8. Bukman A, Heineman MJ. Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Hum Reprod Update*. 2001 Nov-Dec;7(6):581-90.
9. Seifer DB, Scott RT, Jr., Bergh PA, Abrogast LK, Friedman CI, Mack CK, 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 Jul;72(1):63-5.
10. Fawzy M, Lambert A, Harrison RF, Knight PG, Groome N, Hennelly B, et al. Day 5 inhibin B levels in a treatment cycle are predictive of IVF outcome. *Hum Reprod*. 2002 Jun;17(6):1535-43.
11. Creus M, Penarrubia J, Fabregues F, Vidal E, Carmona F, Casamitjana R, et al. Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome. *Hum Reprod*. 2000 Nov;15(11):2341-6.
12. Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Predicting poor ovarian response in IVF: use of repeat basal FSH measurement. *J Reprod Med*. 2004 Mar;49(3):187-94.
13. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Looman CW, Blankenstein M, Fauser BC, teJong FH, et al. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod*. 2003 Apr;18(4):700-6.
14. 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 Feb;18(2):323-7.
15. 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 Feb;93(3):855-64.
16. Nardo LG, Gelbaya TA, Wilkinson H, Roberts SA, Yates A, Pemberton P, 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 Nov;92(5):1586-93.
17. 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 Nov-Dec;12(6):685-718.
  18. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, et al. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2002 Dec;17(12):3065-71.
  19. 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 Feb;77(2):357-62.
  20. Mohiyiddeen L, Newman WG, McBurney H, Mulugeta B, Roberts SA, Nardo LG. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphisms are not associated with ovarian reserve markers. *Fertil Steril*. 2012 Mar;97(3):677-81.
  21. de Castro F, Ruiz R, Montoro L, Perez-Hernandez D, Sanchez-Casas Padilla E, Real LM, et al. Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril*. 2003 Sep;80(3):571-6.
  22. Behre HM, Greb RR, Mempel A, Sonntag B, Kiesel L, Kaltwasser P, 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 Jul;15(7):451-6.
  23. de Castro F, Moron FJ, Montoro L, Galan JJ, Hernandez DP, Padilla ES, et al. Human controlled ovarian hyperstimulation outcome is a polygenic trait. *Pharmacogenetics*. 2004 May;14(5):285-93.
  24. Kevenaar ME, Themmen AP, Laven JS, Sonntag B, Fong SL, Uitterlinden AG, 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 Jun;22(6):1547-54.
  25. Juengel JL, McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update*. 2005 Mar-Apr;11(2):143-60.
  26. Chand AL, Ponnampalam AP, Harris SE, Winship IM, Shelling AN. Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2006 Oct;86(4):1009-12.
  27. Hanevik HI, Hilmarsen HT, Skjelbred CF, Tanbo T, Kahn JA. A single nucleotide polymorphism in BMP15 is associated with high response to ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online*. 2011 Jul;23(1):97-104.
  28. Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*. 2006 May;154(5):739-44.
  29. Margulis S, Abir R, Felz C, Nitke S, Krissi H, Fisch B. Bone morphogenetic protein 15 expression in human ovaries from fetuses, girls, and women. *Fertil Steril*. 2009 Nov;92(5):1666-73.
  30. Gromoll J, Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab*. 2005 Oct;16(8):368-73.
  31. Sundarajan C, Liao W, Roy AC, Ng SC. Association of oestrogen receptor gene polymorphisms with outcome of ovarian stimulation in patients undergoing IVF. *Mol Hum Reprod*. 1999 Sep;5(9):797-802.

32. Aittomaki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, et al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*. 1995 Sep 22;82(6):959-68.
33. Jiang LH, Oomura Y. Effect of catecholamine-receptor antagonists on feeding-related neuronal activity in the central amygdaloid nucleus of the monkey: a microiontophoretic study. *J Neurophysiol*. 1988 Aug;60(2):536-48.
34. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*. 1997 Jan;22(1):176-81.
35. Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*. 2005 Jan 20;433(7023):269-77.
36. Simoni M, Tempfer CB, Destenaves B, Fauser BC. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: Polycystic ovary syndrome and ovarian response. *Hum Reprod Update*. 2008 Sep-Oct;14(5):459-84.
37. Perez-Cerda C, Merinero B, Rodriguez-Pombo P, Perez B, Desviat LR, Muro S, et al. Potential relationship between genotype and clinical outcome in propionic acidaemia patients. *Eur J Hum Genet*. 2000 Mar;8(3):187-94.
38. 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 Oct;8(10):893-9.
39. Rodini GP, Genro VK, Matte U, Pereira FS, Bilibio JP, Greggianin C, 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*. 2011 Mar;28(3):221-4.
40. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, et al. Anti-Mullerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril*. 2011 Nov;96(5):1246-51 e1.
41. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597-641.
42. La Marca A, De Leo V, Giulini S, Orvieto R, Malmusi S, Giannella L, et al. Anti-Mullerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *J Soc Gynecol Investig*. 2005 Oct;12(7):545-8.
43. Ledger WL. Clinical utility of measurement of anti-mullerian hormone in reproductive endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Dec;95(12):5144-54.
44. Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, Kretschmer R, Birkhauser MH. Statistically significant changes of antimullerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women. *Fertil Steril*. 2008 Apr;89(4):927-33.
45. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006 Aug;132(2):191-206.
46. Rombauts L, Onwude JL, Chew HW, Vollenhoven BJ. The predictive value of antral follicle count remains unchanged across the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 2011 Dec;96(6):1514-8.
47. 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 Mar;91(3):705-14.
48. Hubayter ZR, Popat V, Vanderhoof VH, Ndubizu O, Johnson D, Mao E, et al. A prospective evaluation of antral follicle function in women with 46,XX spontaneous primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril*. 2010 Oct;94(5):1769-74.

49. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artensio AC, et al. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update*. 2010 Mar-Apr;16(2):113-30.
50. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*. 2004 Feb;10(2):77-83.
51. Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, Mellon SH, McGee E, Nachtigal MW, et al. Autocrine and paracrine Mullerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Prog Horm Res*. 2000;55:53-67; discussion -8.
52. Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of anti-Mullerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Oct;91(10):4064-9.
53. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2002 Mar;143(3):1076-84.
54. Nelson SM, Yates RW, Lyall H, Jamieson M, Traynor I, Gaudoin M, et al. Anti-Mullerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. *Hum Reprod*. 2009 Apr;24(4):867-75.
55. Gnoth 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 Jun;23(6):1359-65.
56. Ocal P, Sahmay S, Cetin M, Irez T, Guralp O, Cepni I. Serum anti-Mullerian hormone and antral follicle count as predictive markers of OHSS in ART cycles. *J Assist Reprod Genet*. 2011 Dec;28(12):1197-203.
57. Coccia ME, Rizzello F. Ovarian reserve. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Apr;1127:27-30.
58. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Anti-Mullerian hormone (AMH) defines, independent of age, low versus good live-birth chances in women with severely diminished ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2010 Dec;94(7):2824-7.
59. Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol*. 1994 Apr;100(1-2):51-4.
60. Haavisto AM, Pettersson K, Bergendahl M, Virkamaki A, Huhtaniemi I. Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Apr;80(4):1257-63.
61. Furui K, Sukanuma N, Tsukahara S, Asada Y, Kikkawa F, Tanaka M, et al. Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) beta-subunit, associated with immunologically anomalous LH variants. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Jan;78(1):107-13.
62. Okuda K, Takamatsu J, Okazaki T, Yamada T, Saeki M, Sugimoto O. Hereditary abnormality of luteinizing hormone resulting in discrepant serum concentrations determined by different assays. *Endocr J*. 1994 Dec;41(6):639-44.
63. Lamminen T, Huhtaniemi I. A common genetic variant of luteinizing hormone; relation to normal and aberrant pituitary-gonadal function. *Eur J Pharmacol*. 2001 Feb 23;414(1):1-7.
64. Alviggi C, Clarizia R, Pettersson K, Mollo A, Humaidan P, Strina I, et al. Suboptimal response to GnRHa long protocol is associated with a common LH polymorphism. *Reprod Biomed Online*. 2009 Jan;18(1):9-14.

65. De Placido G, Alviggi C, Mollo A, Strina I, Ranieri A, Alviggi E, et al. Effects of recombinant LH (rLH) supplementation during controlled ovarian hyperstimulation (COH) in normogonadotrophic women with an initial inadequate response to recombinant FSH (rFSH) after pituitary downregulation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004 May;60(5):637-43.
66. Skiadas CC, Duan S, Correll M, Rubio R, Karaca N, Ginsburg ES, et al. Ovarian reserve status in young women is associated with altered gene expression in membrana granulosa cells. *Mol Hum Reprod*. 2012 Jul;18(7):362-71.
67. Piersma D, Verhoef-Post M, Look MP, Uitterlinden AG, Pols HA, Berns EM, et al. Polymorphic variations in exon 10 of the luteinizing hormone receptor: functional consequences and associations with breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Sep 30;276(1-2):63-70.
68. Piersma D, Berns EM, Verhoef-Post M, Uitterlinden AG, Braakman I, Pols HA, et al. A common polymorphism renders the luteinizing hormone receptor protein more active by improving signal peptide function and predicts adverse outcome in breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Apr;91(4):1470-6.
69. Kerkela E, Skottman H, Friden B, Bjuresten K, Kere J, Hovatta O. Exclusion of coding-region mutations in luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor genes as the cause of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2007 Mar;87(3):603-6.
70. Juengel JL, Bodensteiner KJ, Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, et al. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Anim Reprod Sci*. 2004 Jul;82-83:447-60.
71. Genro VK, Matte U, De Conto E, Cunha-Filho JS, Fanchin R. Frequent polymorphisms of FSH receptor do not influence antral follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone administration as assessed by the Follicular Output RaTe (FORT). *J Assist Reprod Genet*. 2012 Jul;29(7):657-63.
72. Ball LJ, Lucas EJ, Miles JN, Gale AG. Inspection times and the selection task: what do eye-movements reveal about relevance. *Q J Exp Psychol A*. 2003 Aug;56(6):1053-77.
73. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril*. 1999 May;71(5):836-42.
74. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril*. 2003 Aug;80(2):341-9.
75. Schoolcraft WB, Gardner DK, Lane M, Schlenker T, Hamilton F, Meldrum DR. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertil Steril*. 1999 Oct;72(4):604-9.
76. Jun JK, Yoon JS, Ku SY, Choi YM, Hwang KR, Park SY, et al. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET. *J Hum Genet*. 2006;51(8):665-70.
77. Wang TT, Wu YT, Dong MY, Sheng JZ, Leung PC, Huang HF. 546G>A polymorphism of growth differentiation factor-9 contributes to the poor outcome of ovarian stimulation in women with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2010 Nov;94(6):2490-2.
78. Lawson R, El-Toukhy T, Kassab A, Taylor A, Braude P, Parsons J, et al. Poor response to ovulation induction is a stronger predictor of early menopause than elevated basal FSH: a life table analysis. *Hum Reprod*. 2003 Mar;18(3):527-33.

79. Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol.* 2006 Aug 15;296(2):514-21.
80. Yeo CX, Gilchrist RB, Thompson JG, Lane M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Hum Reprod.* 2008 Jan;23(1):67-73.
81. Kovanci E, Rohozinski J, Simpson JL, Heard MJ, Bishop CE, Carson SA. Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 2007 Jan;87(1):143-6.

**8. ARTIGO 1: Association of LH, AMH, BMP15, GDF9, FSHR, LHR, and AMHR genetic polymorphisms with poor responses in patients undergoing in vitro fertilization**

Artigo submetido à revista Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.

**Title page:**

Association of LH, AMH, BMP15, GDF9, FSHR, LHR, and AMHR  
genetic polymorphisms with poor responses in patients undergoing in vitro  
fertilization

## Abstract

**Context:** Approximately 10% of women seeking fertility treatment have diminished ovarian reserve (DOR). Gene association studies have identified several single nucleotide polymorphisms (SNPs) involved in the ovarian response.

**Objective:** To evaluate the associations of the polymorphisms in genes encoding major hormones and their receptors with follicular development. In particular, polymorphisms in the LH (Trp8Arg and Ile15Thr), AMH (Ile49Ser), BMP15 (673C>T, 9C>G, IVSI+905A/ G) and GDF9 (546G>A, 398C>G, 447C>T and 646G>A) genes, and FSH (Ser680Asn), LH (18isnILQ) and AMH receptors (482A>G) genes were assessed in patients undergoing stimulation for in vitro fertilization (IVF), and differences between patients in terms of treatment success (poor and normal responding) were investigated.

**Design and setting:** we performed a case-control study.

**Materials:** Normal patients and poor responders undergoing IVF.

**Interventions:** We extracted DNA from the peripheral blood and assessed polymorphisms in the LH, AMH, BMP15, GDF9, FSHR, LHR and AMHR genes using polymerase chain reaction (PCR).

**Main outcome measures:** The presence of these polymorphisms in poor and normal responder patients undergoing IVF.

**Results:** In the present study, we found that the 398C>G polymorphism in the GDF9 gene was present in 68% of poor responders versus 23% of normal responders to ovarian stimulation for IVF (OR: 4.01, 95% CI:1.52-10.60). In addition, the homozygous mutant genotype for the 447C>T polymorphism of the GDF9 gene was found in 50% and 19%, respectively, of poor and normal responder patients (OR: 2.88, 95% CI:1.19-6.04), which provides evidence for the strong association between poor ovarian response and ovulation induction. Only the GDF9 398C>G polymorphism was

associated with a poor response to treatment, after controlling for any bias related to the other polymorphisms.

**Conclusions:** We conclude that the GDF9 398C>G and 447C>T polymorphisms exert important influences on oocyte development. These findings represent the basis for future functional studies aimed at elucidating the precise genetic mechanism involved in oocyte development and developing potential treatments to improve the number of oocytes retrieved in patients with GDF9 polymorphisms.

**Key words:** poor response, polymorphisms, ovarian reserve, IVF

## **Manuscript:**

### **Introduction**

Approximately 10% of women seeking fertility treatment have diminished ovarian reserve (DOR), which is defined as a decrease in the number or quality of oocytes (1-4). The Bologna Criteria published in 2011 define a poor ovarian response as two or three of the following criteria: older than 39 years of age; prior poor ovarian response to conventional stimulation protocols (less than three oocytes retrieved); and abnormal ovarian reserve test results (5). The etiology of DOR has been associated with autoimmune, idiopathic, iatrogenic and genetic factors (6-7), and the causes of prematurely decreased follicle number can occur at many different levels of follicular or oocyte development (1).

Gene association studies have identified a number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting the gonadotrophin, steroid and TGF $\beta$  signaling pathways involved in the ovarian response. Most of these SNPs alter mRNA levels or protein sequences and thus lead to quantitative functional protein variations that may account for the observed inter-individual variability in controlled ovarian hyperstimulation (COH) (1). The first SNP studied was the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor polymorphism, Asn608Ser, which affects baseline FSH levels and increases gonadotrophin requirements during COH (8-9). Another study found that women who were homozygous for the Ser680 variant had a greater number of mature oocytes compared to women who were homozygous for the Asn680 variant. The anti-Mullerian hormone (AMH) (Ile49Ser) and AMH receptor (AMHR) polymorphisms (-428A>G) have been associated with variations in estradiol levels and may modulate FSH sensitivity (10). In women undergoing IVF treatment, the 8Arg-15Thr variant has been found to be more frequent among hypo-responders to recombinant FSH (rFSH)

(11) and among women with ovarian resistance to rFSH who require higher rFSH consumption yet achieve fewer oocytes retrieved (11).

Growth differentiation factor 9 (GDF-9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) are expressed in oocytes from early stage follicles (12), and both proteins play crucial roles in determining follicle growth and ovulation rates. With respect to COH phenotypes, GDF9 and BMP15 alleles have been associated with stimulation outcome (13-15). In particular, variant alleles of BMP15 were associated with increased follicle production in COH (13). In addition, another published study demonstrated a association between the -9G allele and a high response to ovarian stimulation (15). Several genetic variants of GDF9 have been identified, and their correlation with poor ovarian response has been noted, suggesting that these variants contribute to aberrant follicular development and oocyte loss (16-19). In the GDF9 gene 546G>A polymorphism, the A allele was correlated with poor COH and IVF outcomes in women with DOR (14).

The results of previous studies suggest that genetic polymorphisms may be associated with the ovarian response (7). However, this is the first paper that included polymorphisms that are related with all stages of follicular development. Therefore, the objective of this study was to evaluate the association between polymorphisms in genes encoding the major hormones and their receptors involved in follicular development (FSH, LH, BMP15, GDF9, AMH) and compare these polymorphisms between poor and normal responder patients undergoing stimulation for IVF.

## **Materials and methods**

### **Ethical approval**

All participants signed an informed consent form. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Institutional Review Board equivalent #14/0070).

### **Subjects**

Patients undergoing IVF at the Pronatus Center of Reproductive Medicine were prospectively selected. All patients who satisfied the inclusion and exclusion criteria were invited to participate in the study and signed an informed consent form.

### **Inclusion criteria**

The inclusion criteria were as follows: age between 20 and 39 years; presence of ovaries; no previous IVF treatment; BMI < 30, and infertility due to male factor, tubal factor or unexplained causes. None of the women had endocrine disorders.

### **Exclusion criteria**

The exclusion criteria were as follows: age older than 40 years; presence of only one ovary; previous chemotherapy; abnormal karyotype; and other factors affecting ovarian function, such as ovarian surgery or endometrioma.

### **Ovarian stimulation protocol**

The ovarian stimulation protocol included rFSH antagonists and recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG). All patients underwent an antral follicle count on day 2 or 3 of the menstrual cycle, and FSH, luteinizing hormone (LH), and estradiol assays were performed. Treatment with rFSH (Puregon – Organon) was then initiated. After cycle day 5, transvaginal ultrasound was performed every two days to monitor the development of the follicles. Of note, the rFSH dose was optimally adjusted based on

the ultrasound results regarding the number and size of the developing follicles. The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist Orgalutran (Organon 0.25 mg/d) was administered daily by subcutaneous (s.c.) injection from stimulation cycle day 6 until the administration of recombinant rhCG (Ovidrel 250 mcg, Serono). Ultrasonography was performed every 2 days to monitor follicular growth, until the majority of the follicles reached 17 mm in diameter. Oocyte maturation was stimulated with rhCG, and follicular and oocyte retrieval were guided by transvaginal ultrasound performed after 35 hours.

### **Study groups**

After oocyte retrieval, patients were classified into 2 groups: poor responders PR (3 or fewer oocytes) and normal responders NR (4 or more oocytes).

### **DNA preparation**

DNA was extracted from 350  $\mu$ L of peripheral blood collected in EDTA tubes as outlined in the protocol for the Easy-DNA commercial kit (Invitrogen, UK). DNA concentration and purity were determined using a NanoDrop ND1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., USA). This DNA was used for the analysis of polymorphisms in the LH, LHR, GDF9, FSHR, AMH, AMHR and BMP15 genes (TABLE 3).

### **Detection of LH, LHR, FSHR, and GDF9 polymorphisms by PCR**

Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the regions of interest in the LH, LHR, FSHR and GDF9 genes (TABLE 3). The forward and reverse primers delimited the regions where the polymorphisms are located and are described in

TABLE 3. Amplification of 200 ng of DNA was performed in a Veriti ® 96-well thermocycler (Applied Biosystems, USA) using Invitrogen (UK) reagents. The following annealing temperatures were applied: 63°C, LHR; 64°C, GDF9; 63°C, FSHR; and 60°C, LH. The PCR products were stained with SYBR ® Gold (Life Technologies, USA) and verified by electrophoresis on 1.5% agarose gels; the DNA fragments showed the following sizes: LH $\beta$  - 662 base pairs, LHR - 350 pairs bases, GDF9 - 491 base pairs and FSHR - 520 base pairs.

### **Detection of LH, LHR and GDF-9 polymorphisms by direct sequencing**

PCR products were purified using the PEG8000 purification protocol with 2.5% NaCl. Direct sequencing was performed using the Sanger method with an ABI 3500 Genetic Analyzer automated sequencer (Applied Biosystems, USA). Assays were performed at the Unit of Molecular and Protein Analysis of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (UAMP / HCPA). Primers for sequencing were used at a concentration of 4 pmol/ $\mu$ L. The results were compared with the NCBI reference sequences (LH $\beta$  - NM\_000894.2, LHR - NM\_000233.3 and GDF9 - NM\_005260.3) (TABLE 3).

### **Detection of FSHR polymorphisms by RFLP**

The product of the PCR reaction for the FSHR gene was subjected to restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the BSRI restriction enzyme for 4 hours at 65°C. After digestion, the samples were stained with SYBR ® Gold (Life Technologies, USA), and the following products were obtained by electrophoresis on a 2.5% agarose gels: NN (680Asn/Asn) fragment of 520 base pairs, SS (680Ser/Ser) fragments of 413 and 107 base pairs, and NS (680Asn/Ser) fragments of 520, 413 and 107 base pairs. The results were compared with the NCBI reference sequence NM\_000145.3 (TABLE 3).

## **Detection of AMH, AMHR and BMP15 polymorphisms**

Polymorphisms in the AMH, AMHR, and BMP15 genes (TABLE 3) were determined by TaqMan allelic discrimination using real-time PCR with a DNA concentration of 10-20 ng. The tests used are shown in Table X (Applied Biosystems, USA) and were performed using a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) in the Unit of Molecular and Protein Analysis at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (UAMP / HCPA).

## **Statistics**

Data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test; data with a normal distribution, as determined by t-test, were used to compare means. The Kruskal-Wallis test was used for non-parametric data.

The observed numbers for each genotype were compared with the expected values to test whether the sample was in Hardy-Weinberg equilibrium using the chi-squared test with one degree of freedom. Statistical analyses to determine the association between the polymorphisms were performed using the chi-squared test and the Monte Carlo method of performing multiple simulations, assuming that the null hypothesis is correct with fixed marginal values. The marginal values were determined from experimental data. This method determines an empirical *P* value for the observed data. Moreover, we utilized advanced statistical analysis to evaluate the effects of the studied polymorphisms, we used logistic regression to predict the effect of these polymorphisms on poor response to treatment.

Statistical significance was set at  $P < 0.05$ . The statistical tests were performed with the Statistical Package for the Social Sciences 17 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## Results

The demographic data are presented in TABLE 1. The ovarian and hormonal characteristics of the female sample are presented in TABLE 2.

Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the chi-squared test, and the following *P* values were obtained: *P*=0.51 for GDF9 398C>G *P*=0.33 for GDF9 447C>T; *P*=0.74 for GDF9 546G>A; *P*=0.51 for FSHR; *P*=0.60 for LH8; *P*=0.60 for LH15; *P*=0.99 for LHR; *P*=0.16 for AMH; *P*=0.91 for AMHR; *P*=0.98 for BMP15 polymorphism 1 and *P*=0.33 for BMP15 polymorphism 2.

The genotype and allele frequencies for the LH (Trp8Arg and Ile15Thr), LHR (18isnLQ), GDF9 (398C>G, 546G>A, 447C>T and 646G>A), FSHR (Asn680Ser), AMH (Ile49Ser), AMHR (482A>G) and BMP15 (9C>G) polymorphisms are shown in TABLE 4. An analysis of the GDF9 398C>G genotypes demonstrated an odds ratio of 4.01 (1.52-10.60), and the GDF9 447C>T genotypes demonstrated an odds ratio of 2.88 (1.19-6.04) for the presence of these polymorphisms in the poor responder group.

When we evaluated our data using logistic regression analysis to determine the influence of the polymorphisms (TABLE 5), only the GDF9 398C>G polymorphism was associated with a poor response to treatment, after controlling for any bias related to the other polymorphisms.

## Discussion

In the present study, we showed that the presence of the 398C>G polymorphism in the GDF9 gene was associated with a poor response in infertile patients undergoing ovarian stimulation for IVF ( $\leq 3$  mature oocytes). In particular, the mutant genotype was found in 69% of poor responder patients yet only 23% of normal responders, thus indicating a strong association of this polymorphism with poor ovarian response. The homozygous mutant genotype for the 447C>T polymorphism of the GDF9 gene was found in 50% and 19%, respectively, of poor and normal responder patients, supporting the same strong association with poor ovarian response to ovulation induction.

Multivariate analysis revealed the possible influence of polymorphisms in genes regulating follicular growth and oocyte development (FSHR, LH, LHR, AMH, AMHR, BMP15 and GDF9). In addition, analysis of the response to gonadotropin administration (as part of ovarian hyperstimulation for IVF) showed that only the 398G>C polymorphism in the GDF9 gene had a strong association with poor ovarian response ( $P=0.039$ ), suggesting that this polymorphism plays an important role in the status of ovarian reserve and function.

In this study, we found no correlation between some polymorphisms, including those in the LH (Trp8Arg and Ile15Thr), LHR (181snLQ), GDF9 (398C>G, 546G>A, 447C>T and 646G>A), FSHR (Asn680Ser), AMH (Ile49Ser), AMHR (482A>G) and BMP15 (9C>G) genes, and a poor response to IVF treatment. Other studies have demonstrated an association between FSHR (20-21) and LHR (22) polymorphisms and a poor response to treatment, although these results were not supported by data in our study. One possible cause for this difference is the ethnic origin of the population in each study.

GDF9 plays a pivotal role during early folliculogenesis, and deletion of GDF9 in the mouse causes follicular arrest at the primary stage and infertility (23). In addition, GDF9 stimulates granulosa cell proliferation (24) and cumulus cell expansion (25), inhibits follicular apoptosis (26), and enhances oocyte and embryo development (27-28). In this study, the number of antral follicles, total follicles, and oocytes retrieved; the level of HAM expression; and the estradiol level on the day of r-hCG administration were lower in patients with a poor response, suggesting that the GDF9 polymorphism influences oocyte development at all stages of folliculogenesis.

In vitro studies using recombinant GDF-9 protein have clarified the biological roles and importance of GDF-9 in follicle growth and development at all stages of folliculogenesis. At the preantral stage, GDF-9 has been shown to be effective in stimulating the growth of in vitro-cultured preantral follicles (29). GDF-9 also promotes early preantral follicle growth in human ovaries (30). In the transition to the antral stage, it appears that GDF-9 promotes follicular survival by suppressing granulosa cell apoptosis and follicular atresia (26). This may be achieved in part by GDF-9 stimulation of FSHR expression, as adequate FSRH levels in granulosa cells are essential for FSH-dependent antral follicle growth.

GDF-9 also plays an important role during the final stages of follicle growth prior to ovulation. Prior to the LH surge, cumulus cells require GDF-9 to support metabolic cascades such as glycolysis and sterol biosynthesis (31). GDF-9 also regulates diverse processes and gene expression during the preovulatory stage (32) and enhances cumulus cell expansion in the presence of FSH (33), whereas this enhancement was not observed in the absence of FSH (34). Although animal models and in vitro and humans studies have revealed the role of GDF9 in regulating follicular development, little is known about its role in human ovarian function. However, studies

have demonstrated a strong correlation between GDF9 polymorphisms in women with DOR, poor responses to treatment, and poor IVF outcomes (19, 35), indicating that GDF9 plays an important role in determining ovarian reserve status and function.

One strength of the present study is the fact that we found a strong association between the GDF-9 398 C>G polymorphism and poor ovarian responses in patients undergoing ovarian stimulation for IVF, who were sampled from a relatively young and ethnically heterogeneous population. Nevertheless, despite the number of patients evaluated, we found a population with heterogeneous ethnicities. Our findings indicate that this polymorphism may serve as a marker in predicting ovarian responses in other populations, however the limitation of our results is that we don't realized functional studies to validate the precise genetic mechanism involved in oocyte development.

Thus, we conclude that the GDF9 398C>G polymorphism exerts an important influence on oocyte development. Additionally, this polymorphism can be used as a marker in the evaluation of patients undergoing ovarian stimulation for IVF to improve the efficacy of medications and therefore more cost-effective individualization of treatment. Nevertheless, functional studies should be performed to determine the precise mechanism involved and to develop treatments to improve the number of oocytes that are retrieved from patients with this polymorphism.

## **Acknowledgments**

We are grateful for the financial support provided by the Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

## References

1. Levi AJ, Raynault MF, Bergh PA, Drews MR, Miller BT, Scott RT, Jr. Reproductive outcome in patients with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2001 Oct;76(4):666-9.
2. Pastore LM, Young SL, Baker VL, Karns LB, Williams CD, Silverman LM. Elevated prevalence of 35-44 FMR1 trinucleotide repeats in women with diminished ovarian reserve. *Reprod Sci*. 2012 Nov;19(11):1226-31.
3. May-Panloup P, Ferre-L'Hotellier V, Moriniere C, Marcaillou C, Lemerle S, Malinge MC, et al. Molecular characterization of corona radiata cells from patients with diminished ovarian reserve using microarray and microfluidic-based gene expression profiling. *Hum Reprod*. 2012 Mar;27(3):829-43.
4. Gleicher N, Weghofer A, Oktay K, Barad DH. Is the immunological noise of abnormal autoimmunity an independent risk factor for premature ovarian aging? *Menopause*. 2009 Jul-Aug;16(4):760-4.
5. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod*. 2011 Jul;26(7):1616-24.
6. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Horm Res*. 2007;68(4):196-202.
7. Greene AD, Patounakis G, Segars JH. Genetic associations with diminished ovarian reserve: a systematic review of the literature. *J Assist Reprod Genet*. 2014 May 20.
8. Lawson R, El-Toukhy T, Kassab A, Taylor A, Braude P, Parsons J, et al. Poor response to ovulation induction is a stronger predictor of early menopause than elevated basal FSH: a life table analysis. *Hum Reprod*. 2003 Mar;18(3):527-33.
9. Ferrarini E, Russo L, Fruzzetti F, Agretti P, De Marco G, Dimida A, et al. Clinical characteristics and genetic analysis in women with premature ovarian insufficiency. *Maturitas*. 2013 Jan;74(1):61-7.
10. de Boer EJ, den Tonkelaar I, te Velde ER, Burger CW, Klip H, van Leeuwen FE. A low number of retrieved oocytes at in vitro fertilization treatment is predictive of early menopause. *Fertil Steril*. 2002 May;77(5):978-85.
11. Alviggi C, Clarizia R, Pettersson K, Mollo A, Humaidan P, Strina I, et al. Suboptimal response to GnRH $\alpha$  long protocol is associated with a common LH polymorphism. *Reprod Biomed Online*. 2009 Jan;18(1):9-14.
12. Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, et al. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Aug;84(8):2744-50.
13. Moron FJ, de Castro F, Royo JL, Montoro L, Mira E, Saez ME, et al. Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) alleles predict over-response to recombinant follicle stimulation hormone and iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Pharmacogenet Genomics*. 2006 Jul;16(7):485-95.

14. Wang JG, Douglas NC, Nakhuda GS, Choi JM, Park SJ, Thornton MH, et al. The association between anti-Mullerian hormone and IVF pregnancy outcomes is influenced by age. *Reprod Biomed Online*. 2010 Dec;21(6):757-61.
15. Hanevik HI, Hilmarsen HT, Skjelbred CF, Tanbo T, Kahn JA. A single nucleotide polymorphism in BMP15 is associated with high response to ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online*. 2011 Jul;23(1):97-104.
16. Abir R, Ben-Haroush A, Melamed N, Felz C, Krissi H, Fisch B. Expression of bone morphogenetic proteins 4 and 7 and their receptors IA, IB, and II in human ovaries from fetuses and adults. *Fertil Steril*. 2008 May;89(5 Suppl):1430-40.
17. Shimizu T, Miyahayashi Y, Yokoo M, Hoshino Y, Sasada H, Sato E. Molecular cloning of porcine growth differentiation factor 9 (GDF-9) cDNA and its role in early folliculogenesis: direct ovarian injection of GDF-9 gene fragments promotes early folliculogenesis. *Reproduction*. 2004 Nov;128(5):537-43.
18. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet*. 2004 Jul;75(1):106-11.
19. Wang TT, Wu YT, Dong MY, Sheng JZ, Leung PC, Huang HF. 546G>A polymorphism of growth differentiation factor-9 contributes to the poor outcome of ovarian stimulation in women with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2010 Nov;94(6):2490-2.
20. Sheikhha MH, Eftekhari M, Kalantar SM. Investigating the association between polymorphism of follicle-stimulating hormone receptor gene and ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation. *J Hum Reprod Sci*. 2011 May;4(2):86-90.
21. Livshyts G, Podlesnaja S, Kravchenko S, Sudoma I, Livshits L. A distribution of two SNPs in exon 10 of the FSHR gene among the women with a diminished ovarian reserve in Ukraine. *J Assist Reprod Genet*. 2009 Jan;26(1):29-34.
22. Skiadas CC, Duan S, Correll M, Rubio R, Karaca N, Ginsburg ES, et al. Ovarian reserve status in young women is associated with altered gene expression in membrana granulosa cells. *Mol Hum Reprod*. 2012 Jul;18(7):362-71.
23. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 1996 Oct 10;383(6600):531-5.
24. Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJ. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod*. 2000 Feb;62(2):370-7.
25. Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*. 2001 Jun;15(6):854-66.
26. Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, et al. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol Endocrinol*. 2006 Oct;20(10):2456-68.
27. Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol*. 2006 Aug 15;296(2):514-21.

28. Yeo CX, Gilchrist RB, Thompson JG, Lane M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Hum Reprod.* 2008 Jan;23(1):67-73.
29. Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, et al. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology.* 1999 Mar;140(3):1236-44.
30. Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jan;87(1):316-21.
31. Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev Biol.* 2005 Mar 1;279(1):20-30.
32. Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 29;97(18):10288-93.
33. Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol Endocrinol.* 1999 Jun;13(6):1018-34.
34. Dragovic RA, Ritter LJ, Schulz SJ, Amato F, Armstrong DT, Gilchrist RB. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology.* 2005 Jun;146(6):2798-806.
35. Wang TT, Ke ZH, Song Y, Chen LT, Chen XJ, Feng C, et al. Identification of a mutation in GDF9 as a novel cause of diminished ovarian reserve in young women. *Hum Reprod.* 2013 Sep;28(9):2473-81.

**TABLE 1**  
Demographic characteristics (mean±SD)

Parameter	Poor responders n=14	Normal responders n=52	<i>P</i> value <sup>a</sup>
Age (years)	35.5±3.7	34.6±3.3	0.271
Infertility (years)	5.35±4.7	3.92±2.68	0.208
Menstrual cycles (days)	28.31±2.25	29.1±3.98	0.504
Ethnic origin			
Caucasian	4	25	0.341 <sup>b</sup>
Afro-American	0	1	
Hispanic	10	26	
Pregnancy (n)	0.21±0.57	0.08±0.33	0.093
BMI <sup>c</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	22.0±3.10	24.6±3.18	0.005
Weight (kg)	56.4±8.13	65.9±9.38	0.001
Height (m)	1.58±0.06	1.63±0.06	0.117

<sup>a</sup> T-test

<sup>b</sup> Chi-squared test

<sup>c</sup> BMI: Body mass index

**TABLE 2**  
Ovarian and hormonal characteristics (mean±SD)

Parameter	Poor responders n=14	Normal responders n=52	Pvalue <sup>a</sup>
Antral follicle count (n)	4.29±1.59	12.33±4.63	0.000
Induction length (days)	8.79±2.25	9.71±1.60	0.005
Gonadotrophin administration (rFSH) (UI)	1173.2±405.5	1586.0±281.4	0.000
Endometrial thickness (mm)	8.96±2.10	9.94±1.86	0.095
Follicle >17 mm rhCG day (n)	2.00±0.67	7.13±3.39	0.000
Follicle between 14-16 mm rhCG day (n)	1.00±0.87	3.33±2.01	0.000
Follicle between 12-14 mm rhCG day (n)	0.43±0.85	2.50±1.74	0.000
Total oocytes (n)	2.12±0.94	12.42±7.43	0.000
MII oocytes (n)	1.79±0.80	9.83±6.25	0.000
FSH 3° day menstrual cycle	6.94±6.02	5.01±3.57	0.185
E2 3° day menstrual cycle	59.09±58.33	56.47±41.24	0.850
LH 3° day menstrual cycle	4.22±1.50	4.55±3.34	0.721
AMH	0.68±0.54	2.06±2.47	0.017
LH day rhCG	1.45±1.16	1.67±1.96	0.071
Progesterone day rhCG	0.75±1.30	0.90±1.18	0.717
E2 day rhCG	568.37±306.00	1370.81±778.25	0.001
Prolactin (ng/mL)	18.26±19.28	21.31±17.69	0.694

<sup>a</sup> T-test

<sup>b</sup> Chi-squared test

<sup>c</sup> BMI: Body mass index

**TABLE 3**  
Polymorphisms and genes

Gene	Chromosome	Polymorphism	Molecular biology techniques	Primer <sup>a</sup>
<i>LH</i>	19	p.Trp8Arg p.Ile15Thr	Direct sequencing	Forward: 5' GAAGCAGTGTCCCTTGTCCCA 3' Reverse: 5' GAAGAGGAGGCCTGAGAGTT 3'
<i>LHR</i>	2	18insLQ	Direct sequencing	Forward: 5' CACTCAGAGGCCGTCCAAG 3' Reverse: 5' GGAGGGAAGGTGGCATAGAG 3'
<i>GDF9</i>	5	c.398-39 C>G (intron) p.Thr149Thr (c.447C>T) p.Glu186Glu (c.546G>A) p.Val216Met (c.646G>A)	Direct sequencing	Forward: 5' TTGACTTGACTGCCTGTTGTG 3' Reverse: 5' AGCCTGAGCACTTGTGTCATT 3'
<i>FSHR</i>	2	p.Asn680Ser	RFLP - restriction enzyme BsrI	Forward: 5' TTGTGGTCATCTGTGGCTGC 3' Reverse: 5' AAAGGCAAGGACTGAATTATCATT 3'
<i>AMH</i>	19	p.Ile49Ser (c.146T>G)	Taqman	Assay ID: C_25599842_10
<i>AMHR</i>	12	c.-482A>G	Taqman	Assay ID: C_1673084_10
<i>BMP15</i>	X	c.-9C>G	Taqman	Assay ID: C_27504454_10

<sup>a</sup>C: cytosine, T: thymine, A: adenine, G: guanine

**TABLE 4**

Genotype and allele frequencies of each polymorphism studied

Polymorphism	Population studied	N	Genotypes <sup>b</sup>			P value <sup>a</sup>	Alleles <sup>b</sup>		OR (95% CI)	P value
			n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		
<b>GDF9</b> (398-39; C to G)	Normal responders	52	<b>CC</b> 40 (76.9)	<b>CG</b> 10 (19.2)	<b>GG</b> 2 (3.8)	0.006	<b>C</b> 90 (86.5)	<b>G</b> 14 (13.5)	4.01(1.52-10.60)	0.005
	Poor responders	13	4 (30.8)	8 (61.5)	1 (7.7)		16 (61.5)	10 (38.5)		
<b>GDF9</b> (447C>T)	Normal responders	52	<b>TT</b> 18 (34.6)	<b>TG</b> 24 (46.2)	<b>CC</b> 10 (19.2)	0.049	<b>T</b> 60 (57.7)	<b>G</b> 44 (42.3)	2.88 (1.19-6.04)	0.019
	Poor responders	14	2 (14.3)	5 (35.7)	7 (50.0)		9 (32.1)	19 (67.9)		
<b>GDF9</b> (546G>A)	Normal responders	52	<b>CC</b> 37 (69.2)	<b>CG</b> 15 (28.8)	<b>GG</b> 1 (1.9)	0.362	<b>C</b> 89 (85.6)	<b>G</b> 17 (16.4)	0.87 (0.26-2.83)	0.821
	Poor responders	14	11 (78.6)	2 (14.3)	1 (7.1)		24 (85.7)	4 (14.3)		
<b>GDF9</b> (646G>A)	Normal responders	52	<b>GG</b> 52 (100)	<b>AG</b> 0 (0)	<b>AA</b> 0 (0)	c	<b>G</b> 104(100)	<b>A</b> 0 (0)	c	c
	Poor responders	14	14 (100)	0 (0)	0 (0)		28 (100)	0 (0)		
<b>FSHR</b> (680; N to S)	Normal responders	52	<b>NN</b> 18 (34.6)	<b>NS</b> 25 (48.1)	<b>SS</b> 9 (17.3)	0.259	<b>N</b> 61 (58.7)	<b>S</b> 43 (41.3)	1.41 (0.61-3.27)	0.410
	Poor responders	14	2 (14.3)	10 (71.4)	2 (14.3)		14 (50.0)	14 (50.0)		
<b>LH</b> (CODON 8)	Normal responders	52	<b>TT</b> 45 (86.5)	<b>TC</b> 7 (13.5)	<b>CC</b> 0 (0)	0.520	<b>T</b> 97 (93.3)	<b>C</b> 7 (6.7)	0.51 (0.06-4.35)	0.541
	Poor responders	14	13 (92.9)	1 (7.1)	0 (0)		27 (96.4)	1 (3.6)		
<b>LH</b> (CODON 15)	Normal responders	52	<b>TT</b> 45 (86.5)	<b>TC</b> 7 (13.5)	<b>CC</b> 0 (0)	0.520	<b>T</b> 97 (93.3)	<b>C</b> 7 (6.7)	0.51 (0.06-4.35)	0.541
	Poor responders	14	13 (92.9)	1 (7.1)	0 (0)		27 (96.4)	1 (3.6)		
<b>LHR</b> (N to V)	Normal responders	51	<b>NN</b> 31 (61.5)	<b>NV</b> 18 (34.6)	<b>VV</b> 2 (3.8)	0.903	<b>N</b> 80 (78.4)	<b>V</b> 22 (21.6)	0.82 (0.28-2.43)	0.729
	Poor responders	14	9 (64.5)	4 (28.6)	1 (7.1)		22 (78.5)	5 (21.5)		
<b>AMH</b> (T to G)	Normal responders	52	<b>TT</b> 30 (57.7)	<b>TG</b> 21 (40.4)	<b>GG</b> 1 (1.9)	0.206	<b>T</b> 81 (77.9)	<b>G</b> 23 (22.1)	1.95 (0.79-4.81)	0.144
	Poor responders	14	5 (35.7)	8 (57.1)	1 (7.1)		18 (64.3)	10 (35.7)		
<b>AMH-R</b> (A to G)	Normal responders	52	<b>AA</b> 41 (78.8)	<b>AG</b> 11 (21.1)	<b>GG</b> 0 (0)	0.117	<b>A</b> 93 (89.4)	<b>G</b> 11 (10.6)	2.30 (0.76-6.91)	0.136
	Poor responders	14	9 (64.3)	4 (28.6)	1 (7.1)		22 (78.5)	6 (21.5)		
<b>BMP15</b> (C to G)	Normal responders	52	<b>CC</b> 33 (63.5)	<b>CG</b> 16 (30.8)	<b>GG</b> 3 (5.8)	0.506	<b>C</b> 82 (78.9)	<b>G</b> 22 (21.1)	1.01 (0.36-2.81)	0.975
	Poor responders	14	8 (57.1)	6 (42.9)	0 (0)		22 (78.5)	6 (21.5)		

<sup>a</sup> Monte Carlo test<sup>b</sup>C: cytosine, T: thymine, A: adenine, G: guanine<sup>c</sup> No statistics are computed because GDF9 646G>A is a constant

**TABLE 5**

Logistic regression analysis of the influence of each polymorphism

Unstandardized coefficients B	Standardized Coefficients	Beta	95% Confidence interval for B
<b>Constant</b>	<b>3.087</b>	<b>0.393</b>	<b>21.916</b>
GDF9 398	-1.361	0.039	0.257 (0.070-0.935)
GDF9 447C>T	0.841	0.113	2.318 (0.820-6.555)
GDF9 546G>A	0.675	0.296	1.964 (0.554-6.968)
FSHR 680	-0.937	0.077	0.392 (0.139-1.107)
LH CODON 8	0.263	0.678	1.301 (0.376-4.498)
LHR	0.344	0.631	1.410 (0.346-5.730)
AMH	-0.371	0.371	0.690 (0.306-1.555)
AMHR	0.110	0.810	1.116 (0.457-2.723)
BMP15	0.275	0.675	1.316 (0.364-4.759)

## **9. ARTIGO 2: Influence of GDF9 polymorphisms in follicular dynamics in patients undergoing in vitro fertilization**

Artigo submetido à revista Fertility and Sterility.

**Title page:**

**Influence of GDF9 polymorphisms in follicular dynamics in patients  
undergoing in vitro fertilization**

## Abstract

**Objective:** The objective of this study was to assess the influence of growth differentiation factor-9 (GDF9) polymorphisms in patients undergoing in vitro fertilization.

**Design:** Cross sectional prospective study design.

**Setting:** The setting for this study was a fertility center.

**Patients:** Sixty-seven women undergoing in vitro fertilization (IVF) treatments using r-FSH and recombinant GnRH antagonist protocol were included in the study.

**Intervention(s):** We performed DNA extraction of peripheral blood, followed by polymerase chain reaction (PCR) to amplify the region of interest in the GDF9 gene.

**Main outcome:** We sequenced four polymorphisms of GDF9 and analyzed their influences on patients undergoing IVF.

**Results:** Women with the mutant allele 447C>T gene of GDF9 had a smaller number of follicles between 12 and 14 mm on the day of r-hCG administration (1.62 vs. 2.46, mutant vs. normal allele, respectively,  $P=0.007$ ). In addition, women with the mutant allele 398C>G gene of GDF9 had a smaller number of follicles at least 17 mm on the day of r-hCG administration (4.33 vs. 6.49, mutant vs. normal allele, respectively,  $P=0.001$ ), a smaller number of follicles between 12 and 14 mm on the day of r-hCG administration (1.42 vs. 2.25, mutant vs. normal allele,  $P=0.017$ ), a lower number of follicles on the day of r-hCG administration (7.33 vs. 10.11, mutant vs. normal allele,  $P=0.007$ ), and a lower number of total MII oocytes retrieved (5.38 vs. 8.84, mutant vs. normal allele, respectively  $P=0.017$ ).

**Conclusions:**

Polymorphisms in the GDF9 gene significantly influence oocyte development. The presence of mutant alleles 447C>T and 398C>G decrease the total number of mature follicles and the total number of oocytes collected from patients undergoing ovulation induction for IVF. This finding shows that in addition to playing a role in the early stages of folliculogenesis, this member of the transforming growth factor- $\beta$  (TGFB) family also has an important influence on the final stage of oocyte development.

**Keywords:** GDF9, polymorphism, in vitro fertilization, oocyte, follicle retrieval

## **Manuscript:**

### **Introduction**

The role of oocyte-derived growth factors in either up- or down-regulating fertility is an exciting paradigm in reproduction biology. Factors such as GDF9 and BMP15 are known to influence the growth and depletion rates of follicles (1-2). The genetic variants of these factors are associated with abnormal follicular loss and may result in premature ovarian failure (POF) (2). GDF9, a member of the transforming growth factor- $\beta$  (TGFB) super family, is an oocyte-derived factor that is preferentially expressed in the oocytes of humans and mice.

Because GDF9 plays a pivotal role during early folliculogenesis, the deletion of GDF9 in the mouse causes follicular arrest at the primary stage and infertility (3). In mammals, oocytes preferentially express GDF9 within the ovary, and the GDF9 signals to the surrounding somatic cells are necessary for ovarian folliculogenesis(4). GDF9-deficient female mice are completely infertile because of multiple defects in the ovary, including blocks in folliculogenesis at the primary stage, degenerated oocytes, impaired granulosa cell differentiation and increased follicle-stimulating hormone levels (3). In contrast, GDF9 knockout male mice are unaffected (5). GDF9 stimulates granulosa cell proliferations (6), cumulus expansion (7), and cumulus cell expansion (7); GDF9 also inhibits follicular apoptosis (5) and enhances oocyte and embryo development (8-9).

These data suggest that the disruption of the GDF9 gene may prevent folliculogenesis and oogenesis, resulting in ovarian failure. Consistent with these results, GDF9 mutations are related to abnormal reproductive phenotypes in women, including POF (10-12), polycystic ovary syndrome (13) and dizygotic twinning (14).

Several genetic variants of GDF9 have recently been identified, and their correlations with POF suggest that these variants may contribute to aberrant follicular development and oocyte loss (12, 15-16). At least two studies have suggested an association between GDF9 polymorphisms and controlled ovarian hyperstimulation outcomes (17-18); however these studies investigated a specific Chinese poor responder population undergoing in vitro fertilization (IVF) treatment.

In this study, we investigated the possible influence of the 398C>G, 447C>T, 546G>A and 646G>A polymorphisms of GDF9 in the follicular dynamics during the ovarian stimulation in IVF cycles using r-FSH and recombinant GnRH.

## **Materials and methods**

### **Ethical approval**

All participants provided written informed consent. The study was approved by the Ethics Committee at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **Subjects**

Patients requiring IVF were prospectively selected at the Pronatus Center of Reproductive Medicine. All patients who satisfied the inclusion and exclusion criteria were invited to participate in the study and signed an informed consent.

### **Inclusion criteria**

Women between 20 and 39 years of age with both ovaries and no previous IVF treatment or male or tubal factor infertility were eligible for the study.

**Exclusion criteria**

Women older than 40 years of age with only one ovary or previous ovarian surgery, previous chemotherapy or abnormal karyotypes were excluded from the study.

**Ovarian stimulation**

The ovarian stimulation protocol included recombinant FSH (r-FSH, Puregon/Organon), recombinant GnRH antagonist (r-GnRH antagonist, Orgalutran 0.25 mg/d, Organon) and recombinant hCG (r-hCG, Ovidrel 250 mcg, Serono). All patients underwent an antral follicle count on day 2 or 3 of the menstrual cycle; in addition, as well as FSH, LH, estradiol assays were performed. Medication was then initiated with r-FSH. The patients were advised to use 200 IU per day for the first 3 days followed by 150 IU per day until the last stimulation day. After cycle day 6, a transvaginal ultrasound was performed every two days to monitor the follicle development. Based on the ultrasound results, the dose of r-FSH was optimally adjusted for the number and size of developing follicles. The recombinant GnRH antagonist was administered daily by subcutaneous injection from stimulation cycle day 6 until the day of r-hCG administration. The r-GnRH antagonist and r-FSH were administered continuously until at least 3 follicles were at least 17 mm. Estradiol, progesterone and LH assays were performed when the oocyte maturation was stimulated with r-hCG. Oocyte retrieval was scheduled 35 h after the r-hCG injection; micronized progesterone and transdermal estrogen were then administered as luteal support during the cycles in which embryo transfers were performed.

## **DNA preparation**

DNA was extracted from 350  $\mu\text{L}$  of peripheral blood collected in EDTA using the Easy-DNA commercial kit (Invitrogen, UK) protocol; the DNA concentration and purity were determined by spectrophotometer NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies Inc., USA). The DNA was used for the analysis of polymorphisms in the GDF9 genes.

## **Detection of polymorphisms of GDF9**

Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the region of interest in the GDF9 genes. The forward and reverse primers delimit the region in which the polymorphisms are located (see **TABLE 1**). Amplification of DNA at a concentration of 200 ng/ $\mu\text{L}$  was performed in a thermocycler Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) with Invitrogen (UK) reagents. The following annealing temperatures were applied: LHR, 64 °C; GDF9, 63 °C; and FSHR, LH, 60 °C. The PCR products were stained with SYBR Gold (Life Technologies, USA) and verified by electrophoresis on 1.5% agarose gel. The DNA fragments showed the following sizes: LH $\beta$ , 662 base pairs; LHR, 350 base pairs; GDF9, 491 base pairs; and FSHR, 520 base pairs.

The PCR products were purified using the purification protocol PEG8000 2.5% NaCl, and the products were subjected to direct sequencing using the Sanger method with an automated sequencer (ABI 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA). The assays were performed at the Unit of Molecular and Protein Analysis (UAMP) at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The sequencing primers were used at a concentration of 4 pmol/ $\mu\text{L}$ . The results were compared with the NCBI reference sequences for GDF9 (NM\_005260.3).

## Statistics

To determine whether the sample was in Hardy-Weinberg equilibrium, a chi-square test with one degree of freedom was used to compare the observed and expected values for each genotype.

The data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Between-group differences for the normally distributed data were determined with a t-test or one-way analysis of variance (ANOVA). If a significant overall difference was found, a post hoc Bonferroni test was computed for multiple comparisons. For non-parametric data, the Mann-Whitney U-test was used for two variables, and the Kruskal-Wallis test was used for more than two variables. If a significant overall difference was found, the Bonferroni test was used for multiple comparisons. The chi-square test was performed for qualitative variables.

Statistical significance was set at 0.05. The statistical analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences 17 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## Results

The demographic data are presented in **TABLE 2**.

The Hardy-Weinberg equilibrium chi-square tests showed the following:  $P=0.51$  for GDF9 polymorphism 398C>G;  $P=0.33$  for GDF9 polymorphism 447C>T; and  $P=0.74$  for GDF9 polymorphism 546G>A.

**TABLE 3** shows the evaluation of the 447C>T polymorphism of GDF9 in patients undergoing IVF. The presence of the mutant allele significantly reduced the number of follicles between 12 and 14 mm on the day of hCG administration (2.46 vs. 1.62, normal vs. mutant allele, respectively,  $P=0.007$ ). **TABLE 4** demonstrates the

influence of the 398C>G polymorphism of GDF9 in patients undergoing IVF. We found that the presence of the mutant allele decreased the total number of follicles that were at least 17 mm on the day of r-hCG administration (6.49 vs. 4.33, normal vs. mutant allele, respectively,  $P=0.001$ ), decreased the number of follicles measuring between 12 and 14 mm on the day of r-hCG administration (2.25 vs. 1.42, normal vs. mutant allele, respectively,  $P=0.017$ ), decreased the total number of follicles on the day of r-hCG administration (7.33 vs. 10.11, normal vs. mutant allele, respectively,  $P=0.007$ ), and decreased the total number of MII oocytes retrieved (8.84 vs. 5.38, normal vs. mutant allele, respectively,  $P=0.017$ ). **TABLE 5** demonstrates the influence of the 546G>A polymorphism in patients undergoing IVF. Additionally, in both the 546G>A and 398C>G polymorphisms, we found a lower value of progesterone on the day of r-hCG administration in patients with mutant alleles of these polymorphisms. Regarding the polymorphism of GDF9 649, all studied patients were homozygous wild-type for this gene.

## Discussion

Several studies have demonstrated the influence of GDF9 in oocyte development. However, this is the first study to assess the real influence of GDF9 in patients undergoing induction for IVF. Our findings demonstrate that the 398C>G and 447C>T polymorphisms exhibit strong negative influences on the total number of follicles on the day of collection and on the number of follicles at least 17 mm and between 12 and 14 mm on the day of r-hCG administration. Most importantly, there was a decreased number of MII oocytes collected from patients with the 398C>G polymorphism.

The GDF9 gene plays a pivotal role during early folliculogenesis; the deletion of GDF9 in the mouse results in follicular arrest in the primary stage and infertility (3). In addition, GDF9 stimulates granulosa cell proliferation (6) and cumulus cell expansion (7), inhibits follicular apoptosis (5), and enhances oocyte and embryo development (8-9). In this study, we observed that the number of antral follicles was identical in patients with wild and mutant alleles in the GDF9 polymorphisms studied; however, the total number of follicles on the day of r-hCG administration and the number of oocytes retrieved were smaller in patients with the mutant allele, suggesting that the polymorphism of GDF9 greatly influences oocyte development in all stages of folliculogenesis.

In vitro studies using the recombinant GDF9 protein have clarified the biological role and importance of GDF9 actions in follicle growth and development at all stages of folliculogenesis. In the preantral stage, GDF9 has been shown to be effective in stimulating growth of in vitro cultured preantral follicles (19). GDF9 also promotes early preantral follicle growth in human ovaries (20). In the transition to the antral stage,

GDF9 appears to promote follicular survival by suppressing granulosa cell apoptosis and follicular atresia (5).

GDF9 also plays an important role during the final stages of follicle growth prior to ovulation. Prior to the LH surge, cumulus cells require GDF9 to support the metabolic cascades, such as glycolysis and sterol biosynthesis (21). GDF9 also regulates diverse processes and gene expression during the pre ovulatory stage (22); GDF9 enhances cumulus cell expansion in the presence of FSH (23) but not in the absence FSH (24). Animal models, as well as in vitro and human studies, have revealed the role of GDF9 in regulating follicular development, but little is known about the ovarian function of GDF9 in humans. However, studies have demonstrated strong correlations between the GDF9 polymorphism and diminished ovarian reserve, poor response to treatment and poor IVF outcomes (17-18), which suggests that the GDF9 gene plays an important role in determining ovarian reserve status and functions. These data reinforce the present findings; for women with and without GDF9 polymorphisms, there was no difference in the number of antral follicles, but there was a difference in the numbers of follicles measuring between 12 and 14 mm and those measuring at least 17 mm on the day of r-hCG administration, as well as the total number of oocytes retrieved. These results demonstrate the influence of GDF9 in follicular development.

The present study found a strong negative association between the 398C>G and 447C>T polymorphisms of GDF9 and the total number of follicles on the day of collection, as well as the number of follicles at least 17 mm and the number of follicles between 12 and 14 mm on the day of r-hCG administration. Most importantly, we observed a decreased number of MII oocytes collected from patients with the GDF9 polymorphism 398C>G.

Although we found a lower number of follicles and MII oocytes after ovulation induction, no difference in the number of antral follicle count at the start of the ovulation induction was demonstrated. This finding suggests that these polymorphisms could influence negatively on follicular growth, causing highest follicular apoptosis, follicular atresia and diminished the expression of FSHR in granulosa cells, that is a fundamental step on dependent FSH phase for the follicular growth (8,9).

Furthermore, we found that the presence of these polymorphisms reduces the progesterone levels on the day of r-hCG. Previous study already demonstrated that lower progesterone levels on the day of hCG was associated with a lower ovarian response, however this is the first study that demonstrate it in patients that have had used protocol with GnRH antagonist (26). We observed in our study that the presence of GDF9 polymorphisms was associated with lower serum progesterone levels without changing the serum LH levels. So, we can concluded that these polymorphisms exert a negatively influence in the final stage of follicular development, regardless of mechanism of action of LH (8,9,26).

We must note that the patients who participated in the study were comprised relatively young women in an ethnically heterogeneous population. These suggest that the GDF9 polymorphisms may be used as a biomarker in patients undergoing ovarian

stimulation for IVF cycles may predict the ovarian response in heterogeneous populations.

We conclude that polymorphisms in the GDF9 gene have a significant influence on oocyte development, as the presence of mutant alleles 447C>T and 398C>G decrease the total number of mature follicles and the total number of oocytes collected from patients undergoing ovulation induction for IVF. This finding shows that in addition to playing a role in the early stages of folliculogenesis, these members of the TGFB family also have an important influence on the final stage of oocyte development.

**Acknowledgements**

We are grateful for the financial support provided by the Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

## References

1. Simoni M, Tempfer CB, Destenaves B, Fauser BC. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: Polycystic ovary syndrome and ovarian response. *Hum Reprod Update*. 2008 Sep-Oct;14(5):459-84.
2. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev*. 2009 Aug;30(5):465-93.
3. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 1996 Oct 10;383(6600):531-5.
4. McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol*. 1995 Jan;9(1):131-6.
5. Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, et al. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol Endocrinol*. 2006 Oct;20(10):2456-68.
6. Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJ. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod*. 2000 Feb;62(2):370-7.
7. Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*. 2001 Jun;15(6):854-66.
8. Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol*. 2006 Aug 15;296(2):514-21.
9. Yeo CX, Gilchrist RB, Thompson JG, Lane M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Hum Reprod*. 2008 Jan;23(1):67-73.
10. Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod*. 2004 Apr;70(4):900-9.
11. Dixit H, Rao LK, Padmalatha V, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, et al. Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure. *Menopause*. 2005 Nov-Dec;12(6):749-54.
12. Chand AL, Ponnampalam AP, Harris SE, Winship IM, Shelling AN. Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2006 Oct;86(4):1009-12.
13. Sun RZ, Lei L, Cheng L, Jin ZF, Zu SJ, Shan ZY, et al. Expression of GDF-9, BMP-15 and their receptors in mammalian ovary follicles. *J Mol Histol*. 2010 Dec;41(6):325-32.

14. Palmer JS, Zhao ZZ, Hoekstra C, Hayward NK, Webb PM, Whiteman DC, et al. Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Nov;91(11):4713-6.
15. Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol.* 2006 May;154(5):739-44.
16. Kovanci E, Rohozinski J, Simpson JL, Heard MJ, Bishop CE, Carson SA. Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 2007 Jan;87(1):143-6.
17. Wang TT, Wu YT, Dong MY, Sheng JZ, Leung PC, Huang HF. 546G>A polymorphism of growth differentiation factor-9 contributes to the poor outcome of ovarian stimulation in women with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2010 Nov;94(6):2490-2.
18. Wang TT, Ke ZH, Song Y, Chen LT, Chen XJ, Feng C, et al. Identification of a mutation in GDF9 as a novel cause of diminished ovarian reserve in young women. *Hum Reprod.* 2013 Sep;28(9):2473-81.
19. Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, et al. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology.* 1999 Mar;140(3):1236-44.
20. Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jan;87(1):316-21.
21. Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev Biol.* 2005 Mar 1;279(1):20-30.
22. Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 29;97(18):10288-93.
23. Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol Endocrinol.* 1999 Jun;13(6):1018-34.
24. Dragovic RA, Ritter LJ, Schulz SJ, Amato F, Armstrong DT, Gilchrist RB. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology.* 2005 Jun;146(6):2798-806.
25. Xu B, Li Z, Zhang H, Jin L, Li Y, Ai J, Zhu G. Serum progesterone level effects on the outcome of in vitro fertilization in patients with different ovarian response: an analysis of more than 10,000 cycles. *Fertil Steril.* 2012 June;97:1321-7.

**TABLE 1**

Polymorphic genes.

Gene	Chromosome	Polymorphism	Molecular biology techniques	Primer <sup>a</sup>
GDF9	5	c.398-39 C>G (intron) p.Thr149Thr (c.447C>T) p.Glu186Glu (c.546G>A) p.Val216Met (c.646G>A)	Direct sequencing	Forward: 5' TTGACTTGACTGCCTGTTGTG 3' Reverse: 5' AGCCTGAGCACTTGTGTCATT 3'  Reverse: 5' AAAGGCAAGGACTGAATTATCATT 3'

<sup>a</sup>C: cytosine; T: thymine; A: adenine; G: guanine.

**TABLE 2**  
Demographic characteristics of patients.

Parameter	Mean	Standard deviation (SD)
Age (years)	35.35	4.03
Infertility (years)	4.22	3.22
Menstrual cycles (days)	28.9	3.64
Ethnic origin		
Caucasian (%)	29 (43.9)	
Hispanic (%)	36 (54.5)	
Afro-American (%)	1 (1.5)	
Pregnancy (N)	0.48	0.84
BMI <sup>a</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	24.1	3.28
Weight (Kg)	63.9	9.88
Height (m)	1.62	0.06

<sup>a</sup> BMI: Body mass index.

**TABLE 3**  
**Influence of the C447 polymorphism of GDF9 in patients undergoing IVF.**

Parameter	Genotypes <sup>c</sup>			P value <sup>a</sup>	Post Hoc P value <sup>d</sup>	Alleles <sup>c</sup>		P value <sup>b</sup>
	TT (20)	CT (29)	CC (17)			T (69)	C (63)	
Menstrual cycles (days)	28.5	30.0	27.5	0.128	-	29.2	28.7	0.518
BMI <sup>f</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	25.2	23.5	23.8	0.229	-	24.5	23.7	0.164
Antral follicles (N)	12.4	9.7	10.0	0.199	-	11.2	9.9	0.139
Days of induction (N)	9.3	9.2	10.2	0.151	-	9.28	9.78	0.103
r-FSH UI (UI)	1581	1466	1455	0.457	-	1532	1460	0.239
Endometrial thickness (mm)	9.7	9.9	9.3	0.558	-	9.82	9.64	0.586
Follicles at least 17 mm on day of r-hCG (N)	6.75	5.86	5.53	0.574	-	6.38	5.68	0.280
Follicles between 14 and 16 mm on day of r-hCG (N)	2.85	2.45	3.47	0.320	-	2.68	3.00	0.413
Follicles between 12 and 14 mm on day of r-hCG (N)	2.80	2.00	1.29	0.037	<sup>e</sup> 0.356 <sup>f</sup> 0.033	2.46	1.62	0.007
Total number of follicles (N)	10.40	8.79	9.76	0.637	-	9.72	9.32	0.696
Total number of oocytes (N)	11.00	9.59	10.47	0.822	-	10.41	10.06	0.803
MII oocyte (N)	9.05	7.31	8.41	0.644	-	8.32	7.90	0.714
MI oocyte (N)	0.60	0.79	0.76	0.842	-	0.68	0.78	0.632
VG oocyte (N)	1.10	1.24	0.88	0.795	-	1.16	1.05	0.708
FSH on day 3 of menstrual cycle	6.83	5.02	5.55	0.460	-	5.99	5.28	0.408
E2 on day 3 of menstrual cycle	75.88	48.67	53.34	0.188	-	63.24	51.09	0.172
LH on day 3 of menstrual cycle	4.33	4.28	4.99	0.782	-	4.31	4.63	0.578
HAM	1.23	1.75	1.87	0.621	-	1.45	1.82	0.341
LH on day of r-hCG	1.75	1.56	1.56	0.951	-	1.67	1.56	0.578
Progesterone on day of r-hCG	1.27	0.78	0.52	0.245	-	1.06	0.64	0.072
E2 on day of r-hCG	1172	1072	1320	0.672	-	1129	1199	0.652

<sup>a</sup> Analysis of variance (ANOVA).

<sup>b</sup> T-test.

<sup>c</sup> T: thiamine; G: guanine.

<sup>d</sup> Bonferroni test.

<sup>e</sup> Difference between TT and CT.

<sup>f</sup> Difference between TT and CC.

**TABLE 4**  
**Influence of the 398C>G polymorphism of GDF9 in patients undergoing IVF.**

Parameter	Genotypes <sup>c</sup>			<i>P</i> value <sup>a</sup>	Post Hoc <i>P</i> value <sup>d</sup>	Alleles <sup>c</sup>		<i>P</i> value <sup>b</sup>
	CC (44)	CG (18)	GG (3)			C (106)	G (24)	
Menstrual cycles (days)	29.2	28.6	26.3	0.406	-	29.1	28.0	0.888
BMI <sup>f</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	24.5	23.5	23.4	0.593	-	24.3	23.5	0.302
Antral follicles (N)	11.5	9.06	9.00	0.214	-	11.1	9.04	0.084
Days of induction (N)	9.4	9.7	8.6	0.589	-	9.53	9.50	0.944
r-FSH UI (UI)	1559	1365	1450	0.142	-	1526	1386	0.079
Endometrial thickness (mm)	9.7	9.5	9.8	0.929	-	9.75	9.65	0.826
Follicle at least 17 mm on day of r-hCG (N)	6.95	4.22	4.67	0.021	<sup>e</sup> 0.022 <sup>f</sup> 0.84 4	6.49	4.33	0.001
Follicle between 14 and 16 mm on day of r-hCG (N)	3.11	2.11	3.33	0.254	-	2.94	2.42	0.293
Follicle between 12 and 14 mm on day of r-hCG (N)	2.41	1.44	1.33	0.120	-	2.25	1.42	0.017
Total follicles (N)	10.77	6.89	8.67	0.049	<sup>e</sup> 0.049 <sup>f</sup> 0.87 3	10.11	7.33	0.032
Total oocyte (N)	11.68	7.33	9.00	0.134	-	10.94	7.75	0.048
MII oocyte (N)	9.55	5.39	5.33	0.048	<sup>e</sup> 0.049 <sup>f</sup> 0.79 6	8.84	5.38	0.017
MI oocyte (N)	0.60	0.79	0.76	0.151	-	0.69	0.96	0.400
VG oocyte (N)	1.10	1.24	0.88	0.964	-	1.12	1.13	0.995
FSH on day 3 of menstrual cycle	6.83	5.02	5.55	0.165	-	5.47	5.99	0.633
E2 on day 3 of menstrual cycle	61.35	49.89	56.63	0.729	-	59.21	51.73	0.506
LH on day 3 of menstrual cycle	4.79	4.04	2.76	0.440	-	4.65	3.67	0.180
HAM	1.51	2.15	0.56	0.404	-	1.63	1.75	0.802
LH on day of r-hCG	1.47	2.27	0.90	0.351	-	1.93	1.59	0.495
Progesterone on day of r-hCG	1.04	0.54	0.23	0.347	-	0.96	0.47	0.003
E2 on day of r-hCG	24.5	1043	672	0.629	-	1108	1194	0.678

<sup>a</sup> Analysis of Variance (ANOVA).

<sup>b</sup> T-test.

<sup>c</sup> C: cytosine; G: guanine.

<sup>d</sup> Bonferroni test.

<sup>e</sup> Difference between CC and CG.

<sup>f</sup> Difference between CC and GG.

**TABLE 5**  
**Influence of GDF9 polymorphism of 546G>A in patients undergoing IVF.**

Parameter	Genotypes <sup>c</sup>			P value <sup>a</sup>	Post Hoc P value <sup>d</sup>	Alleles <sup>c</sup>		P value <sup>b</sup>
	GG (47)	GA (17)	AA (3)			G (99)	A (33)	
Menstrual cycles (days)	29.2	27.8	29.5	0.491	-	28.2	29.3	0.408
BMI <sup>f</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	24.4	23.0	24.9	0.354	-	24.2	23.4	0.336
Antral follicles (N)	10.6	10.5	10.5	0.996	-	10.6	10.5	0.927
Days of induction (N)	9.3	10.0	10.0	0.298	-	9.41	10.05	0.133
r-FSH UI (UI)	1495	1541	1200	0.436	-	1502	1476	0.752
Endometrial thickness (mm)	9.7	9.6	9.7	0.985	-	9.74	9.67	0.874
Follicle at least 17 mm on day of r-hCG (N)	5.70	6.88	7.00	0.499	-	5.88	6.90	0.244
Follicle between 14 and 16 mm on day of r-hCG (N)	2.51	3.65	3.50	0.174	-	2.68	3.62	0.073
Follicle between 12 and 14 mm on day of r-hCG (N)	2.02	2.12	2.50	0.926	-	2.04	2.19	0.720
Total number of follicles (N)	8.81	11.12	13.00	0.270	-	9.16	11.48	0.097
Total number of oocytes (N)	9.74	11.35	12.50	0.712	-	9.99	11.57	0.397
MII oocyte (N)	7.43	9.82	10.00	0.395	-	7.79	9.86	0.179
MI oocyte (N)	0.68	0.76	1.50	0.618	-	0.90	0.69	0.444
VG oocyte (N)	1.26	0.76	0.50	0.533	-	0.71	1.18	0.252
FSH on day 3 of menstrual cycle	5.75	5.60	2.60	0.785	-	5.73	5.22	0.673
E2 on day 3 of menstrual cycle	61.68	46.95	43.60	0.557	-	59.44	46.21	0.271
LH on day 3 of menstrual cycle	4.16	4.36	16.90 <sup>x</sup>	0.000	<sup>x</sup>	4.19	5.92	0.029
HAM	1.58	1.65	2.45	0.862	-	1.60	1.81	0.686
LH on day of r-hCG	1.85	1.16	1.00	0.446	-	1.72	1.14	0.224
Progesterone on day of r-hCG	0.99	0.57	0.30	0.491	-	0.92	0.53	0.025
E2 on day of r-hCG	1106	1184	2800	0.093	-	1119	1386	0.204

<sup>a</sup> Analysis of Variance (ANOVA).

<sup>b</sup> T test.

<sup>c</sup> G: guanine; A: adenine.

<sup>d</sup> Bonferroni test.

<sup>x</sup> Post hoc tests were not performed for LH on day 3 of the menstrual cycle because at least one group had fewer than two cases.

## 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS (CONCLUSÕES)

Após os resultados dos nossos estudos, conclui-se:

- 1- Os polimorfismos no gene de GDF9 tem uma influência significativa sobre o desenvolvimento dos oócitos, pois a presença de alelos mutantes 398C>G e 447C>T diminuíram o número total de folículos maduros e o número total de oócitos obtidos a partir de pacientes submetidos à indução da ovulação para FIV.
- 2- Os polimorfismos no gene de GDF9 398C>G e 447C>T estão associados a pacientes pobre respondedoras. Isso mostra que este membro da família TGFβ além de atuar nas fases iniciais da foliculogênese também tem uma influência importante sobre a fase final do desenvolvimento do oócito.
- 3- O polimorfismo no gene do GDF9 398C>G parece exercer uma influência importante no desenvolvimento do oócito. Estes polimorfismos poderão ser usados como marcadores a ser considerados na avaliação de pacientes submetidos à estimulação ovariana para fertilização *in vitro* visando à adequação da medicalização e, portanto, melhor relação custo-efetiva na individualização do tratamento.
- 4- A presença dos polimorfismos nos genes do GDF9 398C>G e 546G>A está associada a um nível sérico menor de progesterona no dia da maturação folicular com r-hCG, podendo influenciar na qualidade da maturação oocitária.
- 5- Os outros genes estudados: gene do receptor do FSH (Ser680Asn), LH (Trp8Arg e Ile15Thr), nos gene do AMH (Ile49Ser), receptor do AMH (A>G – 482), da BMP15 (- 673C/T, -9C/G, IVSI+905A/G) e da GDF9 (546G/A e 646 G>A) não foram associados à pobre resposta ovariana, nem ao número total de MII de acordo com nossa hipótese nula.

## 11. PERSPECTIVAS

A diminuição da reserva ovariana afeta um significativo número de mulheres com infertilidade, entretanto na maioria dos casos a etiologia permanece obscura. Diante deste contexto, vem se intensificando as pesquisas para podermos compreender estes mecanismos de crescimento oocitário. Cada vez mais polimorfismos genéticos, mutações e fatores epigenéticos tem sido associados com resposta ovariana anormal.

Nosso estudo demonstrou que o polimorfismo do GDF9 está associado à pacientes consideradas pobres respondedoras e ao menor número de oócitos MII coletados. Diante disto, a criação de um painel de testes incluindo o polimorfismo do GDF9 poderá ser desenvolvido para podermos utilizar como rastreamento e avaliação prognóstica para tais pacientes antes de a mesma ser submetidas à indução ovulatória para FIV.

Além da utilização destes polimorfismos como um painel de marcador prognóstico e de resposta ovariana, nossa perspectiva é avançar neste caminho com estudos funcionais para maior compreensão destes mecanismos. Sendo conhecido que a taxa de desenvolvimento folicular e ovulação é determinada por um conjunto de sinais endócrinos coordenados entre a hipófise, ovário e por sinais parácrinos entre o ovócito e as células somáticas adjacentes, ou seja, células da teca e da granulosa e sabendo que os membros da superfamília TGF $\beta$ , GDF9 e BMP15, importantes fatores parácrinos (e possivelmente autócrinos) derivados do oócito e com papel essencial para o desenvolvimento normal de folículos primordiais e antrais torna-se fundamental o desenvolvimento de estudos para a melhor compreensão dos mecanismos funcionais pelos quais a GDF9 e seus polimorfismos genéticos atuam na função ovariana. Além do objetivo de compreensão destes mecanismos, estes estudos funcionais terão o objetivo também de procurarmos mecanismos de reversão e tratamento para este grupo singular de pacientes.

Além do mais, dada a importância dos fatores de crescimento oocitários no fenótipo das células do cúmulus, mais informações sobre o papel destes fatores durante o crescimento folicular e desenvolvimento oocitário proporcionará avanços na terapêutica no manejo da infertilidade, assim como nossa compreensão de como melhor avaliar a qualidade oocitária.