

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e

Obstetrícia

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO *IN SILICO* PARA RESPOSTA  
OVARIANA RELACIONADA A FATORES NÃO DEMOGRÁFICOS**

Bárbara Schneider Eisele

Porto Alegre, 2019

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e

Obstetrícia

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO *IN SILICO* PARA RESPOSTA  
OVARIANA RELACIONADA A FATORES NÃO DEMOGRÁFICOS**

Bárbara Schneider Eisele

Orientador: Prof. Dr. João Sabino  
Lahorgue Cunha-Filho

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

Porto Alegre, 2019

## AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia estar aqui sem o apoio de algumas pessoas.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor João Sabino Lahorgue da Cunha-Filho, por todo o tempo e paciência que dedicou à minha formação e, acima de tudo, a motivação de que podemos ser cada vez melhores e nos desafiar a cada tentativa.

Agradeço também a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia.

Por último, e mais importante, quero agradecer aos meus pais, Cassandra e Rogério (*in memoriam*) que me deram a vida, me incentivaram sempre a estudar e buscar o meu melhor.; à minha irmã, Geórgia, pela compreensão da minha ausência; e ao meu namorado, Guilherme, pela paciência, companheirismo e carinho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	10
RESUMO E PALAVRAS-CHAVE.....	11
ABSTRACT AND KEYWORDS.....	13
INTRODUÇÃO .....	14
REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1. Estratégia de busca.....	17
2. Mapa conceitual .....	17
3. Estimulação ovariana controlada.....	17
4. Resposta ovariana à estimulação controlada.....	18
4.1. Preditores da resposta ovariana .....	18
4.1.1. AMH and AMHR2.....	19
4.1.2. APOB .....	19
4.1.3. Receptor androgênico.....	20
4.1.4. v-betaLH.....	20
4.1.5. BMP15 .....	21
4.1.6. CA125 .....	21
4.1.7. CYP19.....	22
4.1.8. Estrogênios e ESR 1 e 2.....	22
4.1.9. EGF.....	23
4.1.10. FSH e FSHR .....	23
4.1.11. GDF9 .....	24
4.1.12. HRG .....	24
4.1.13. IGF1, IGFBP1, IGFBP3 e IGFBP4 .....	24
4.1.14. IL1 $\beta$ (interleucina1 $\beta$ ) e TNF $\alpha$ (fator de necrose tumoral $\alpha$ ) ....	25
4.1.15. Inibina B .....	25

4.1.16.	KDR .....	26
4.1.17.	Leptina .....	26
4.1.18.	LH, LHR e LHCGR.....	26
4.1.19.	miRNA.....	26
4.1.20.	MIS.....	27
4.1.21.	MTHFR.....	27
4.1.22.	NOTCH .....	28
4.1.23.	PAPP-A.....	28
4.1.24.	Progesterona.....	28
4.1.25.	PUFA .....	29
4.1.26.	SHBG .....	29
4.1.27.	VEGF, sVEGFR1 e VEGFR2.....	29
4.1.28.	Testosterona .....	30
4.1.29.	TP73 .....	30
ARTIGOS INCLUÍDOS.....		31
ANÁLISE <i>IN SILICO</i> .....		37
JUSTIFICATIVA .....		40
HIPÓTESES.....		41
Hipótese nula .....		41
Hipótese alternativa .....		41
OBJETIVOS .....		42
Objetivo principal.....		42
Objetivos secundários.....		42
REFERÊNCIAS.....		45
ARTIGO.....		62

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFC - Contagem de Folículos Antrais

AMH – Hormônio Antimulleriano

AMHR – Receptor do Hormônio Antimulleriano

APOB – Apolipoproteína B

BMP-15 - Proteína Morfogenética Óssea do Tipo 15

CA-125 - *Cancer Antigen 125*

CFA – Contagem de folículos antrais

CG – Células da Granulosa

CYP19 – Aromatase

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

EOC – Estimulação Ovariana Controlada

ESR – Receptores de Estrogênio

FF – Fluido Folicular

FIV – Fertilização In Vitro

FOP – Falência Ovariana Precoce

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

FSHR – Receptor de FSH

GDF-9 - Fator de Diferenciação do Crescimento-9

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

HCG - Gonadotrofina Coriônica Humana

HMG – Gonadotrofina Menopáusicas Humana

HRG – Glicoproteína Rica em Histidina

IDL – Lipoproteína de Densidade Intermediária

IGF1 - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IGFBP – Proteína Ligadora do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IL1 $\beta$  - Interleucina1 $\beta$

KDR - *Kinase insert domain receptor*

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

LH – Hormônio Luteinizante

LHCGR - Hormônio Luteinizante/Receptor de Gonadotrofina Coriônica

LHR – Receptor do Hormônio Luteinizante

miRNA - Ácido Micro Ribonucleico

MIS - Substância Inibidora do Mülleriano

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro

MTHFR – Metilenotetrahidrofolato Redutase

OHSS - Síndrome do Hiperestímulo Ovariano

PAPP-A - Proteína Plasmática A Associada à Gravidez

PUFA - Ácidos Graxos Poliinsaturados

RA – Receptor Androgênico

recFSH – FSH Recombinante

RNA – Ácido Ribonucleico

sVEGFR – Receptor Solúvel do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SHBG - Globulina Ligadora de Hormônios Sexuais

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*

TG – Triglicerídeos

TGF – Fator de Crescimento Transformador

TNF $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

TP73 – Proteína tumoral 73

TRA – Técnicas de Reprodução Assistida

uFSH – FSH Purificado

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquematização gráfica do Mapa conceitual

Figura 2. Modelo *In Silico* STRING

Figura 3. Modelo *In Silico* STRING ampliado 1x

Figura 4. Modelo *In Silico* STRING ampliado 2x

## FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1. Flow diagram

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Artigos incluídos na revisão

## RESUMO E PALAVRAS-CHAVE

**Introdução:** O resultado esperado do tratamento de fertilização in vitro depende muito da eficácia da estimulação ovariana controlada (EOC). Vários fatores preditivos, como idade, contagem de folículos antrais, concentrações de FSH no dia 3, inibina B e hormônio anti-Mülleriano estão relacionados ao resultado individual de um ciclo de tratamento. A variabilidade genética também parece ser um fator importante na determinação da resposta ovariana na EOC e na FIV. Diferenças no genoma humano podem alterar os efeitos celulares e teciduais ao FSH, alterando assim a resposta a EOC. Através da pesquisa farmacogenômica, a terapêutica medicamentosa pode ser otimizada com base no perfil genético individual. A identificação correta de pacientes que tem risco para baixa resposta pode ajudar a individualizar o aconselhamento e permitir as pacientes decidirem a se submeter a tratamentos de infertilidade. A medicina *In Silico* é caracterizada por modelos, simulações e visualização de processos médicos e biológicos no computador, com o objetivo de simular processos biológicos reais em um ambiente virtual. **Objetivo:** Identificar proteínas e moléculas envolvidas na resposta ovariana e inserir o modelo *In Silico* para avaliação de resposta ovariana, desenvolvendo um modelo *In Silico* para resposta ovariana baseado em fatores moleculares não demográficos. **Métodos:** Uma revisão da literatura foi realizada no banco de dados PUBMED. As palavras-chave utilizadas foram: ovulation induction, in vitro fertilization, gens, biomarkers e ovarian response. Os resultados foram inseridos na base de dados STRING para desenvolvimento de um modelo *In Silico*. **Resultados:** Após a triagem de títulos e resumos, foram selecionados 144 artigos para leitura posterior. Um total de 100 estudos foram incluídos. Entre os 100 artigos, 42 biomarcadores foram identificados, além de seus polimorfismos. **Conclusão:** Nosso estudo foi o primeiro a usar o modelo *In Silico* para identificar biomarcadores que poderiam ser usados na resposta ovariana à estimulação ovariana controlada e conseguimos demonstrar uma associação entre as moléculas. No entanto, precisamos de mais estudos para avaliar outros biomarcadores, além dos encontrados em nossa pesquisa; Ensaios clínicos randomizados também são necessários para uma melhor qualidade de evidência, para que possamos melhorar a prática clínica,

individualizando o tratamento de pacientes submetidas à estimulação ovariana controlada e à reprodução assistida.

**Palavras-chave:** indução da ovulação, resposta ovariana, *In Silico*, preditores de resposta ovariana, biomarcadores

## ABSTRACT AND KEYWORDS

**Introduction:** The expected outcome of IVF treatment depends greatly on the effectiveness of controlled ovarian hyperstimulation (COH). Several predictive factors such as age, antral follicle count, day 3 FSH concentrations, inhibin B and anti-Müllerian hormone have been shown to be related to the individual outcome of a treatment cycle. Genetic variability also seems to be an important factor in determining the ovarian response in COH and IVF. Through pharmacogenomics research, drug therapy can be optimized on the basis of individual genetic profile. Correctly identifying patients who are at risk for poor response could help individualize counseling and allow patients to decide to undergo infertility treatments. The *In Silico* medicine is characterized by models, simulations and visualization of medical and biological processes on the computer, with the objective of simulating real biological processes in a virtual environment. **Objective:** To identify proteins and molecules involved in ovarian response and insert the *In Silico* model for ovarian response evaluation, developing an *In Silico* model for ovarian response based on non demographic molecular factors. **Methods:** A literature review was carried out in the PUBMED database. The keywords used were ovulation induction, in vitro fertilization, gens, biomarkers and ovarian response. The results were inserted into the STRING database for the development of an *In Silico* model. **Results:** After sorting titles and abstracts, 144 articles were selected for later reading. A total of 100 studies were included. Among the 100 articles, 42 biomarkers were identified, in addition to their polymorphisms. **Conclusion:** Our study was the first to use the *In Silico* model to identify biomarkers to be used in the ovarian response to controlled ovarian stimulation and we were able to demonstrate an association between the molecules. However, we need more studies to evaluate other biomarkers than those we found in our search; Randomized controlled trials are also needed for better quality of evidence, so we could improve clinical practice by individualizing the treatment of patients undergoing controlled ovarian stimulation and assisted reproduction.

**Keywords:** ovulation induction, ovarian response, *In Silico*, predictors of ovarian response, biomarkers

## INTRODUÇÃO

A prevalência de infertilidade está aumentando, afetando ~ 15% dos casais em idade reprodutiva, resultando em implicações médicas, sociais e financeiras significativas. Hoje, estima-se que 2-3% de todos os nascimentos em países desenvolvidos sejam resultado de procedimentos de fertilização in vitro. (Altmäe, S., 2011)

Independentemente da melhoria constante das taxas de gravidez, a taxa de sucesso na fertilização in vitro ainda permanece em torno de 30% por ciclo. O resultado esperado do tratamento de fertilização in vitro depende muito da eficácia da estimulação ovariana controlada (EOC), um procedimento de rotina precedente à fertilização in vitro, onde as gonadotrofinas exógenas são usadas para induzir o crescimento e desenvolvimento de múltiplos folículos. (Altmäe, S., 2011)

A estimulação ovariana faz parte integrante das técnicas de reprodução assistida. O número e a qualidade dos oócitos recuperados são determinantes do sucesso: mesmo que um número alto de oócitos não preveja um bom resultado, foi demonstrado que o número de oócitos fertilizados obtidos está diretamente relacionado à chance de gestação. (Keck, C., 2005)

Vários estudos demonstraram alta variabilidade no resultado clínico da EOC em mulheres. Essa variabilidade imprevisível na resposta às gonadotrofinas representa um dos maiores problemas na fertilização in vitro, com respostas péssimas a excelentes, levando ao cancelamento do ciclo e falha da fertilização in vitro ou complicações indesejadas relacionadas à síndrome de hiperestimulação ovariana iatrogênica (OHSS). Assim, a compreensão e predição da resposta ovariana à estimulação é de suma importância para o sucesso e a segurança da fertilização in vitro. (Altmäe, S., 2011)

Demonstrou-se que vários fatores preditivos, como idade, contagem de folículos antrais, concentrações de FSH no dia 3, inibina B e hormônio anti-Mülleriano estão relacionados ao resultado individual de um ciclo de tratamento. (Keck, C., 2005)

A idade é o preditor de fertilidade mais comumente usado; o aumento da idade inevitavelmente resulta em perda substancial de células germinativas aos 40 anos. As estatísticas de gravidez, nascidos vivos e taxa de nascidos vivos únicos também diminuem rapidamente a partir dos trinta anos. No entanto, embora a idade esteja claramente ligada ao declínio da fertilidade, ela não afeta todas as mulheres da mesma forma. (Alviggi, C., 2012)

Além desses parâmetros, a variabilidade genética também parece ser um fator importante na determinação da resposta ovariana na EOC e na FIV. Diferenças no genoma humano podem alterar os efeitos celulares e teciduais ao FSH, alterando assim a resposta a EOC. (Altmäe, S., 2011)

Por fim, a triagem genética pode fornecer informações específicas sobre o sistema reprodutivo da mulher que não poderiam ser obtidas com precisão através da idade ou de biomarcadores hormonais ou funcionais. Considerando biomarcadores hormonais (FSH e anti-Mülleriano [AMH]), funcionais (contagem de folículos antrais [CFA]) e genéticos em combinação, pode-se formular uma imagem completa do status reprodutivo geral de um paciente para fornecer uma base para um plano de tratamento ótimo. (Alviggi, C., 2012)

Espera-se que, através da pesquisa farmacogenômica, a terapêutica medicamentosa possa ser otimizada com base no perfil genético individual. A análise farmacogenética de mulheres submetidas a estimulação ovariana controlada (EOC) é um campo emergente na medicina reprodutiva. (de Castro, F., 2005)

O método *In Silico* é o uso direto da simulação computacional no diagnóstico, tratamento ou prevenção de uma doença. Mais especificamente, medicina *In Silico* é caracterizada por modelos, simulações e visualização de processos médicos e biológicos no computador, com o objetivo de simular processos biológicos reais em um ambiente virtual.

O modelo *In Silico*, na qual modelos computacionais são desenvolvidos para modelar um processo farmacológico ou fisiológico, é uma extensão lógica da experimentação *in vitro* controlada. É o resultado natural do aumento

explosivo do poder da computação disponível para o pesquisador com uma redução contínua de custos.

O modelo *In Silico* combina as vantagens da experimentação *in vivo* e *in vitro*, sem submeter-se às considerações éticas e à falta de controle das experiências *in vivo*. Ao contrário das experiências *in vitro*, que existem isoladamente, os modelos *In Silico* permitem que o pesquisador inclua uma variedade de parâmetros ilimitados, que tornam os resultados mais aplicáveis ao organismo como um todo. Além disso, modelos complexos *In Silico* foram aplicados a problemas fisiopatológicos para fornecer informações que não podem ser obtidas na prática ou por falta de ética nos métodos tradicionais de pesquisa clínica. Esses experimentos levaram ao desenvolvimento de percepções significativas em assuntos que vão desde a fisiologia pura até a cirurgia cardíaca congênita, via aérea de anestesia obstétrica, ventilação mecânica e dispositivos de suporte de circulação extracorpórea/ventricular. A utilidade desses modelos baseia-se tanto na validade da estrutura do modelo quanto nas suposições correspondentes. A experimentação *in vivo* validou algumas, mas não todas as estratégias empregadas no modelo *In Silico*. (Colquitt, Richard B., 2011; Geris, Liesbet.,2014)

A identificação correta de pacientes que tem risco para baixa resposta pode ajudar a individualizar o aconselhamento e permitir as pacientes decidirem a se submeter a tratamentos de infertilidade. A avaliação precisa da resposta ovariana antes da paciente entrar em programa de FIV é, portanto, de crucial importância.

Assim, a aplicação do modelo *In Silico* poderia ser utilizada, após seleção de moléculas e proteínas implicadas na resposta ovariana, para prever resposta ovariana, através da associação entre mesmas, podendo-se identificar fatores para melhor resposta em mulheres que serão submetidas à TRA.



## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Estratégia de busca

Uma revisão da literatura foi realizada no banco de dados PUBMED. As palavras-chave utilizadas foram: ovulation induction, in vitro fertilization, gens, biomarkers e ovarian response.

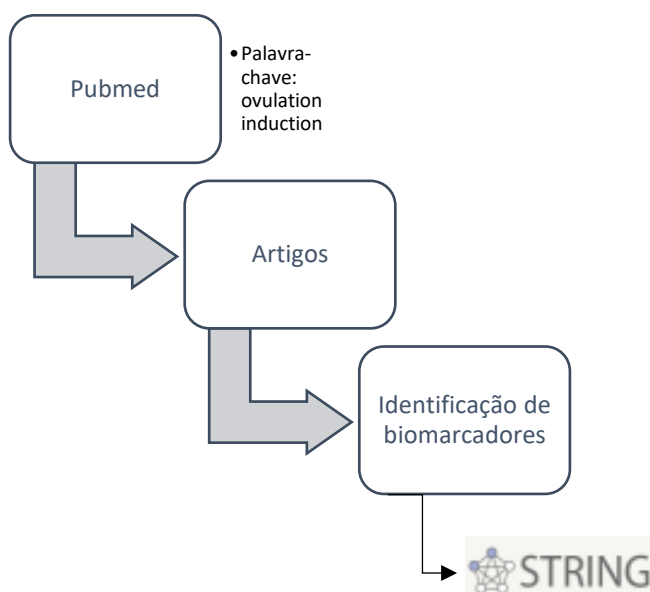
Nossa busca inicial nos levou a 15.977 artigos.

Após a triagem de títulos e resumos, selecionamos 144 artigos para leitura posterior. Um total de 100 estudos foram selecionados.

Entre os 100 artigos, 42 biomarcadores foram identificados, além de polimorfismos.

### 2. Mapa conceitual

Figura 1. Mapa conceitual esquemático



### 3. Estimulação ovariana controlada

A disfunção ovariana é a indicação mais comum para uso de medicamentos indutores da ovulação. O uso desses medicamentos para estimular o desenvolvimento folicular e a ovulação, com o intuito de coletar oócitos para TRA, é chamado de EOC (Strauss, J; Barbieri, R. L. Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology, 7ª edição, Elsevier).

O objetivo da EOC é o desenvolvimento de múltiplos folículos para obter o maior número possível de oócitos maduros para aumentar as chances de gestação com a FIV (Macklon et al, 2006).

As gonadotrofinas vêm sendo usadas para estimulação ovariana desde o início das técnicas de reprodução e foram originalmente desenvolvidas nos Estados Unidos. Há disponibilidade de preparações com Gonadotropina Menopáusica Humana (hMG), obtido da urina de mulheres pós-menopáusicas – contém hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH); FSH purificado (uFSH) e FSH recombinante (recFSH).

Diversos regimes de uso são relatados na literatura, com divergências entre dia de início das medicações no ciclo, doses, esquema “step-up” ou “down-up”, protocolos com agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ou antagonista do GnRH, entre outras. Cabe avaliação individual do perfil de efeitos adversos inerentes a cada regime adotado, baseada no desfecho desejado. (Arslan et al. 2005; Macklon et al. 2006; Fauser et al. 2008; Grisendi and La Marca 2017)

#### 4. Resposta ovariana à estimulação controlada

##### Preditores da resposta ovariana

A reserva ovariana é a base da resposta do ovário à indução da ovulação. Diversos preditores da resposta ovariana já foram estudados, como AMH, FSH basal, inibina B e AFC. Porém, nenhum desses métodos é acurado o suficiente para predizer resposta ovariana (Navot *et al*, 1987; Fanchin *et al*, 1994; Lass *et al*, 1997; Tomas *et al*, 1997; Hall *et al*, 1999; Bancsi *et al*, 2002; Broekmans *et al*, 2006; La Marca *et al*, 2010).

Um estudo italiano demonstrou que a prevalência de más respondedoras aumenta com a idade, e em mulheres acima dos 40 anos esse número seria de aproximadamente 50% (Ferraretti, AP, 2001). Entretanto, El-Toukhy *et al* (2002), mostraram que idade jovem (<ou=30 anos) não protege completamente contra má resposta.

Em relação aos testes para avaliar reserva ovariana, AFC e AMH tem a melhor sensibilidade e especificidade para prever resposta ovariana, apesar de taxas de falsos positivos em torno de 10-20% (Broekmans *et al*, 2006; Broer *et al*, 2009; La Marca *et al*, 2010). Broekmans *et al*. (2006) sugeriu a hipótese que a resposta ovariana à um primeiro ciclo de FIV poderia ser usada como substituta aos testes. Uma metanálise demonstrou que o uso combinado desses testes em relação a teste único não aumenta detecção de más respondedoras. (Verhagen *et al.*, 2008).

Mutações cromossômicas e gênicas vem sendo implicadas em estudos como redutoras da reserva ovariana, levando a menopausa precoce e resistência ovariana a gonadotrofinas durante estimulação ovariana (De Vos *et al.*, 2010).

#### 4.1.1. AMH and AMHR2

O AMH é um membro da superfamília beta do fator de crescimento transformador e é produzido pelas células da granulosa de folículos pré-antrais e por pequenos folículos antrais no ovário. É altamente expresso nos folículos em desenvolvimento, mas sua expressão diminui no estágio de seleção do folículo dominante pelo FSH. É utilizado na prática clínica como um biomarcador da reserva ovariana. O AMH é expresso nas células da granulosa e pode regular a sensibilidade ao FSH no ovário. Portanto, foi proposto que ele tivesse um papel na influência da resposta ovariana à estimulação. (Cerra, C., 2016)

O AMH tem a vantagem de ter níveis relativamente estáveis ao longo do ciclo menstrual e é mais preciso do que o FSH em fornecer informações sobre a resposta esperada do ovário à estimulação controlada. (Motawi, T.M. K., 2017)

O AMH exerce seus efeitos biológicos através do receptor AMH tipo II (AMHRII), que por sua vez ativa o receptor AMH tipo I (AMHRI) e cria uma via de sinalização. O gene humano para AMHRII está localizado no cromossomo 12, consiste em 11 éxons e é expresso nas células da granulosa e da teca. (Karagiorga, I., 2015)

#### 4.1.2. APOB

A apolipoproteína B (APOB) é uma proteína estrutural importante para lipoproteínas aterogênicas contendo APOB, incluindo quilomícrons, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL). As lipoproteínas contendo APOB têm grandes quantidades de colesterol e triglicerídeos (TG) e estão envolvidas no metabolismo das lipoproteínas e no transporte lipídico plasmático.

As células da granulosa humana (CG) são capazes de montar e secretar lipoproteínas contendo APOB100. Embora as funções das CG sejam influenciadas principalmente pelas gonadotrofinas, a regulação hormonal da expressão de APOB nas GC nunca foi investigada.

A APOB é hiporegulado por gonadotrofinas (FSH e hCG) que podem influenciar o conteúdo de APOB no folículo ovariano durante a EOC. (Scalici, E., 2016)

#### 4.1.3. Receptor androgênico

O receptor androgênico é expresso no ovário, principalmente nas células da granulosa, sugerindo envolvimento na foliculogênese. Da mesma forma, o RA foi localizada nas células tecais dos folículos pré-antrais, células granulosas dos folículos antrais e, mais intensamente, nas células granulosas e nas células tecais dos folículos dominantes. Os androgênios ativam o RA, exercendo seus efeitos biológicos, estimulando genes-alvo por meio de uma sequência de processos, incluindo ligação a ligantes, homodimerização, translocação nuclear, ligação a DNA e uma formação complexa com co-reguladores e fatores gerais de transcrição.

Diferentes estudos mostraram uma associação entre repetições CAG no gene RA e ovários policísticos. Além disso, publicações recentes relataram essa associação em pacientes com falência ovariana precoce. (Lledó, B., 2014)

#### 4.1.4. v-betaLH

LH é um hormônio heterodimérico caracterizado por duas subunidades, alfa e beta, produzidas na glândula pituitária anterior; a subunidade beta confere a especificidade do hormônio.

O v-betaLH é caracterizado por uma glicosilação extra na subunidade  $\beta$ , que aparentemente adiciona uma segunda cadeia lateral de oligossacarídeo a Asn13 da proteína  $\beta$ . Essa variação molecular influencia as propriedades farmacocinéticas do v-betaLH, que mostra uma bioatividade elevada in vitro, mas uma meia-vida significativamente mais curta (26 min) na circulação quando comparada com o LH (48 min), sendo associada a hiporesposta e resistência a administração de FSH recombinante. (Alviggi et al., 2009).

#### 4.1.5. BMP15

O BMP15 é um membro da superfamília BMP que controla muitos aspectos do desenvolvimento pela ligação e ativação de dois tipos de receptores transmembrana serina/treonina quinase e sinalizando contra proteínas homólogas decapentaplégicas (SMAD) para regular as funções celulares. BMP15 está localizado no cromossomo X no genoma humano e é expresso no ovário.

A proteína BMP15 é sintetizada no oócito e é um fator secretado por oócitos que trabalha em conjunto com o GDF9 na foliculogênese e na fertilidade, desempenhando papel importante na regulação da fertilidade e no desenvolvimento folicular. (Peluso, C., 2017)

#### 4.1.6. CA125

O CA125 é um antígeno determinante em uma glicoproteína de alto peso molecular, é expresso pela maioria dos cânceres epiteliais de ovário.

Também é expresso nos três derivados do epitélio celômico e pode ser demonstrado no epitélio da endocérvice, nas trompas de Falópio e no endométrio proliferativo e secretório. O CA-125 pode ser medido na circulação periférica. Embora tenha sido investigado principalmente por seu potencial como marcador sérico da função e receptividade endometrial, dados contraditórios foram publicados na literatura sobre a fonte exata do CA-125, seja ele derivado do endométrio ou dos ovários.

O CA-125 também pode ser detectado em lavagens uterinas nos ciclos naturais e estimulados, e alguns autores relataram concentrações significativas de CA-125 nos folículos periovulatórios em pacientes em fertilização in vitro. (Urbancsek, J., 2005)

#### 4.1.7. CYP19

O citocromo P450 aromatase é expresso nas células da granulosa ovariana e no corpo lúteo, participa na reprodução humana catalisando a transformação irreversível do androgênio em estrogênio. (Lazaros, L., 2012)

A enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol, produto do citocromo P450, família 11, subfamília A, gene polipeptídeo 1, catalisa a conversão do colesterol em pregnenolona, o substrato para a esteroidogênese. Seu gene se localiza na região cromossomal 15q23-q24 e é composto por 9 éxons. 241 SNPs já foram descritos nesse gene.

Gharani et al (1997) demonstrou associação entre o polimorfismo (TTTTA)<sub>n</sub> com estados hiperandrogênicos e síndrome dos ovários policísticos. Um estudo Americano não encontrou associação entre a variação e aumento de risco de desenvolvimento de síndrome de hiperestímulo ovariano, apesar de amostra pequena (Ferk et al., 2006).

O gene da aromatase (CYP19A1) é outro candidato na investigação farmacogenética para indução da ovulação. O gene está localizado na região cromossomal 15q21.1 e é composto por 10 éxons. Mais de 1080 SNPs foram identificados nesse gene ([www.snpper.chip.org](http://www.snpper.chip.org))

Mulheres com a variação (TTTA)<sub>n</sub> apresentam baixas concentrações de estrogênio (Haiman et al., 2000; Tworoger et al., 2004). Altma et al (2009) encontrou associação entre o polimorfismo e baixa sensibilidade ovariana a administração de FSH para estimulação ovariana, enquanto outros dois trabalhos não evidenciaram o mesmo resultado (de Castro et al., 2004; Binder et al., 2008).

#### 4.1.8. Estrogênios e ESR 1 e 2

Além da foliculogênese, os estrógenos desempenham um papel importante na preparação endometrial para implantação. A sinalização de estrogênio é mediada por receptores de estrogênio, que são fatores de transcrição ativados por ligantes compostos por vários domínios importantes para a ligação hormonal, ligação ao DNA e ativação da transcrição.

Os receptores de estrogênio (ESR) são candidatos importantes na responsividade ovariana ao FSH, uma vez que os efeitos diretos dos estrógenos no crescimento folicular, maturação e liberação de oócitos estão bem estabelecidos.

Dois receptores de estrogênio foram identificados em humanos, ERa (6q25) e ERb (14q22), codificados pelos genes ESR1 e ESR2, respectivamente. Na foliculogênese, as ações proliferativas dos estrogênios são mediadas por ERa (predominantemente expressa na camada teca), enquanto os efeitos diferenciadores e antiproliferativos necessários para atingir o estágio antral requerem ERb (expresso em células granulosas de folículos em crescimento em todos os estágios do desenvolvimento.). (Altmäe, S., 2011)

#### 4.1.9. EGF

O fator de crescimento epidérmico (EGF) possivelmente desempenha papel facultativo como modulador autócrino e parácrino da função ovariana.

Há evidências crescentes de que os fatores de crescimento ovariano estão envolvidos na dinâmica folicular e o EGF afeta a esteroidogênese nas células da granulosa. O EGF estimula a maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos, bem como a diferenciação celular na granulosa. Por outro lado, o EGF diminui a atividade da aromatase nas células da granulosa. (Bahceci, M., 2007)

#### 4.1.10. FSH e FSHR

Está bem estabelecido que a ação fisiológica do FSH depende da ativação de seu receptor (FSHR), que é expresso pelas células da granulosa. O hormônio FSH desempenha um papel central na função ovariana, onde seus principais efeitos estão relacionados à proliferação de células da granulosa, maturação de oócitos e síntese de estrogênio via ativação do gene da aromatase. Como o sucesso da EOC depende muito da eficácia da dose de FSH administrada ao paciente, o gene FSHR é claramente o principal candidato a explicar as diferenças no resultado da EOC. (Altmäe, S., 2011)

O SNP mais estudado associado a resposta ovariana à EOC é a variante (Ans680Ser) do receptor do hormônio folículo estimulante (FSHR), que juntamente com a variante alfa do receptor de estrogênio (gene ESR1, gene

Pvull T / C) são praticamente os únicos marcadores genéticos aplicados em testes clínicos.

#### 4.1.11. GDF9

O fator de crescimento diferencial-9 (GDF-9), um membro da superfamília do fator de crescimento transformador b, é um fator derivado de oócito que é expresso preferencialmente nos ooócitos de humanos e camundongos. Como o GDF-9 desempenha um papel central durante a foliculogênese precoce, a exclusão do GDF-9 no camundongo causa parada folicular no estágio primário e infertilidade.

Além disso, o GDF-9 estimula a proliferação de células da granulosa e a expansão das células do cumulus, inibe a apoptose folicular e melhora o desenvolvimento de oócitos e embriões. Recentemente, várias variantes genéticas do GDF-9 foram identificadas e sua correlação com a FOP foi observada, sugerindo que essas variantes contribuem para o desenvolvimento folicular aberrante e a perda de oócitos. (Wang, T. T., 2010)

#### 4.1.12. HRG

A glicoproteína rica em histidina é uma glicoproteína plasmática envolvida em sistemas biológicos, como fibrinólise e coagulação, sistema de resposta imunológica, apoptose e angiogênese. Sabe-se que esses sistemas estão envolvidos no desenvolvimento de oócitos e na gestação. Embora sua função biomolecular exata não seja clara, a HRG parece ser uma molécula adaptadora devido à sua estrutura molecular única, que permite interagir com uma infinidade de ligantes diferentes. (Nordqvist, S., 2015)

#### 4.1.13. IGF1, IGFBP1, IGFBP3 e IGFBP4

(IGF-1) parece ter uma ação importante autócrina/parácrina. Esse peptídeo é produzido pelas células da granulosa após estimulação com FSH, e sua atividade é controlada por proteínas catalíticas e por proteínas de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP), que atuam como inibidores ou reguladores de sua ação.

Além disso, o IGF-1 ativa a produção de estrogênio e progesterona e a atividade da aromatase, além de modular o efeito do FSH e do LH.



O IGFBP-1 exerce um efeito inibitório sobre o IGF-1, atuando como um agente antagonizante e modulando a atividade do IGF-1. O IGFBP-3 também pode exercer um papel regulador no fluido folicular, tendo efeito inibitório no IGF-1 e 2. Seu aumento da concentração pode diminuir a disponibilidade de IGF-1 e 2 no fluido folicular e, conseqüentemente, sua ação. (Cunha-Filho, J. S., 2005)

O IGFBP-4 é um IGFBP de baixo peso molecular e tem papel na regulação da biodisponibilidade intra-folicular do IGF livre. Proteases específicas de IGFBP clivam IGFbps, permitindo que IGFs se liguem a seus receptores. (Choi, Y. S., 2006)

#### 4.1.14. IL1 $\beta$ (interleucina1 $\beta$ ) e TNF $\alpha$ (fator de necrose tumoral $\alpha$ )

Citocinas pró-inflamatórias podem ser encontradas no FF como resultado da síntese e liberação local do ovário durante a maturação folicular e ovulação; por exemplo, a IL-1beta do fluido folicular deriva tanto do ultrafiltrado do plasma quanto da síntese local por células luteinizantes da granulosa.

É possível que a IL-1beta leve à maturação citoplasmática e fertilização normal, mas não desempenhe um papel no desenvolvimento embrionário pós-fertilização.

O TNF-alfa pode participar do processo de degradação da parede folicular, e sua concentração na proporção ideal pode refletir um melhor meio intrafolicular capaz de otimizar o desenvolvimento e a maturação do oócito. (Revelli, A., 2009)

#### 4.1.15. Inibina B

A inibina B é um membro da família TGF beta. As células foliculares ovarianas da granulosa produzem AMH e inibina B. (Muttukrishna, S., 2004)

As inibinas são produzidas pelos ovários em duas isoformas, A e B. A inibina B aumenta no início da fase folicular para atingir um pico que coincide com o início da fase folicular média e declínio nos níveis de FSH e depois diminui durante a fase lútea até o pico periovulatório. Isso sugere secreção pela coorte em desenvolvimento de folículos. Portanto, foi proposto que a inibina B na fase folicular inicial pudesse refletir o número de folículos basais presentes. (Urbancsek, J., 2005)

#### 4.1.16. KDR

O receptor do domínio de inserção da quinase (KDR) modula a atividade do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) no ovário. O VEGF está implicado na fisiopatologia da OHSS devido ao aumento da permeabilidade vascular. (O'Brien, T.J., 2014)

#### 4.1.17. Leptina

A leptina é um hormônio proteico de 16 kDa liberado predominantemente a partir do tecido adiposo sob o controle do gene da obesidade (*ob*). Ela regula a homeostase energética, o apetite e o peso corporal, enviando sinais que indicam o status energético do corpo para o sistema nervoso central.

Embora a leptina pareça exercer seus efeitos na reprodução pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário, também pode haver um efeito ovariano direto. A leptina também é sintetizada em oócitos, células da granulosa e tecidos placentários, além do tecido adiposo. A leptina parece se ligar especificamente às células da granulosa. (Gürbüz, B., 2005)

#### 4.1.18. LH, LHR e LHCGR

O receptor do hormônio luteinizante (LHR) é um receptor hormonal acoplado à proteína G (GPCR) e é expresso em vários tecidos, incluindo gônadas, útero, trompas de falópio, placenta e feto. Tanto o LH quanto o gonadotrofina coriônica humana (hCG) são ligantes endógenos do LHR, sendo que este último também é empregado durante o COH. Antes da ovulação, FSH e estradiol aumentam a produção hipofisária de LH e induzem a expressão de LHR nos ovários, onde o LHR atua na promoção da maturação folicular, lutenização e ovulação.

Na reprodução assistida, acredita-se que a administração de hCG (gatilho de hCG) ativa a sinalização mediada por LHR. O LHR é codificado pelo gene do hormônio luteinizante/receptor de gonadotrofina coriônica (LHCGR) (~ 69 kb) localizado no cromossomo 2p21. O LHCGR abriga pelo menos 300 polimorfismos conhecidos, alguns dos quais com um impacto significativo no desenvolvimento sexual e na fertilidade. (O'Brien, T.J., 2013)

#### 4.1.19. miRNA

Várias alterações transcricionais específicas da linha germinativa que ocorrem durante o processo da maturação dos oócitos foram identificadas, e estamos apenas começando a entender os mecanismos pelos quais alterações pós-transcricionais na expressão gênica podem facilitar o desenvolvimento dos oócitos. Um desses processos é através de alterações na expressão do ácido micro ribonucleico (miRNA), e os miRNAs seletivos das gônadas podem desempenhar papéis importantes no desenvolvimento ovariano e na fertilidade feminina.

Os microRNAs são uma grande família de RNAs curtos e não codificantes que reprimem a expressão de genes-alvo pela degradação de RNAs mensageiros alvo (mRNAs) ou pela inibição de sua tradução por interações com as regiões 3' não traduzidas (3'UTRs). Os microRNAs regulam processos celulares essenciais, incluindo crescimento, diferenciação e apoptose. Eles são, portanto, necessários para o desenvolvimento normal dos mamíferos, e sua função é conservada através da evolução, dos fungos aos mamíferos.

Os microRNAs parecem desempenhar um papel na função das células da granulosa (GC) e, portanto, podem ser importantes para a sinalização folicular e o desenvolvimento de oócitos. (Karakaya, C., 2015)

#### 4.1.20. MIS

A substância inibidora do Mülleriano (MIS) é um componente do fluido folicular produzido pelas células da granulosa. A substância inibidora do Mülleriano é detectada no soro humano normal. Seus níveis variam ligeiramente com o ciclo menstrual, atingindo um máximo na fase folicular tardia. O MIS parece agir de maneira parácrina para regular a função das células e oócitos da granulosa. (Seifer, D.B., 2002)

#### 4.1.21. MTHFR

Há evidências crescentes de que o status do folato e a variação nos genes metabolizadores do folato estão envolvidos nas funções reprodutivas femininas. (Altmäe, S., 2011)

A flavoenzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) tem um papel central no metabolismo do folato, catalisando a conversão de 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato.

Mães portadoras da mutação MTHFR 677C> T exibem um risco significativamente menor de gestação gemelar dicoriônica do que aquelas com o genótipo CC do tipo selvagem. (Pavlik, R., 2011)

#### 4.1.22. NOTCH

Os genes Notch codificam receptores transmembranares que são altamente conservados evolutivamente e que controlam as decisões sobre o destino celular entre células adjacentes, modulando a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Os mamíferos têm 4 tipos de receptores Notch (Notch 1-4) e 2 famílias de ligantes (Jagged1; Jagged2; e Delta [DII] 1, DII 3, DII 4).

Os genes Notch são expressos ativamente pelas células do cumulus durante a foliculogênese. No entanto, não são liberados pelos oócitos e folículos atrésicos. Vários estudos experimentais envolvendo animais relataram que o Notch2, Notch3 e Jagged2 são liberados pelas células da granulosa e que o Jagged1 é liberado com mais frequência dos oócitos do que das células da granulosa. (Tanriverdi, G., 2013)

#### 4.1.23. PAPP-A

A proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A) é um regulador chave da bioatividade do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), liberando os IGFs de suas proteínas de ligação do IGF (IGFBPs). O menor alelo do polimorfismo do nucleotídeo único (SNP), rs7020782 (serina <tirosina), no PAPP-A já havia sido associado anteriormente à perda recorrente de gravidez, bem como a níveis reduzidos da proteína PAPP-A em folículos ovarianos humanos. (Choi, Y. S., 2006)

#### 4.1.24. Progesterona

A progesterona é um hormônio importante na regulação complexa das funções reprodutivas femininas normais. O principal papel fisiológico da progesterona no ovário e no útero é a liberação de oócitos maduros, facilitação do implante e manutenção da gravidez.

A progesterona aumenta o efeito do FSH nas células da granulosa, aumentando o cAMP e esse inibe a produção de estradiol induzida por FSH. (Altmäe, S., 2011)

#### 4.1.25. PUFA

Entre os diferentes ácidos graxos insaturados, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) das séries ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3) são sintetizados a partir de seus respectivos precursores: ácido linoleico (n6) e  $\alpha$ -linolênico ácido (n-3), que são essenciais e, portanto, devem ser supridos pela dieta. Os PUFA n-3 e n-6 são necessários na reprodução feminina.

O perfil de ácidos graxos do FF dos folículos dominantes pode estar relacionado aos resultados da estimulação ovariana. (Ruiz-Sanz, J. I., 2019)

#### 4.1.26. SHBG

A globulina de ligação a hormônios sexuais (SHBG) é a principal proteína de transporte de esteroides sexuais, regulando seu acesso aos tecidos-alvo. É produzido principalmente pelo fígado, mas recentemente o mRNA de SHBG também foi demonstrado em vários tecidos não hepáticos. O mRNA que codifica SHBG demonstrou ser expresso nos ovários e corpos lúteos, bem como nas células da granulosa luteinizadas a partir de amostras foliculares de fertilização in vitro (FIV). Estes resultados indicam um papel do SHBG na regulação local da função ovariana. (Hatzi, E., 2011)

#### 4.1.27. VEGF, sVEGFR1 e VEGFR2

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma citocina com uma estrutura glicoproteica dimérica, que mostra potentes propriedades mitogênicas das células angiogênicas e endoteliais. No ovário, o VEGF é produzido pelas células da granulosa e da teca; as células da granulosa (GC) geram maior produção de VEGF em resposta ao FSH, LH, gonadotrofina coriônica humana (HCG) e hipóxia e são fundamentais na conversão do folículo pré-ovulatório avascular no corpo lúteo, que é muito vascularizado.

Como o VEGF estimula a permeabilidade vascular, vários estudos avaliaram seu papel na síndrome de hiperestimulação ovariana (OHSS), com o aumento dos níveis séricos de VEGF após a administração de HCG, sendo

preditivo do risco de desenvolvimento de OHSS. Além disso, as concentrações elevadas de VEGF no líquido folicular correlacionaram-se negativamente com as taxas de concepção na reprodução assistida. (Quintana, R., 2001)

O VEGF medeia seus efeitos por meio de dois receptores específicos, o receptor de tirosina semelhante a *fms-1* (*flt-1* = VEGFR-1) ou o receptor de domínio de tirosina inserido por quinase (KDR = VEGFR-2). O VEGFR-1 também é produzido como um receptor solúvel (sVEGFR-1) por *splicing* alternativo do mRNA precursor. Ainda não está claro se o derramamento proteolítico produz mais sVEGFR-1. Obviamente, o sVEGFR-1 atua como um modulador negativo para a bioatividade do VEGF. Ambos os receptores são produzidos pelas células endoteliais. As células endoteliais podem ser uma fonte proeminente de sVEGFR-1. Ainda não se sabe como a produção de VEGFR-1 solúvel ou ligado à membrana é regulada nas células endoteliais. (Neulen, J., 2001)

#### 4.1.28. Testosterona

Os androgênios, principalmente a testosterona (T) e a androstenediona, são importantes para melhorar o recrutamento folicular, promover o crescimento e desenvolvimento folicular e aumentar a expressão do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) no ovário de primatas, que desempenha um papel essencial na regulação do desenvolvimento folicular. (Qin, Y., 2001)

#### 4.1.29. TP73

Os membros da família p53 (p63, p73 e p53), além do papel na regulação do ciclo celular, transativação e apoptose, estão envolvidos na reprodução feminina e no implante de blastocisto. Estudos em ratos mostraram que o gene p73 desempenha um papel na infertilidade feminina. O gene p73 contém dois promotores que dirigem a expressão de dois grupos principais de isoformas p73 com ações celulares opostas: pró-apoptótico e anti-apoptótico e ambos são necessários para a embriogênese normal. (LD Vagnini, 2019)

## ARTIGOS INCLUÍDOS

Tabela 1

	Aflatoonian, A., 2009 (P)
	Alson, S. S. E., 2018 (P)
	Anckaert, E., 2012 (R)
	Andersen, A. N., 2011 (P)
	Arce, J. C., 2013 (P)
	Baker, V. L., 2018 (P)
	Burks, H. R., 2015 (R)
	Buyuk, E., 2011 (R)
	Cerra, C., 2016 (P)
	Coskun, B., 2018 (R)
	Ficicioglu, C., 2014 (P)
<b>AMH e AMHR2</b>	Ganidou, M. A., 2014 (P)
	Grzegorzczuk-Martin, V., 2012 (R)
	Hamdine, O., 2015 (R)
	Hanevik, H. I., 2010 (R)
	Karagiorga, I., 2015 (P)
	Knez, J., 2015 (R)
	Kunt, C., 2011 (P)
	La Marca, A., 2007 (P)
	Lee, R. K., 2011 (R)
	Li, R., 2016 (P)
	Li, Y., 2015 (P)

Motawi, T. M. K., 2017 (P)  
Muttukrishna, S., 2004 (P)  
Muttukrishna, S., 2005 (R)  
Riggs, R., 2011 (R)  
Romão, G. S., 2012 (P)  
Siddiqui, Q. U. A., 2019 (R)  
Singh, N., 2013 (P)  
Smeenk, J. M., 2007 (P)  
Tolikas, A., 2011 (P)  
Wu, C. H., 2009 (P)  
Yoshida, Y., 2014 (P)  
Zheng, H., 2017 (R)

<b>APOB</b>	Scalici, E., 2016 (P)
<b>AR</b>	Lledó, B., 2014 (P)
<b>v-betaLH</b>	Alviggi, C., 2013 (R)
	Hanevik, H. I., 2014 (R)
	Cerra, C., 2014 (P)
<b>BMP15</b>	Hanevik, H. I., 2011 (R)
	Morón, F. J., 2006 (R)



- Peluso, C., 2017 (P)
- Wu, Y. T., 2012 (R)
- CA125**
- Hauzman, E. E., 2005 (P)
- Urbancsek, J., 2005 (P)
- CYP19**
- Lazaros, L., 2012 (P)
- Anagnostou, E., 2012 (P)
- Bahceci, M., 2007 (P)
- de Mattos, C. S., 2014 (P)
- Kahyaoglu, S., 2015 (R)
- Estrogênio e ESR 1 e 2**
- Kunt, C., 2011 (P)
- Motawi, T. M. K., 2017 (P)
- Wu, C. H., 2009 (P)
- Zamaniara, T., 2017 (P)
- EGF (Fator de crescimento epidermal)**
- Bahceci, M., 2007 (P)
- Achrekar, S. K., 2009 (R)
- Alviggi, C., 2016 (R)
- Anagnostou, E., 2012 (P)
- FSH e FSHR**
- Andersen, A. N., 2011 (P)
- Ashrafi, M., 2005 (R)
- Barad, D. H., 2005 (P)
- Binder, H., 2012 (R)
- Cai, J., 2006 (P)
- Cai, J., 2007 (P)

Čuš, M., 2019 (P)  
de Castro, F., 2003 (R)  
Desai, S. S., 2013 (R)  
García-Jiménez, G., 2018 (P)  
Genro, V. K., 2012 (P)  
Grzegorzczak-Martin, V., 2012 (R)  
Huang, X., 2015 (P)  
Iwase, A., 2005 (P)  
Kaviani, M., 2017 (P)  
Klinkert, E. R., 2006 (P)  
Kunt, C., 2011 (P)  
Laven, J. S., 2003 (P)  
Lazaros, L., 2012 (P)  
Lazaros, L., 2013 (P)  
Liang, X., 2001 (P)  
Loutradis, D., 2006 (P)  
Motawi, T. M. K., 2017 (P)  
Muttukrishna, S., 2004 (P)  
Ng, E. H., 2005 (P)  
Shrim, A., 2006 (R)  
Siddiqui, Q. U. A., 2019 (R)  
Sudo, S., 2002 (P)  
Tohlob, D., 2016 (P)  
Wu, C. H., 2009 (P)

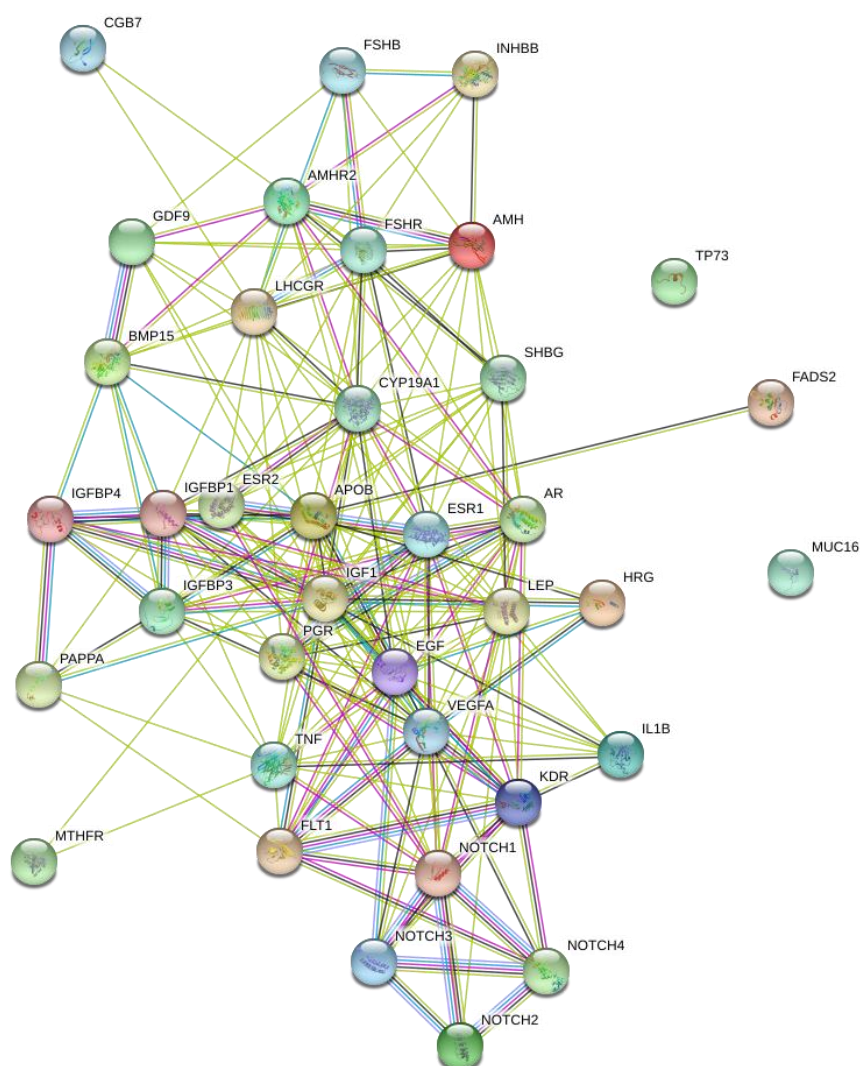
	Yan, Y., 2013 (P)
	Zamaniara, T., 2017 (P)
<b>GDF9</b>	Wang, T. T., 2010 (P)
<b>HRG</b>	Nordqvist, S., 2015 (P)
	Bahceci, M., 2007 (P)
	Choi, Y. S., 2006 (P)
	Cunha-Filho, J. S., 2005 (P)
<b>IGF1, IGFBP1, IGFBP3 e IGFBP4</b>	Dorn, C., 2003 (P)
	Fried, G., 2003 (R)
	Genc, G., 2011 (P)
<b>IL1<math>\beta</math> (interleucina-1beta) e TNF<math>\alpha</math> (fator de necrose tumoral alpha)</b>	Nikolettos, N., 2004 (P)
	Fried, G., 2003 (R)
	Li, Y., 2015 (P)
	Kunt, C., 2011 (P)
<b>Inibina B</b>	Wu, C. H., 2009 (P)
	Muttukrishna, S., 2005 (R)
	Urbancsek, J., 2005 (P)
	Muttukrishna, S., 2004 (P)
<b>KDR</b>	O'Brien, T. J., 2014 (P)
	Nikolettos, N., 2004 (P)
<b>Leptina</b>	Dorn, C., 2003 (P)
	Gürbüz, B., 2005 (P)

	G A, R., 2018 (R)
	Kunt, C., 2011 (P)
	Liang, X., 2001 (P)
<b>LH, LHR e LHCGR</b>	O'Brien, T. J., 2013 (P)
	Shrim, A., 2006 (R)
	Wu, C. H., 2009 (P)
	Yin, Q., 2015 (P)
<b>MiRNA</b>	Karakaya, C., 2015 (P)
<b>MIS</b>	Seifer, D. B., 2002 (R)
<b>MTHFR</b>	Pavlik, R., 2011 (P)
<b>NOTCH</b>	Tanriverdi, G., 2013 (P)
<b>PAPP-A</b>	Choi, Y. S., 2006 (P)
<b>Progesterona</b>	Bahceci, M., 2007 (P)
<b>PUFA</b>	Ruiz-Sanz, J. I., 2019 (P)
<b>SHBG</b>	Hatzi, E., 2011 (P)
	Dorn, C., 2003 (P)
	Neulen, J., 2001 (P)
<b>VEGF, sVEGFR1 e VEGFR2</b>	Nikolettos, N., 2004 (P)
	O'Brien, T. J., 2014 (P)
	Quintana, R., 2001 (P)
	Bahceci, M., 2007 (P)
<b>Testosterona</b>	Xiao, S., 2016 (R)
	Qin, Y., 2011 (R)
<b>TP73</b>	LD Vagnini, 2019 (P)

## ANÁLISE *IN SILICO*

Escolhemos a base de dados STRING para realizar a análise *In Silico*, inserindo os 42 biomarcadores no modelo. Desses 42, 4 (testosterona, progesterona, estrogênio e miRNA) não tiveram correspondência nesta base de dados. O resultado está na figura 2.

Figura 2



Esta base de dados permite expandir a busca e encontrar relações entre outros biomarcadores, além dos que incluímos em nossa revisão.

Figura 3

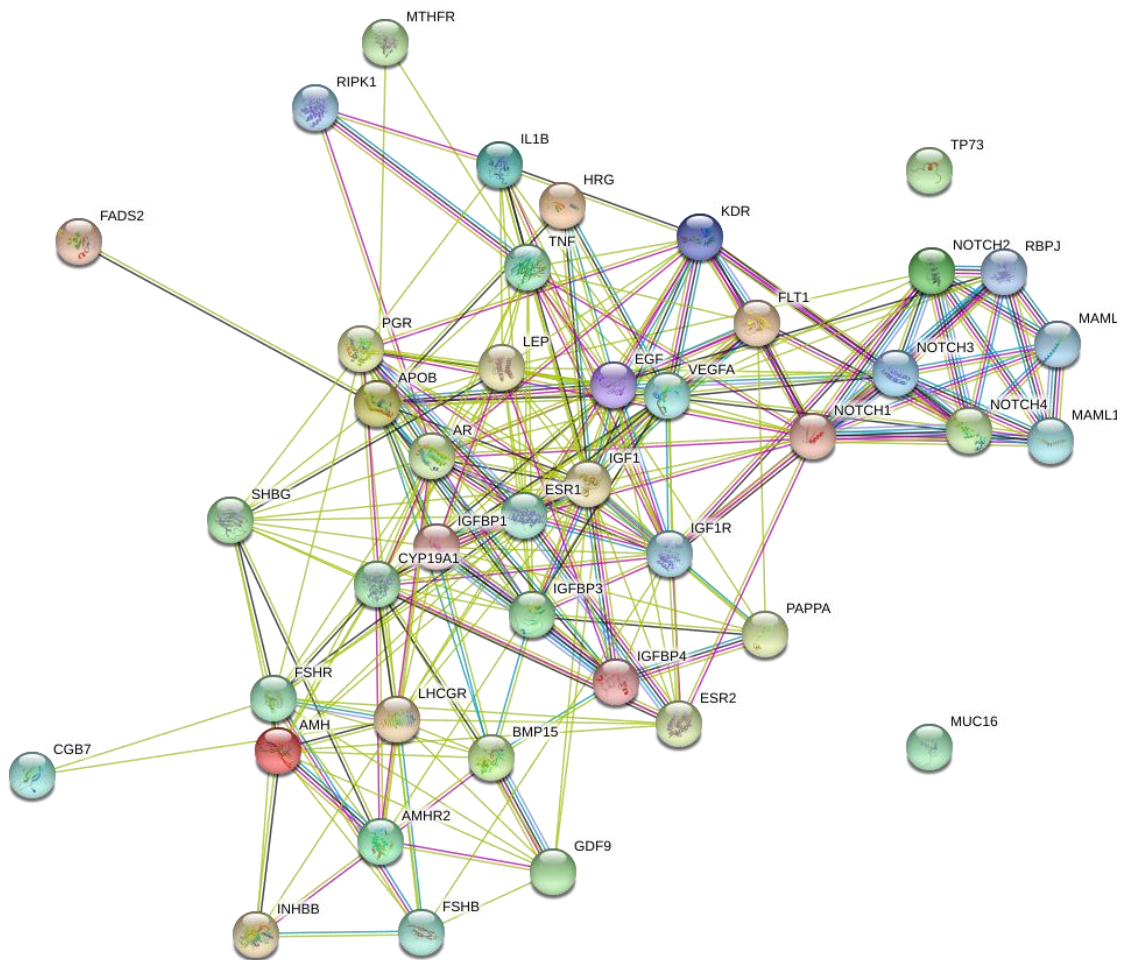
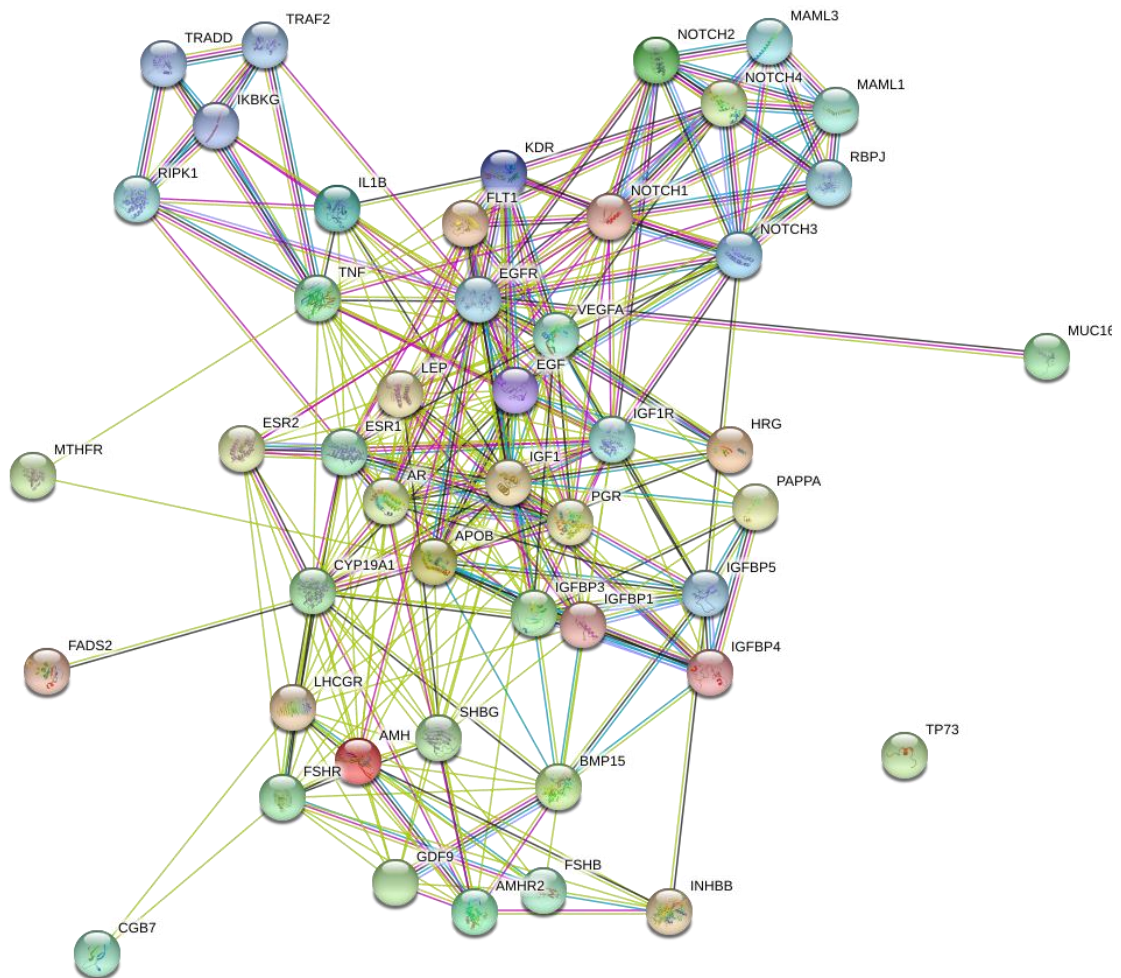


Figura 4



## JUSTIFICATIVA

Com base no exposto acima, a aplicação do modelo *In Silico* em preditores moleculares não demográficos de resposta ovariana pode fornecer dados para melhor entendimento de resposta ovariana em mulheres inférteis com pretensão a TRA, podendo-se, então, individualizar doses e tratamentos.



## HIPÓTESES

### Hipótese nula

O modelo *In Silico* aplicado a fatores moleculares não demográficos não poderia ser usado para melhor predição de resposta ovariana

### Hipótese alternativa

O modelo *In Silico* aplicado a fatores moleculares não demográficos poderia ser útil para predição de resposta ovariana

## OBJETIVOS

### Objetivo principal

Desenvolver um modelo *In Silico* para resposta ovariana baseado em fatores moleculares não demográficos.

### Objetivos secundários

Identificar proteínas e moléculas envolvidas na resposta ovariana

Inserir o modelo *In Silico* para avaliação de resposta ovariana

## CONCLUSÃO

Na análise *In Silico*, usando o banco de dados STRING, podemos ver as relações entre as 38 moléculas identificadas a partir da revisão da literatura e, expandindo, podemos encontrar outras moléculas, além daquelas que selecionadas.

Na nossa revisão, todos os estudos incluídos são transversais prospectivos e retrospectivos, pois não foram encontrados ensaios clínicos randomizados sobre o assunto. Assim, há uma heterogeneidade entre os artigos com alguns malconduzidos.

Podemos concluir através da nossa análise *In Silico* que as proteínas incluídas têm mais interações entre si do que seria esperado para um conjunto aleatório de proteínas de tamanho semelhante, extraídas do genoma. Tal enriquecimento indica que as proteínas estão pelo menos parcialmente biologicamente conectadas, como um grupo.

Mais estudos são necessários, mas podemos inferir que existem inúmeras correlações desconhecidas e, através de bancos de dados e da medicina *In Silico*, podemos identificar outras moléculas a serem estudadas, melhorando a predição da resposta ovariana na estimulação ovariana controlada e, assim, individualizando o tratamento.

## PERSPECTIVAS

Neste estudo, realizamos uma revisão para identificar biomarcadores descritos na literatura que poderiam prever a resposta ovariana à estimulação ovariana controlada e, em seguida, usamos o método *In Silico* para entender as relações entre os vários biomarcadores. Até onde sabemos, essa foi a primeira tentativa de uso da medicina *In Silico* para esse fim.

Provavelmente, o teste para estimulação ovariana controlada mais preditivo envolverá uma combinação de fenótipo e marcadores genéticos, que serão aplicados em testes diagnósticos de rotina antes de iniciar a estimulação da ovulação, para poder prever e obter uma resposta 'apropriada', ou seja, obter um equilíbrio entre a eficácia (recuperação de um número adequado de oócitos) e os riscos (evitar a OHSS e o cancelamento do ciclo devido a uma resposta inadequada), maximizando a chance de gravidez.

Para desenvolver painéis preditivos reais de testes genéticos para resultados de COH, é importante aumentar o número de marcadores validados e analisar a interação entre eles. A aplicação da medicina *In Silico* nesse contexto poderia nos ajudar a entender as relações entre os vários biomarcadores, individualizando, assim, o tratamento na reprodução assistida.

## REFERÊNCIAS

1. ACHREKAR, S. K.; MODI, D. N.; DESAI, S. K.; MANGOLI, V. S. *et al.* Poor ovarian response to gonadotrophin stimulation is associated with FSH receptor polymorphism. **Reprod Biomed Online**, 18, n. 4, p. 509-515, Apr 2009.
2. AFLATOONIAN, A.; OSKOUIAN, H.; AHMADI, S.; OSKOUIAN, L. Prediction of high ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation: anti-Müllerian hormone versus small antral follicle count (2-6 mm). **J Assist Reprod Genet**, 26, n. 6, p. 319-325, Jun 2009.
3. ALSON, S. S. E.; BUNGUM, L. J.; GIWERCMAN, A.; HENIC, E. Anti-müllerian hormone levels are associated with live birth rates in ART, but the predictive ability of anti-müllerian hormone is modest. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 225, p. 199-204, Jun 2018.
4. ALTMÄE, S.; HOVATTA, O.; STAVREUS-EVERS, A.; SALUMETS, A. Genetic predictors of controlled ovarian hyperstimulation: where do we stand today? **Hum Reprod Update**, 17, n. 6, p. 813-828, 2011 Nov-Dec 2011.
5. ALVIGGI, C.; CONFORTI, A.; CAPRIO, F.; GIZZO, S. *et al.* In Estimated Good Prognosis Patients Could Unexpected "Hyporesponse" to Controlled Ovarian Stimulation be Related to Genetic Polymorphisms of FSH Receptor? **Reprod Sci**, 23, n. 8, p. 1103-1108, 08 2016.
6. ALVIGGI, C.; HUMAIDAN, P.; EZCURRA, D. Hormonal, functional and genetic biomarkers in controlled ovarian stimulation: tools for matching patients and protocols. **Reprod Biol Endocrinol**, 10, p. 9, Feb 2012.
7. ALVIGGI, C.; PETTERSSON, K.; LONGOBARDI, S.; ANDERSEN, C. Y. *et al.* A common polymorphic allele of the LH beta-subunit gene is associated with higher exogenous FSH consumption during controlled ovarian stimulation for assisted reproductive technology. **Reprod Biol Endocrinol**, 11, p. 51, Jun 2013.
8. AMARAL, M. E. B.; EJZENBERG, D.; WAJMAN, D. S.; MONTELEONE, P. A. *et al.* Risk factors for inadequate response to ovarian stimulation in assisted reproduction cycles: systematic review. **J Assist Reprod Genet**, 36, n. 1, p. 19-28, Jan 2019.
9. ANAGNOSTOU, E.; MAVROGIANNI, D.; THEOFANAKIS, C.; DRAKAKIS, P. *et al.* ESR1, ESR2 and FSH receptor gene polymorphisms in combination: a

- useful genetic tool for the prediction of poor responders. **Curr Pharm Biotechnol**, 13, n. 3, p. 426-434, 03 2012.
10. ANCKAERT, E.; SMITZ, J.; SCHIETTECATTE, J.; KLEIN, B. M. *et al.* The value of anti-Mullerian hormone measurement in the long GnRH agonist protocol: association with ovarian response and gonadotrophin-dose adjustments. **Hum Reprod**, 27, n. 6, p. 1829-1839, Jun 2012.
  11. ANDERSEN, A. N.; WITJES, H.; GORDON, K.; MANNAERTS, B. *et al.* Predictive factors of ovarian response and clinical outcome after IVF/ICSI following a rFSH/GnRH antagonist protocol with or without oral contraceptive pre-treatment. **Hum Reprod**, 26, n. 12, p. 3413-3423, Dec 2011.
  12. ARCE, J. C.; LA MARCA, A.; MIRNER KLEIN, B.; NYBOE ANDERSEN, A. *et al.* Antimüllerian hormone in gonadotropin releasing-hormone antagonist cycles: prediction of ovarian response and cumulative treatment outcome in good-prognosis patients. **Fertil Steril**, 99, n. 6, p. 1644-1653, May 2013.
  13. ASHRAFI, M.; MADANI, T.; TEHRANIAN, A. S.; MALEKZADEH, F. Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. **Int J Gynaecol Obstet**, 91, n. 1, p. 53-57, Oct 2005.
  14. BAHCECI, M.; ULUG, U.; TURAN, E.; AKMAN, M. A. Comparisons of follicular levels of sex steroids, gonadotropins and insulin like growth factor-1 (IGF-1) and epidermal growth factor (EGF) in poor responder and normoresponder patients undergoing ovarian stimulation with GnRH antagonist. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 130, n. 1, p. 93-98, Jan 2007.
  15. BAKER, V. L.; GRACIA, C.; GLASSNER, M. J.; SCHNELL, V. L. *et al.* Multicenter evaluation of the Access AMH antimüllerian hormone assay for the prediction of antral follicle count and poor ovarian response to controlled ovarian stimulation. **Fertil Steril**, 110, n. 3, p. 506-513.e503, 08 2018.
  16. BARAD, D. H. Use of follicle-stimulating hormone test to predict poor response in in vitro fertilization. **Obstet Gynecol**, 106, n. 1, p. 196-197; author reply 197, Jul 2005.
  17. BESSOW, C.; DONATO, R.; DE SOUZA, T.; CHAPON, R. *et al.* Antral follicle responsiveness assessed by follicular output RaTe(FORT) correlates with follicles diameter. **J Ovarian Res**, 12, n. 1, p. 48, May 2019.

18. BIASONI, V.; PATRIARCA, A.; DALMASSO, P.; BERTAGNA, A. *et al.* Ovarian sensitivity index is strongly related to circulating AMH and may be used to predict ovarian response to exogenous gonadotropins in IVF. **Reprod Biol Endocrinol**, 9, p. 112, Aug 2011.
19. BILIBIO, J. P.; CUNHA-FILHO, J. S. Serum Prolactin and CA-125 Levels as Biomarkers of Peritoneal Endometriosis. **Gynecol Obstet Invest**, 81, n. 1, p. 96, 2016.
20. BINDER, H.; STRICK, R.; ZAHERDOUST, O.; DITTRICH, R. *et al.* Assessment of FSHR variants and antimüllerian hormone in infertility patients with a reduced ovarian response to gonadotropin stimulation. **Fertil Steril**, 97, n. 5, p. 1169-1175.e1161, May 2012.
21. BÓDIS, J.; SULYOK, E.; KŐSZEGI, T.; GÖDÖNY, K. *et al.* Serum and follicular fluid levels of sirtuin 1, sirtuin 6, and resveratrol in women undergoing in vitro fertilization: an observational, clinical study. **J Int Med Res**, 47, n. 2, p. 772-782, Feb 2019.
22. BURKS, H. R.; ROSS, L.; OPPER, N.; PAULSON, E. *et al.* Can highly sensitive antimüllerian hormone testing predict failed response to ovarian stimulation? **Fertil Steril**, 104, n. 3, p. 643-648, Sep 2015.
23. BUYUK, E.; SEIFER, D. B.; YOUNGER, J.; GRAZI, R. V. *et al.* Random anti-Müllerian hormone (AMH) is a predictor of ovarian response in women with elevated baseline early follicular follicle-stimulating hormone levels. **Fertil Steril**, 95, n. 7, p. 2369-2372, Jun 2011.
24. CAI, J.; GAO, H. J.; HUANG, H. F. [Ovarian response to gonadotropin stimulation depends on the level of follicle stimulating hormone receptor on granulosa cells]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, 41, n. 6, p. 372-374, Jun 2006.
25. CAI, J.; LOU, H. Y.; DONG, M. Y.; LU, X. E. *et al.* Poor ovarian response to gonadotropin stimulation is associated with low expression of follicle-stimulating hormone receptor in granulosa cells. **Fertil Steril**, 87, n. 6, p. 1350-1356, Jun 2007.
26. CERRA, C.; NEWMAN, W. G.; TOHLOB, D.; BYERS, H. *et al.* AMH type II receptor and AMH gene polymorphisms are not associated with ovarian reserve, response, or outcomes in ovarian stimulation. **J Assist Reprod Genet**, 33, n. 8, p. 1085-1091, Aug 2016.

27. CERRA, C.; OLIVER, J.; ROBERTS, S. A.; HORNE, G. *et al.* A single nucleotide polymorphism of bone morphogenic protein-15 is not associated with ovarian reserve or response to ovarian stimulation. **Hum Reprod**, 29, n. 12, p. 2832-2837, Dec 2014.
28. CHALUMEAU, C.; MOREAU, J.; GATIMEL, N.; COHADE, C. *et al.* Establishment and validation of a score to predict ovarian response to stimulation in IVF. **Reprod Biomed Online**, 36, n. 1, p. 26-31, Jan 2018.
29. CHAMBERS, A. E.; FAIRBAIRN, C.; GAUDOIN, M.; MILLS, W. *et al.* Soluble LH-HCG receptor and oestradiol as predictors of pregnancy and live birth in IVF. **Reprod Biomed Online**, 38, n. 2, p. 159-168, Feb 2019.
30. CHOI, Y. S.; KU, S. Y.; JEE, B. C.; SUH, C. S. *et al.* Comparison of follicular fluid IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, IGFBP-4 and PAPP-A concentrations and their ratios between GnRH agonist and GnRH antagonist protocols for controlled ovarian stimulation in IVF-embryo transfer patients. **Hum Reprod**, 21, n. 8, p. 2015-2021, Aug 2006.
31. COSKUN, B.; DILBAZ, B.; KARADAG, B.; TOHMA, Y. A. *et al.* The role of anti-Mullerian hormone in predicting the response to clomiphene citrate in unexplained infertility. **Taiwan J Obstet Gynecol**, 57, n. 5, p. 713-717, Oct 2018.
32. COUSE, J. F.; YATES, M. M.; DEROO, B. J.; KORACH, K. S. Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. **Endocrinology**, 146, n. 8, p. 3247-3262, Aug 2005.
33. CUNHA-FILHO, J. S.; LEMOS, N. A.; FREITAS, F. M.; FACIN, A. C. *et al.* Insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-1 and 3 in the follicular fluid of infertile patients submitted to in vitro fertilization. **J Assist Reprod Genet**, 22, n. 5, p. 207-211, May 2005.
34. CUNHA-FILHO, J. S.; LEMOS, N. A.; FREITAS, F. M.; FACIN, A. C. *et al.* Insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-1 and 3 in the follicular fluid of infertile patients submitted to in vitro fertilization. **J Assist Reprod Genet**, 22, n. 5, p. 207-211, May 2005.
35. ČUŠ, M.; VLAISAVLJEVIĆ, V.; REPNIK, K.; POTOČNIK, U. *et al.* Could polymorphisms of some hormonal receptor genes, involved in folliculogenesis help in predicting patient response to controlled ovarian stimulation? **J Assist Reprod Genet**, 36, n. 1, p. 47-55, Jan 2019.



36. DE CASTRO, F.; MORÓN, F. J.; MONTORO, L.; REAL, L. M. *et al.* Pharmacogenetics of controlled ovarian hyperstimulation. **Pharmacogenomics**, 6, n. 6, p. 629-637, Sep 2005.
37. DE CASTRO, F.; RUIZ, R.; MONTORO, L.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, D. *et al.* Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. **Fertil Steril**, 80, n. 3, p. 571-576, Sep 2003.
38. DE CONTO, E.; MATTE, Ú.; BILIBIO, J. P.; GENRO, V. K. *et al.* Endometriosis-associated infertility: GDF-9, AMH, and AMHR2 genes polymorphisms. **J Assist Reprod Genet**, 34, n. 12, p. 1667-1672, Dec 2017.
39. DE MATTOS, C. S.; TREVISAN, C. M.; PELUSO, C.; ADAMI, F. *et al.* ESR1 and ESR2 gene polymorphisms are associated with human reproduction outcomes in Brazilian women. **J Ovarian Res**, 7, p. 114, Dec 2014.
40. DESAI, S. S.; ACHREKAR, S. K.; PARANJAPE, S. R.; DESAI, S. K. *et al.* Association of allelic combinations of FSHR gene polymorphisms with ovarian response. **Reprod Biomed Online**, 27, n. 4, p. 400-406, Oct 2013.
41. DEWAILLY, D. [Usefulness of inhibin B, serum progesterone, and AMH concentrations obtained during controlled ovarian hyperstimulation (COH) in predicting ovarian response and oocyte quality]. **J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)**, 35, n. 5 Pt 2, p. 2S44-42S46, Sep 2006.
42. DORN, C.; REINSBERG, J.; KUPKA, M.; VAN DER VEN, H. *et al.* Leptin, VEGF, IGF-1, and IGFBP-3 concentrations in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. **Arch Gynecol Obstet**, 268, n. 3, p. 187-193, Aug 2003.
43. FERRARI, B.; PEZZUTO, A.; BARUSI, L.; COPPOLA, F. Gonadotropin-releasing hormone antagonists increase follicular fluid insulin-like growth factor-I and vascular endothelial growth factor during ovarian stimulation cycles. **Gynecol Endocrinol**, 22, n. 6, p. 289-296, Jun 2006.
44. FERRERO, S.; BELLUTI, A.; ANSERINI, P.; REMORGIDA, V. *et al.* Is VEGF a marker for ovarian response and pregnancy outcome? **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 121, n. 2, p. 249; author reply 250, Aug 2005.
45. FICICIOGLU, C.; CENKSOY, P. O.; YILDIRIM, G.; KASPAR, C. Which cut-off value of serum anti-Müllerian hormone level can predict poor ovarian reserve, poor ovarian response to stimulation and in vitro fertilization success? A

- prospective data analysis. **Gynecol Endocrinol**, 30, n. 5, p. 372-376, May 2014.
46. FRIED, G.; REMAEUS, K.; HARLIN, J.; KROG, E. *et al.* Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-I/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. **J Assist Reprod Genet**, 20, n. 5, p. 167-176, May 2003.
  47. G A, R.; CHEEMAKURTHI, R.; PRATHIGUDUPU, K.; BALABOMMA, K. L. *et al.* Role of Lh polymorphisms and r-hLh supplementation in GnRh agonist treated ART cycles: A cross sectional study. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 222, p. 119-125, Mar 2018.
  48. GANIDOU, M. A.; KOLIBIANAKIS, E. M.; VENETIS, C. A.; GEROU, S. *et al.* Is assessment of anti-Müllerian hormone and/or antral follicle count useful in the prediction of ovarian response in expected normal responders treated with a fixed dose of recombinant FSH and GnRH antagonists? A prospective observational study. **Gynecol Endocrinol**, 30, n. 11, p. 817-821, Nov 2014.
  49. GARCÍA-JIMÉNEZ, G.; ZARIÑÁN, T.; RODRÍGUEZ-VALENTÍN, R.; MEJÍA-DOMÍNGUEZ, N. R. *et al.* Frequency of the T307A, N680S, and -29G>A single-nucleotide polymorphisms in the follicle-stimulating hormone receptor in Mexican subjects of Hispanic ancestry. **Reprod Biol Endocrinol**, 16, n. 1, p. 100, Oct 2018.
  50. GENC, G.; YILMAZ, N.; UYGUR, D.; DOGAN, M. *et al.* The effect of intrafollicular IGF 1 and IGFBP 3 on IVF outcome in patients using different gonadotropins: a prospective study. **J Assist Reprod Genet**, 28, n. 5, p. 405-410, May 2011.
  51. GENRO, V. K.; MATTE, U.; DE CONTO, E.; CUNHA-FILHO, J. S. *et al.* 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**, 29, n. 7, p. 657-663, Jul 2012.
  52. GENRO, V. K.; MATTE, U.; DE CONTO, E.; CUNHA-FILHO, J. S. *et al.* 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**, 29, n. 7, p. 657-663, Jul 2012.

53. GREB, R. R.; BEHRE, H. M.; SIMONI, M. Pharmacogenetics in ovarian stimulation - current concepts and future options. **Reprod Biomed Online**, 11, n. 5, p. 589-600, Nov 2005.
54. GRZEGORCZYK-MARTIN, V.; KHROUF, M.; BRINGER-DEUTSCH, S.; MAYENGA, J. M. *et al.* [Low circulating anti-Müllerian hormone and normal follicle stimulating hormone levels: which prognosis in an IVF program?]. **Gynecol Obstet Fertil**, 40, n. 7-8, p. 411-418, 2012 Jul-Aug 2012.
55. GÜRBÜZ, B.; YALTI, S.; FICICIOGLU, C.; TAŞDEMİR, S. The relation of serum and follicular fluid leptin and ovarian steroid levels in response to induction of ovulation in in vitro fertilization cycles. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 118, n. 2, p. 214-218, Feb 2005.
56. HAMDINE, O.; EIJKEMANS, M. J.; LENTJES, E. W.; TORRANCE, H. L. *et al.* Ovarian response prediction in GnRH antagonist treatment for IVF using anti-Müllerian hormone. **Hum Reprod**, 30, n. 1, p. 170-178, Jan 2015.
57. HANEVIK, H. I.; HILMARSEN, H. T.; SKJELBRED, C. F.; TANBO, T. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the anti-Müllerian hormone signalling pathway do not determine high or low response to ovarian stimulation. **Reprod Biomed Online**, 21, n. 5, p. 616-623, Nov 2010.
58. HANEVIK, H. I.; HILMARSEN, H. T.; SKJELBRED, C. F.; TANBO, T. *et al.* A single nucleotide polymorphism in BMP15 is associated with high response to ovarian stimulation. **Reprod Biomed Online**, 23, n. 1, p. 97-104, Jul 2011.
59. HANEVIK, H. I.; HILMARSEN, H. T.; SKJELBRED, C. F.; TANBO, T. *et al.* Variant-beta luteinizing hormone is not associated with poor ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation. **Reprod Biol Endocrinol**, 12, p. 20, Mar 2014.
60. HATZI, E.; BOUBA, I.; GALIDI, A.; LAZAROS, L. *et al.* Association of serum and follicular fluid SHBG levels and SHBG (TAAAA)<sub>n</sub> polymorphism with follicle size in women undergoing ovarian stimulation. **Gynecol Endocrinol**, 27, n. 1, p. 27-32, Jan 2011.
61. HAUZMAN, E. E.; LAGARDE, A. R.; NAGY, K.; FANCSOVITS, P. *et al.* Prognostic value of serum CA-125 measurements on stimulation day 1 and on the day of oocyte pickup in the prediction of IVF treatment outcome. **J Assist Reprod Genet**, 22, n. 6, p. 265-268, Jun 2005.

62. HUANG, X.; LI, L.; HONG, L.; ZHOU, W. *et al.* The Ser680Asn polymorphism in the follicle-stimulating hormone receptor gene is associated with the ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation. **Clin Endocrinol (Oxf)**, 82, n. 4, p. 577-583, Apr 2015.
63. ILIODROMITI, S.; ANDERSON, R. A.; NELSON, S. M. Technical and performance characteristics of anti-Müllerian hormone and antral follicle count as biomarkers of ovarian response. **Hum Reprod Update**, 21, n. 6, p. 698-710, 2015 Nov-Dec 2015.
64. ILIODROMITI, S.; NELSON, S. M. Ovarian response biomarkers: physiology and performance. **Curr Opin Obstet Gynecol**, 27, n. 3, p. 182-186, Jun 2015.
65. IWASE, A.; ANDO, H.; KUNO, K.; MIZUTANI, S. Use of follicle-stimulating hormone test to predict poor response in in vitro fertilization. **Obstet Gynecol**, 105, n. 3, p. 645-652, Mar 2005.
66. KAHYAOGU, S.; YUMUSAK, O. H.; OZGU-ERDINC, A. S.; YILMAZ, S. *et al.* Can serum estradiol levels on the fourth day of IVF/ICSI cycle predict outcome in poor responder women? **Syst Biol Reprod Med**, 61, n. 4, p. 233-237, 2015.
67. KARAGIORGA, I.; PARTSINEVELOS, G. A.; MAVROGIANNI, D.; ANAGNOSTOU, E. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the Anti-Müllerian hormone (AMH Ile(49)Ser) and Anti-Müllerian hormone type II receptor (AMHR II -482 A>G) as genetic markers in assisted reproduction technology. **J Assist Reprod Genet**, 32, n. 3, p. 357-367, Mar 2015.
68. KARAKAYA, C.; GUZELOGLU-KAYISLI, O.; HOBBS, R. J.; GERASIMOVA, T. *et al.* Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) alternative skipping of exon 2 or 3 affects ovarian response to FSH. **Mol Hum Reprod**, 20, n. 7, p. 630-643, Jul 2014.
69. KARAKAYA, C.; GUZELOGLU-KAYISLI, O.; UYAR, A.; KALLEN, A. N. *et al.* Poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization is associated with altered microRNA expression in cumulus cells. **Fertil Steril**, 103, n. 6, p. 1469-1476.e1461-1463, Jun 2015.
70. KAVIANI, M.; GHADERIAN, S. M. H.; AREFI, S.; HASHEMI, M. *et al.* Role of FSHR rs6165 and ESR2 rs4986938 polymorphisms in ovarian stimulation of Iranian women who underwent assisted reproduction treatment. **Hum Antibodies**, 26, n. 3, p. 121-126, 2017.

71. KAYA, A.; ATABEKOGLU, C. S.; KAHRAMAN, K.; TASKIN, S. *et al.* Follicular fluid concentrations of IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, VEGF, AMH, and inhibin-B in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation using GnRH agonist or GnRH antagonist. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 164, n. 2, p. 167-171, Oct 2012.
72. KECK, C.; BASSETT, R.; LUDWIG, M. Factors influencing response to ovarian stimulation. **Reprod Biomed Online**, 11, n. 5, p. 562-569, Nov 2005.
73. KLINKERT, E. R.; TE VELDE, E. R.; WEIMA, S.; VAN ZANDVOORT, P. M. *et al.* FSH receptor genotype is associated with pregnancy but not with ovarian response in IVF. **Reprod Biomed Online**, 13, n. 5, p. 687-695, Nov 2006.
74. KNEZ, J.; KOVAČIČ, B.; MEDVED, M.; VLAISAVLJEVIĆ, V. What is the value of anti-Müllerian hormone in predicting the response to ovarian stimulation with GnRH agonist and antagonist protocols? **Reprod Biol Endocrinol**, 13, p. 58, Jun 2015.
75. KUNT, C.; OZAKSIT, G.; KESKIN KURT, R.; CAKIR GUNGOR, A. N. *et al.* Anti-Mullerian hormone is a better marker than inhibin B, follicle stimulating hormone, estradiol or antral follicle count in predicting the outcome of in vitro fertilization. **Arch Gynecol Obstet**, 283, n. 6, p. 1415-1421, Jun 2011.
76. LA MARCA, A.; GIULINI, S.; TIRELLI, A.; BERTUCCI, E. *et al.* Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. **Hum Reprod**, 22, n. 3, p. 766-771, Mar 2007.
77. LA MARCA, A.; SIGHINOLFI, G.; ARGENTO, C.; GRISENDI, V. *et al.* Polymorphisms in gonadotropin and gonadotropin receptor genes as markers of ovarian reserve and response in in vitro fertilization. **Fertil Steril**, 99, n. 4, p. 970-978.e971, Mar 2013.
78. LA MARCA, A.; SIGHINOLFI, G.; RADI, D.; ARGENTO, C. *et al.* Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). **Hum Reprod Update**, 16, n. 2, p. 113-130, 2010 Mar-Apr 2010.
79. LAVEN, J. S.; MULDER, A. G.; SURYANDARI, D. A.; GROMOLL, J. *et al.* Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in women with normogonadotropic anovulatory infertility. **Fertil Steril**, 80, n. 4, p. 986-992, Oct 2003.

80. LAZAROS, L. A.; HATZI, E. G.; PAMPORAKI, C. E.; SAKALOGLOU, P. I. *et al.* The ovarian response to standard gonadotrophin stimulation depends on FSHR, SHBG and CYP19 gene synergism. **J Assist Reprod Genet**, 29, n. 11, p. 1185-1191, Nov 2012.
81. LAZAROS, L.; HATZI, E.; XITA, N.; TAKENAKA, A. *et al.* Influence of FSHR diplotypes on ovarian response to standard gonadotropin stimulation for IVF/ICSI. **J Reprod Med**, 58, n. 9-10, p. 395-401, 2013 Sep-Oct 2013.
82. LEE, J. R.; KIM, S. H.; JEE, B. C.; SUH, C. S. *et al.* Antimüllerian hormone as a predictor of controlled ovarian hyperstimulation outcome: comparison of two commercial immunoassay kits. **Fertil Steril**, 95, n. 8, p. 2602-2604, Jun 2011.
83. LEE, R. K.; WU, F. S.; LIN, M. H.; LIN, S. Y. *et al.* The predictability of serum anti-Müllerian level in IVF/ICSI outcomes for patients of advanced reproductive age. **Reprod Biol Endocrinol**, 9, p. 115, Aug 2011.
84. LEHERT, P.; CHIN, W.; SCHERTZ, J.; D'HOOGHE, T. *et al.* Predicting live birth for poor ovarian responders: the PROsPeR concept. **Reprod Biomed Online**, 37, n. 1, p. 43-52, Jul 2018.
85. LI, R.; GONG, F.; ZHU, Y.; FANG, W. *et al.* Anti-Müllerian hormone for prediction of ovarian response in Chinese infertile women undergoing IVF/ICSI cycles: a prospective, multi-centre, observational study. **Reprod Biomed Online**, 33, n. 4, p. 506-512, Oct 2016.
86. LI, Y.; NIE, M.; LIU, Y.; ZHANG, W. *et al.* The dynamic changes of anti-Müllerian hormone and inhibin B during controlled ovarian hyperstimulation in decreased ovarian reserve women and the effect on clinical outcome. **Gynecol Endocrinol**, 31, n. 6, p. 450-453, Jun 2015.
87. LIANG, X.; ZHUANG, G.; ZHOU, C. [The predication of ovarian response in control ovarian hyperstimulation by the ratio of basal FSH and LH level]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, 81, n. 13, p. 819-821, Jul 2001.
88. LIE FONG, S.; SCHIPPER, I.; DE JONG, F. H.; THEMME, A. P. *et al.* Serum anti-Müllerian hormone and inhibin B concentrations are not useful predictors of ovarian response during ovulation induction treatment with recombinant follicle-stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**, 96, n. 2, p. 459-463, Aug 2011.

89. LIN, K. C.; SUN, M. J. Relationship between sex hormone-binding globulin and pregnancy outcome in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for assisted reproduction. **Endocr J**, 52, n. 4, p. 407-412, Aug 2005.
90. LLEDÓ, B.; LLÁCER, J.; TURIENZO, A.; ORTIZ, J. A. *et al.* Androgen receptor CAG repeat length is associated with ovarian reserve but not with ovarian response. **Reprod Biomed Online**, 29, n. 4, p. 509-515, Oct 2014.
91. LLEDO, B.; ORTIZ, J. A.; LLACER, J.; BERNABEU, R. Pharmacogenetics of ovarian response. **Pharmacogenomics**, 15, n. 6, p. 885-893, Apr 2014.
92. LOUTRADIS, D.; PATSOULA, E.; MINAS, V.; KOUSSIDIS, G. A. *et al.* FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs. **J Assist Reprod Genet**, 23, n. 4, p. 177-184, Apr 2006.
93. LOUTRADIS, D.; THEOFANAKIS, C.; ANAGNOSTOU, E.; MAVROGIANNI, D. *et al.* Genetic profile of SNP(s) and ovulation induction. **Curr Pharm Biotechnol**, 13, n. 3, p. 417-425, 03 2012.
94. MAGNUSSON, Å.; NILSSON, L.; OLERÖD, G.; THURIN-KJELLBERG, A. *et al.* The addition of anti-Müllerian hormone in an algorithm for individualized hormone dosage did not improve the prediction of ovarian response-a randomized, controlled trial. **Hum Reprod**, 32, n. 4, p. 811-819, 04 2017.
95. MOHIYIDDEEN, L.; NARDO, L. G. Single-nucleotide polymorphisms in the FSH receptor gene and ovarian performance: future role in IVF. **Hum Fertil (Camb)**, 13, n. 2, p. 72-78, 2010.
96. MORÓN, F. J.; DE CASTRO, F.; ROYO, J. L.; MONTORO, L. *et al.* Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) alleles predict over-response to recombinant follicle stimulation hormone and iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). **Pharmacogenet Genomics**, 16, n. 7, p. 485-495, Jul 2006.
97. MORÓN, F. J.; RUIZ, A. Pharmacogenetics of controlled ovarian hyperstimulation: time to corroborate the clinical utility of FSH receptor genetic markers. **Pharmacogenomics**, 11, n. 11, p. 1613-1618, Nov 2010.
98. MOTAWI, T. M. K.; RIZK, S. M.; MAURICE, N. W.; MAGED, A. M. *et al.* The role of gene polymorphisms and AMH level in prediction of poor ovarian response in Egyptian women undergoing IVF procedure. **J Assist Reprod Genet**, 34, n. 12, p. 1659-1666, Dec 2017.

99. MUTTUKRISHNA, S.; MCGARRIGLE, H.; WAKIM, R.; KHADUM, I. *et al.* Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? **BJOG**, 112, n. 10, p. 1384-1390, Oct 2005.
100. MUTTUKRISHNA, S.; SUHARJONO, H.; MCGARRIGLE, H.; SATHANANDAN, M. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? **BJOG**, 111, n. 11, p. 1248-1253, Nov 2004.
101. NELSON, S. M. Biomarkers of ovarian response: current and future applications. **Fertil Steril**, 99, n. 4, p. 963-969, Mar 2013.
102. NEULEN, J.; WENZEL, D.; HORNIG, C.; WÜNSCH, E. *et al.* Poor responder-high responder: the importance of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in ovarian stimulation protocols. **Hum Reprod**, 16, n. 4, p. 621-626, Apr 2001.
103. NG, E. H.; CHAN, C. C.; TANG, O. S.; HO, P. C. Antral follicle count and FSH concentration after clomiphene citrate challenge test in the prediction of ovarian response during IVF treatment. **Hum Reprod**, 20, n. 6, p. 1647-1654, Jun 2005.
104. NIKOLETTOS, N.; ASIMAKOPOULOS, B.; NIKOLETTOS, N.; EFTHIMIADOU, A. *et al.* Evaluation of leptin, interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha and vascular endothelial growth factor in serum and follicular fluids of women undergoing controlled ovarian hyperstimulation as prognostic markers of ICSI outcome. **In Vivo**, 18, n. 5, p. 667-673, 2004 Sep-Oct 2004.
105. NORDQVIST, S.; KÅREHED, K.; SKOOG SVANBERG, A.; MENEZES, J. *et al.* Ovarian response is affected by a specific histidine-rich glycoprotein polymorphism: a preliminary study. **Reprod Biomed Online**, 30, n. 1, p. 74-81, Jan 2015.
106. O'BRIEN, T. J.; HARRALSON, A. F.; TRAN, T.; GINDOFF, I. *et al.* Kinase insert domain receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (KDR) genetic variation is associated with ovarian hyperstimulation syndrome. **Reprod Biol Endocrinol**, 12, p. 36, May 2014.
107. O'BRIEN, T. J.; KALMIN, M. M.; HARRALSON, A. F.; CLARK, A. M. *et al.* Association between the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR) rs4073366 polymorphism and ovarian hyperstimulation syndrome during controlled ovarian hyperstimulation. **Reprod Biol Endocrinol**, 11, p. 71, Jul 2013.



108. OLIVEIRA, J. B.; BARUFFI, R. L.; PETERSEN, C. G.; MAURI, A. L. *et al.* A new ovarian response prediction index (ORPI): implications for individualised controlled ovarian stimulation. **Reprod Biol Endocrinol**, 10, p. 94, Nov 2012.
109. OVERBEEK, A.; LAMBALK, N. Pharmacogenomics of ovulation induction: facilitating decisions on who, when and how to treat. **Pharmacogenomics**, 10, n. 9, p. 1377-1379, Sep 2009.
110. PABALAN, N.; TREVISAN, C. M.; PELUSO, C.; JARJANAZI, H. *et al.* Evaluating influence of the genotypes in the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) Ser680Asn (rs6166) polymorphism on poor and hyper-responders to ovarian stimulation: a meta-analysis. **J Ovarian Res**, 7, p. 285, Dec 2014.
111. PAVLIK, R.; HECHT, S.; OCHSENKÜHN, R.; NOSS, U. *et al.* Divergent effects of the 677C>T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene on ovarian responsiveness and anti-Müllerian hormone concentrations. **Fertil Steril**, 95, n. 7, p. 2257-2262, Jun 2011.
112. PELUSO, C.; GOLDMAN, C.; CAVALCANTI, V.; GASTALDO, G. *et al.* Use of Bone Morphogenetic Protein 15 Polymorphisms to Predict Ovarian Stimulation Outcomes in Infertile Brazilian Women. **Genet Test Mol Biomarkers**, 21, n. 5, p. 328-333, May 2017.
113. POLYZOS, N. P.; TOURNAYE, H.; DEVROEY, P. AMH for predicting poor ovarian responders in GnRH antagonist cycles. **Hum Reprod**, 27, n. 6, p. 1876-1877; author reply 1877, Jun 2012.
114. QIN, Y.; ZHAO, Z.; SUN, M.; GENG, L. *et al.* Association of basal serum testosterone levels with ovarian response and in vitro fertilization outcome. **Reprod Biol Endocrinol**, 9, p. 9, Jan 2011.
115. QUINTANA, R.; KOPCOW, L.; MARCONI, G.; SUELDO, C. *et al.* Relationship of ovarian stimulation response with vascular endothelial growth factor and degree of granulosa cell apoptosis. **Hum Reprod**, 16, n. 9, p. 1814-1818, Sep 2001.
116. RICCETTI, L.; DE PASCALI, F.; GILIOLI, L.; SANTI, D. *et al.* Genetics of gonadotropins and their receptors as markers of ovarian reserve and response in controlled ovarian stimulation. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, 44, p. 15-25, Oct 2017.

117. RIGGS, R.; KIMBLE, T.; OEHNINGER, S.; BOCCA, S. *et al.* Anti-Müllerian hormone serum levels predict response to controlled ovarian hyperstimulation but not embryo quality or pregnancy outcome in oocyte donation. **Fertil Steril**, 95, n. 1, p. 410-412, Jan 2011.
118. RODINI, G. P.; GENRO, V. K.; MATTE, U.; PEREIRA, F. S. *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**, 28, n. 3, p. 221-224, Mar 2011.
119. ROMÃO, G. S.; NAVARRO, P. A.; FERRIANI, R. A.; DIB, L. A. *et al.* [Serum anti-Müllerian hormone to predict ovarian response in assisted reproduction cycles]. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 34, n. 12, p. 575-581, Dec 2012.
120. ROQUE, M.; BIANCO, B.; CHRISTOFOLINI, D. M.; BARCHI CORDTS, E. *et al.* Pharmacogenetic algorithm for individualized controlled ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. **Panminerva Med**, 61, n. 1, p. 76-81, Mar 2019.
121. RUIZ-SANZ, J. I.; PÉREZ-RUIZ, I.; MEIJIDE, S.; FERRANDO, M. *et al.* Lower follicular n-3 polyunsaturated fatty acid levels are associated with a better response to ovarian stimulation. **J Assist Reprod Genet**, 36, n. 3, p. 473-482, Mar 2019.
122. SCALICI, E.; BECHOUA, S.; ASTRUC, K.; DUVILLARD, L. *et al.* Apolipoprotein B is regulated by gonadotropins and constitutes a predictive biomarker of IVF outcomes. **Reprod Biol Endocrinol**, 14, n. 1, p. 28, May 2016.
123. SEIFER, D. B.; MACLAUGHLIN, D. T.; CHRISTIAN, B. P.; FENG, B. *et al.* Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. **Fertil Steril**, 77, n. 3, p. 468-471, Mar 2002.
124. SERDYŃSKA-SZUSTER, M.; OZEGOWSKA, K.; HOŁYSZ, M.; JAGODZIŃSKI, P. *et al.* [Prediction of poor response to controlled ovarian hyperstimulation based on GDF-9 polymorphism -- case report]. **Ginekol Pol**, 87, n. 1, p. 71-75, 2016.
125. SHRIM, A.; ELIZUR, S. E.; SEIDMAN, D. S.; RABINOVICI, J. *et al.* Elevated day 3 FSH/LH ratio due to low LH concentrations predicts reduced ovarian response. **Reprod Biomed Online**, 12, n. 4, p. 418-422, Apr 2006.

126. SIDDIQUI, Q. U. A.; ANJUM, S.; ZAHRA, F.; YOUSUF, S. M. Ovarian reserve parameters and response to controlled ovarian stimulation in infertile patients. **Pak J Med Sci**, 35, n. 4, p. 958-962, 2019 Jul-Aug 2019.
127. SINGH, N.; MALIK, E.; BANERJEE, A.; CHOSDOL, K. *et al.* "Anti-Mullerian Hormone: Marker for Ovarian Response in Controlled Ovarian Stimulation for IVF Patients": A First Pilot Study in the Indian Population. **J Obstet Gynaecol India**, 63, n. 4, p. 268-272, Aug 2013.
128. SIRISTATIDIS, C.; VOGIATZI, P.; POULIAKIS, A.; TRIVELLA, M. *et al.* Predicting IVF Outcome: A Proposed Web-based System Using Artificial Intelligence. **In Vivo**, 30, n. 4, p. 507-512, 2016 Jul-Aug 2016.
129. SMEENK, J. M.; SWEEP, F. C.; ZIELHUIS, G. A.; KREMER, J. A. *et al.* Antimüllerian hormone predicts ovarian responsiveness, but not embryo quality or pregnancy, after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. **Fertil Steril**, 87, n. 1, p. 223-226, Jan 2007.
130. SÖNMEZER, M.; ÖZMEN, B.; ATABEKOGLU, C. S.; PAPUCCU, E. G. *et al.* Serum anti-Mullerian hormone levels correlate with ovarian response in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. **J Assist Reprod Genet**, 29, n. 7, p. 597-602, Jul 2012.
131. SONNTAG, B.; KIESEL, L.; NIESCHLAG, E.; BEHRE, H. M. Association of inhibin B serum levels with parameters of follicular response in a randomized controlled trial comparing GnRH agonist versus antagonist protocols for ovarian hyperstimulation. **J Assist Reprod Genet**, 21, n. 7, p. 249-255, Jul 2004.
132. SUDO, S.; KUDO, M.; WADA, S.; SATO, O. *et al.* Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. **Mol Hum Reprod**, 8, n. 10, p. 893-899, Oct 2002.
133. TANRIVERDI, G.; DENIR, S.; AYLA, S.; BILIR, A. *et al.* Notch signaling pathway in cumulus cells can be a novel marker to identify poor and normal responder IVF patients. **J Assist Reprod Genet**, 30, n. 10, p. 1319-1326, Oct 2013.
134. TOHLOB, D.; ABO HASHEM, E.; GHAREEB, N.; GHANEM, M. *et al.* Association of a promoter polymorphism in FSHR with ovarian reserve and response to ovarian stimulation in women undergoing assisted reproductive treatment. **Reprod Biomed Online**, 33, n. 3, p. 391-397, Sep 2016.
135. TOLIKAS, A.; TSAKOS, E.; GEROU, S.; PRAPAS, Y. *et al.* Anti-Mullerian Hormone (AMH) levels in serum and follicular fluid as predictors of ovarian

- response in stimulated (IVF and ICSI) cycles. **Hum Fertil (Camb)**, 14, n. 4, p. 246-253, Dec 2011.
136. URBANCSEK, J.; HAUZMAN, E. E.; MURBER, A.; LAGARDE, A. R. *et al.* Serum CA-125 and inhibin B levels in the prediction of ovarian response to gonadotropin stimulation in in vitro fertilization cycles. **Gynecol Endocrinol**, 21, n. 1, p. 38-44, Jul 2005.
137. VAGNINI, Laura Diniz *et al.* The TP73 gene polymorphism (rs4648551, a> G) is associated with diminished ovarian reserve. **PLoS one**, v. 10, n. 3, p. e0120048, 2015.
138. WANG, T. T.; WU, Y. T.; DONG, M. Y.; SHENG, J. Z. *et al.* G546A polymorphism of growth differentiation factor-9 contributes to the poor outcome of ovarian stimulation in women with diminished ovarian reserve. **Fertil Steril**, 94, n. 6, p. 2490-2492, Nov 2010.
139. WU, C. H.; CHEN, Y. C.; WU, H. H.; YANG, J. G. *et al.* Serum anti-Müllerian hormone predicts ovarian response and cycle outcome in IVF patients. **J Assist Reprod Genet**, 26, n. 7, p. 383-389, Jul 2009.
140. WU, Y. T.; WANG, T. T.; CHEN, X. J.; ZHU, X. M. *et al.* Bone morphogenetic protein-15 in follicle fluid combined with age may differentiate between successful and unsuccessful poor ovarian responders. **Reprod Biol Endocrinol**, 10, p. 116, Dec 2012.
141. XI, W.; YANG, Y.; MAO, H.; ZHAO, X. *et al.* Circulating anti-mullerian hormone as predictor of ovarian response to clomiphene citrate in women with polycystic ovary syndrome. **J Ovarian Res**, 9, p. 3, Feb 2016.
142. XIAO, S.; LI, Y.; LONG, L.; LUO, C. *et al.* Basal serum testosterone levels correlate with ovarian reserve and ovarian response in cycling women undergoing in vitro fertilization. **Gynecol Endocrinol**, 32, n. 1, p. 51-54, 2016.
143. YAN, Y.; GONG, Z.; ZHANG, L.; LI, Y. *et al.* Association of follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms with ovarian response in Chinese women: a prospective clinical study. **PLoS One**, 8, n. 10, p. e78138, 2013.
144. YIN, Q.; LI, Y.; HUANG, J.; YANG, D. [Association of rs13405728 polymorphism of LHR gene with slow ovarian response]. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**, 32, n. 6, p. 840-843, Dec 2015.
145. YOSHIDA, Y.; YAMASHITA, Y.; SAITO, N.; ONO, Y. *et al.* Analyzing the possible involvement of anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone

- receptor II single nucleotide polymorphism in infertility. **J Assist Reprod Genet**, 31, n. 2, p. 163-168, Feb 2014.
146. YOVICH, J. L.; ALSBJERG, B.; CONCEICAO, J. L.; HINCHLIFFE, P. M. *et al.* PIVET rFSH dosing algorithms for individualized controlled ovarian stimulation enables optimized pregnancy productivity rates and avoidance of ovarian hyperstimulation syndrome. **Drug Des Devel Ther**, 10, p. 2561-2573, 2016.
147. ZAMANIARA, T.; TAHERIPANAH, R.; GHADERIAN, S. M. H.; ZAMANIARA, E. *et al.* Polymorphism FSHR (-29G/A) as a genetic agent together with ESRI (XbaI/G/A) in women with poor response to controlled ovarian hyperstimulation. **Hum Antibodies**, 26, n. 3, p. 143-147, 2017.
148. ZHANG, F.; LIU, X. L.; RONG, N.; HUANG, X. W. Clinical value of serum anti-mullerian hormone and inhibin B in prediction of ovarian response in patients with polycystic ovary syndrome. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, 37, n. 1, p. 70-73, Feb 2017.
149. ZHENG, H.; CHEN, S.; DU, H.; LING, J. *et al.* Ovarian response prediction in controlled ovarian stimulation for IVF using anti-Müllerian hormone in Chinese women: A retrospective cohort study. **Medicine (Baltimore)**, 96, n. 13, p. e6495, Mar 2017.
150. ZHONG, G.; CHEN, B. Serum and follicular fluid levels of IGF-II, IGF-binding protein-4 and pregnancy-associated plasma protein-A in controlled ovarian hyperstimulation cycle between polycystic ovarian syndrome (PCOS) and non-PCOS women. **Gynecol Endocrinol**, 27, n. 2, p. 86-90, Feb 2011.

ARTIGO (This article will be submitted in Human Reproduction)

## DEVELOPMENT OF AN *IN SILICO* MODEL FOR OVARIAN RESPONSE RELATED TO NON DEMOGRAPHIC FACTORS

Eisele, B.S.; Bessow, C.; Donato, R.; Genro, V. K.; Cunha-Filho, J. S.

### INTRODUCTION

Today, 2–3% of all births in developed countries are estimated to be the result of IVF procedures. (Altmäe, S., 2011)

Regardless of the constant improvement of pregnancy rate, the success rate in IVF still remains around 30% per cycle. The expected outcome of IVF treatment depends greatly on the effectiveness of controlled ovarian hyperstimulation (COH). (Altmäe, S., 2011)

Several studies have demonstrated high variability in clinical outcome in COH-treated women. This unpredictable variability in the response to gonadotrophins represents one of the most intractable problems of IVF treatment. Thus, an understanding and prediction of the ovarian response to stimulation is of paramount importance to the success and safety of IVF treatment. (Altmäe, S., 2011, Kligman and Rosenwaks, 2001; Coccia and Rizzello, 2008; Freour et al., 2008; Haller et al., 2008).

Several predictive factors such as age, antral follicle count, day 3 FSH concentrations, inhibin B and anti-Müllerian hormone have been shown to be related to the individual outcome of a treatment cycle. (Keck, C., 2005)

Age is the most commonly used predictor of fertility; increasing age inevitably results in substantial germ cell loss by the age of 40. Statistics for pregnancy, live birth and singleton live birth rate also decline rapidly from the mid-thirties on. However, even though age is clearly linked to declining fertility, it does not affect all women equally. (Alviggi, C., 2012)

The antral follicle count (AFC) and anti-Müllerian hormone (AMH) are currently considered to have the best sensitivity and specificity to predict the

ovarian response, despite them having 10–20% false-positive rates (Broekmans FJ, 2006).

Moreover, the Follicular Output RaTe (FORT) evaluates the proportion of follicles that were responsive to FSH and is calculated by dividing the number of preovulatory follicles (16–20 mm)  $\times$  100 by the antral follicle count (3–8 mm), and it is known to be correlated to the outcomes of IVF, including pregnancy rates (C. Bessow, 2019). Follicular output rate (FORT) is an excellent option to evaluate the follicular response objectively, owing to it is not influenced by the size of the pre-existing cohort of antral follicles, but rather by showing the proportion of follicles which has responded during COH. Besides that, FORT has already been related to reproductive outcomes in previous studies (Genro et al. 2011; Gallot et al. 2012; Zhang et al. 2013; Rehman et al. 2015; Hassan et al. 2017).

Besides these parameters, genetic variability also seems to be an important factor in determining the ovarian response in COH and IVF. (Altmäe, S., 2011)

Therefore, genetic screening could provide specific information about a woman's reproductive system that would not be accurately predicted by age, hormonal or functional biomarkers. By considering hormonal (FSH and anti-Müllerian hormone [AMH]), functional (antral follicle count [AFC]), and genetic biomarkers in combination, a complete picture of an individual patient's overall reproductive status can be formulated to provide a basis of designing an optimal treatment plan. (Alviggi, C., 2012)

Hence, through pharmacogenomics research, drug therapy can be optimized on the basis of individual genetic profile. (de Castro, F., 2005)

*In Silico* research, in which mathematical models of a physiologic or pharmacologic system are developed and tested on a computer, are a hybrid of *in vivo* and *in vitro* techniques. Like *in vivo* techniques, *In Silico* experiments are designed to mimic the behavior of organisms in their entirety. However, like *in vitro* experiments, they do not require actual experimentation on animal subjects.

Furthermore, conditions can be controlled with exquisite detail, because the investigator determines them as part of the model employed. *In Silico* techniques, thus, offer the clinician-scientist the opportunity to answer questions that, for a variety of reasons, could not otherwise be easily addressed. (Colquitt RB, 2011)

*In Silico* medicine, until then, was not used for assisted reproduction purposes, therefore, we proposed to perform, for the first time, an *In Silico* model for ovarian response evaluation.

Correctly identifying patients who are at risk for poor response could help individualize counseling and allow patients to decide to undergo infertility treatments. Accurate assessment of ovarian response before the patient enters the IVF program is therefore of crucial importance.

This study aims to find, based on a literature review, biomarkers that could predict the ovarian response and use an *In Silico* model to know the relationship among them.

## MATERIAL AND METHODS

### **Criteria for considering studies for this review**

This review is focused on studies of biomarkers and its influence on COH in IVF technology. Articles were eligible if they covered evaluation of the association between any biomarker and ovarian response outcome. Articles were selected if the target population consisted of women undergoing ovarian stimulation.

### **Search strategy for the identification of studies**

A review of the literature was conducted up to October 2019 across PUBMED database. Keywords used for the searchers were: ovarian induction, in vitro fertilization, gens, biomarkers and ovarian response. We downloaded all references identified into EndNote web.

The 2009 PRISMA checklist was used to guide this review.

### **Inclusion and exclusion criteria**



Articles were included if they studied associations between one or more biomarker and ovarian response outcome, and if the study group consisted of women undergoing COH.

Articles were excluded if they reported other outcomes, instead ovarian response and we excluded studies with women with polycystic ovary syndrome. We excluded articles published before 2000, studies in animals and non-cross-sectional studies as we found no randomized controlled trials.

### **Identification of eligible studies**

The abstracts of all articles identified through the search were read by one researcher, who selected the articles that were potentially eligible. In the next step, two researchers carefully read and evaluated potentially eligible articles and decided on inclusion.

The reference list of every selected article was carefully checked to identify other potentially eligible studies.

## **RESULTS**

### **Search Results**

Our initial search led us to 15.977 articles, 7.070 excluding articles published before 2000 and articles with animals. The process of paper selection is summarized in the flow below. Articles were removed at initial screening (based on the title or abstract) if they did not meet the inclusion criteria.

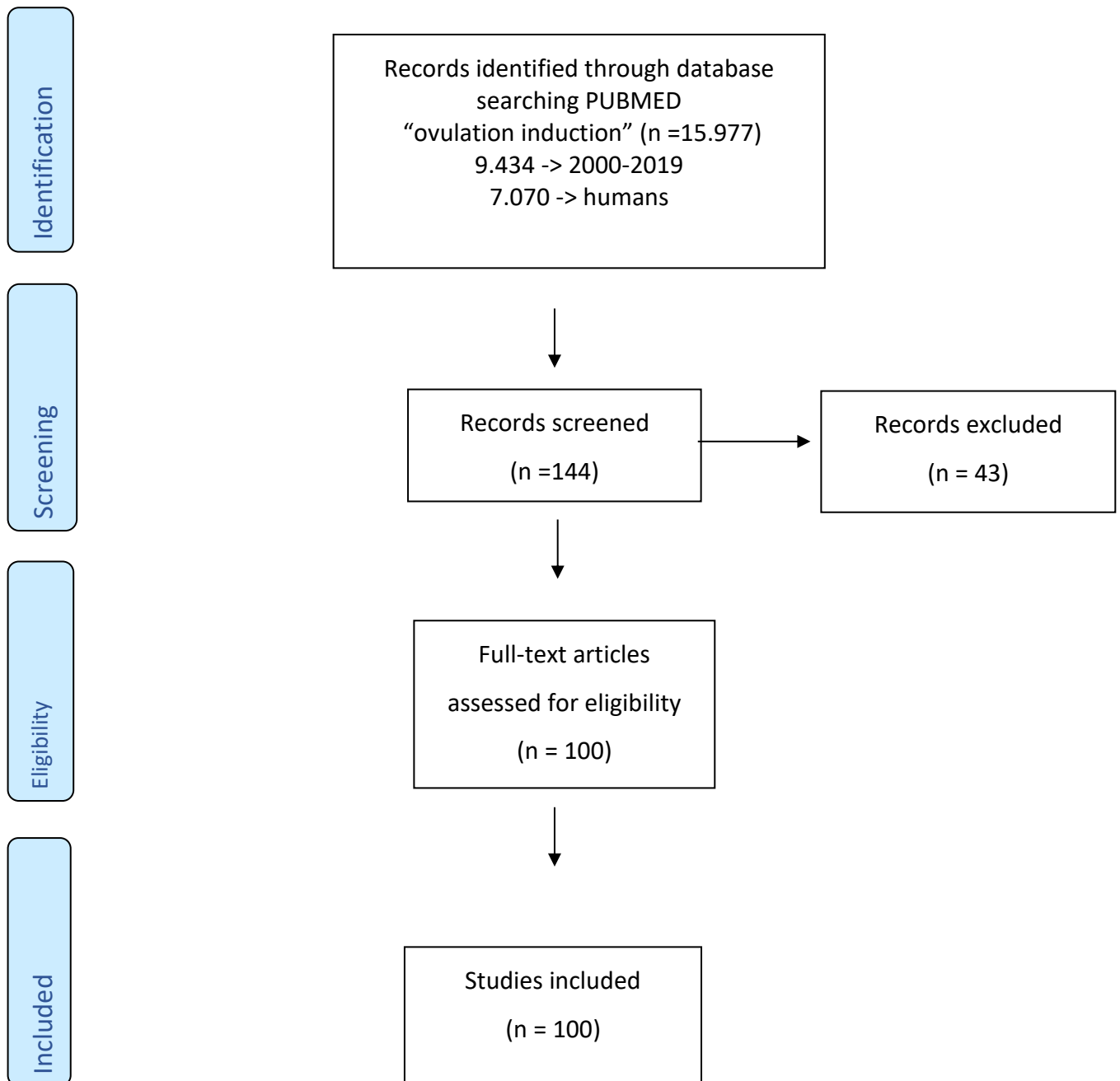
Full-text versions of articles were obtained if eligibility could not be determined from reading the abstract. After screening titles and abstracts, we selected 144 articles for further reading. A total of 43 articles did not meet our inclusion criteria, and 100 studies were included in the review. All the studies included are cross-sectional, we did not find randomized clinical trials.

Among the 100 articles, 42 biomarkers were identified, besides their polymorphisms. All the biomarkers and their descriptions are in the attachment 1.

Most of the included studies are prospective, 31 are retrospective and 69 are prospective. The study outcomes differ greatly, with only 2 articles with

pregnancy rate outcome. Others evaluated ovarian response by number, quality or size of oocytes, gonadotropin dose, hyperstimulation or cycle cancellation, and were, therefore, quite heterogeneous.

### Flow Diagram



**Articles Included**

Table 1

**AMH e AMHR2**

Aflatoonian, A., 2009 (P)  
Alson, S. S. E., 2018 (P)  
Anckaert, E., 2012 (R)  
Andersen, A. N., 2011 (P)  
Arce, J. C., 2013 (P)  
Baker, V. L., 2018 (P)  
Burks, H. R., 2015 (R)  
Buyuk, E., 2011 (R)  
Cerra, C., 2016 (P)  
Coskun, B., 2018 (R)  
Ficicioglu, C., 2014 (P)  
Ganidou, M. A., 2014 (P)  
Grzegorzczak-Martin, V., 2012 (R)  
Hamdine, O., 2015 (R)  
Hanevik, H. I., 2010 (R)  
Karagiorga, I., 2015 (P)  
Knez, J., 2015 (R)  
Kunt, C., 2011 (P)  
La Marca, A., 2007 (P)  
Lee, R. K., 2011 (R)  
Li, R., 2016 (P)  
Li, Y., 2015 (P)

Motawi, T. M. K., 2017 (P)  
Muttukrishna, S., 2004 (P)  
Muttukrishna, S., 2005 (R)  
Riggs, R., 2011 (R)  
Romão, G. S., 2012 (P)  
Siddiqui, Q. U. A., 2019 (R)  
Singh, N., 2013 (P)  
Smeenk, J. M., 2007 (P)  
Tolikas, A., 2011 (P)  
Wu, C. H., 2009 (P)  
Yoshida, Y., 2014 (P)  
Zheng, H., 2017 (R)

<b>APOB</b>	Scalici, E., 2016 (P)
<b>AR</b>	Lledó, B., 2014 (P)
<b>v-betaLH</b>	Alviggi, C., 2013 (R)
	Hanevik, H. I., 2014 (R)
	Cerra, C., 2014 (P)
<b>BMP15</b>	Hanevik, H. I., 2011 (R)
	Morón, F. J., 2006 (R)

- Peluso, C., 2017 (P)
- Wu, Y. T., 2012 (R)
- CA125**
- Hauzman, E. E., 2005 (P)
- Urbancsek, J., 2005 (P)
- CYP19**
- Lazaros, L., 2012 (P)
- Anagnostou, E., 2012 (P)
- Bahceci, M., 2007 (P)
- de Mattos, C. S., 2014 (P)
- Kahyaoglu, S., 2015 (R)
- Estrogênio e ESR 1 e 2**
- Kunt, C., 2011 (P)
- Motawi, T. M. K., 2017 (P)
- Wu, C. H., 2009 (P)
- Zamaniara, T., 2017 (P)
- EGF (Fator de crescimento epidermal)**
- Bahceci, M., 2007 (P)
- Achrekar, S. K., 2009 (R)
- Alviggi, C., 2016 (R)
- Anagnostou, E., 2012 (P)
- FSH e FSHR**
- Andersen, A. N., 2011 (P)
- Ashrafi, M., 2005 (R)
- Barad, D. H., 2005 (P)
- Binder, H., 2012 (R)
- Cai, J., 2006 (P)
- Cai, J., 2007 (P)

Čuš, M., 2019 (P)  
de Castro, F., 2003 (R)  
Desai, S. S., 2013 (R)  
García-Jiménez, G., 2018 (P)  
Genro, V. K., 2012 (P)  
Grzegorzczak-Martin, V., 2012 (R)  
Huang, X., 2015 (P)  
Iwase, A., 2005 (P)  
Kaviani, M., 2017 (P)  
Klinkert, E. R., 2006 (P)  
Kunt, C., 2011 (P)  
Laven, J. S., 2003 (P)  
Lazaros, L., 2012 (P)  
Lazaros, L., 2013 (P)  
Liang, X., 2001 (P)  
Loutradis, D., 2006 (P)  
Motawi, T. M. K., 2017 (P)  
Muttukrishna, S., 2004 (P)  
Ng, E. H., 2005 (P)  
Shrim, A., 2006 (R)  
Siddiqui, Q. U. A., 2019 (R)  
Sudo, S., 2002 (P)  
Tohlob, D., 2016 (P)  
Wu, C. H., 2009 (P)

	Yan, Y., 2013 (P)
	Zamaniara, T., 2017 (P)
<b>GDF9</b>	Wang, T. T., 2010 (P)
<b>HRG</b>	Nordqvist, S., 2015 (P)
	Bahceci, M., 2007 (P)
	Choi, Y. S., 2006 (P)
	Cunha-Filho, J. S., 2005 (P)
<b>IGF1, IGFBP1, IGFBP3 e IGFBP4</b>	Dorn, C., 2003 (P)
	Fried, G., 2003 (R)
	Genc, G., 2011 (P)
<b>IL1<math>\beta</math> (interleucina-1beta) e TNF<math>\alpha</math> (fator de necrose tumoral alpha)</b>	Nikolettos, N., 2004 (P)
	Fried, G., 2003 (R)
	Li, Y., 2015 (P)
	Kunt, C., 2011 (P)
<b>Inibina B</b>	Wu, C. H., 2009 (P)
	Muttukrishna, S., 2005 (R)
	Urbancsek, J., 2005 (P)
	Muttukrishna, S., 2004 (P)
<b>KDR</b>	O'Brien, T. J., 2014 (P)
	Nikolettos, N., 2004 (P)
<b>Leptina</b>	Dorn, C., 2003 (P)
	Gürbüz, B., 2005 (P)

	G A, R., 2018 (R)
	Kunt, C., 2011 (P)
	Liang, X., 2001 (P)
<b>LH, LHR e LHCGR</b>	O'Brien, T. J., 2013 (P)
	Shrim, A., 2006 (R)
	Wu, C. H., 2009 (P)
	Yin, Q., 2015 (P)
<b>MiRNA</b>	Karakaya, C., 2015 (P)
<b>MIS</b>	Seifer, D. B., 2002 (R)
<b>MTHFR</b>	Pavlik, R., 2011 (P)
<b>NOTCH</b>	Tanriverdi, G., 2013 (P)
<b>PAPP-A</b>	Choi, Y. S., 2006 (P)
<b>Progesterona</b>	Bahceci, M., 2007 (P)
<b>PUFA</b>	Ruiz-Sanz, J. I., 2019 (P)
<b>SHBG</b>	Hatzi, E., 2011 (P)
	Dorn, C., 2003 (P)
	Neulen, J., 2001 (P)
<b>VEGF, sVEGFR1 e VEGFR2</b>	Nikolettos, N., 2004 (P)
	O'Brien, T. J., 2014 (P)
	Quintana, R., 2001 (P)
	Bahceci, M., 2007 (P)
<b>Testosterona</b>	Xiao, S., 2016 (R)
	Qin, Y., 2011 (R)
<b>TP73</b>	LD Vagnini, 2019 (P)



### ***In Silico* Analysis**

We choose the database STRING to do the *In Silico* analysis, inserting the 42 biomarkers in the model. Of this 42, four biomarkers (testosterone, progesterone, estrogen and miRNA) were not found in this database. The result is shown in Figure 1.

### **String Results**

number of nodes:39

number of edges:210

average node degree:10.8

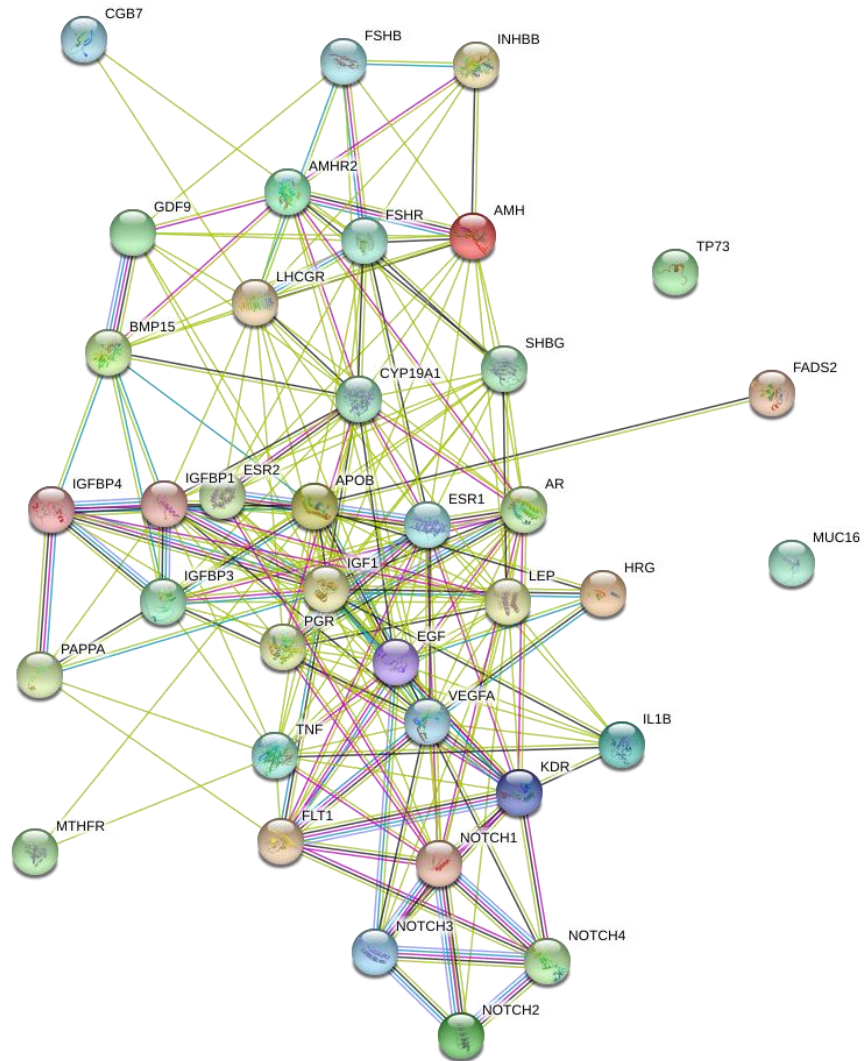
avg. local clustering coefficient:0.652

expected number of edges:42

PPI enrichment p-value:< 1.0e-16

This means that your proteins have more interactions among themselves than what would be expected for a random set of proteins of similar size, drawn from the genome. Such an enrichment indicates that the proteins are at least partially biologically connected, as a group.

Figure 1



This database allows to expand this search and found relationships between others types of biomarkers, besides the ones included in our review.

Figure 2

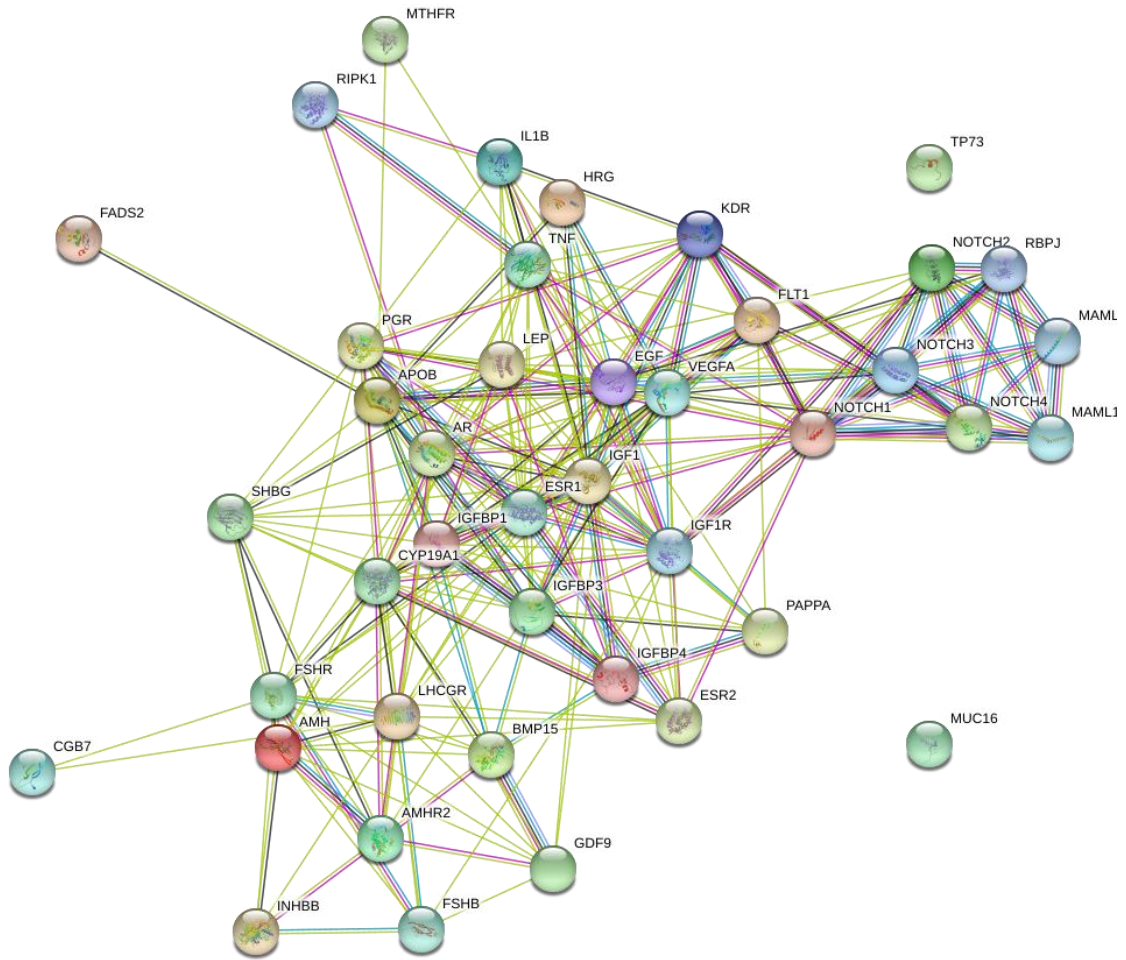
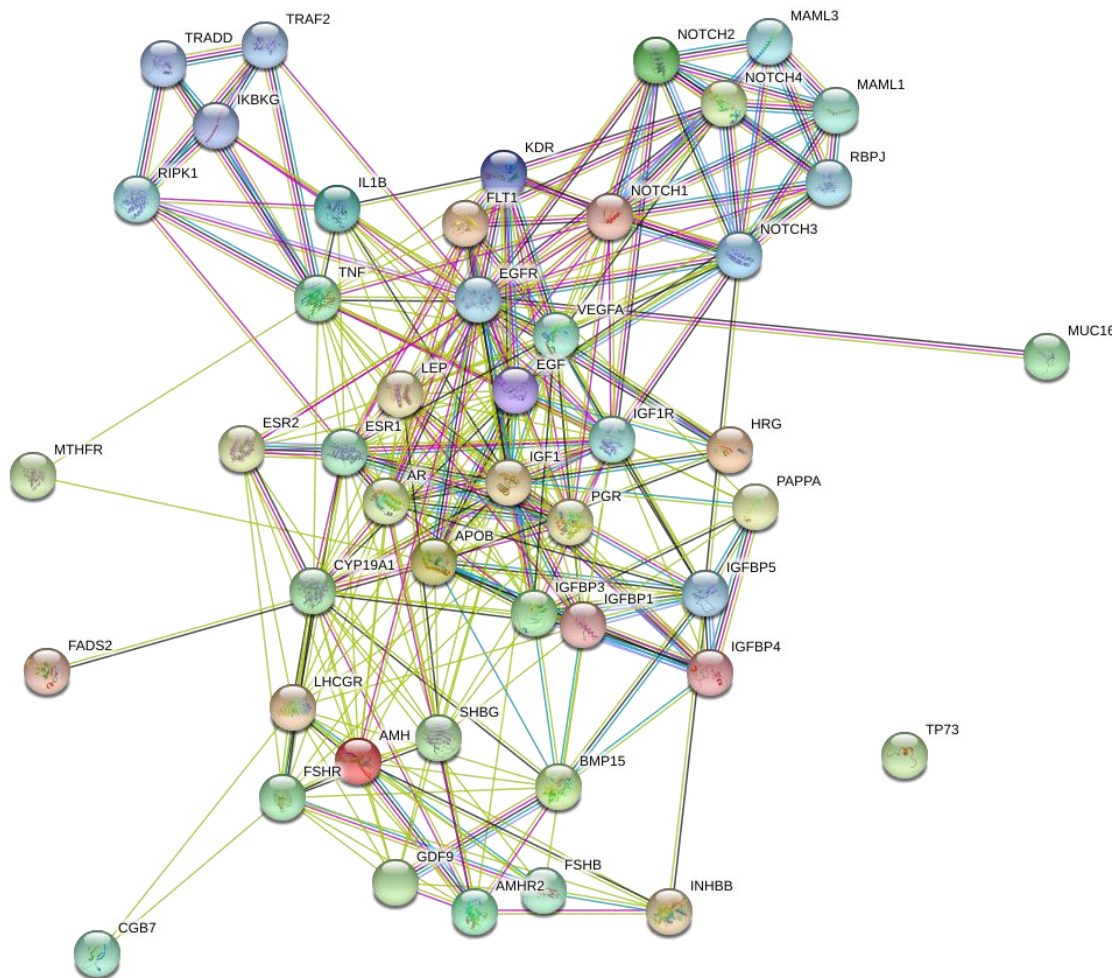


Figure 3



## CONCLUSION AND DISCUSSION

In this study we conducted a review to identify biomarkers described in the literature that could predict the ovarian response to controlled ovarian stimulation and then we use the *In Silico* method to understand the relationships between the various biomarkers. To our knowledge this was the first attempt to use *In Silico* medicine for this purpose.

We identified 42 biomarkers among the 100 articles included in the literature review, all included studies were cross-sectional perspectives and retrospectives, we found no randomized controlled trials associating biomarkers with ovarian response, we could say that the evidence we have in these articles is of low quality, both due to the design and the chosen outcomes, which are variable, with many biases.

The obstacles in pharmacogenetic studies applied in IVF-treated women so far are the small sample sizes and the lack of independent replication of the results (Altmae, 2011).

In *In Silico* analysis, using the STRING database, we can see the relationships between the 38 molecules and by expanding we can find other molecules, besides those we have selected in the literature, that may be related to assisted reproduction and that we may not have knowledge yet.

We could conclude from this analysis that proteins have more interactions among themselves than what would be expected for a random set of proteins of similar size, drawn from the genome. Such an enrichment indicates that the proteins are at least partially biologically connected, as a group.

As limitations of this study, we could say that a more comprehensive literature review would be necessary and, perhaps, it would be interesting to perform the *In Silico* model in other databases besides STRING. This would give us a more complete and comprehensive view of the molecules involved in the ovarian response.

On the other hand, this is the first attempt to use the *In Silico* method in assisted reproduction. Although the studies are not of good quality, we were able to identify some biomarkers and prove their interaction and connection through the *In Silico* method.

The genetic marker FSHR Asn680Ser is by far the most studied in relation to ovarian stimulation, and is practically the only marker that could currently be explored in the clinical field in terms of testing its utility in the routine analysis of women undergoing COH protocols.

However, the specificity and sensitivity of a single genetic marker will be too low for it to be employed as a predictive biomarker (Moron et al., 2007).

In addition to the large sample size, these genetic association studies should focus on optimal selection of study samples, which are controlled for ethnicity and geographic origin in order to minimize phenotype heterogeneity (McCarthy et al., 2008).

Although data are accumulating with evidence suggesting that the ovarian response to COH is mediated by various polymorphisms, the optimal biomarkers and the efficacy of the tests still remain to be evaluated.

Ideally, pharmacogenetic/genomic studies will eventually lead to an era in which an individual's DNA sequence is regarded as an integral determinant of drug therapy (Giacomini et al., 2007).

Therefore, in order to develop real predictive genetic testing panels for COH outcome, it is important to increase the number of validated markers and to analyse interaction among them. *In Silico* medicine, applied in this context could help us understand the relationships between the various biomarkers.

Thus, there is clearly a need for a series of large and well-designed clinical studies, taking into account different COH protocols, in order to be able to identify markers useful for adjusting the doses during COH treatment.

Probably, the most predictive COH test will involve a combination of phenotypic (patient's age, weight, ovarian morphology, basal FSH level and other blood serum ovarian reserve markers) and genetic markers, which will be applied in routine diagnostic tests before starting ovulation stimulation in order to be able to predict and achieve an 'appropriate' response, i.e. obtain a balance between efficacy (retrieval of an adequate number of oocytes) and risks (avoidance of OHSS and cycle cancellation because of an inadequate response) while maximizing the chance of pregnancy (Fauser et al., 2008; Overbeek and Lambalk, 2009b).

Ovarian response in IVF is a complex puzzle for which we now know the most important pieces. The correct measurement of markers of ovarian reserve allows a scientific estimate of the pool of follicles that potentially respond to ovarian stimulation. Published studies indicate an important role for both AFC and AMH in the prediction of the extremes of ovarian response and for enabling the subsequent individualization of a therapeutic strategy. (La Marca, 2014)

The age-associated decline in female reproductive function due to the reduction of the ovarian reserve and the quality of oocytes has been well

established. The age-related reduction in ovarian reserve has been well established and very clearly reflected by the continuous decrease in the ovarian primordial follicle pool with ageing through atresia or ovulatory recruitment. As a consequence, the pool of follicles becomes depleted, and the reproductive function is considered to be exhausted. (La Marca, 2017)

As expected, the prevalence of poor ovarian responder increases with age, and in women over 40 years of age it is >50%. However, several of these women are still able to produce more follicles and oocytes, whereas young age does not completely protect against POR (El-Toukhy et al., 2002). From this point of view, age may be proposed as a post hoc test, allowing clinicians to classify women aged over 40 years with one previous poor IVF cycle as poor responders. In the same manner, if young women present with a POR during the first cycle, a truly diminished ovarian reserve must be confirmed using a post hoc test, an abnormal ovarian reserve test or a subsequent POR despite maximal stimulation. (A.P. Ferraretti, 2011)

Serum AMH concentrations are strongly related to the pool of primordial follicles and decline with advancing female age, becoming undetectable some years before menopause. Owing to the strong relationship with ovarian reserve, serum AMH measurement may allow predicting the age at menopause and the number of retrieved oocytes. (La Marca, 2003; La Marca, 2007)

Comparing AMH with AFC, AMH has the advantage of a very little intra- and inter-cycle variability. Direct comparisons between AFC and serum AMH in IVF cycles have generally shown a similar capacity in predicting ovarian response and the number of retrieved oocytes, but AMH and AFC cut-off values reported in literature are very variable.

In our *In Silico* analysis we identified some unmatched molecules in the literature regarding ovarian response. Among them, RIPK1 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1), IKBKG (NF-kappa-B essential modulator), TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), MAML3 (mastermind-like protein 3), MAML1 (mastermind-like protein 1) and RBPJ (recombining binding protein suppressor of hairless), perhaps further studies using these biomarkers in relation to ovarian response might be interesting.

In conclusion, our study was the first to use the *In Silico* model to identify biomarkers to be used in the ovarian response to controlled ovarian stimulation and we were able to demonstrate an association between the molecules. However, we need more studies to evaluate other biomarkers than those we found in our search; Randomized controlled trials are also needed for better quality of evidence, so we could improve clinical practice by individualizing the treatment of patients undergoing controlled ovarian stimulation and assisted reproduction.



**ATTACHMENT 1:****AMH and AMHR2**

AMH is a member of the transforming growth factor beta superfamily and is produced by the granulosa cells of preantral and small antral follicles in the ovary. It is highly expressed in the developing follicles, but its expression diminishes at the stage for selection of the dominant follicle by FSH. It is used in clinical practice as a biomarker of ovarian reserve. AMH is expressed in granulosa cells and may regulate FSH sensitivity in the ovary. Therefore, it has been proposed to have a role in influencing ovarian response to stimulation. (Cerra, C., 2016)

AMH has the advantage of having relatively stable levels throughout the menstrual cycle and is more accurate in providing information on the expected ovarian response to controlled stimulation. (Motawi, T. M. K., 2017)

AMH exerts its biological effects through the AMH type II receptor (AMHR2), which in turn activates AMH type I receptor (AMHR1) and creates a downstream signaling pathway. The human gene for AMHR2 is located on chromosome 12, consists of 11 exons and is expressed in granulosa and theca cells. (Karagiorga, I., 2015)

Genro et al, 2017 showed that that an SNP in the AMH gene is associated with infertility in endometriosis, whereas several SNPs in the GDF-9 gene and the -482A G SNP in the AMHR2 gene were found to be unrelated.

**APOB**

Apolipoprotein B (APOB) is a major structural protein for atherogenic APOB-containing lipoproteins, including chylomicrons, Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL), Intermediate-Density Lipoprotein (IDL) and Low-Density Lipoprotein (LDL). The APOB-containing lipoproteins contain large amounts of cholesterol and triglycerides (TG) and are involved in lipoprotein metabolism and plasma lipid transport.

Human granulosa cells (GC) are able to assemble and secrete APOB100 containing lipoproteins. Although GC functions are mostly influenced by

gonadotropins, hormonal regulation of APOB expression in GC has never been investigated.

APOB is down-regulated by gonadotropins (FSH and hCG) which could influence APOB content in ovarian follicle during COS (Scalici, E., 2016)

## **AR**

Androgen Receptor is expressed in the ovary, mainly in the granulosa cells, suggesting involvement in folliculogenesis. Similarly, AR protein has been localized to the theca cells of preantral follicles, granulosa cells of antral follicles and most intensely in granulosa cells and theca cells of dominant follicles. Androgen activated AR exerts its biological effects by stimulating target genes via a sequence of processes, including ligand binding, homodimerization, nuclear translocation, DNA binding and a complex formation with co-regulators and general transcription factors .

Different studies have shown no association between CAG repeats in the AR gene and polycystic ovaries. Moreover, recent publications reported this association with premature ovarian failure patients. (Lledó, B.,2014)

## **v-betaLH**

LH is a heterodimeric hormone characterized by two subunits, alpha and beta, produced in the anterior pituitary gland; the beta-subunit confers the specificity of the hormone.

v-betaLH is characterized by an extra glycosylation signal into the  $\beta$  subunit, which apparently adds a second oligosaccharide side-chain to Asn13 of the  $\beta$  protein. This molecular variation influences the pharmacokinetic properties of v-betaLH which shows an elevated bioactivity in vitro, but a significantly shorter half-life (26 min) in circulation when compared with the wild type LH (48 min), being associated with hyporesponse and resistance to recombinant FSH administration. (Alviggi et al., 2009).

## **BMP15**

BMP15 is a member of the BMP superfamily that controls many aspects of development by binding and activating two types of transmembrane

serine/threonine kinase receptors and signaling molecules against decapentaplegic (SMAD) homologue proteins to regulate cellular functions. BMP15 is located on the X chromosome in human genome and is expressed in the ovary.

The BMP15 protein is synthesized in the oocyte and is an oocyte-secreted factor that works together with GDF9 in folliculogenesis and fertility to play important roles in fertility regulation and follicular development. (Peluso, C., 2017)

### **CA125**

CA125, which is an antigenic determinant on a highmolecular-weight glycoprotein, is expressed by most epithelial ovarian cancers.

It is also expressed in all three derivatives of celomic epithelium and can be demonstrated in the epithelium of the endocervix, the Fallopian tubes, and in both proliferative and secretory endometrium. CA-125 can be measured in the peripheral circulation. Although it has been investigated mainly for its potential as a serum marker of endometrial function and receptivity, contradictory data have been published in the literature on the exact source of serum CA-125, whether it is derived from the endometrium or the ovaries.

CA-125 can also be detected in uterine flushings in both natural and stimulated cycles, and some authors reported significant concentrations of CA-125 in periovulatory follicles in IVF patients. (Urbancsek, J., 2005)

### **CYP19**

Cytochrome P450 aromatase is expressed in ovarian granulosa cells and luteal corpus, participates in human reproduction by catalyzing the irreversible transformation of androgen to estrogen. (Lazaros, L., 2012)

A cholesterol side chain cleavage enzyme, product of cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide gene 1, catalyzes the conversion of cholesterol in pregnancy, or substrate for steroidogenesis. Its gene is located in chromosomal region 15q23-q24 and is composed of 9 exons. 241 SNPs have already been included in this gene.

Gharani et al (1997) demonstrated an association between polymorphism (TTTTA) in hyperandrogenic states and polycystic ovary syndrome. An American study found no association between variation and increased risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome, despite a small sample (Ferk et al., 2006).

The aromatase gene (CYP19A1) is another candidate in pharmacogenetic research for ovulation induction. The gene is located in chromosomal region 15q21.1 and is composed of 10 exons. More than 1080 SNPs have been identified in this gene ([www.snpper.chip.org](http://www.snpper.chip.org))

Women with variation (TTTA) with low estrogen variation (Haiman et al., 2000; Tworoger et al., 2004). Altma et al (2009) found an association between polymorphism and low ovarian sensitivity in the administration of FSH for ovarian stimulation, while two other studies did not show the same result (de Castro et al., 2004; Binder et al., 2008).

### **Estrogens and ESR 1 e 2**

In addition to folliculogenesis, estrogens play an important role in endometrial preparation for implantation. Estrogen signalling is mediated by estrogen receptors, which are ligand-activated transcription factors composed of several domains important for hormone binding, DNA binding and activation of transcription.

Estrogen receptors (ESRs) are important candidates in ovarian responsiveness to FSH, since direct effects of estrogens on follicle growth, maturation and oocyte release are well established.

Two estrogen receptors have been identified in humans, ERa (6q25) and ERb (14q22), encoded by ESR1 and ESR2 genes, respectively. In folliculogenesis, the proliferative actions of estrogens are mediated by ERa (predominantly expressed in the theca layer), while the differentiation and antiproliferative effects required for reaching the antral stage require ERb (expressed in granulosa cells of growing follicles at all developmental stages). (Altmäe, S., 2011)

### **EGF (Epidermal growth factor)**

Epidermal growth factor (EGF) possibly play facultative role as autocrine and paracrine modulator of ovarian function.

There is increasing evidence that ovarian growth factors are involved in follicular dynamics, and EGF affect steroidogenesis in granulosa cells. EGF stimulates oocyte nuclear and cytoplasmic maturation, as well as granulosa cell differentiation. On the other hand, EGF decreases aromatase activity in granulosa cells. (Bahceci, M., 2007)

### **FSH and FSHR**

It is well established that the physiological action of FSH depends on the activation of its receptor (FSHR), which is expressed by granulosa cells. The hormone FSH plays a pivotal role in ovarian function, where its main effects are related to granulosa cell proliferation, oocyte maturation and estrogen synthesis via activation of the aromatase gene. As the success of COH depends greatly on the efficacy of the FSH dose administered to the patient, the FSHR gene clearly is the primary candidate gene to explain differences in COH outcome. (Altmäe, S., 2011)

The most studied SNP associated with ovarian response to COS, is the follicle stimulation hormone receptor (FSHR) variant (Ans680Ser), which along with estrogen receptor alpha variant (ESR1 gene, PvuII T/C) are practically the only genetic markers applied in clinical tests.

There is a statistically significant association between the polymorphisms T307A and N680S in the FSHR gene in fertile patients, but there was no complete link between them. (Rodini GP, 2011)

### **GDF9**

Growth differential factor-9 (GDF-9), a member of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily, is an oocyte-derived factor that is preferentially expressed in the oocytes of humans and mice. Because GDF-9 plays a pivotal role during early folliculogenesis, deletion of GDF-9 in the mouse causes follicular arrest at the primary stage and infertility.

Also, GDF-9 stimulates granulosa cell proliferation and cumulus cell expansion, inhibits follicular apoptosis, and enhances oocyte and embryo

development. Recently, several genetic variants of GDF-9 have been identified, and their correlation with POF has been noted, suggesting that these variants contribute to aberrant follicular development and oocyte loss. (Wang, T. T., 2010)

## **HRG**

Histidine-rich glycoprotein is a plasma glycoprotein involved in biological systems, such as fibrinolysis and coagulation, the immunological response system, apoptosis and angiogenesis. These systems are known to be involved in oocyte development and pregnancy. Although its exact biomolecular function is unclear, HRG seems to be an adaptor molecule owing to its unique molecular structure, which allows it to interact with a multitude of different ligands. (Nordqvist, S., 2015)

## **IGF1, IGFBP1, IGFBP3 and IGFBP4**

(IGF-1) seems to have an autocrine/ paracrine important action. This peptide is produced by granulosa cells after FSH stimulation, and its activity is controlled by catalytic proteins and by insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP), which act as inhibitors or regulators of its action.

In addition, IGF-1 activates the production of estrogen and progesterone and the activity of aromatase, and also modulates the effect of FSH and LH.

IGFBP-1 exerts an inhibitory effect on IGF-1, acting as an antigonadotrophic agent and modulating IGF-1 activity. IGFBP-3 in follicular fluid could exert also a regulatory role, serving as an inhibitory effect on IGF-1 and 2. Its increased concentration may decrease IGF-1 and 2 availability on follicular fluid and, consequently, its action. (Cunha-Filho, J. S., 2005)

IGFBP-4 is a low-molecular weight IGFBP and plays a role in regulating intrafollicular bioavailability of free IGF. Specific IGFBP proteases cleave IGFBPs, allowing IGFs to bind to their receptors. (Choi, Y. S., 2006)

## **IL1 $\beta$ (interleukin-1beta) and TNF $\alpha$ (tumor necrosis factor-alpha)**

Pro-inflammatory cytokines can be found in FF as a result of ovarian local synthesis and release during follicular maturation and ovulation; for example, FF

IL-1beta derives both from the plasma ultrafiltrate and from the local synthesis by luteinizing granulosa cells.

It is possible that IL-1beta leads to cytoplasmic maturation and normal fertilization, but does not play a role in post-fertilization embryo development.

TNF-alpha may take part in the process of follicle wall degradation, and their concentration in optimal proportion may reflect a better intrafollicular milieu able to optimize oocyte development and maturation. (Revelli, A., 2009)

### **Inhibin B**

Inhibin B is a member of the TGF beta family. Ovarian follicular granulosa cells produce AMH and inhibin B. (Muttukrishna, S., 2004)

Inhibins are produced by the ovaries in two isoforms, A and B. Inhibin B rises from early in the follicular phase to reach a peak coinciding with the onset of the mid-follicular phase decline in FSH levels and then declines during the luteal phase apart from a periovulatory peak. This suggests secretion by the developing cohort of follicles. Therefore, it was proposed that inhibin B in the early follicular phase may reflect the number of follicles present at baseline. (Urbancsek, J., 2005)

### **KDR**

Kinase insert domain receptor (KDR) mediates the activity of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in the ovary. VEGF is implicated in the pathophysiology of OHSS due to increased vascular permeability. (O'Brien, T. J., 2014)

### **Leptin**

Leptin is a 16-kDa protein hormone released predominantly from white adipose tissue under the control of the obesity (ob) gene. It restores energy homeostasis and regulates appetite and body weight by sending signals indicating the body energy status to the central nervous system.

Even though leptin has been thought to exert its effects on reproduction via the hypothalamo–pituitary–ovarian axis, there might also be a direct ovarian effect. Leptin is also synthesized in oocytes, granulosa cells and placental tissues

other than adipose tissue in humans. Leptin is shown to bind specifically by way of granulosa cells. (Gürbüz, B., 2005)

### **LH, LHR and LHCGR**

The luteinizing hormone receptor (LHR) protein is a G protein-coupled hormone receptor (GPCR) and is expressed in numerous tissues including the gonads, uterus, fallopian tubes, placenta and fetus. Both LH and human chorionic gonadotropin (hCG) are endogenous ligands for LHR with the latter also employed during COH. Prior to ovulation, FSH and estradiol both increase pituitary production of LH and induce LHR expression in the ovaries where LHR functions in promoting follicular maturation, lutenization and ovulation.

During assisted reproduction, it is believed that hCG administration (i.e. hCG trigger) activates LHR mediated signaling. LHR is encoded by the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR) gene (~69 kb) located on chromosome 2p21. LHCGR harbors at least 300 known polymorphisms some of which having a significant impact on sexual development and fertility. (O'Brien, T. J., 2013)

### **miRNA**

Several germline-specific transcriptional changes that occur during the process of oocyte maturation have been identified, and we are just beginning to understand the mechanisms by which post transcriptional alterations in gene expression can facilitate oocyte development. One such process is via changes in micro ribonucleic acid (miRNA) expression, and gonadal-selective miRNAs may play important roles in ovarian development and female fertility.

MicroRNAs are a large family of short, noncoding RNAs that repress expression of target genes via degradation of target messenger RNAs (mRNAs) or inhibition of their translation by interactions with the 3'-untranslated regions (3'UTRs). MicroRNAs regulate essential cellular processes, including growth, differentiation, and apoptosis. They are therefore required for normal mammalian development, and their function is conserved across evolution, from yeast to mammals.



MicroRNAs seem to play a role in granulosa cell (GC) function and thus may be important for follicular signaling and oocyte development. (Karakaya, C., 2015)

## **MIS**

Müllerian-inhibiting substance (MIS) is a follicular fluid component produced by granulosa cells. Müllerian-inhibiting substance is detected in normal human serum. Its levels vary slightly with the menstrual cycle, reaching a maximum in the late follicular phase. MIS appears to act in a paracrine fashion to regulate granulosa cell and oocyte function. (Seifer, D. B., 2002)

## **MTHFR**

There is growing evidence that folate status and variation in folate metabolizing genes are involved in female reproductive functions. (Altmäe, S., 2011)

The flavoenzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) has a central role in folate metabolism by catalyzing the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate.

Mothers carrying the MTHFR 677C>T mutation exhibit a significantly lower risk of dichorionic twinning than those with the wild type CC genotype. (Pavlik, R., 2011)

## **NOTCH**

The Notch genes encode transmembrane receptors that are highly conserved evolutionarily and which control cell-fate decisions between tightly adjacent cells by modulating cell proliferation, differentiation, and survival. Mammals have 4 types of Notch receptors (Notch1–4) and 2 ligand families (Jagged1; Jagged2; and Delta-like [DII] 1, DII 3, DII 4).

Notch genes are actively expressed by cumulus cells during folliculogenesis. However, it is not released by oocyte and atretic follicles. Several experimental studies involving animals have reported that Notch2, Notch3, and Jagged2 are released from granulosa cells and that Jagged1 is released more often from oocytes than from granulosa cells. (Tanriverdi, G., 2013)

## **PAPP-A**

Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) is a key regulator of insulin-like growth factor (IGF) bioactivity, by releasing the IGFs from their corresponding IGF-binding proteins (IGFBPs). The minor allele of the single nucleotide polymorphism (SNP), rs7020782 (serine < tyrosine), in PAPP-A has previously been associated with recurrent pregnancy loss as well as with significant reduced levels of PAPP-A protein in human ovarian follicles. (Choi, Y. S., 2006)

## **Progesterone**

Progesterone is an important hormone in the complex regulation of normal female reproductive functions. The major physiological role of progesterone in the ovary and uterus is the release of mature oocytes, facilitation of implantation and maintenance of pregnancy.

Progesterone enhances the effect of FSH on granulosa cells by increasing cAMP and it inhibits FSH-induced estradiol production. (Altmäe, S., 2011)

## **PUFA**

Among the different unsaturated fatty acids, the polyunsaturated fatty acids (PUFA) of the omega-6 (n-6) and omega-3 (n-3) series are synthesized from their respective precursors: linoleic acid (n6) and  $\alpha$ -linolenic acid (n-3), which are essential and must therefore be supplied by the diet. The n-3 and n-6 PUFA are necessary in female reproduction.

The fatty acid profile of the FF from dominant follicles may be related to the outcomes of ovarian stimulation. (Ruiz-Sanz, J. I., 2019)

## **SHBG**

Sex hormone-binding globulin (SHBG) is the main transport protein of sex steroids regulating their access to target tissues. It is primarily produced by the liver, but recently SHBG mRNA has been also demonstrated in a number of non-hepatic tissues and cell-lines. Interestingly, mRNA encoding SHBG has been shown to be expressed in the ovaries and corpora lutea as well as in luteinised

granulosa cells from in vitro fertilisation (IVF) follicular samples. These results indicate a role of SHBG in the local regulation of ovarian function. (Hatzi, E., 2011)

### **VEGF, sVEGFR1 and VEGFR2**

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a cytokine with a dimeric glycoprotein structure, that shows potent angiogenic and endothelial cell mitogenic properties. In the ovary, VEGF is produced by both granulosa and theca cells; the granulosa cells (GC) generate higher production of VEGF in response to FSH, LH, human chorionic gonadotrophin (HCG) and hypoxia and is instrumental in the conversion of the avascular preovulatory follicle into the corpus luteum, a very vascular organ.

Since VEGF stimulates vascular permeability, a number of studies have evaluated its role in the ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), with increasing serum levels of VEGF after HCG administration being predictive for the risk of developing OHSS. Furthermore, the elevated concentrations of VEGF in follicular fluid correlated negatively with conception rates in assisted reproductive technologies. (Quintana, R., 2001)

VEGF mediates its effects through two specific receptors, fms-like tyrosine receptor-1 (flt-1 = VEGFR-1) or kinase inserted tyrosine domain receptor (KDR = VEGFR-2). VEGFR-1 is also produced as a soluble receptor (sVEGFR-1) by alternative splicing of the precursor mRNA. It is not yet clear whether proteolytic shedding produces additionally sVEGFR-1. Obviously, sVEGFR-1 acts as a negative modulator for the bioactivity of VEGF. Both receptors are produced by endothelial cells. Endothelial cells can be accepted as a prominent source of sVEGFR-1. How the production of membrane bound or soluble VEGFR-1 is regulated in endothelial cells remains to be determined. (Neulen, J., 2001)

### **Testosterone**

Androgens, primarily testosterone (T) and androstenedione, are noteworthy to enhance follicular recruitment, promote follicular growth and development and increase insulin like growth factor 1 (IGF-1) expression in the primate ovary which plays an essential role in regulating follicular development. (Qin, Y., 2001)

### **TP73**

The members of the p53 family (p63, p73 and p53), besides their roles in cell cycle regulation, transactivation and apoptosis, are involved in female reproduction and blastocyst implantation. Studies in mice have showed that the p73 gene plays a role in female infertility. The p73 gene contains two promoters that drive the expression of two major groups of p73 isoforms with opposing cellular actions: pro-apoptotic and anti-apoptotic and both are required for normal embryogenesis. (LD Vagnini, 2019)