



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

JOANA MARIA FIGUEIREDO OLIVEIRA REIS

***Polimorfismo do Gene do Receptor da Hormona Folículo-
estimulante e Resposta à Estimulação Ovárica***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE GENÉTICA CLÍNICA

Trabalho realizado sob a orientação de:
ANA TERESA MOREIRA DE ALMEIDA SANTOS
ANA PAULA MARQUES DE SOUSA

MARÇO/2017

POLIMORFISMO DO GENE DO RECETOR DA HORMONA FOLÍCULO- ESTIMULANTE E RESPOSTA À ESTIMULAÇÃO OVÁRICA

Joana Maria Figueiredo Oliveira Reis¹

¹Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Correspondência:

Rua dos Corticeiros, 199, 4535-387, Santa Maria de Lamas

E-mail: joanafigueiredoreis@gmail.com

RESUMO

Introdução: A resposta ovárica à terapêutica com FSH recombinante exibe uma grande variabilidade individual, pelo que os genes relacionados com o mecanismo de ação da FSH têm sido amplamente estudados. Neste estudo, investigamos a associação entre o polimorfismo Asn680Ser do *FSHR* e a resposta ovárica de mulheres submetidas a técnicas de RMA.

Material e Métodos: Este estudo retrospectivo incluiu 563 mulheres inférteis, com idade inferior a 40 anos e com uma concentração sérica de FSH no 3º dia de um ciclo menstrual anterior entre 1 e 12 UI/L. As pacientes foram submetidas a protocolos de estimulação ovárica controlada com FSH recombinante e a resposta ovárica foi classificada de acordo com o número de ovócitos obtidos por ciclo de tratamento. Após extração de ADN genómico, o polimorfismo foi analisado pela técnica de PCR-RFLP.

Resultados: A distribuição das variantes genótípicas do polimorfismo foi de 38,4% para Asn/Asn, de 46,5% para Asn/Ser e de 15,1% para Ser/Ser. As concentrações séricas de FSH, LH e E2 aos 3º e 23º dias de um ciclo menstrual anterior foram semelhantes entre os três genótipos. O número de folículos pré-ovulatórios, de ovócitos e de ovócitos maduros obtidos no ciclo de estimulação ovárica, assim como a classificação da resposta, foi semelhante entre os três genótipos. O doseamento sérico de AMH apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as mulheres com má resposta, resposta normal e resposta aumentada ($1,7 \pm 1,8$, $3,0 \pm 2,5$ e $6,5 \pm 4,7$ respetivamente, com $p < 0,001$).

Discussão: O genótipo do polimorfismo Asn680Ser não parece influenciar a concentração sérica de FSH no 3º dia do ciclo menstrual nem os resultados do processo de estimulação ovárica com FSH recombinante. A AMH parece ter elevada aplicabilidade clínica, permitindo a previsão de má resposta e de resposta aumentada, o que pode resultar em adaptação do protocolo de estimulação ovárica.

Conclusão: A resposta ovárica à estimulação com FSH não parece depender do genótipo do polimorfismo Ans680Ser.

Palavras-chave: Hormona Folículo-estimulante; Recetor da FSH; Polimorfismo; Estimulação Ovárica; Hormona Anti-mülleriana.

ABSTRACT

Introduction: Ovarian response to recombinant FSH therapy shows a high individual variability. For this reason, genes related to the FSH action mechanism have been extensively investigated. In this study, we investigated the association between *FSHR* Asn680Ser polymorphism and ovarian response in women submitted to assisted reproduction technology procedures.

Materials and methods: This retrospective study included 563 infertile women below the age of 40 and with serum FSH levels on the 3rd day of a previous menstrual cycle between 1 and 12 IU/L. The patients were submitted to controlled ovarian stimulation protocols using recombinant FSH and the ovarian response was classified according to the number of retrieved oocytes per treatment cycle. After the extraction of the genomic DNA, the polymorphism was analysed using the PCR-RFLP technique.

Results: The distribution of the genotypic variants of the polymorphism was 38,4% for Asn/Asn, 46,5% for Asn/Ser and 15,1% for Ser/Ser. Serum FSH, LH and E2 levels on the 3rd and 23rd day of a previous menstrual cycle were similar among these three genotypes. The number of preovulatory follicles, retrieved oocytes and mature oocytes per treatment cycle, as well as the classification of ovarian response, was similar among these three genotypes. Serum AMH levels showed significant statistical differences between poor response, normal response and increased response groups (1.7 ± 1.8 , 3.0 ± 2.5 and 6.5 ± 4.7 respectively, with $p < 0.001$).

Discussion: The genotype of the Asn680Ser polymorphism does not seem to influence neither the serum FSH concentration levels on the 3rd day of the menstrual cycle or the outcomes of the ovarian stimulation to recombinant FSH. AMH seems to have high clinical applicability, allowing the prediction of both poor and high response, which might result in adjustments to the ovarian stimulation protocol.

Conclusion: Ovarian response to FSH therapy does not seem to be dependant of the genotype of the Asn680Ser polymorphism.

Keywords: Follicle-stimulating Hormone; FSH Receptor; Polymorphism; Ovarian Stimulation; Anti-müllerian Hormone.

ÍNDICE

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS.....	VII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
2.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO	5
2.2 PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO OVÁRICA CONTROLADA	5
2.3 DOSEAMENTOS HORMONAIS	7
2.4 EXTRAÇÃO DO ADN E ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO FSHR	7
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	9
3. RESULTADOS.....	10
3.1 ANÁLISE DA POPULAÇÃO EM ESTUDO	10
3.2 POLIMORFISMO DO FSHR E PARÂMETROS HORMONAIS.....	11
3.3 POLIMORFISMO DO FSHR E RESPOSTA À ESTIMULAÇÃO OVÁRICA CONTROLADA ...	12
3.4 AMH E RESPOSTA À ESTIMULAÇÃO OVÁRICA CONTROLADA	14
4. DISCUSSÃO.....	15
5. CONCLUSÃO.....	20
AGRADECIMENTOS.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 - Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.....	2
Ilustração 2 - Representação esquemática do FSHR e dos polimorfismos Thr307Ala e Asn680Ser	3
Ilustração 3 - Análise RFLP do polimorfismo Asn680Ser do FSHR	9

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das variantes genóticas do polimorfismo Asn680Ser do FSHR	10
Tabela 2 – Parâmetros hormonais, de acordo com o genótipo do polimorfismo Asn680Ser do FSHR	11
Tabela 3 – Protocolo de estimulação ovárica controlada, de acordo com o genótipo do polimorfismo Asn680Ser do FSHR.....	12
Tabela 4 – Resultados da estimulação ovárica controlada, de acordo com o genótipo do polimorfismo Asn680Ser do FSHR.....	13
Tabela 5 - Classificação da resposta ovárica, de acordo com o genótipo do polimorfismo Asn680Ser do FSHR.....	14
Tabela 6 –Concentração sérica da AMH, de acordo com a classificação da resposta ovárica	14

LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

Ala – Aminoácido alanina

AMH - *Anti-müllerian hormone*

AMPc - Adenosina monofosfato cíclica

Asn – Aminoácido asparagina

E2 – Estradiol

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH – *Follicle-stimulating hormone*

FSHR – *Follicle-stimulating hormone receptor*

GnRH – *Gonadotropin-releasing hormone*

hCG – *Human chorionic gonadotropin*

ICSI – *Intracytoplasmic sperm injection*

LH – *Luteinizing hormone*

PCR – *Polymerase chain reaction*

RFLP – *Restriction fragment length polymorphism*

RMA – Reprodução medicamente assistida

Ser – Aminoácido serina

SHO – Síndrome de hiperestimulação ovárica

SNPs – *Single-nucleotide polymorphisms*

Thr – Aminoácido treonina

1. INTRODUÇÃO

A estimulação ovária controlada é um pilar das técnicas de reprodução medicamente assistida (RMA) e tem como objetivo o desenvolvimento de múltiplos folículos e consequente obtenção de um número ótimo de ovócitos maduros por ciclo de tratamento, possibilitando a seleção do embrião mais viável para transferir. Apesar do progresso nos protocolos de estimulação com gonadotrofinas, a resposta ovária continua a ser imprevisível, mesmo em mulheres com perfis hormonais idênticos, variando desde uma má resposta até resposta aumentada. De acordo com os critérios da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia, considera-se uma má resposta quando se obtém 3 ou menos ovócitos num ciclo de estimulação.¹ Ainda que não exista um consenso, alguns estudos consideram uma resposta aumentada quando se obtém um número de ovócitos igual ou superior a 15, por ciclo de estimulação.² A resposta aumentada pode ocasionar síndrome de hiperestimulação ovária (SHO)^{3,4}, que ocorre na prática clínica como uma complicação iatrogénica potencialmente grave, resultando no aumento do volume ovárico e da permeabilidade vascular.^{2,5}

A idade e a reserva ovária têm sido descritas como dois fatores-chave da resposta ovária. Contudo, o genótipo da mulher parece ter também um papel relevante na variabilidade individual da resposta à terapêutica com gonadotrofinas.¹ Os genes relacionados com os mecanismos de ação da hormona foliculo-estimulante (FSH) têm assumido especial relevância no estudo das causas desta variabilidade.⁶ A FSH desempenha um papel determinante na reprodução humana, atuando ao nível do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Esta hormona é produzida pela hipófise anterior, sob

estimulação pulsátil da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), e no ovário estimula a maturação folicular e a produção de estrogénios⁷ (Ilustração 1).

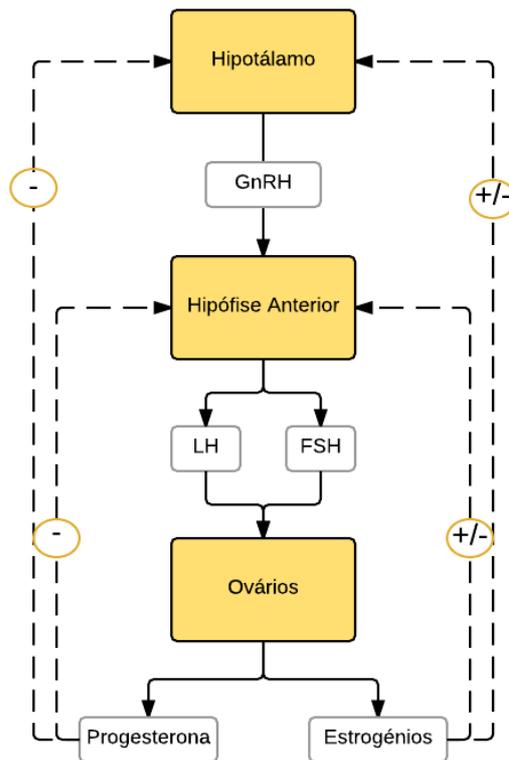


Ilustração 1 - Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

A ação da FSH é mediada pela interação com o seu recetor específico (FSHR), localizado na superfície das células da granulosa.^{8,9} O FSHR é um recetor transmembranar acoplado à proteína G que utiliza a adenosina monofosfato cíclica (AMPC) como segundo mensageiro. O gene do *FSHR* localiza-se no cromossoma 2p21-16 e é constituído por 10 exões. Entre os cerca de 1300 *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs) identificados no gene do FSRH, oito localizam-se na região

codificante e seis são não-sinónimos.⁷ Os dois SNPs mais investigados em termos de frequência e distribuição étnica ocorrem nos nucleotídeos 919 e 2039 do exão 10, ocupando as posições 307 e 680, respetivamente, na cadeia de aminoácidos da proteína.⁸ O primeiro SNP, o Thr307Ala, localiza-se no domínio extracelular e resulta da substituição do aminoácido treonina (Thr) pelo aminoácido alanina (Ala), introduzindo um potencial local de fosforilação. O segundo SNP, o Asn680Ser, localiza-se no domínio intracelular e resulta da substituição do aminoácido asparagina (Asn) pelo aminoácido serina (Ser), removendo um potencial local de glicosilação (Ilustração 2). Os dois SNPs encontram-se em forte desequilíbrio de ligação, nomeadamente nos caucasianos, resultando em dois haplótipos predominantes: Thr307-Asn680 e Ala307-Ser680.⁹ Por uma questão de simplificação, muitos estudos focam-se exclusivamente no polimorfismo Asn680Ser.

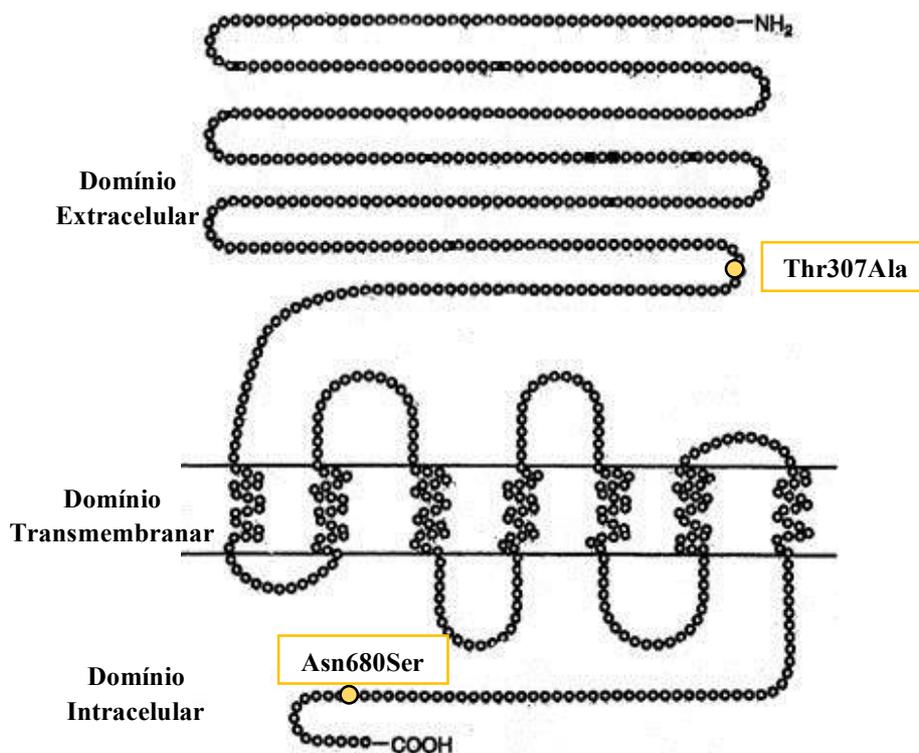


Ilustração 2 - Representação esquemática do FSHR e dos polimorfismos Thr307Ala e Asn680Ser

A ideia original de que estes polimorfismos podem influenciar a concentração sérica de FSH e modular a resposta ovária à estimulação com gonadotrofinas foi apresentada em 2000.¹⁰ Num estudo retrospectivo abrangendo 161 mulheres normovulatórias submetidas a protocolos de estimulação ovária controlada, Mayorga *et al.* demonstrou que as mulheres portadoras do haplótipo Ala307-Ser680 são menos sensíveis à FSH, pelo que estas mulheres apresentam níveis basais de FSH significativamente mais altos, requerendo uma maior dosagem de FSH exógena para obter uma resposta ovária idêntica.¹⁰ Apesar de resultados semelhantes terem sido obtidos em estudos subsequentes,¹¹⁻¹⁶ alguns resultados contraditórios foram também publicados.^{17,18} Um estudo prospetivo recente de Mohiyiddeen *et al.*, englobando 421 mulheres inférteis, não encontrou qualquer associação entre o polimorfismo Asn680Ser e a resposta ovária.¹⁸ Assim sendo, o papel destes polimorfismos como preditores da resposta ovária não está completamente esclarecido, pelo que os seus efeitos na modulação da atividade da FSH e consequentes resultados da estimulação ovária controlada é motivo de controvérsia.

Como o sucesso das técnicas de RMA depende da resposta ovária à terapia com FSH exógena, seria extremamente benéfico prever a resposta das pacientes, antecipando os casos de má resposta ou de resposta aumentada. A identificação de fatores preditivos da resposta ovária permite otimizar e individualizar os protocolos de estimulação ovária controlada, obtendo um número adequado de ovócitos e taxas de gravidez mais elevadas, com efeitos secundários reduzidos.

Com este estudo, pretende-se avaliar a prevalência do polimorfismo Asn680Ser num grupo de pacientes submetidas a técnicas de RMA e verificar se nesta população se verifica uma associação entre o SNP estudado e a resposta ovária.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO

Neste estudo retrospectivo foram incluídas 563 mulheres submetidas a estimulação ovária controlada no Serviço de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal, entre os anos de 2014 e 2015. Os critérios de inclusão definidos foram: idade inferior a 40 anos, com o diagnóstico de infertilidade estabelecido de acordo com a definição da Organização Mundial de Saúde¹⁹ e com uma concentração sérica de FSH no 3º dia de um ciclo menstrual anterior ao ciclo de estimulação $\geq 1 \text{ UI/L}$ e $< 12 \text{ UI/L}$.

Os processos clínicos das pacientes forneceram informações referentes ao ciclo de estimulação ovária, nomeadamente o tipo de protocolo de estimulação ovária efetuado, o número de folículos pré-ovulatórios, o número de ovócitos e de ovócitos maduros obtidos, assim como a ocorrência de cancelamento do ciclo e respetiva causa, quando aplicável.

Todas as pacientes foram informadas dos propósitos do estudo e assinaram uma declaração de consentimento informado antes do início do mesmo.

2.2 PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO OVÁRICA CONTROLADA

Em todos os casos foi realizada a estimulação ovária controlada com FSH recombinante, de várias marcas, de acordo com os protocolos convencionais: protocolo curto com antagonista da GnRH ou protocolo longo.

No protocolo curto com antagonista, no 3º dia do ciclo menstrual iniciou-se a administração diária de FSH, com doses variáveis (100-300 UI) dependendo de respostas prévias ou da previsão da resposta. O desenvolvimento folicular foi geralmente avaliado aos 5º e 7º ou 8º dias de estimulação, através de ecografia transvaginal e do doseamento sérico do estradiol (E2). Para prevenir a ocorrência de ovulação espontânea, uma dose diária de 0,25 mg de Cetrorelix ou de Ganirelix (antagonistas da GnRH) foi administrada desde o momento em que o maior folículo atingiu 14 mm até ao dia de administração de gonadotrofina coriónica humana (hCG).

No protocolo longo, no 21º dia do ciclo menstrual anterior à estimulação iniciou-se a dessensibilização com uma dose diária de 0,1 mg de Triptorelina (agonista da GnRH), que se manteve até ao dia em que iniciou a administração de FSH. A supressão ovária foi avaliada 12 a 14 dias depois, utilizando-se a ecografia transvaginal e o doseamento sérico de E2. A administração de FSH foi efetuada de forma semelhante à supracitada, passando-se a administrar uma dose inferior de Triptorelina (0,05mg) até ao dia da administração de hCG. A avaliação do desenvolvimento folicular realizou-se, da mesma forma, aos 6º e 8º ou 9º dias de estimulação.

Em ambos os protocolos, para indução da maturação folicular final, a hCG foi administrada numa dose de 10000 UI, quando pelo menos dois folículos atingiram os 17 mm. A colheita de ovócitos realizou-se por punção transvaginal ecoguiada após 36 horas e, dependendo da indicação clínica, foi realizada a técnica de fertilização *in vitro* (FIV) ou a injeção intracitoplasmática de um espermatozoide (ICSI).

Neste estudo, classificou-se a resposta ovária de acordo com o número de ovócitos obtidos por ciclo de tratamento. Tendo em consideração os critérios supracitados, considerou-se uma má resposta quando se obteve um número de ovócitos

igual ou inferior a 3¹, uma resposta aumentada quando se obteve um número de ovócitos igual ou superior a 15² e uma resposta normal quando se obteve um número de ovócitos entre 4 e 14.

2.3 DOSEAMENTOS HORMONAIIS

Os doseamentos hormonais da FSH, da hormona luteinizante (LH) e do E2, nos 3º e 23º dias de um ciclo menstrual anterior, assim como da hormona anti-Mülleriana (AMH), foram obtidos a partir de uma amostra de sangue periférico. As amostras foram processadas pelo serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e os doseamentos séricos da FSH, da LH e do E2 foram obtidos com recurso a tecnologia quimioluminométrica direta, utilizando o sistema ADVIA Centaur® CP, de acordo com as especificações do aparelho (ensaios: ADVIA Centaur® FSH, ADVIA Centaur® LH e ADVIA Centaur® eE2, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., EUA). O doseamento sérico de AMH foi obtido com recurso a um ensaio de eletroquimioluminescência, utilizando o sistema Cobas e411, de acordo com as especificações do aparelho (ensaio: Elecsys® AMH, Roche Diagnostics International Ltd., Suíça).

2.4 EXTRAÇÃO DO ADN E ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO *FSHR*

O ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico foi extraído dos leucócitos de uma amostra de sangue periférico colhido em tubo de ácido etilenodiaminotetracético, utilizando o QIAamp® DNA Mini kit (QIAGEN, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

A presença do polimorfismo Asn680Ser introduz um local de restrição que permite aplicar a técnica PCR-RFLP, utilizando o ADN extraído como substrato da reação. Recorrendo à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificou-se um fragmento do exão 10 do *FSHR*, entre os nucleotídeos 1624 e 2143. A mistura de reação de PCR foi preparada com 0,1 µL de DNA genómico, 1,25 U de Taq Polimerase (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA), 0,2 µM de dNTP's (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA) e 0,2 µM de cada *primer* (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, EUA), perfazendo um volume final de 25 µL. O *primer sense*, constituído pela sequência 5' TTT GTG GTC ATC TGT GGC TGG 3' e o *primer anti-sense*, constituído pela sequência 5' CAA AGG CAA GGA CTG AAT TAT CAT T 3', foram submetidos a uma temperatura de emparelhamento de 60°C, obtendo-se um fragmento com um tamanho de 520pb, que foi amplificado no termociclador C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, EUA), segundo as instruções do fabricante. De seguida, os produtos da PCR foram visualizados sob luz ultravioleta, pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com recurso a 5 µL de Brometo de Etídio (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA).

O produto da PCR, num volume de 5 µL, foi digerido por 0,5 µL de enzima de restrição BseNI (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, e os produtos resultantes foram visualizados sob luz ultravioleta, pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com recurso a 5 µL de Brometo de Etídio (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA). A presença de um fragmento não clivado, 520pb, confirma a homozigotia para Asn, a presença de um fragmento clivado, 413pb, confirma a homozigotia para Ser e a presença de dois fragmentos confirma a heterozigotia (Ilustração 3).

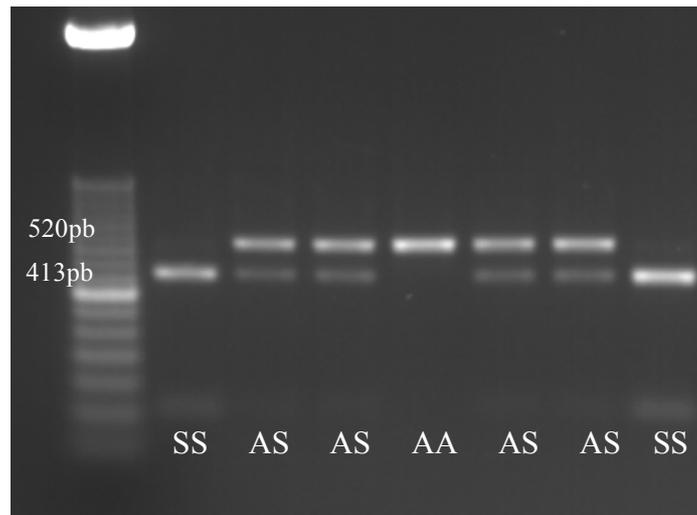


Ilustração 3 - Análise RFLP do polimorfismo Asn680Ser do FSHR

A técnica de eletroforese em gel de agarose permite visualizar uma banda com 520pb na variante Asn/Asn (representada como AA), uma banda com 413pb na variante Ser/Ser (representada como SS) e duas bandas, com 413 bp e 520 bp, na variante Asn/Ser (representada como AS).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi efetuada com o suporte do programa Statistical Package for the Social Sciences, versão 24 (SPSS, IBM Inc., EUA). Para comparar os diferentes genótipos com os parâmetros clínicos e hormonais referidos, foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*, quando não se verificou homogeneidade da variância, e o teste *One-way ANOVA*, quando se verificou homogeneidade da variância. Para comparar a frequência dos diferentes genótipos com a classificação da resposta à estimulação ovária recorreu-se ao teste do Qui-quadrado para independência. Os resultados foram apresentados sob a forma de: média (\pm desvio-padrão) ou percentagem (e frequência absoluta). Um valor $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DA POPULAÇÃO EM ESTUDO

As 563 mulheres incluídas neste estudo apresentaram uma concentração sérica média de FSH no 3º dia do ciclo menstrual de $6,7 \pm 1,9$ UI/L. Todas as intervenientes foram submetidas a um protocolo de estimulação ovária controlada com FSH recombinante, sendo que em 75,3% dos casos se efetuou um protocolo curto com antagonista, enquanto que em 24,7% se efetuou um protocolo longo. Em 6,7% dos casos ocorreu o cancelamento do ciclo por ausência de resposta adequada. Nos restantes, obteve-se um número médio de $12,1 \pm 6,6$ folículos pré-ovulatórios, de $9,2 \pm 6,1$ ovócitos e de $6,1 \pm 4,2$ ovócitos maduros. A resposta ovária, de acordo com o número de ovócitos obtidos, foi muito variável, com 118 casos (21,0%) de má resposta, 364 casos (64,7%) de resposta normal e 81 casos (14,4%) de resposta aumentada.

A prevalência das três variantes genótípicas do polimorfismo na posição 680 do gene do *FSHR* encontra-se apresentada na Tabela 1. Na população estudada, a frequência do polimorfismo é de 38,4, 46,5 e 15,1% para as variantes Asn/Asn, Asn/Ser e Ser/Ser, respetivamente. As distribuições alélicas respeitam a lei de Hardy-Weinberg ($p = 0,70$).

Tabela 1 - Distribuição das variantes genótípicas do polimorfismo Asn680Ser do FSHR

	Asn/Asn	Asn/Ser	Ser/Ser	Total
População em estudo	38,4% (216)	46,5% (262)	15,1% (85)	100% (563)

Os dados são apresentados como percentagem (frequência absoluta).

3.2 POLIMORFISMO DO *FSHR* E PARÂMETROS HORMONAIS

As concentrações séricas médias de FSH, LH e E2 aos 3° e 23° dias do ciclo menstrual e a concentração sérica média de AMH foram analisadas de acordo com a variante genotípica do polimorfismo Asn680Ser. Estes resultados encontram-se representados na Tabela 2. Verificou-se que não existem evidências de que a média da concentração sérica de FSH no 3° dia do ciclo menstrual apresente diferenças estatisticamente significativas entre as três variantes do polimorfismo estudado ($p=0,19$), ou seja, o genótipo do *FSHR* não parece influenciar o valor de FSH no 3° dia do ciclo menstrual. Resultados idênticos foram obtidos para os restantes parâmetros hormonais estudados, não se encontrando diferenças estatisticamente significativas entre estes parâmetros e as diferentes variantes do genótipo do *FSHR*.

Tabela 2 – Parâmetros hormonais, de acordo com o genótipo do polimorfismo Asn680Ser do *FSHR*

	Asn/Asn	Asn/Ser	Ser/Ser	Valor de p
FSH 3° dia (UI/L)	6,5 ($\pm 1,9$)	6,8 ($\pm 1,9$)	6,6 ($\pm 2,0$)	0,19 ^a
FSH 23° dia (UI/L)	4,3 ($\pm 2,9$)	3,9 ($\pm 2,3$)	4,0 ($\pm 2,7$)	0,26 ^a
LH 3° dia (UI/L)	5,5 ($\pm 3,8$)	5,0 ($\pm 2,4$)	4,9 ($\pm 2,3$)	0,92 ^b
LH 23° dia (UI/L)	7,5 ($\pm 9,9$)	5,7 ($\pm 5,3$)	7,5 ($\pm 10,4$)	0,48 ^b
E2 3° dia (pg/mL)	56,3 ($\pm 50,1$)	50,4 ($\pm 23,2$)	50,7 ($\pm 29,8$)	0,19 ^a
E2 23° dia (pg/mL)	148,3 ($\pm 84,5$)	145,8 ($\pm 76,4$)	145,7 ($\pm 93,2$)	0,94 ^a
AMH (ng/mL)	3,0 ($\pm 2,9$)	3,0 ($\pm 3,0$)	3,3 ($\pm 3,2$)	0,85 ^a

Os dados são apresentados como média (\pm desvio-padrão).

^a Teste *One-way ANOVA*

^b Teste de *Kruskal-Wallis*

3.3 POLIMORFISMO DO *FSHR* E RESPOSTA À ESTIMULAÇÃO OVÁRICA CONTROLADA

A distribuição do protocolo de estimulação ovária controlada selecionado foi analisada, de acordo com a variante genotípica do polimorfismo Asn680Ser, e os resultados encontram-se representados na Tabela 3. Tendo em consideração os resultados obtidos, não parecem existir evidências estatísticas para se afirmar que os protocolos de estimulação ovária controlada selecionados sejam significativamente diferentes entre as três variantes genotípicas do polimorfismo Asn680Ser ($p=0,72$).

Tabela 3 – Protocolo de estimulação ovária controlada, de acordo com o genótipo do polimorfismo Asn680Ser do FSHR

	Asn/Asn	Asn/Ser	Ser/Ser
Protocolo Curto com Antagonista	74,5% (161)	74,8% (196)	78,8% (67)
Protocolo Longo	25,5% (55)	25,2% (66)	21,2% (18)
Total	100% (216)	100% (262)	100% (85)

Os dados são apresentados como percentagem (frequência absoluta).
Teste de independência de Qui-quadrado com $p=0,72$

Os dados referentes aos resultados do processo de estimulação ovária controlada, de acordo com a variante genotípica do polimorfismo Asn680Ser, encontram-se apresentados na Tabela 4. Os resultados obtidos não suportam a hipótese de que existam diferenças estatisticamente significativas entre o número de folículos pré-ovulatórios, o número de ovócitos e o número de ovócitos maduros e as três variantes do polimorfismo Asn680Ser ($p=0,85$, $p=0,60$ e $p=0,10$, respetivamente), sugerindo que, independentemente da variante genotípica, o tratamento atingiu

resultados semelhantes. Apesar de não atingir valores estatisticamente significativos, parece existir um discreto aumento do número médio de ovócitos maduros para a variante Ser/Ser.

Tabela 4 – Resultados da estimulação ovária controlada, de acordo com o genótipo do polimorfismo Asn680Ser do FSHR

	Asn/Asn	Asn/Ser	Ser/Ser	Valor de p
Nº de folículos	12,2 (\pm 6,2)	12,1 (\pm 6,9)	11,7 (\pm 5,2)	0,85 ^a
Nº de ovócitos	9,0 (\pm 6,2)	9,2 (\pm 6,1)	9,8 (\pm 6,1)	0,60 ^a
Nº de ovócitos maduros	5,8 (\pm 3,9)	6,1 (\pm 4,3)	7,0 (\pm 4,3)	0,10 ^a

Os dados são apresentados como média (\pm desvio-padrão).

^a One-way ANOVA

A Tabela 5 apresenta a distribuição da classificação da resposta ovária de acordo com a variante genotípica do polimorfismo Asn680Ser. De acordo com os resultados obtidos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a classificação da resposta ovária e o genótipo do *FSHR* ($p=0,82$), pelo que o genótipo do *FSHR* não parece influenciar a resposta ovária.

Para além disso, a percentagem de cancelamento de ciclos e o motivo de cancelamento dos mesmos (má resposta, ausência de fecundação ou risco de SHO) foi também semelhante entre as três variantes genotípicas ($p=0,37$ e $p=0,99$ respetivamente), não se detetando, da mesma forma, diferenças estatisticamente significativas que permitam considerar que o genótipo do *FSHR* influencie o sucesso do processo de estimulação ovária (resultados não apresentados).

Tabela 5 - Classificação da resposta ovária, de acordo com o genótipo do polimorfismo Asn680Ser do FSHR

	Asn/Asn	Asn/Ser	Ser/Ser
Má resposta	22,7% (49)	21,0% (55)	16,5% (14)
Resposta normal	63,4% (137)	64,9% (170)	67,1% (57)
Resposta aumentada	13,9% (30)	14,1% (37)	16,5% (14)
Total	100% (216)	100% (262)	100% (85)

Os dados são apresentados como percentagem (frequência absoluta).

Teste de independência de Qui-quadrado com $p=0,82$

3.4 AMH E RESPOSTA À ESTIMULAÇÃO OVÁRICA CONTROLADA

A concentração sérica média de AMH, de acordo com a classificação da resposta ovária, encontra-se apresentado na Tabela 6. Os resultados obtidos permitem afirmar que existem diferenças estatisticamente significativas entre o valor médio de AMH e os três grupos de classificação da resposta ovária ($p<0,001$). De facto, verifica-se que o valor médio de AMH no caso de uma má resposta é de $1,7 \pm 1,8$ ng/mL, no caso de uma resposta normal é de $3,0 \pm 2,5$ ng/mL e no caso de uma resposta aumentada é de $6,5 \pm 4,7$ ng/mL.

Tabela 6 –Concentração sérica da AMH, de acordo com a classificação da resposta ovária

	Má resposta	Resposta normal	Resposta aumentada	Valor de p
AMH (ng/mL)	1,7 ($\pm 1,8$)	3,0 ($\pm 2,5$)	6,5 ($\pm 4,7$)	<0,001

Os dados são apresentados como média (\pm desvio-padrão).

Teste de *Kruskal-Wallis*

4. DISCUSSÃO

O nosso estudo retrospectivo investigou a associação entre o polimorfismo Asn680Ser do gene do *FSHR* e a resposta ovárica de mulheres submetidas a técnicas de RMA.

Desde o primeiro estudo sobre a influência do genótipo do *FSHR* na resposta ovárica,¹⁰ que o impacto do polimorfismo Asn680Ser na terapia com FSH exógena tem sido motivo de controvérsia. O estudo original, conduzido por Mayorga *et al.* e envolvendo 161 mulheres ovulatórias, encontrou uma associação entre o alelo Ser680 e concentrações de FSH no 3º dia do ciclo menstrual significativamente mais altas ($p < 0,01$), necessitando uma quantidade significativamente maior de FSH exógena para obter uma resposta ovárica semelhante ($p < 0,01$). Apesar de o número de folículos pré-ovulatórios e de ovócitos obtidos ter sido semelhante entre as três variantes genótípicas do gene, estes resultados sugerem uma menor sensibilidade do alelo Ser680 à terapia com FSH.¹⁰ Alguns dos estudos que se seguiram confirmam na íntegra a associação encontrada por Mayorga *et al.*^{11,16} Um estudo retrospectivo recente englobando 1250 mulheres ovulatórias sugere, adicionalmente, uma associação entre o genótipo Ser/Ser e a obtenção de um número de ovócitos significativamente menor, quando comparado com os outros genótipos ($p = 0,001$), assim como uma frequência de más respostas duas vezes superior em relação ao genótipo Asn/Asn (24% e 12%, respetivamente).¹⁶ No entanto, outros estudos confirmam apenas parcialmente a observação original.¹²⁻¹⁵ Apesar dos resultados de *De Castro et al.* serem sugestivos de uma associação entre o genótipo Ser/Ser e a má resposta à terapia com FSH exógena, este estudo considera que a influência do polimorfismo Asn680Ser é provavelmente baixa.¹²

Pelo contrário, outros estudos não encontram qualquer associação entre o

genótipo do *FSHR* e a resposta ovária.^{17,18} Um estudo prospetivo de Mohiyiddeen *et al.* e envolvendo 421 mulheres inférteis, contraria mesmo a observação inicial e coloca hipótese de o polimorfismo Asn680Ser não ser um fator preditivo da resposta ovária.¹⁸ De forma semelhante, no nosso estudo não foram encontradas diferenças significativas entre o genótipo e as concentrações de FSH no 3º dia do ciclo menstrual ou entre o genótipo e os resultados da estimulação ovária controlada, quando avaliados o número de folículos pré-ovulatórios ou de ovócitos obtidos. De facto, não foi encontrada também qualquer associação entre as diferentes variantes genótípicas do Asn680Ser e a classificação da resposta ovária, quando avaliada em três categorias, de acordo com o número de ovócitos obtidos.

Uma revisão elaborada em 2013 por La Marca *et al.* constatou que o facto de vários estudos falharem em demonstrar a associação entre o polimorfismo Asn680Ser e a resposta ovária revela que a associação estudada não é tão forte quanto se pensava originalmente e que esta provavelmente depende do grupo étnico.²⁰ Curiosamente, o nosso estudo apresenta uma prevalência dos genótipos do polimorfismo de 38,4% para a variante Asn/Asn, 46,5% para a variante Asn/Ser e de 15,1% para a variante Ser/Ser, revelando uma dominância acentuada do alelo ancestral Asn em relação ao alelo Ser, o que se aproxima mais dos resultados obtidos em estudos realizados na população asiática^{11,15,16} do que em estudos realizados na população europeia.^{10,13,14}

Adicionalmente, os vários estudos *in vitro* realizados não conseguiram demonstrar a associação descrita *in vivo*, falhando ao tentar encontrar diferenças estatisticamente significativas entre a atividade dos dois alelos Asn680 e Ser680 em termos de afinidade de ligação do complexo FSH-FSHR, de produção de AMPc, de degradação de fosfatidilinositol ou de produção de estrogénios.^{11,17,21} Resultados inesperados foram também obtidos num estudo retrospectivo realizado por Daelemans *et*

al. que avaliou a associação entre este polimorfismo e a ocorrência de SHO iatrogénica em mulheres submetidas a técnicas de RMA. Apesar do alelo Ser680 estar originalmente associado a má resposta ovária, neste estudo, o grupo de mulheres em que ocorreu SHO apresentou uma maior frequência de alelo Ser680 do que o grupo de controlo constituído por mulheres não submetidas a técnicas de RMA ($p=0,010$). Controversamente, o estudo encontrou também uma associação entre o alelo Asn680 e o incremento da gravidade da SHO.²² Um outro polimorfismo, localizado na região -29 da região 5' não traduzida do gene do *FSHR*, o g.-29G>A, tem sido destacado como potencial responsável pela variabilidade da resposta ovária. Um estudo realizado por Desai *et al.* avaliou o efeito combinado dos polimorfismos nas posições -29 e 680 do *FSHR*, recorrendo a vários parâmetros clínicos, assim como à medição da expressão do FSHR nas células da granulosa, e, curiosamente, o genótipo A/A-Asn/Asn foi associado a uma má resposta ovária ($p=0,009$).²³

De facto, as variações genéticas devido a SNPs são bastante frequentes nos genes das hormonas e dos recetores envolvidos no eixo hipotálamo-hipófise gonadal, indicando, por questões evolutivas, que os seus efeitos na reprodução humana não deverão ser pronunciados.²⁴ Outros SNPs relacionados com o eixo, que poderão influenciar a sensibilidade ovária à terapia com FSH exógena, localizam-se anteriormente ou posteriormente ao nível hipofisário. Destacam-se os estudos efetuados para os genes da CYP19 aromatase⁶, dos recetores alfa dos estrogénios^{6,25}, dos recetores beta dos estrogénios⁶, da AMH e do recetor da AMH tipo II²⁶, que suportam a hipótese de a resposta ovária se tratar de uma situação de transmissão poligénica. Do mesmo modo, de momento não existem evidências suficientes sobre a utilidade clínica destes polimorfismos em termos de aplicabilidade farmacogenética, pelo que novos estudos serão necessários para clarificar o verdadeiro poder preditivo da utilização conjunta dos

vários candidatos.

A inconsistência dos resultados obtidos nos diferentes estudos realizados até ao momento poderá dever-se a vários fatores. Por um lado, uma grande maioria destes estudos recorre a amostras reduzidas, adequadas apenas a situações de transmissão monogénica. Adicionalmente, alguns estudos incluem dados obtidos através de mais do que um centro, podendo existir uma reduzida uniformidade em termos de protocolos de estimulação ovária ou de metodologias laboratoriais utilizadas num mesmo estudo. O desenho do estudo, as causas de infertilidade incluídas e de protocolos de estimulação ovária utilizados são igualmente divergentes entre os diferentes estudos. Desta forma, tem sido proposto que o efeito do polimorfismo Asn680Ser na resposta ovária poderá não ser tão evidente em estudos que incluem mulheres com infertilidade devido a patologia ovária ou causa desconhecida^{13,18}. Por outro lado, os estudos existentes são também bastante variáveis em termos de população interviniente, incluindo grupos étnicos distintos que apresentam uma prevalência muito diversa das variantes genóticas do polimorfismo. Para além disso, o gene analisado poderá estar sujeito a fenómenos de penetrância incompleta ou de interação gene-gene ou mesmo gene-ambiente.²⁷ O nosso estudo recorre a uma amostra considerável e os dados utilizados foram obtidos a partir de um único centro, garantido uma elevada uniformidade em relação aos protocolos de estimulação ovária realizados e às metodologias laboratoriais utilizadas. Deste modo, num trabalho futuro seria interessante avaliar se se obtêm resultados idênticos quando excluídas as pacientes com patologia ovária documentada e quando avaliadas as dosagens totais de FSH recombinante utilizada.

A AMH, glicoproteína expressa pelas células da granulosa dos folículos pré-antrais, tem sido relacionada com o número de folículos primordiais e com a taxa de recrutamento folicular. Com base nestes conhecimentos, foi identificada como um

marcador da reserva ovária.²⁸ No nosso estudo, não parece existir nenhuma associação entre a concentração sérica de AMH e o polimorfismo Asn680Ser. Contudo, foi possível encontrar uma associação entre a resposta ovária e a concentração sérica de AMH, visto que se verificaram níveis de AMH gradualmente maiores, desde a má resposta até à resposta aumentada. Estes resultados encontram-se em concordância com estudos prévios²⁹⁻³¹, e reforçam a ideia de que se trata de um biomarcador da resposta ovária de elevado valor clínico, com potencial capacidade de prever, simultaneamente, uma má resposta ou uma resposta aumentada. Assim, as evidências apontam para a utilidade da AMH na prática clínica, na previsão da resposta ovária e consequente adaptação do protocolo de estimulação, propondo-se a medição dos níveis de AMH antes de submeter as doentes a estimulação ovária controlada.

A previsão da resposta ovária à estimulação com FSH e a adaptação do protocolo utilizado são ainda tarefas de difícil alcance, em consequência de o resultado da estimulação ovária depender de uma combinação de fatores genéticos e ambientais. O adicional desenvolvimento de biomarcadores da resposta ovária e o conhecimento do genótipo das pacientes é necessário de forma a adaptar os protocolos individualmente.⁴ O esclarecimento da complexidade genética da interação FSH-FSHR e do próprio eixo hipotálamo-hipófise-gonadal poderá possibilitar a verdadeira aplicação do potencial farmacogenético da terapia com FSH.⁹

5. CONCLUSÃO

O genótipo do polimorfismo Asn680 do *FSHR* não parece influenciar a concentração sérica de FSH no 3º dia do ciclo menstrual, nem os restantes doseamentos séricos dos parâmetros hormonais avaliados neste estudo. De igual forma, o número de folículos pré-ovulatórios, de ovócitos e de ovócitos maduros obtidos não se encontra associado ao genótipo deste polimorfismo, pelo que independentemente do genótipo, o ciclo de tratamento atingiu resultados idênticos. Para além disso, não se encontraram associações entre o polimorfismo estudado e a resposta ovária quando classificada de acordo com o número de ovócitos obtidos, nem entre o polimorfismo estudado e a ocorrência de cancelamento do ciclo de tratamento. Desta forma, os nossos resultados são consistentes com a hipótese de que a resposta ovária não depende do genótipo do *FSHR*, pelo que não é possível reconhecer que exista evidência para adaptar as doses de FSH ao genótipo do *FSHR*.

No entanto, os resultados obtidos confirmam que existe uma associação entre a concentração sérica de AMH e a resposta ovária. Devido à sua capacidade em prever a ocorrência de má resposta ou de resposta aumentada, a AMH parece ter elevada aplicabilidade clínica permitindo a adaptação do protocolo de estimulação ovária.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação apenas foi possível graças ao apoio imprescindível de várias pessoas que amavelmente me ofereceram a sua colaboração. Deixo apenas algumas palavras que espero que façam justiça ao meu profundo e sincero sentimento de agradecimento:

À Professora Doutora Ana Teresa Almeida Santos, agradeço o privilégio de frequentar a cadeira de Genética Médica, pelo saber que me transmitiu e que contribuiu grandemente para o enriquecimento da minha formação académica e científica. Agradeço também a qualidade da sua orientação científica e a enorme oportunidade de realizar este trabalho.

À Doutora Ana Paula Sousa, expresso o meu profundo agradecimento pela coorientação deste trabalho, assim como por todas as palavras de incentivo e apoio determinantes e pela disponibilidade e amabilidade demonstradas.

A todo o Serviço de Medicina da Reprodução, por me terem proporcionado as condições necessárias, por permitirem a minha integração num local de tão elevada qualidade e exigência e pela simpatia com que fui sempre recebida.

Aos meus pais e ao meu irmão, por acreditarem constantemente em mim, principalmente quando eu própria não acredito, por acompanharem incondicionalmente cada etapa da minha vida e por todas as preciosas lições de vida.

Ao Francisco, por tudo o que nos une, por toda a coragem transmitida e por me incentivares a seguir os meus sonhos. Não poderia ter tido um melhor companheiro ao longo desta nossa caminhada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferraretti A, La Marca A, Fauser B, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus on the definition of poor response to ovarian stimulation for in vitro fertilization: The Bologna criteria. *Hum Reprod.* 2011;26(7):1616–24.
2. Nastri C, Teixeira D, Moroni R, Leitão V, Martins W. Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology, staging, prediction and prevention. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(4):377–93.
3. Strickler R, Radwanska E, Williams D. Controlled ovarian hyperstimulation regimens in assisted reproductive technologies. *Am J Obs Gynecol.* 1995;172(2):765–73.
4. Bosch E, Ezcurra D. Individualised controlled ovarian stimulation (iCOS): maximising success rates for assisted reproductive technology patients. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9(82):1–9.
5. Smith V, Osianlis T, Vollenhoven B. Prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: a review. *Obstet Gynecol Int.* 2014;36(11):1024–33.
6. de Castro F, Morón F, Montoro L, Galán J, Hernández D, Padilla E, et al. Human controlled ovarian hyperstimulation outcome is a polygenic trait. *Pharmacogenetics.* 2004;14(5):285–93.
7. Laan M, Grigorova M, Huhtaniemi I. Pharmacogenetics of FSH action. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19(3):220–7.
8. Gromoll J, Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(8):368–73.

9. Simoni M, Casarini L. Genetics of FSH action : a 2014-and-beyond view. *Eur J Endocrinol.* 2014;170(3):91–107.
10. Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre H, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(9):3365–9.
11. Sudo S, Kudo M, Wada S, Sato O, Hsueh A, Fujimoto S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Mol Hum Reprod.* 2002;8(10):893–9.
12. De Castro F, Ruiz R, Montoro L, Pérez-Hernández D, Padilla E, Real L, et al. Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril.* 2003;80(3):571–6.
13. Laven J, Mulders A, Suryandari D, Gromoll J, Nieschlag E, Fauser B, et al. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in women with normogonadotropic anovulatory infertility. *Fertil Steril.* 2003;80(4):986–92.
14. Falconer H, Andersson E, Aanesen A, Fried G. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in a population of infertile women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005;84(8):806–11.
15. Jun J, Yoon J, Ku S-Y, Choi Y, Hwang K, Park S, et al. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET. *J Hum Genet.* 2006;51(8):665–70.

16. Huang X, Li L, Hong L, Zhou W, Shi H, Zhang H, 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)*. 2015;82(4):577–83.
17. Klinkert E, Velde E, Weima S, Zandvoort P, Hanssen R, Philomeen R. FSH receptor genotype is associated with pregnancy but not with ovarian response in IVF. *Reprod Biomed Online*. 2006;13(5):687–95.
18. Mohiyiddeen L, Newman W, Cerra C, McBurney H, Mulugeta B, Roberts S, et al. A common Asn680Ser polymorphism in the follicle-stimulating hormone receptor gene is not associated with ovarian response to gonadotropin stimulation in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2013;99(1):149–55.
19. Adamson G, Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART. *Fertil Steril*. 2009;92(5):1520–4.
20. La Marca A, Sighinolfi G, Argento C, Grisendi V, Casarini L, Volpe A, et al. Polymorphisms in gonadotropin and gonadotropin receptor genes as markers of ovarian reserve and response in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2013;99(4):970–8.
21. Nordhoff V, Sonntag B, Tils D, Redmann K, Schu A. Effects of the FSH receptor gene polymorphism p.N680S on cAMP and steroid production in cultured primary human granulosa cells. *Reprod Biomed Online*. 2011;23(1):196–203.

22. Daelemans C, Smits G, De Maertelaer V, Costagliola S, Englert Y, Vassart G, et al. Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(12):6310–5.
23. Desai S, Achrekar S, Paranjape S, Desai S, Mangoli V, Mahale S. Association of allelic combinations of FSHR gene polymorphisms with ovarian response. *Reprod Biomed Online.* 2013;27(4):400–6.
24. Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene : implications for human reproduction. *Hum Reprod Update.* 2002;8(5):413–21.
25. Georgiou I, Konstantelli M, Syrrou M, Messinis I, Lolis D. Oestrogen receptor gene polymorphisms and ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1997;12(7):1430–3.
26. Karagiorga I, Partsinevelos G, Mavrogianni D, Anagnostou E, Zervomanolakis I, Kallianidis K, et al. Single nucleotide polymorphisms in the Anti-Mullerian hormone (AMH Ile49Ser) and Anti-Mullerian hormone type II receptor (AMHR II -482 A>G) as genetic markers in assisted reproduction technology. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(3):357–67.
27. Simoni M, Tempfer C, Destenaves B, Fauser B. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I - polycystic ovary syndrome and ovarian response. *Hum Reprod Update.* 2008;14(5):459–84.
28. Iliodromiti S, Nelson S. Ovarian response biomarkers: physiology and performance. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2015;27(3):182–6.

29. Gomez R, Schorsch M, Hahn T, Henke A, Hoffmann I, Seufert R, et al. The influence of AMH on IVF success. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;293(3):667–73.
30. Salmassi A, Mettler L, Hedderich J, Jonat W, Deenadayal A, von Otte S, et al. Cut-Off Levels of Anti-Mullerian Hormone for The Prediction of Ovarian Response, In Vitro Fertilization Outcome and Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *Int J Fertil Steril.* 2015;9(2):157–67.
31. Gleicher N, Kim A, Kushnir V, Weghofer A, Shohat-Tal A, Lazzaroni E, et al. Clinical relevance of combined FSH and AMH observations in infertile women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):2136–45.