

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE ANTÍGENOS  
LEUCOCITÁRIOS HUMANOS-G EM FLUIDO FOLICULAR E A  
QUALIDADE DO EMBRIÃO AVALIADA PELO CRITÉRIO DE  
ESCORE EMBRIONÁRIO GRADUADO EM CICLOS DE  
FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

GLÍCIA PINHEIRO BEZERRA

Porto Alegre  
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE ANTÍGENOS  
LEUCOCITÁRIOS HUMANOS-G EM FLUIDO FOLICULAR E A  
QUALIDADE DO EMBRIÃO AVALIADA PELO CRITÉRIO DE  
ESCORE EMBRIONÁRIO GRADUADO EM CICLOS DE  
FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

GLÍCIA PINHEIRO BEZERRA

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

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre/Doutor em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2014

### CIP - Catalogação na Publicação

Pinheiro Bezerra , Glícia

ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE ANTÍGENOS  
LEUCOCITÁRIOS HUMANOS-G EM FLUIDO FOLICULAR E A  
QUALIDADE DO EMBRIÃO AVALIADA PELO CRITÉRIO DE ESCORE  
EMBRIONÁRIO GRADUADO EM CICLOS DE FERTILIZAÇÃO IN  
VITRO / Glícia Pinheiro Bezerra . -- 2014.  
43 f.

Orientador: João Sabino Lahorgue da Cunha Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2014.

1. sHLA-G. 2. Qualidade embrionária. 3. Reprodução  
Assistida . 4. Endometriose. 5. Escore embrionário  
GES. I. Lahorgue da Cunha Filho, João Sabino,  
orient. II. Título.

## **Banca Examinadora**

Edison Capp

Maria Lúcia da Rocha Oppermann

Ricardo Francalacci Savaris

Alexandre Urban Borbely

## **Dedicatória**

Dedico esse trabalho ao meu pai Francisco Isac *in memoriam*, que desde muito pequena me ensinou que a maior herança que nos deixaria e, nos deixou, seria o conhecimento.

## **Agradecimentos**

- Agradeço a Deus, que me concebeu o dom da vida e me permitiu evoluir ao longo das adversidades deste trabalho.
- À minha mãe, que mesmo estando a mais de 3.000 Km de distância sempre esteve muito presente e me acompanhou em todos os passos da realização desse trabalho com palavras de carinho e com sua inerente determinação.
- Ao Eduardo, meu amor e grande companheiro que pulsou em sintonia aos meus ideais nessa caminhada.
- À minha irmã Glaydcianne, por ser a minha melhor amiga e grande incentivadora em sempre alçar grandes vôos.
- Ao meu irmão Francisco, com sua inquietude ímpar e dedicação é um exemplo de que a zona de conforto nunca é confortável.
- Ao meu orientador, especialmente, Prof. João Sabino Cunha Filho, por quem tenho profunda admiração, gratidão e respeito por ter me proporcionado o contato com todo o conhecimento adquirido e desafios ao longo da realização desse trabalho.
- À Emily De Conto, que entre cafés, artigos, almoços, mais cafés, reuniões científicas e jantas me acompanhou ao longo desses dois anos e me ajudou sempre no que precisei.
- Aos colegas Rita Chapon, Joelmir Chiesa, por estarmos nessa caminhada juntos e podermos compartilhar as ansiedades dos prazos e das provas e aos amigos Kadu, Jakeline e Marília que sempre me deram conselhos valiosos.
- À Vanessa Genro e ao Carlos Souza, pelo apoio e ensinamentos que muito agregaram a minha vida científica/acadêmica.
- Ao Luciano, com sua vasta sabedoria sobre os mais variados testes laboratoriais e sempre esteve disposto a me explicar cada um deles.
- Ao Centro de Imunologia da Reprodução, em especial à Tatiana Michelin e ao Jorge Neumann que me incentivaram desde o início dessa caminhada.
- Aos profissionais do Instituto Willkok - Projeto Cegonha e do Centro de Reprodução Humana Insemine, em especial à embriologista Daniela Scherer da Silva que ,sempre disposta, me ajudou na coleta das amostras.

## Resumo

**Introdução:** A taxa da prevalência da infertilidade em casais com idade reprodutiva atinge 8-10%. A fim de tentar contornar esse problema, esses casais optam pela reprodução assistida. Em muitos dos casos, os resultados das técnicas de reprodução assistida (TRA) são bem sucedidos ao realizarem a fertilização *in vitro* (FIV), em outros não são satisfatórios ou ocorrem gestações múltiplas que aumenta o risco de morbidade a essas gestantes. Diante deste quadro, estudam-se formas de aperfeiçoar as TRA no que se refere à seleção do embrião. O hormônio anti-Mülleriano (AMH) já desempenha este papel ao refletir a reserva ovariana na rotina das clínicas de FIV. Os antígenos leucocitários humanos-G solúveis (sHLA-G) vêm sendo investigado no seu papel em refletir a qualidade embrionária. A existência da associação entre as concentrações de HLA-G mensuradas em fluido folicular e a qualidade embrionária avaliada pelo critério de pontuação *Graded Embryo Score* (GES) poderia caracterizar o sHLA-G como um possível biomarcador de qualidade embrionária.

**Objetivos:** Investigar a associação entre as concentrações do sHLA-G no fluido folicular (FF) e a pontuação dos embriões gerados avaliados pelo critério GES em ciclos de mulheres submetidas à fertilização *in vitro* (FIV).

**Métodos:** Um estudo transversal foi realizado. Avaliaram-se setenta e três mulheres com idade  $\leq 39$  anos, submetidas à FIV pelas seguintes causas: fator tubário, fator masculino e/ou endometriose, com ambos os ovários e níveis hormonais de TSH, FSH e PRL dentro dos valores de referência. Não foram elegíveis ao estudo mulheres com síndrome de hiperestimulação ovariana no ciclo avaliado, com doença auto-imune, com síndrome dos ovários policísticos, com luteinização precoce e/ou endometrioma. Realizou-se a mensuração de sHLA-G por ELISA no FF de um pool de folículos puncionados das mulheres submetidas à indução de ovulação para a FIV. Os embriões obtidos após fertilização foram classificados segundo o critério GES. As outras variáveis necessárias foram transcritas dos prontuários das pacientes participantes no estudo.

**Resultados:** A associação entre as concentrações de sHLA-G e o escore médio dos embriões gerados não foi observada. Observou-se uma sensibilidade aumentada do teste ELISA, quando comparada aos estudos da literatura, com detecção em mais de 98% das amostras analisadas. Foi encontrada uma associação significativa entre o AMH e a idade ( $r=-0,38$ ;

p=0,003), entre AMH e total de oócitos (  $r=0,53$ ;  $p<0,05$ ) e idade e total de oócitos (  $r= -0,31$ ,  $p=0,009$ ). A mensuração de sHLA-G em mulheres com endometriose e sem endometriose (fator tubário e masculino) não mostrou diferença significativa ( $p=0,57$ ).

**Conclusão:** Não houve associação entre a qualidade embrionária e dosagens de sHLA-G. Diante destes resultados, ainda está controverso o uso de sHLA-G mensurado em FF como marcador prognóstico de qualidade de embrião embrionária avaliada pelo critério GES. Os resultados encontrados referentes ao AMH corroboram com a literatura.

**PALAVRAS-CHAVE:** sHLA-G, GES, qualidade embrionária, fluido folicular, endometriose.



## Abstract

**Background:** The prevalence of infertility rate in the couples in reproductive age reaches 8-10%. In order to solve this problem, these couples opt for assisted reproduction. In many cases, the results of assisted reproduction techniques (ART) are successful in performing the *in vitro* fertilization (IVF), while in others they are not satisfactory or occur multiple pregnancy that increase morbidity risk to these pregnant women. In this context, several studies attempt new forms for to improve the ART in the selection the embryo. The anti-Müllerian hormone (AMH) already plays this role to reflect the ovarian reserve in IVF clinics routine. Soluble human leukocyte antigen-G (sHLA-G) has been investigated its role to reflect the embryo quality. The existence of the association between the sHLA-G concentrations measured in follicular fluid and embryo quality based on Graduated Embryo Score (GES) criteria could characterize the sHLA-G as a possible biomarker of embryo quality.

**Objectives:** Our study investigated the association between the sHLA-G concentrations in follicular fluid (FF) and the score of embryo evaluated by Graduated Embryo Score (GES) criteria in women cycles treated by *in vitro* fertilization (IVF).

**Methods:** A cross-sectional study was conducted. Evaluated a total of seventy-three women aged  $\leq 39$  years, undergoing IVF because of tubal factor, male factor and / or endometriosis, with both ovaries and hormone levels of TSH, FSH and PRL within the range of reference. It was not eligible to study women with ovarian hyperstimulation syndrome in the evaluated cycle, autoimmune disease, polycystic ovary syndrome, with early luteinization and / or endometrioma. In this study was measured the sHLA-G by ELISA in FF from a pool of follicles punctured of women undergoing ovulation induction for IVF. The embryos after fertilization were classified by GES criteria. The other study variables were transcribed from medical records of patients.

**Results:** The association between concentrations of sHLA-G and the average score of the generated embryos was not observed. Sensitivity of the ELISA was observed with detection by more than 98% of the samples. Significant association was found between AMH and age ( $r = -0.38$ ;  $p = 0.003$ ), between AMH and total oocytes ( $r = 0.53$ ;  $p < 0.05$ ) and age and total oocytes ( $r = -0.31$ ,  $p = 0.009$ ). The results of sHLA-G in women with endometriosis

and without endometriosis (tubal and male factor) showed no significant difference ( $p = 0.57$ ).

**Conclusion:** There was no association between embryo quality and the dosages of sHLA-G. Considering these results, the use of sHLA-G measured in FF as a prognostic marker of quality embryo based on GES criteria is still controversial. The results for the AMH corroborate with the literature.

**KEYWORDS:** sHLA-G, GES, embryo quality, follicular fluid, endometriosis.

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1.** Avaliação da morfologia no 3º dia do desenvolvimento embrionário.....35

**Tabela 2.** Avaliação e classificação do embrião pelo critério GES .....36

## **Lista de Figuras**

- Figura 1:** Representação do cromossomo 6 e as regiões do HLA.....22
- Figura 2:** Antígeno leucocitário humano-G e suas isoformas.....25

## Lista de Abreviaturas

<b>SIGLA</b>	<b>Significado</b>
<b>AFC</b>	<b>Antral Follicle Count</b> (Contagem de Folículos Antrais)
<b>AMH</b>	<b>Anti-Müllerian Hormone</b> (Hormônio Anti-Mülleriano)
<b>AMHR2</b>	<b>anti-Mullerian hormone receptor, type II</b> (Receptor de Hormônio anti-mülleriano tipo II)
<b>FIV</b>	<b>Fertilization <i>in vitro</i></b> (Fertilização <i>in vitro</i> )
<b>FSH</b>	<b>Follicle Stimulating Hormone</b> (Hormônio Folículo Estimulante )
<b>GES</b>	<b>Graduated Embryo Score</b> (Escore Graduado do Embrião)
<b>GnRH</b>	<b>Gonadotropin-Releasing Hormone</b> (Hormônio Liberador de Gonadotrofina)
<b>HLA-G</b>	<b>Human Leukocyte Antigen G</b> (Antígeno Leucocitário Humano G)
<b>hMG</b>	<b>human Menopausal Gonadotrophin</b> (Gonadotrofina Menopáusica humana)
<b>ICSI</b>	<b>Intracytoplasmic injection</b> (Injeção Intracitoplasmética)
<b>LH</b>	<b>Luteinizing hormone</b> (Hormônio Luteinizante)
<b>MHC</b>	<b>Major Histocompatibility Complex</b> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
<b>MIS</b>	<b>Müllerian-Inhibiting Substance</b> (Substância Inibidora de Müller)
<b>sHLA-G</b>	<b>Human Leukocyte Antigen G soluble</b> (Antígeno Leucocitário Humano G solúvel )
<b>TRA</b>	<b>Assisted Reproductive Techniques/ Technologies</b> (Técnicas/ Tecnologias de Reprodução Assistida)
<b>VLP</b>	<b>Laparoscopy</b> (Videolaparoscopia)

# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1) ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES .....	17
2.2) INFERTILIDADE FEMININA .....	18
2.2.1) <i>Conceito e Epidemiologia</i> .....	18
2.2.2) <i>Infertilidade e Reprodução Assistida</i> .....	18
2.3) HLA-G .....	21
2.3.1) <i>Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)</i> .....	21
2.3.2) <i>Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G)</i> .....	22
2.3.3) <i>Genética do HLA-G</i> .....	23
2.3.4) <i>HLA-G na Reprodução Humana</i> .....	26
2.4) HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO .....	28
2.4.1) <i>Histórico e Conceito</i> .....	28
2.4.2) <i>Hormônio Anti-Mülleriano na Reprodução Assistida</i> .....	30
2.4.3) <i>HLA-G versus Qualidade do Embrião</i> .....	32
2.4.4) <i>Qualidade do Embrião versus Reprodução Assistida</i> .....	33
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>36</b>
<b>4. HIPÓTESE NULA .....</b>	<b>37</b>
<b>5. OBJETIVO .....</b>	<b>38</b>
5.1) OBJETIVO GERAL: .....	38
5.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	38
<b>6. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>39</b>
<b>7. ARTIGO.....</b>	<b>44</b>
<b>8.CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>9. PERPECTIVAS.....</b>	<b>68</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>69</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A infertilidade é uma patologia que afeta 8-10% dos casais em idade reprodutiva (1). Estima-se que entre 60 e 80 milhões de pessoas em todo mundo são diagnosticadas com essa condição. A Tecnologia de reprodução assistida (TRA) é um tratamento comum de escolha para muitos casais que enfrentam problemas de infertilidade, seja devido ao fator masculino, ao feminino e/ou por causa idiopática.

A infertilidade feminina pode ser explicada por diversas causas desde as anatômicas às hormonais. As TRA, diante de seus próprios desafios do ambiente *in vitro* que não se configuram em um ambiente tão ideal como o ambiente *in vivo*, requerem um aprimoramento constante a fim de tentar reverter essas diversas formas de manifestação de infertilidade em um aumento das chances de gravidez. Essas melhorias se voltam principalmente aos critérios de avaliação e seleção do embrião (4).

O critério morfológico é uma forma de avaliação já bem estabelecida nas rotinas das clínicas de fertilização e ao longo dos anos o seu aprimoramento vem sendo observado. O surgimento do critério do *Graduated Embryo Score* (GES) possibilitou um maior monitoramento e uma melhor avaliação da qualidade do embrião a partir dos momentos iniciais do seu desenvolvimento. Isso vai de encontro ao que preconiza os procedimentos mais usuais em que essa avaliação do embrião ocorre no terceiro dia após a fertilização *in vitro* (FIV). Estudos investigam os antígenos leucocitários humanos-G solúveis (sHLA-G) na condição de critério complementar da avaliação morfológica da qualidade embrionária(8).

A partir do conhecimento já bem estabelecido da expressão do sHLA-G na interface materno-fetal, muitos estudos investigam o papel dessa molécula como possível marcador diagnóstico, prognóstico e terapêutico nas fases presentes em todo o processo pré – gestacional bem como gestacional. A expressão de sHLA-G foi descrita pela primeira vez em células do citotrofoblasto e ao se investigar a sua função demonstrou-se importância

significativa na indução e manutenção da tolerância gestacional (12). Há evidências de que durante o processo de implantação embrionária humana ocorra uma estimulação adaptativa do sistema imune materno e que juntamente com uma habilidade do embrião de se implantar no útero e com uma receptividade endometrial adequada seja possível o estabelecimento e progressão da gestação (15).

O sHLA-G vem sendo estudado nos últimos anos a fim de classificá-lo como um biomarcador não invasivo de qualidade embrionária no âmbito da reprodução assistida, a partir da análise da concentração dessa molécula em vários compartimentos maternos e a associação com as taxas de implantação e de gravidez. A detecção do sHLA-G de produção materna já foi possível no plasma, fluido amniótico, fluido folicular (FF) e sobrenadantes de culturas de oócitos (20)(24). O fluido folicular representa um microambiente essencial e específico para a regulação da função ovariana. Isso se deve ao contato íntimo do FF com as células da granulosa que criam uma ponte de comunicação com os oócitos pré-ovulatórios para fornecê-los nutrientes e fatores metabólicos essenciais ao processo de maturação oocitária e que muitas vezes esses são liberados nesse fluido (56). O sHLA-G ao ser produzido por essas células permanece em íntimo contato com esse microambiente que envolve os oócitos durante todo o seu desenvolvimento e por isso a sua importância em ser estudado como marcador de qualidade oocitária, bem como de qualidade embrionária.

O anti-Mülleriano é um hormônio que também é produzido pelas células da granulosa e desempenha um papel em regular o número de folículos em crescimento e sua seleção para ovulação (30). Esse hormônio é importante porque auxilia no manejo das pacientes submetidas às TRA de modo que suas concentrações no sangue periférico representam um índice de fertilidade valioso, um marcador de reserva do ovário e/ou uma preditor de falência ovariana prematura (32)(40). Deste modo, o anti-mülleriano tem por finalidade em obter, de forma segura pelas TRA, um elevado número de folículos dominantes com um pool de oócitos maduros que supostamente originarão mais de um embrião e assim, baseando-se no critério morfológico em complementar ao uso da concentração de sHLA-G no FF proporcionaria a seleção do embrião de melhor qualidade para a transferência (36)(42).

Essa qualidade é definida através de critérios de avaliação da morfologia do embrião que hoje na literatura vem sendo descrita basicamente por dois tipos: o critério que classifica em Grau A, B, C, D (63) e o critério GES que classifica em uma pontuação de 0-100 (08). As principais diferenças entre esses critérios são: enquanto a primeira se baseia no número de



células (8 células) e na quantidade de fragmentação a partir do 3º dia após a FIV, a segunda se baseia em praticamente todo o desenvolvimento do embrião a partir das 16 horas após a FIV.

O sHLA-G em uso complementar a esse score vem sendo bastante discutido no que se refere ao seu potencial de refletir a qualidade do melhor embrião no momento da escolha deste para transferência.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1) Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura foi embasada nos conceitos da infertilidade e das melhorias constantes das tecnologias de reprodução assistida que objetivam reverter esse quadro. Focamos na possibilidade do sHLA-G ser um biomarcador de qualidade embrionária e assim poder complementar o critério GES no momento crítico da escolha do melhor embrião. Na estratégia de busca, foram utilizadas as seguintes bases de dados: Portal de periódicos CAPES/MEC, PubMed e MedLine-Bireme. Os artigos utilizados estão datados entre os períodos 1958 e 2014. As buscas foram realizadas a partir de palavras-chave dos conceitos explorados no texto da Revisão da Literatura e que norteiam o objetivo deste estudo: “*sHLA-G*”, “*GES*”, “*embryo quality*”, “*follicular fluid*”, “*endometriosis*”, “*infertility*”, *anti-Müllerian hormone* e suas combinações. Essa estratégia de busca das referências bibliográficas está melhor representada abaixo.



## **2.2) Infertilidade Feminina**

### **2.2.1) Conceito e Epidemiologia**

Infertilidade é clinicamente definida como “uma doença” do sistema reprodutivo caracterizada pela falha de alcançar uma gravidez clínica após 12 meses ou mais de relações sexuais desprotegidas ocorridas regularmente. A infertilidade ou um estado de sub-infertilidade pode se manifestar pela incapacidade de engravidar, de manter uma gravidez ou de levar uma gravidez a termo. Esta condição se apresenta mundialmente com uma taxa de prevalência em cerca 8-10% em casais em idade reprodutiva, 40% dos homens, 40% das mulheres, os 20% restantes foram por limitações do casal, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (1)(2).

Um dos fatores que caracteriza a integridade da fertilidade é a produção de um número suficiente de gametas saudáveis, gametas masculinos com motilidade adequada, passagem bem sucedida dos espermatozóiide através do canal vaginal, do útero e das tubas uterinas, a penetração pelo gameta masculino em um oócito normal e a implantação do blastocisto na mucosa uterina. A ocorrência de falha em qualquer uma dessas etapas pode resultar a infertilidade conjugal (1).

### **2.2.2) Infertilidade e Reprodução Assistida**

Estima-se que entre 60 e 80 milhões de pessoas em todo mundo foram diagnosticadas com infertilidade. A fim de tentar reverter esse quadro, muitos casais optam pela reprodução assistida (1). As causas mais comuns de infertilidade e as quais requerem técnicas de reprodução assistida (TRA) incluem as obstruções tubárias, as causas masculinas, a endometriose, causas imunológicas, bem como infertilidade sem causa aparente. Embora existam diversos procedimentos que possam ser empregados para reverter esse quadro de infertilidade, o uso de cada um deles deve ser bem avaliado levando em consideração a causa de infertilidade, a investigação clínica e o tratamento de fatores associados a essa condição (3).

Um exemplo disso seria a doença inflamatória pélvica que representa a causa mais comum de lesão tubária. Estudos sugerem que antes dessas pacientes serem direcionadas aos procedimentos de reprodução assistida, a cirurgia seja indicada. A cirurgia continua sendo uma opção bastante eficaz para reverter a infertilidade associada ao fator tubário. Sendo assim, em muitos casos a cirurgia desempenha um papel equivalente, em termos de desempenho reprodutivo, à fertilização *in vitro* (FIV) (4).

As principais causas femininas de infertilidade são: danos pós-infecção de trompas, endometriose e anomalias uterinas congênitas (útero septado) / adquiridas (miomas). Esses danos comprometem a fertilidade, ocasionando complicações obstétricas e quando essas mulheres engravidam podem provocar perdas gestacionais. Outra causa de infertilidade bastante prevalente nas clínicas de reprodução assistida é a endometriose. Essa é uma doença ginecológica caracterizada pela presença de glândulas endometriais funcionais e/ou estroma fora da cavidade endometrial e da musculatura uterina. A endometriose está relacionada à infertilidade ou à sub-fertilidade por meio de diversas formas de manifestação; através de mecanismos multifatoriais que envolvem fatores imunológicos, genéticos e ambientais e, assim, o impacto de cada uma destas deve ser examinada criticamente. Em muitos dos casos, a indicação de tratamento cirúrgico para essas pacientes promove o aumento significativo nas taxas de fertilização (3,5).

Em endometriose pélvica avançada (moderada/grave), a presença de grande número de aderências, distorções anatômicas da pelve, endometriomas ovarianos, bem como os mecanismos subjacentes dessas aderências limitam o acesso dos oócitos, dos gametas e dos embriões por meio de alteração da motilidade das fímbrias (6). Na endometriose mínima/leve, fenômenos como disfunção endócrina, fase lútea inadequada síndrome do folículo não-roto luteinizado, disfunção autoimune, produção de substâncias (prostaglandinas, citocinas, fatores de crescimento) podem prejudicar a função ovariana normal, a ovulação pelo comprometimento da foliculogênese com alteração da qualidade do oócito, a fertilização, bem como a implantação do blastocisto e um aumento do risco de abortos recorrentes são os fatores que contribuem para redução da fertilidade. São mecanismos teóricos e ainda não comprovados, mas procuram justificar a infertilidade em mulheres com endometriose (7,8).

A reprodução assistida é um conjunto de técnicas, utilizadas por profissionais especializados, que têm como principal objetivo aumentar as chances de gestação de mulheres com dificuldades para engravidar (9). As técnicas de reprodução assistida foram aplicadas

pela primeira vez em 1978, como estratégia para reverter uma oclusão completa das tubas uterinas. Desde então, as indicações para a TRA têm sido expandidas, incluindo diversas outras causas de infertilidade (2). O sucesso do uso dessas técnicas é refletido, em última análise, pela taxa de gravidez, embora todo o processo seja crítico para que a gravidez ocorra. Por isso a importância do aprimoramento constante dos procedimentos que fazem parte de todo o processo da reprodução assistida.

A investigação da qualidade embrionária antes da transferência do embrião é um processo importante tanto para determinar o número de embriões a ser selecionado quanto para a ocorrência da seleção dos melhores embriões. Diante dessa importância, desde de 1986 diversos sistemas de classificação embrionária vêm sendo propostos (10,11).

O critério morfológico é uma forma de avaliação já bem estabelecida nas rotinas das clínicas de fertilização e ao longo dos anos o seu aprimoramento vem sendo observado. Fisch, J. D. *et. al.*, em seu estudo usando um novo critério chamado de *Graduated Embryo Score* (GES) observou, baseados em seus resultados, que é possível adquirir as mesmas altas taxas de implantação e gravidez associadas à transferência de blastocistos, a partir da transferência de embriões em estado de clivagem selecionados com base neste score (12). O GES que é composto de duas avaliações em cada ponto do desenvolvimento embrionário, paralelamente a uma avaliação ponderada das características morfológicas convencionais do terceiro dia (13).

Aliado a esse critério de avaliação, muitos autores investigam metabólitos presentes no fluido folicular a fim de associá-los como marcador prognóstico de qualidade embrionária. As moléculas de sHLA-G são produzidos pelas células da granulosa e permanecem no fluido folicular (FF) em íntimo contato com todo o processo de desenvolvimento oocitário, sugerindo que eles possam refletir a competência oocitária bem como a qualidade embrionária. Diante disso, nosso estudo investigou a atuação do sHLA-G como um possível biomarcador de qualidade embrionária (14).

O uso de um biomarcador adicional ao critério morfológico proporcionaria maior precisão na seleção dos embriões para transferência. Esta seleção é um ponto crítico nos tratamentos de reprodução assistida de modo que o seu aprimoramento reduz o risco de comorbidades associadas e aumenta as chances de gravidez, principalmente quando se transfere somente um embrião (15).

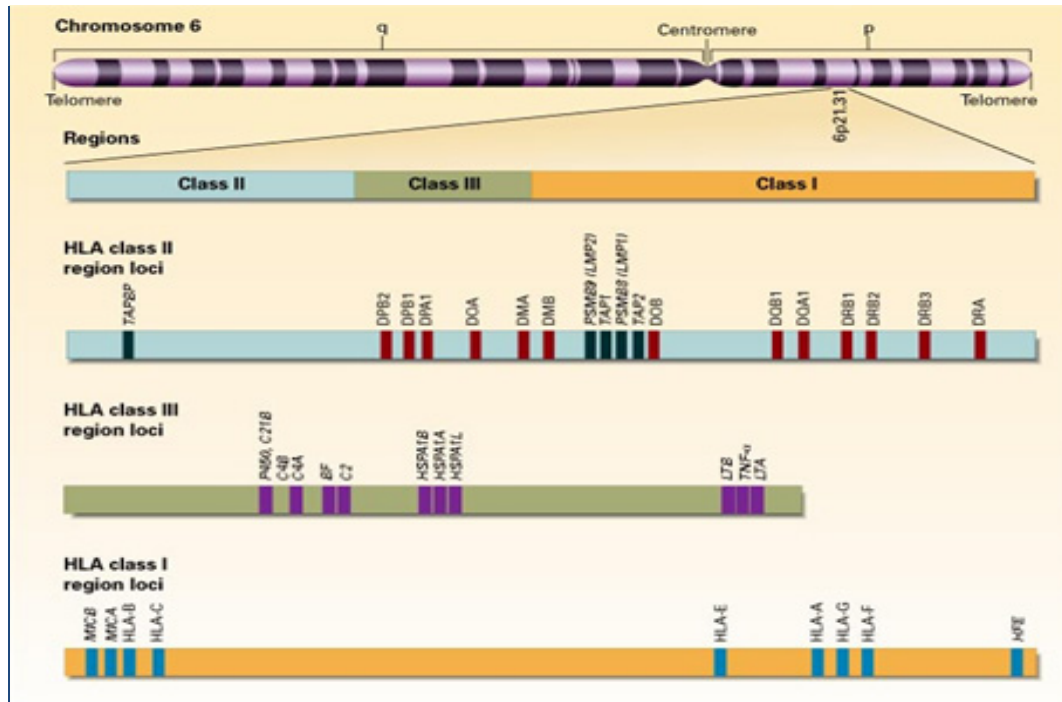
## 2.3) HLA-G

### 2.3.1) Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) foi primeiramente descrito com esta denominação pela identificação destas moléculas que supostamente desempenhavam um papel na aceitação e rejeição de enxertos. Os genes que codificam essas moléculas são os mais polimórficos de todo o genoma humano. Eles transcrevem moléculas de superfície celular que possuem como função primordial a capacidade de ligar fragmentos peptídicos e expor estes na superfície celular, a fim de que possam ser reconhecidos pelos receptores TCRs de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos (16).

O MHC em humanos é conhecido como complexo antígeno leucocitário humano (HLA) e os genes que fazem parte deste complexo estão organizados em um fragmento de  $4.10^6$  bases no braço curto do cromossomo 6, que codificam três classes de moléculas: HLA de classe I, II e III (vide figura 1). Cerca de 40% dos genes desse complexo relacionam-se à resposta imune.

Os genes HLA de classe I são codificados nas regiões HLA-A, HLA-B e HLA-C e seus produtos estão presentes na superfície de todas as células nucleadas do organismo. HLA-A e HLA-B são mais fortemente expressos enquanto que HLA-C tem mais baixa expressão. Os genes de HLA de classe II são codificados nas regiões de HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR e seus antígenos encontram-se na superfície de apenas algumas células, estas com funções especializadas de apresentadoras de antígeno, onde apresentam peptídeos exógenos para células T auxiliares CD4+. Os genes HLA-A de classe III codificam várias proteínas solúveis com importantes funções no sistema imune, como os componentes do sistema complemento e moléculas envolvidas no processo inflamatório (17).



**Figura 2:** Cromossomo 6 e as regiões do HLA classe I, II e III.

**Fonte:** [http://nejm.org/teaching\\_tools/jpegs\\_large/klei.fig1.jpg](http://nejm.org/teaching_tools/jpegs_large/klei.fig1.jpg)

Os antígenos leucocitários humanos de classe I se dividem em clássicos e não-clássicos. Os antígenos HLA clássicos foram descritos primeiro e compreendem os genes HLA-A, HLA-B e HLA-C. Os genes não-clássicos compreendem HLA-E, HLA-F e HLA-G e são expressos em um grupo restrito de células e possuem funções diferentes daquela de apresentação de antígenos endógenos realizada pelas moléculas HLA clássicas (18).

### 2.3.2) Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G)

O antígeno leucocitário humano G (HLA-G) é uma das moléculas HLA não clássica de classe I (Ib) constituída por três  $\alpha$ -domínios ligados a uma cadeia  $\beta 2$ -microglobulina, assim como as moléculas HLA clássicas. O HLA-G está localizado no cromossomo 6 na região entre os genes HLA-A e HLA-F. A organização gênica do HLA-G é similar à organização

dos genes clássicos de HLA de classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C), compostos por 8 *exons*, 7 *íntrons* que codificam a cadeia pesada da molécula e uma região 3' não traduzida (3'UTR). Apesar das moléculas clássicas e não clássicas terem composição bioquímica e organização gênicas similares, as moléculas de HLA-G possuem um número baixo de polimorfismos em sua região codificante, sendo até o presente momento 50 alelos descritos (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>). Essa baixa variabilidade do HLA-G restringe o repertório de peptídeos capazes de se ligarem à fenda desta molécula (19).

A expressão de HLA-G em condições fisiológicas é restrita. Constitutivamente, a sua expressão foi encontrada no citotrofoblasto extraviloso, câmara anterior do olho, na medula do timo fetal, fígado fetal no primeiro trimestre, linfócitos periféricos adultos, embriões pré-implantacionais e fagócitos mononucleares (20). O gene do HLA-G através de *splicing* alternativo na transcrição primária pode dar origem a sete isoformas diferentes, sendo quatro delas proteínas ligadas à membrana (HLA-G1,G2,G3,G4) e as outras três isoformas (sHLA-G5,G6,G7) são proteínas solúveis. De acordo com as condições fisiológicas e do tipo de célula, a expressão das isoformas do HLA-G é determinada. (21,22). O HLA-G foi descrito atuando em benefício da gravidez e em diferentes contextos patológicos tais como infecções virais e microambientes tumorais, como uma via de evasão da resposta imune do hospedeiro.

### 2.3.3) Genética do HLA-G

O gene HLA-G está localizado telomericamente na região 6p21.2-21.3 e é composto por oito *éxons* e sete *íntrons* e sua região promotora se localiza há pelo menos 1,4kb do códon ATG (23) e o códon de parada se localiza no interior do éxon 6. Portanto, o gene possui uma região 3' não-traduzida (3'UTR).

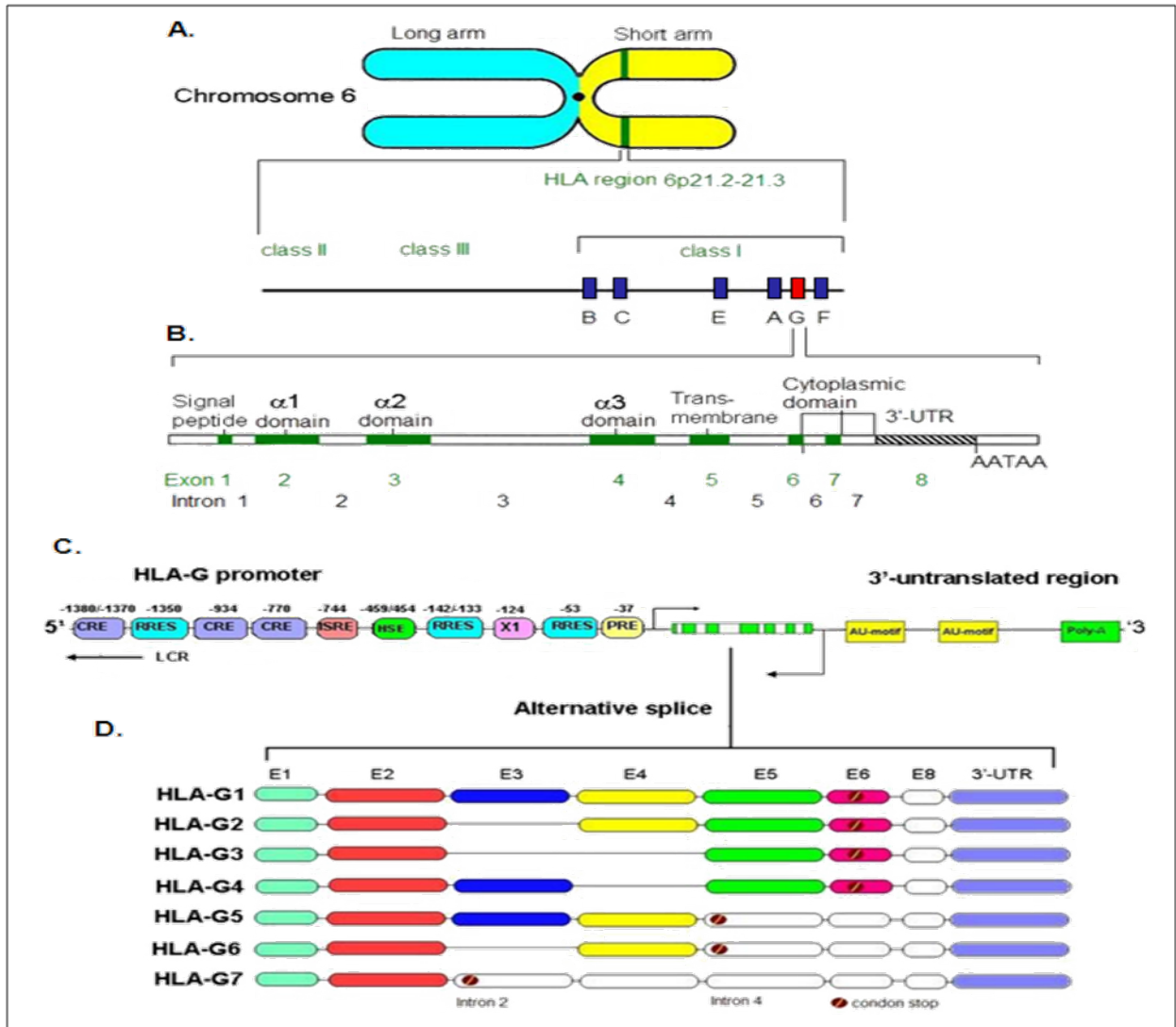
As isoformas ligadas à membrana e as solúveis compartilham a mesma estrutura extracelular e diferem na sua região C-terminal. O *éxon* 1 codifica o sinal peptídeo, enquanto os *éxons* 2, 3 e 4 codificam os domínios extracelulares  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ , respectivamente. Os *éxons* 5 e 6 codificam os domínios transmembrana e citoplasmático da cadeia pesada. O *éxon* 7 é sempre ausente do mRNA e, devido ao *stop* códon no éxon 6 o éxon 8 não é traduzido. As isoformas ligadas à membrana apresentam uma região transmembrana (codificada pelo



*éxon 5*) e uma cauda intracitoplasmática (codificada pelos *éxons 6 – 8*), as formas solúveis substituem esta estrutura por uma pequena cauda hidrofílica codificada pela seqüência 5' do *íntron 4* (HLA-G5 e G6) ou *íntron 2* (HLA-G7) (24)

As isoformas solúveis de HLA-G ocorrem devido à inclusão da seqüência do *íntron 4* no mRNA, o qual contém um códon de término de leitura, fazendo com que a região de ancoragem à membrana não seja transcrita, resultando em proteínas solúveis. HLA-G1 e HLA-G2 são expressos como isoformas solúveis (24). A isoforma solúvel de HLA-G1 é chamada de sHLA-G1 ou HLA-G5 e a isoforma solúvel de HLA-G2 é denominada como sHLA-G2 ou HLA-G6. A isoforma solúvel HLA-G5 contém os domínios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  mais 21 aminoácidos provenientes do *íntron 4*. A isoforma solúvel HLA-G6 contém os domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  mais os 21 aminoácidos do *íntron 4* (2,18). A isoforma HLA-G7 retém o *íntron 2*, que contém um códon de parada, resultando em uma proteína solúvel com somente o domínio  $\alpha 1$ (24). A figura 2 abaixo demonstra a localização do gene que codifica o HLA-G, elementos de regulação da transcrição do gene HLA-G e o *splicing* alternativo de HLA-G com todas as isoformas possíveis.

Os mecanismos responsáveis pela expressão do gene HLA-G permanecem desconhecidos. Todavia, uma melhor compreensão das bases moleculares deste gene pode conduzir a um possível entendimento sobre sua expressão.



**Figura 2:** O gene do Antígeno Leucocitário Humano-G e suas isoformas. **A.** Localização do gene. **B.** estrutura do gene, na cor branca são o 7 íntrons e 8 exons na cor verde. **C.** Promotor do gene HLA-G exibindo elementos que regulam a transcrição desse gene e a região 3'-UTR do gene HLA-G que possui vários outros elementos reguladores. **D.** Transcrito primário pode sofrer *splicing* alternativo produzindo 7 possíveis isoformas que vão desde HLA-G1 a HLA-G7. Fonte: Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (Adaptada); <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/HLAGID43744ch6p22.html> (25).

### 2.3.4) HLA-G na Reprodução Humana

A partir do conhecimento de que ocorre expressão de HLA-G na interface materno-fetal, há uma intensa investigação sobre o papel dessa molécula como possível marcador diagnóstico, prognóstico e terapêutico nas fases presentes em todo o processo pré – gestacional bem como gestacional. A expressão de HLA-G foi descrita pela primeira vez em células do citotrofoblasto e a análise de sua função demonstrou sua importância na indução e manutenção da tolerância gestacional (26).

Há evidências de que durante o processo de implantação embrionária humana ocorra uma estimulação adaptativa do sistema imune materno e que juntamente com uma habilidade do embrião de se implantar no útero e com uma receptividade endometrial adequada seja possível o estabelecimento e progressão da gestação. Ultimamente, muitos pesquisadores se voltaram para o estudo dos antígenos leucocitários humanos de classe-Ib com enfoque para o HLA-G em que descrevem a participação dessa molécula no processo de imunomodulação durante a implantação embrionária de uma gestação normal ou patológica, bem como durante a gravidez (27).

O sistema imune materno permanece em íntimo contato com os tecidos do feto durante a gestação. Este por apresentar 50% dos antígenos de origem materna e 50% dos antígenos de origem paterna é considerado semi-alogênico para o sistema imune materno. Deste modo, para que se estabeleça um microambiente de imunotolerância, é preciso que ocorra a diminuição da expressão de moléculas HLA de classe I clássicas do embrião e que a expressão de HLA-G seja exacerbada.

Tal processo demonstra o caráter imunomodulador da molécula HLA-G. A fim de evitar a vigilância das células T citotóxicas e células NK ativadas pelo sistema imune materno, ocorrem ligações dos receptores dessas moléculas expressos em células imunes maternas às moléculas de HLA-G de origem fetal, causando a modulação da atividade citotóxica na interface materno-fetal (28,29). Um dos importantes mecanismos exercidos pelo HLA-G no controle da invasão das células trofoblásticas e manutenção da imunossupressão local é representado pela modulação da secreção de citocinas. Não apenas a expressão na membrana das células trofoblásticas, mas também as moléculas solúveis (sHLA-G) por elas

secretadas são fundamentais para a modulação da resposta imune materna e controle do processo de invasão trofoblástica (28).

Formas solúveis de *HLA-G*, originadas do processamento alternativo de *splicing* do RNAm de *HLA-G* e detectadas no sangue materno, parecem estar também relacionadas ao sucesso da implantação embrionária por promoverem receptividade endometrial. Os mecanismos que envolvem todo este processo permanecem desconhecidos (27). Ainda antes da gestação, mulheres com baixos níveis pré-ovulatórios de sHLA-G parecem ter um risco aumentado de aborto pós-FIV. Os níveis de sHLA-G no sangue materno são indicativos do vigor da invasão do citotrofoblasto e são correspondentes da “saúde” da interface materno-fetal (18).

Além disso, a molécula sHLA-G demonstra ser promissora, por alguns estudos, na identificação e seleção de embriões nas TRA, cujo resultado foi o aumento na taxa de gestação com sucesso. Em diversos estudos, onde os níveis de sHLA-G foram quantificados em sobrenadantes de embriões de FIV, foram demonstrados que a presença dessas moléculas estava associada à manutenção da gestação após o sucesso implantacional, enquanto que sua ausência favorecia a perda fetal (30,31,32).

Sabendo da importância de estudar o papel do sHLA-G produzido pelas células da granulosa, muitos trabalhos vêm sendo descritos a fim de tentar entender a relação dessa produção com a foliculogênese, bem como com qualidade embrionária. Neste estudo, propõe-se avaliar a associação da mensuração desta molécula provenientes do FF à qualidade embrionária (score médio de embriões gerados) avaliada pelo critério morfológico GES de mulheres submetidas à FIV a fim de que ele seja usado futuramente como um potencial marcador de qualidade embrionária em uso complementar a este critério morfológico (8).

## 2.4) Hormônio Anti-Mülleriano

### 2.4.1) Histórico e Conceito

A existência do hormônio anti-Mülleriano (AMH) foi relatada pela primeira vez quando ele desempenhava um papel na diferenciação sexual masculina, durante o início do desenvolvimento embrionário, pelo cientista francês Alfred Jost na década de 1940. Ele mostrou que um produto testicular, diferente ao conhecido hormônio testosterona, era responsável pela progressão dos ductos de Müller (ductos paramesonéfricos) em fetos do sexo masculino, o que ele chamou de Inibidor Mülleriano (33).

O hormônio anti-mülleriano, peso molecular é de 140 kDa e também chamado de substância inibidora de Müller (MIS), é uma glicoproteína homodimérica pertencente à superfamília dos fatores de crescimento e de diferenciação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), assim como as inibinas e ativinas. O gene que o transcreve está localizado no braço curto do cromossoma 19, no locus 19p13.3 e seu RNAm é composto por 5 éxons, com 2.750 pb (34).

Durante a diferenciação sexual do embrião, a ausência desse hormônio é responsável pelo desenvolvimento do trato reprodutor feminino onde os ductos de Müller se diferenciam em tubas uterinas, útero e parte superior da vagina (34,35). A produção de AMH nas mulheres é realizada nas gônadas pelas células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais (36,37) e esta se inicia ainda na vida intrauterina dos fetos humanos após 36 semanas de gestação, por volta do nascimento (38). Este hormônio é secretado exclusivamente no compartimento intrafolicular e diante de elevadas concentrações no fluido folicular, é possível a sua detecção na circulação sanguínea.

Mecanismos moleculares envolvidos na ação AMH apresentam muitas semelhanças com aqueles de TGF- $\beta$ . Ligação do específico ligante ao domínio do receptor transmembrana extracelular do tipo AMH II provoca a fosforilação do receptor de tipo I e subsequente sinalização de regulação negativa por meio de proteínas Smad intracelulares (39,40). O Gene

AMHR2 que transcreve os receptores AMH tipo II está localizado no cromossomo 12, possui 11 éxons e 8 kbp de tamanho. Esse gene é expresso pelos ductos de Müller e gônadas. No ovário é expresso imediatamente depois do nascimento quando folículos primordiais não foram ainda formados, permanecendo ao longo da vida. Esses receptores AMH tipo II têm sido também identificados nos tecidos, tais como endométrio, cérebro e mama, mas ainda seu papel não está bem esclarecido (41).

Experimentos em camundongos *knock-out* para o gene produtor de AMH divulgaram importantes papéis intra-ovarianos para o AMH na inibição do crescimento de folículos primordiais em repouso. Nele foi observado, que o recrutamento para o crescimento de folículos primordiais foi aumentado. Os resultados mostraram que em camundongos com ausência de AMH, os folículos primordiais foram recrutados em um ritmo mais rápido, resultando em esgotamento prematuro do pool de folículo primordial no ovário (42,43).

Portanto, o AMH teria a função de causar um efeito inibitório na sensibilidade do folículo ao FSH, desempenhando um importante papel no processo de recrutamento de folículos que entraria na via de crescimento até se tornar dominante. Quando os folículos se desenvolvem em tamanhos onde a produção de AMH é mínima ou até mesmo inexistente, ocorre uma redução do limiar do nível de Hormônio Folículo Estimulante (FSH), permitindo que eles continuem crescendo até o momento da ovulação sob o estímulo de FSH (41,44). Essa redução de limiar é importante, pois no ciclo menstrual ocorre uma transição dos níveis hormonais com diminuição de FSH e aumento de Hormônio Luteinizante (LH) para que assim ocorra a liberação do oócito pelo folículo dominante.

O AMH é expresso continuamente nos folículos em estágio de crescimento até eles atingirem um tamanho de 4-8 mm e um estado de diferenciação em que são receptivos ao FSH, tornando-se recrutáveis para a dominância. Em um estudo que foi realizado a técnica de imunohistoquímica em tecido ovariano humano, confirmou-se a ausência de coloração de AMH em folículos primordiais, juntamente com uma expressão elevada de AMH nos folículos primário, secundário, pré-antrais e antrais iniciais com diâmetros < 4 milímetros. A coloração AMH gradualmente desapareceu em folículos com diâmetros entre 4- 8 mm (35). Neste ponto em que o folículo se encontra com tamanho entre 4-8, a diferenciação para a fase antral é suficiente para a dominância do folículo. O receptor AMHR2 não é expresso em folículos antrais, fazendo com que o AMH não tenha efeito sobre estes e permitindo que o FSH promova o seu crescimento, tornando-se o seu desenvolvimento dependente deste

hormônio. Apesar da produção de AMH ser diminuída nos folículos antrais iniciais, eles são considerados a primeira fonte da circulação de AMH devido ao grande número de células da granulosa que contêm nestes folículos (45).

O efeito do AMH sobre a atividade ovariana é complexa e o papel deste hormônio não foi até agora totalmente esclarecido (46). No entanto, o AMH parece ser responsável em regular o número de folículos em crescimento e sua seleção para a ovulação (43). É importante salientar que a hormônio anti-mülleriano, bem como outros testes de reserva ovariana não tem a capacidade de estimar a qualidade oocitária (47).

#### 2.4.2) Hormônio Anti-Mülleriano na Reprodução Assistida

Na Reprodução Assistida, um dos procedimentos usados é a fertilização *in vitro* (FIV) e todas as etapas que compreendem essa técnica são fundamentais para sucesso da FIV. Este processo complexo compreende as seguintes etapas: uma controlada hiperestimulação ovariana com o FSH, a punção dos folículos contendo oócito, a fertilização do oócito, o desenvolvimento do embrião, a transferência de embriões para o útero e a implantação. No entanto, o passo inicial crítico e essencial deste complexo processo é a hiperestimulação ovariana controlada. Ela tem por finalidade em obter, de forma segura, um elevado número de folículos dominantes com um pool de oócitos maduros que supostamente originarão mais de um embrião, propiciando a seleção do embrião mais viável, baseando-se no critério morfológico, para a transferência (48,49).

A resposta ovariana à hiperestimulação controlada com FSH é um dos problemas enfrentados nas clínicas de fertilização, pois esta varia muito entre os paciente, ocorrendo uma dificuldade em predizê-la. Deste modo, são usados inúmeros parâmetros, postulados para

serem preditores da resposta ovariana, mas que possuem limitações e não retratam a complexa dinâmica folicular, tais como: marcadores séricos (FSH, inibina B, 17- $\beta$ -estradiol e hormônio anti-Mülleriano) e/ou variáveis do ultrassom (volume ovariano, contagem de folículos antrais (AFC), fluxo sanguíneo do estroma ovariano). O FSH basal no terceiro dia do ciclo menstrual, dentre esses apresentados, suponha-se ter a melhor capacidade preditora (48).

Nesse contexto de dificuldade em prever a resposta ovariana de mulheres submetidas à FIV e da incapacidade de ter um eficiente preditor de reserva de folículos nas gônadas destas mulheres, o hormônio anti-Mülleriano surge apresentando uma forte correlação entre a população de folículos antrais que permanecem na gônada e as concentrações mensuradas na corrente sanguínea. Esses valores séricos de AMH refletem a quantidade de folículos antrais que estão relacionados proporcionalmente ao pool de folículos primordiais, portanto este hormônio representa indiretamente a reserva ovariana (50).

Seifer *et al.* encontraram correlação significativa entre as amostras de soros positivos para AMH, os números de oócitos puncionados e os números de oócitos maduros. Além disso, a correlação com AMH foi consideravelmente forte em relação aos outros marcadores de reserva ovariana tais como FSH sérico e estradiol. Este foi o primeiro estudo indicando que o AMH pode ser um preditor da resposta ovariana (51).

O AMH se caracteriza como um bom parâmetro endócrino também por sua característica única de apresentar sua concentração constante durante todo o ciclo menstrual ao contrário do que ocorre nos níveis das gonadotrofinas e hormônios esteróides que muitas vezes são flutuantes. As concentrações de AMH no sangue periférico poderia representar um índice de fertilidade valioso, um marcador de reserva do ovário e/ou uma preditor de falência ovariana prematura (52).

O teste de reserva ovariana mais a contagem de folículos antrais (AFC) é uma ferramenta importante, pois proporciona informações a respeito da função ovariana antes de se iniciar as TRA. Isso permite decidir a conduta da paciente: através de uma correta seleção dos diferentes análogos do GnRH, de uma alteração ou manutenção e individualização dos protocolos de dosagens de gonadotrofinas e da percepção da estimativa do número de oócitos que poderão ser recuperados com o uso de TRA, melhorando consideravelmente a resposta ovariana da paciente nos ciclos e as taxas de sucesso de FIV (42).



### 2.4.3) HLA-G versus Qualidade do Embrião

Os altos níveis de proteínas de fase aguda encontrados no fluido folicular é a prova de que o sistema imune é crucial na foliculogênese e de que a ovulação pode ser considerada uma reação inflamatória. Desta forma, o reconhecido papel de moléculas sHLA-G na regulação de condições inflamatórias sugere a possibilidade de associação dessas moléculas no processo de foliculogênese e adequada maturação oocitária. Há evidências de que embriões pré-implantacionais possam secretar sHLA-G em sobrenadantes de cultura de embriões, caracterizando estas moléculas como uma preditora da capacidade de implantação (53).

Rizzo et. al. identificou a presença de moléculas sHLA-G em FFs, propondo um papel biológico para essas moléculas no mecanismo complexo do processo ovulatório. Embora que para se determinar esse papel seja preciso uma validação completa em um número maior de combinações de FF e oócitos correspondentes, ou seja, uma relação significativa entre a presença de sHLA-G por FF e oócitos correspondentes fertilizados. Deste modo, o FF poderia ser uma ferramenta útil a ser analisada e, possivelmente, contribuiria na seleção de oócitos em fertilização *in vitro*. (53,54).

Jee BC et. al. obteve em conclusão de seu estudo que a mensuração de moléculas de sHLA-G no fluido folicular pode ser usada como uma ferramenta adicional para auxiliar a seleção de oócitos, pois estas moléculas atuam como preditoras de falha de fertilização de oócitos correspondentes de FF mensurados e que o sHLA-G não está relacionado com a formação de embrião de melhor qualidade (55). Mais estudos são necessários a fim de compreender a natureza da expressão do sHLA-G. (56). As células da granulosa fornecem fatores de crescimento para os oócitos pré-ovulatórios e sustentam seu desenvolvimento. A produção de moléculas sHLA-G por estes tipos de células sugere um possível papel deste antígeno no processo de maturação do oócito, bem como de qualidade embrionária.

No estudo Rizzo R. et. al., autores avaliaram o possível envolvimento de moléculas sHLA-G na maturação do oócito, analisando os sobrenadantes de cultura de maturados *in vitro* complexo *cumulus-oócito* (CCOs) quanto à presença de sHLA-G. Observou-se a produção de sHLA-G durante o processo de maturação do oócito. Não foram detectadas moléculas sHLA-G em sobrenadantes de cultura correspondentes para COCs imaturos, e a

maior produção de sHLA-G tem sido associada com boa qualidade COCs. Alguns COCs não secretam sHLA-G, mas alcançaram a maturação completa, ressaltando que sHLA-G não é o único fator limitante deste processo (10).

Nosso grupo, a fim de tentar entender esse microambiente folicular investigou o efeito de um antagonista de GnRH sobre a qualidade, bem como a competência dos oócitos, considerando a avaliação das concentrações de inibina A e VEGF no fluido folicular, pois ambas desempenham o papel de marcadores de maturidade do oócito e desenvolvimento (57). Nesse estudo, pretende-se investigar uma molécula que já se sabe que desempenha um importante papel na interação materno-fetal durante a gravidez e que possui muitas evidências no envolvimento da maturação oocitária, mas que ainda não há um consenso sobre seu uso como um preditor de qualidade embrionária (14). Enquanto alguns estudos relatam que ocorreram gravidez clínica no grupo em que as culturas de embriões eram negativas para o sHLA-G (58), outros concluem que a taxa de gravidez é reduzida quando se utilizam estes embriões de culturas negativas para o sHLA-G. Além da necessidade de mais estudos com essa temática a fim de se chegar em um consenso, esses resultados controversos abrem margem para a discussão quanto a sensibilidade e a especificidade dos testes utilizados nos para a mensurar as moléculas de sHLA-G.

#### 2.4.4) Qualidade do Embrião versus Reprodução Assistida

A qualidade embrionária nos laboratórios de reprodução assistida é avaliada pelo critério morfológico e muitas vezes essa qualidade não está estritamente relacionada com a viabilidade do embrião e com o potencial de implantação (59). Diante dessa realidade, necessita-se desenvolver mais biomarcadores de qualidade oocitária, embrionária e marcadores prognósticos de implantação embrionária para serem usados complementarmente ao critério morfológico.

Ao longo desses anos, as abordagens das tecnologias de reprodução assistida vêm sendo em aprimorar critérios que possam refletir fielmente a competência do embrião e supostamente com maiores chances de gestação. O critério mais aceito para avaliar a qualidade do embrião é o morfológico. Esse critério surgiu para a avaliação da qualidade embrionária e essa era avaliada no dia 2 após a FIV (60).

Desai *et. al.* considerando a importância desses critérios relatou o primeiro sistema de pontuação com a avaliação morfológica do embrião no terceiro dia, contrapondo-se ao sistema anterior em que a pontuação do embrião era baseada no segundo dia de cultura (60). Ao passar dos anos, foi proposto um novo sistema de análise do embrião: *Graduated Embryo Score* (GES). Esse foi proposto por Fisch *et. al.*, em que cada embrião necessitava ser cultivado individualmente a fim de permitir uma avaliação microscópica e gradual dos estágios de desenvolvimento do primeiro dia ao terceiro dia (8). A avaliação do embrião no terceiro dia possui suas limitações, pois se atem somente ao número de células (8 células) e à quantidade de fragmentação; como vem descrita na Tabela 1.

**Tabela 1:** Avaliação da morfologia no 3<sup>o</sup> dia do desenvolvimento embrionário.

<b>Grau</b>	<b>Características morfológicas</b>
<b>I</b>	<b>Embriões com blastômeros de igual tamanho, blastômeros com ausência de fragmentação citoplasmática e estes são claro e homogêneos.</b>
<b>II</b>	<b>Embriões com blastômeros de tamanhos iguais ou diferentes e com menos de 25% de fragmentação citoplasmática em cada blastômero</b>
<b>III</b>	<b>Embriões com blastômeros em tamanhos iguais e diferentes e ausência de fragmentação</b>
<b>IV</b>	<b>Blastômeros com tamanhos desiguais e de 30 a 50% de fragmentação citoplasmática</b>
<b>V</b>	<b>Embrião com fragmentos citoplasmáticos maior que 50%.</b>

**Fonte:** Red Latinoamericana de Reproduccion Assistida, 2006 (68).

O Escore Embrionário Graduado é composto por duas avaliações internas de cada ponto do desenvolvimento, paralelamente a uma avaliação ponderada das características morfológicas convencionais do terceiro dia. Esse sistema classifica o embrião de melhor qualidade com um escore total de 100 pontos. A classificação é baseada na avaliação em três períodos após a fertilização: primeiro momento 16-18, segundo momento 25-27 e terceiro momento 64-67h. O critério utilizado para a avaliação da qualidade embrionária baseia-se no número, morfologia e fragmentação dos blastômeros, obtendo-se a seguinte classificação por somatório de pontos. A forma em que essa pontuação é designada a cada embrião está descrita na Tabela 2 (8).

**Tabela 1:** Avaliação e classificação do embrião pelo critério GES

Avaliação	Horas após FIV	Desenvolvimento	Escore
<b>1</b>	16-18	Nucleólos alinhados no eixo dos pró-núcleos	20
<b>2</b>	25-27	Clivagem simétrica e regular	30
		Fragmentação <sup>a</sup> : ausente	30
		< 25%	25
		>25%	0
<b>3</b>	64-67	Número de Células e Grau <sup>b</sup> :	
<sup>a</sup> : Se não houve clivagem até 25 – 27 horas, o grau de fragmentação foi avaliado no tempo 64 – 67 horas. <sup>b</sup> : <b>Grau I</b> = blastômeros simétricos e ausência de fragmentação; <b>Grau II</b> : blastômeros levemente irregulares e < 20% de fragmentação; <b>Grau III</b> : blastômeros irregulares e >20% de fragmentação.		7I; 8I; 8 II, 9I	20
		7II; 9II; 10 I, II; compactado I	10
<b>Fonte:</b> Fisch J et. al., 2001.(adaptado) (8)		<b>ESCORE TOTAL =</b>	<b>≤ 100</b>

Baseados em seus resultados, Fisch *et. al.* sugeriram que é possível adquirir as mesmas altas taxas de implantação e gravidez associadas à transferência de blastocistos, a partir da transferência de embriões em estado de clivagem selecionados com base neste escore GES (8).

Deste modo, existem diferentes formas de avaliar e classificar o desenvolvimento do embrião quanto a sua qualidade. A avaliação mais utilizada é a que ocorre no terceiro dia e essa considera como critério o número de células e suas características no terceiro dia (fragmentação) enquanto a avaliação por GES considera o desenvolvimento do embrião em seu estágio ainda precoce desde a clivagem até o terceiro dia, possibilitando refletir todo o desenvolvimento do embrião transcritos em forma de pontuação de 0-100 (61,62,8).

Nesse estudo, pretende-se correlacionar uma potencial molécula biomarcadora (sHLA-G) por método quantitativo, não invasivo e que juntamente com a análise morfológica GES possa mensurar a qualidade embrionária de forma mais objetiva. Além disso, avaliar como foi a produção de sHLA-G em mulheres que estão inseridas no contexto da infertilidade por causas de endometriose, tubária e masculina.

### **3. Justificativa**

O uso de um biomarcador adicional ao critério morfológico proporcionaria maior precisão na seleção dos embriões de melhor qualidade. Além disso, esse biomarcador poderia contribuir para a tomada de decisão por parte dos embriologistas de qual embrião escolher para a transferência em situações que eles se deparassem com embriões de mesma pontuação. Diante disso, ele escolheria o embrião com maior concentração do biomarcador mensurada em seu fluido folicular correspondente.

Esta seleção é um ponto crítico nos tratamentos de reprodução assistida a fim de reduzir os riscos de gestação múltipla e suas comorbidades associadas e aumentar as chances de gravidez, principalmente na transferência de um embrião.

Diante desse contexto, propõe-se um estudo de avaliação da concentração de sHLA-G como biomarcadora de qualidade embrionária a fim de complementar ao critério GES de avaliação morfológica e assim , com maior precisão, escolher o embrião de melhor qualidade.

#### **4. Hipótese Nula**

Não há associação entre as concentrações de sHLA-G mensuradas em fluido folicular e a qualidade embrionária avaliada pelo critério GES.

## 5. Objetivo

### 5.1) Objetivo Geral:

O presente estudo propõe correlacionar os níveis de sHLA-G à qualidade embrionária avaliada pelo critério GES.

### 5.2) Objetivos Específicos:

- Associar a concentração de sHLA-G mensurada em fluido folicular ao score médio dos embriões gerados (avaliados pelo critério GES) de mulheres submetidas à fertilização *in vitro*;

➤ Desfechos Secundários:

- Associar o hormônio anti-Mülleriano ao total de oócitos recuperados;
- Associar o valor de AMH à idade das pacientes;
- Avaliar como se apresentou a mensuração de sHLA-G nas mulheres que realizaram FIV por causa de endometriose e nas que realizaram por causa tubária e/ou masculina.

## 6. Referências da Revisão da Literatura

1. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009
2. Pauli, SA, Berga, SL, Shang, W, Session, DR, Current status of the approach to assisted reproduction. *Pediatric Clinics of North America* 2009; 56: 467-488.
3. Pinheiro RC, Lambert J, Bernard F, Mauffette F, Miron P. Effectiveness of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection for severe male infertility. *Canadian Medical Association or its Licensors* 1999;161:1397-1401.
4. Abrão MS, Muzii L, Marana R. Anatomical causes of female infertility and their management. *Int. J. Gynaecol* 2013; 123: 18-24.
5. Abrao MS, Neme RM, Carvalho FM, Aldrighi JM, Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int JGynaecol Obstet* 2003, 82:31-40.
6. Opoien KH, Fedorcsak P, Omland KA, et al. In vitro fertilization is a successful treatment in endometriosis-associated infertility. *Fertility and Sterility*. 2012; 97(4):278-282
7. Mahutte NG, Arici A. New advances in the understanding of endometriosis related infertility. *J ReprodImmunol*. 2002;55(1-2):73-83.
8. Toya M, Saito H, Ohta N, Saito T, Kaneko T, Hiroi M. Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 2000;73(2):344-50.
9. Pinheiro R C, Lambert J, Bérnad F, Mauffette F, Miron P. Effectiveness of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection for severe male infertility. *Canadian Medical Association or its Licensors* 1999;161(11):1397-1401.
10. Puissant, F., M. Van Rysselberge, et al. "Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment." *Hum Reprod* 1987;2(8): 705-8.
11. Terriou, P, C Sapin, et al. "Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age." *Fertil Steril* 2001;75(3): 525-31.
12. Fisch J, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G. The graduate embryo scoring system (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rates from cleaved—stage embryos. *Hum Reprod*. 2001;16(9):1970–5.
13. Tesarik, J. and E. Greco. "The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology." *Hum Reprod* 1999; 14(5): 1318-23.
14. Rizzo R, Canto BM, Stignani M, Fadini R, Fumagalli D, Renzini M M, Borgatti M, Gambari R, Baricordi R O, Production of sHLA-G molecules by *in vitro* matured cumulus-



---

oocyte complex. *International Journal of Molecular Medicine* 2009; (24):523-530.

15. Wunder DM, Birkhäuser MH, Bersinger NA, Soluble human leukocyte antigen-G (sHLA-G) in follicular fluid and embryo culture medium and its impact on pregnancy prediction in IVF-ICSI treatment. *Imuno-analyse et biologie spécialisée* 2013; 28: 43-50.
16. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies.]. *Acta Haematol.* 1958;20 :156-66.
17. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. *Kuby immunology*. 6th ed. New York: W.H. Freeman, 2007.
18. Rousserv RG, Coulam CB. *HLA-G* and its role in implantation (review). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2007; 24: 288-295.
19. Ishitani A, Sageshima N, Lee N, et al. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol.* 2003;171:1376-84.
20. Ober C.; Aldrich C.L. HLA-G polymorphisms: neutral evolution or novel function? *Journal of Reproductive Immunology* 2007;36: 1-21, 1997.
21. Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J, Carosella ED. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet.* 2000;355:2138-52.
22. Morales PJ, Pace JL, Platt JS, et al. Placental cell expression of HLA-G2 isoforms is limited to the invasive trophoblast phenotype. *J Immunol.* 2003;171:6215-24.
23. Solier C, Mallet V, Lenfant F, Bertrand A, Huchénq A, Le Bouteiller P. HLA-G unique promoter region: functional implications. *Immunogenetics* 2001;53:617-25.
24. Sargent, I.L. Does 'soluble' HLA-G really exist? Another twist to the tale. *Molecular Human Reproduction* 2005;1, Supp(10): 695-698,
25. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, acessado em 15 de setembro de 2014. [http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/HLA\\_GID43744ch6p22.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/HLA_GID43744ch6p22.html)
26. Ellis SA, Palmer MS, McMichael AJ. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *J Immunol.* 1990;144:731-5.
27. Fanchin R., Gallot, V., Rouas-Freiss, N., Frydman R., Carasella ED. Implication of HLA-G in human embryo implantation. *Human Immunology* 2007; 68: 259-263.
28. Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:11520-5.
29. Eidukaite A, Tamosiunas V. Soluble HLA-G in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertility and Sterility* 2008; 2(89):465-7.

- 
30. Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, Bencini E, Menicucci A, Baricordi O. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Europe Journal Immunology* 2002;32:311-315.
31. Sher G, Keskinetepe L, Fisch JD, Acacio BA, Ahlering P, Batzofin J, Ginsburg M. Soluble Human Leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer. *Fertility and Sterility* 2005; 83(5):1410-1413.
32. Rebmann, V, Switala, M, Eue I, Grosse-Wilde H, Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a Gergam multi-centre study. *Human Reproduction* 2010;25(7):1691-1698.
- 33 Wilson JD, George FW, Griffin JE. The hormonal control of sexual development. *Science* 1981;211:1278–1284
34. Munsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti-Mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 1991;113:613–24.
35. Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev* 1993;14:152–64.
36. Cate R, Mattaliano R, Hession C, et al. Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 1986;45:685–98.
37. Weenen C, Laven JSE, von Bergh ARM, et al. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10:77–83.
38. Lee MM, Donahoe PK, Silverman BL, Hasegawa T, Hasegawa Y, Gustafson ML, Chang YC, MacLaughlin DT. Measurements of serum mullerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads. *N Engl J Med* 1997;336:1480–1486
39. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev* 2001;22:657–674.
40. Salhi I, Cambon-Roques S, Lamarre I, Laune D, Molina F, Pugniere M, Pourquier D, Gutowski M, Picard JY, Xavier F et al. The anti-Mullerian hormone type II receptor: insights into the binding domains recognized by a monoclonal antibody and the natural ligand. *Biochem J* 2004;379:785–793.
41. Wang J, Dicken C, Lustbader JW, Tortoriello DV. Evidence for a Mullerian-inhibiting substance autocrine/paracrine system in adult human endometrium. *Fertil Steril* 2009;91:1195–1203.

- 
42. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999;140:5789–5796.
43. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA et al. Anti-mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001; 142:4891–4899.
44. Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, de Jong FH, Themmen AP. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Mullerian hormone null mice. *Endocrinology* 2007;148:2301–2308.
45. La Marca A, Broekmans F, Volpe A, et al. Anti-Mullerian hormone (AMH): what do we still need to know? ESHRE special interest group for reproductive endocrinology AMH round. *Hum Reprod* 2009;24:2264–75.
46. Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, et al. Statistically significant changes of anti-Mullerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women. *Fertil Steril* 2008;89:927–33.
47. Loh JS, Maheshwari A. Anti-Mullerian hormone — is it a crystal ball for predicting ovarian ageing? *Hum Reprod* 2011;26(11):2925–32.
48. Grady R, Alavi N, Vale R, Khandwala M, McDonald SD. Elective single embryo transfer and perinatal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2012;97:324–31.
49. Boudjenah R, Molina-Gomes D, Torre A, et al. Genetic polymorphisms influence the ovarian response to rFSH stimulation in patients undergoing in vitro fertilization programs with ICSI. *PLoS One* 2012;7(6):e38700.
50. Broekmans F, Kwee J, Hendriks D, et al. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006;12:685–718.
51. Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Sheldon RM. Early follicular serum Mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2002;77:468–71.
52. Lukaszuk K, Liss J, Kunicki M, Jakiel G, Wasniewski T, Woclawek-Potocka I, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH) is a strong predictor of live birth in women undergoing assisted reproductive technology. *Reproductive biology* 2014;14(3):176-181.
53. Rizzo R, Fuzzi B, Stignani M, Criscuoli L, Melchiorri L, Dabizzi S, et al. Soluble HLA-G molecules in follicular fluid: a tool for oocyte selection in IVF ? *J Reprod Immunol* 2007;74:133-42.
54. Shaikly VR, Morrison IE, Taranissi M, Noble CV, Withey AD, Cherry RJ, et al. Analysis of HLA-G in maternal plasma, follicular fluid, and preimplantation embryos reveal an asymmetric pattern of expression. *J Immunol* 2008; 180: 4330-7.

- 
55. Jee BC, Suh CS, Kim SH, Moon SY. Soluble Human Leukocyte Antigen G Level in Fluid from Single Dominant Follicle and the Association with Oocyte Competence. *Yonsei Med J.* 2011;52(6): 967-971.
56. Rizzo R, Stignani M, Melchiori L, Baricordi OR. Possible role of human leukocyte antigen–G molecules in human oocyte/embryo secretome. *Human Immunology.*2009; 70:970-5.
57. Cunha-Filho JS, Lemos NA, Stein N, Laranjeira A. Passos EP: Vascular endothelial growth factor and inhibin A in follicular fluid of infertile patients who underwent in vitro fertilization with a gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Fertil Steril,* 2005; 83:902-7, 2005
58. Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, et al. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2005;20:138-46.
59. Wunder D.M., Birkhäuser M. H., Bersinger N. A., Soluble human leukocyte antigen-G (sHLA-G) in follicular fluid and embryo culture medium and its impact on pregnancy prediction in IVF-ICSI treatment. *Imuno-analyse et biologie spécialisée.* 2013; (28):43-50.
60. Desai N, Goldstein J, Rowland Y, Goldfarb M. Morphology evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod.* 2000;15(10):2190-6.
61. VeecK, L., *Atlas of the human oocyte and early conceptus.*, ed. W. Wilkins. 1991, Baltimore.
62. *Manual de procedimentos de Laboratório de Reprodução Assistida.* 2006: Red Latinoamericana de Reproduccion Assistida.

---

## 7. ARTIGO

“ASSOCIATION BETWEEN HUMAN LEUKOCYTE ANTIGENS-G (sHLA-G)  
CONCENTRATIONS MEASURED IN FLUID FOLLICULAR AND THE EMBRYONIC  
QUALITY IN CYCLES FERTILIZAÇÃO IN VITRO”

Article formatted in accordance with the rules of the journal Fertility & Sterility  
(<http://www.fertstert.org/content/authorinfo>).

---

“ASSOCIATION BETWEEN HUMAN LEUKOCYTE ANTIGENS-G (sHLA-G)  
CONCENTRATIONS MEASURED IN FLUID FOLLICULAR AND THE EMBRYONIC  
QUALITY IN CYCLES FERTILIZAÇÃO IN VITRO”

**Title Summary:** Association between sHLA-G and morphology by GES.

**AUTORES**

Glícia Pinheiro Bezerra<sup>1</sup>; Daniela da Silva<sup>3</sup>, Emily De Conto<sup>3</sup>, Rita Chapon<sup>1</sup>, Vanessa Genro<sup>1,2</sup>, J.S. Cunha-Filho<sup>1,2</sup>.

1. Postgraduate program in medicine: Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre / RS, Brazil.
2. Department of Obstetrics and Gynecology - School of Medicine Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre / RS, Brazil.
3. Human Reproduction Center inseminate, Porto Alegre / RS, Brazil.

\*Correspondence should be addressed to: E-mails: [gliciapb@gmail.com](mailto:gliciapb@gmail.com);  
[gliciapb@yahoo.com.br](mailto:gliciapb@yahoo.com.br)

**Main conclusion**

The sHLA-G concentrations measured in follicular fluid were not associated with the mean score of embryos generated scored with GES criteria.

---

## RESUMO

**Objective(s):** To investigate the association between concentrations of soluble human leukocyte antigen G (sHLA-G) in follicular fluid (FF) and the scores of embryos generated assessed by the criterion score Embryo graduate (GES) in vitro fertilization cycles.

**Design:** Cross-sectional study.

**Local(s):** University Hospital and Insemine Human Reproduction Center, Porto Alegre / Brazil.

**Patient(s):** Seventy-three were evaluated women undergoing in vitro fertilization (IVF) aged  $\leq 39$  years.

**Method(s):** The measurement of sHLA-G, by ELISA, in FF from a pool of punctured follicles of women undergoing ovulation induction for IVF. The embryos generated obtained after fertilization were classified according to the GES criteria.

**Main outcome measure:** Dosage sHLA-G and embryonic classification according to GES criteria

**Resultado(s):** No association was found between concentrations of sHLA-G and the average score of embryos generated ( $p > 0.05$ ). There was a greater sensitivity of the ELISA, compared to the literature, our detection samples by 98%. The pregnancy rate was 39.06%. We found a significant association between the anti-Müllerian hormone (AMH) and age ( $r = -0.38$ ;  $p = 0.003$ ), between AMH and total oocytes ( $r = 0.53$ ;  $p < 0, 05$ ), and the age and the total oocytes ( $r = -0.31$ ,  $p = 0.009$ ). When we analyzed the measurement of sHLA-G between the groups it was found that there is no significant difference ( $p = 0.59$ ).

**Conclusions:** In our study, there was not association between embryo quality and levels of sHLA-G in FF. Given these results, it is still controversial use of sHLA-G in FF as a prognostic marker of embryo quality in complementary use to morphological criteria.

**Keywords:** embryo quality, sHLA-G, follicular fluid, GES, endometriosis.

---

## INTRODUCTION

The greater are the chances of selecting the best embryos and thus the greater are the chances of having success in vitro fertilization (FIV) procedures when an evaluation criterion reflects more faithfully the quality of the embryo (1,2). The morphological criteria is a form of evaluation already well established on the routines of fertility clinics, and over the years, its improvement has been observed (3-5). The emergence of the criterion of Graduated Embryo Score (GES) allowed the evaluation of the embryo development in its early stages after in vitro fertilization procedures (IVF), unlike other criteria that evaluates it after the third day in vitro fertilization (5,6).

Another advance that has contributed to the improvement of these techniques was the emergence of anti-Müllerian hormone (AMH) which are often guiding to the decision of the doses in the oocyte stimulation protocols (7). Given this context, the AMH is presented as a good endocrine parameter because their values are constant throughout the menstrual cycle and has been used as a marker of ovarian reserve and / or ovarian failure predictor (8,9). Serum AMH values reflect the number of antral follicles that are proportionally related to the pool of primordial follicles, so this hormone represents indirectly the ovarian reserve (7).

The another molecule that has been widely investigated is the soluble human leukocyte antigen-G (SHLA-G). It has been investigated because this molecule is linked directly to immune tolerance of the semi-allogeneic fetus in the maternal-fetal interface during pregnancy (10,11) and because it is produced by granulosa cells (12) and for this reason, it remains in close contact with the folliculogenesis process (13). HLA-G is characterized as HLA class I, non-classical and it differs from the classical ones because of the low polymorphism, currently with 50 alleles, and because of the restricted tissue distribution (14). From the alternative splicing of HLA-G in the primary transcript, seven different isoforms may be produced, four membrane-bound isoforms (G1, G2, G3 and G4) and three soluble isoforms (G5, G6 and G7) (15,16).



---

The SHLA-G has been studied in recent years to classify it as a noninvasive biomarker of embryo quality in the context of Assisted Reproduction Techniques (ART). The probes of their concentrations have been analyzed in several maternal compartments: follicular fluid, amniotic fluid and plasma. Regarding ART, embryo and oocytes culture supernatants and they all related to the implantation and pregnancy rates (17). The follicular fluid (FF) is an essential and specific microenvironment for the regulation of ovarian function. This is due to the intimate contact of the FF to the granulosa cells to create a bridge of communication with the preovulatory oocytes to provide them nutrients and essential metabolic factors to the oocyte maturation process (18).

Although there are many studies that describe this molecule as a predictor of embryo quality, there is still no consensus on its real ability to reflect with reliability about the embryo quality. This quality is defined by assessment criteria related to the morphology of the embryo, which today has been described basically of two types: the criterion that ranks Grade A, B, C, D (3,4,5) and the one that ranks on a score of 0-100 (6). The main differences between these two criteria are: the first is based on the number of cells (8 cells) and the amount of fragmentation from the third day after IVF and the second is based on assessment of initial stages as of 16 hours after IVF. The sHLA-G in complementary use to this score has been widely discussed because of its usefulness in choosing the best embryo.

Based on this continuous improvement of assisted reproductive technologies, we investigated the association between SHLA-G concentrations detected in FF with the embryo quality criteria evaluated by the graduated embryo scoring (GES) and the analysis of sHLA-G concentration difference measured in a group with endometriosis and the evaluation of the effect the endometriosis in sHLA-G levels in women undergoing IVF.

---

## MATERIALS AND METHODS

### Study design

A cross-sectional study was conducted from November 2013 to November 2014 at the Hospital of Porto Alegre and at the Inseminate Human Reproduction Center, Porto Alegre, Brazil.

### Patients

Seventy-three women undergoing assisted reproduction treatments were included. The inclusion criteria used in the study was: age  $\leq 39$  years, presence of both ovaries, hormone levels of TSH, FSH and PRL within the reference values and indication of IVF procedure by male cause and / or because of tubal factor or by endometriosis, which was previously diagnosed by laparoscopy. The women with ovarian hyperstimulation syndrome in the evaluated cycle, with autoimmune disease, with polycystic ovary syndrome, with early luteinization and endometrioma were not eligible to the study. Subsequently, we have subdivided into two groups to assess the effect of endometriosis in levels of SHLA-G: with endometriosis (n = 32) and without endometriosis (n = 41).

### Hormone dosage

Patients were required the hormonal dosages of TSH, FSH and PRL so that the patients could be evaluated before the assisted reproduction cycle starts. These results were recorded the only one that were accepted were those with the serum performed on the third day of the cycle.

### Ovarian stimulation, oocyte retrieval and collection of follicular fluid

---

The patients were subjected to ovarian stimulation according to standard protocols. The therapeutic regimen for oocyte stimulation made use of antagonists (n = 56) or agonist (n = 7) GnRH for suppression of the pituitary with recombinant FSH administration (n = 35) or GMT (n = 38) for ovarian stimulation. Follicular growth was monitored by transvaginal ultrasound and, when at least three follicles have reached a diameter  $\geq 17$ mm, it was determined to administration of the hormone human chorionic gonadotropin (HCG) for ovulation induction. The transvaginal follicular aspiration was performed 36 hours after HCG administration under routine intravenous sedation. Upon laboratory recovery of oocytes, the follicular fluid was collected from a pool of follicles aspirated for each cycle of the respective patient, centrifuged for 5 minutes at 1300rpm and, in the absence of blood, it was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Procedures in Assisted Reproduction

IVF was performed in a conventional way or ICSI (intracytoplasmic sperm injection), the technique used was determined by the conditions of the biological material available. IVF was 3 hours and post-puncture and the ICSI 3 to 6 hours post-puncture.

- GES criteria for the evaluation of the embryo quality and calculation of the average score of the embryo generated:

The embryo quality assessment was carried out in three periods of which it was obtained scores ranging from 0 to 100 points. An embryo with 100 points is classified ,according to this criterion, with the best morphological quality (24).

The first moment of evaluation occurs 16-18 hours after IVF, this time the fertilization is confirmed by the visualization of the pronuclei (PNs) male and female and the presence of 2 polar corpuscles in perivitelline space. The second moment occurs 25-27 hours after IVF, it evaluates the early cleavage (presence of two cells), and at the third time of evaluation occurs 64-67 hours after IVF. Within these three moments the following parameters were evaluated:

---

cell division and fragmentation, knowing that an embryo with maximum quality features 6 to 8 blastomeres of uniform size and no fragmentation in the final evaluation.

After the classification in embryos generated score of each cycle, the arithmetic mean among these scores and in this study the embryo quality was evaluated by the average score of the embryo (EMEG) whose calculation was carried out as follows:

$$\text{EMEG} = \frac{(\text{sum of the scores of the N generated embryos})}{N}$$

### Análise da concentração de HLA-G solúvel em fluido folicular

sHLA-G levels in follicular fluid was measured by enzyme-linked immunosorbent assay technique (ELISA) using the ELISA Kit (RD194070100R, Bio Sell, Czech Republic). The kit with the monoclonal anti sHLA-G can identify and measure quantitatively the soluble isoforms HLA-G1 (by proteolytic cleavage) and HLA-G5.

Following the recommendations of the manufacturer of the Kit, the samples were not diluted. The incubation period of 16-20 hours between the FF and monoclonal antibodies anti-HLA-G is one of the points of improvement of the Kit. This longer period enables a higher sensitivity (detection limit of 0.6 Units/ml) to the test. The reading of the boards was held at a wavelength of 450 nm and the concentration of each sample analyzed was calculated by ELISA reader (Biotek multimedia ELX 800) from the construction of a calibration curve formed between the sample absorbance (y-axis) and the concentration of the calibrators and concentration of each sample (x-axis). The value of the concentration of sHLA-G measured is provided in Units/mL.

---

### Ethics approval

This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre under the number: 572.334.

### Statistical analysis

The analysis of the data was performed by Chi-square test or Fisher's exact for categorical data. Continuous variables were compared with Student's t-test or Mann-Whitney-U, depending on their characteristics. These analyses were carried out in the statistical program called Statistical Package for the Social Science (SPSS) 21.0 and data analysis was considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

---

## RESULTS

The average age of the patients was  $33.8 \pm 3.8$  years. One of the patients who received the embryo transfer, the pregnancy rate was 39.06% (25/64). Clinical and laboratory variables analyzed in the study are listed in **table 1** (mean  $\pm$  SD).

The Association (Spearman test) among the following variables was analyzed: AMH and total of oocytes, age and AMH and finally, total of oocytes and age, correlation between the variables was evaluated. They are represented in the **chart 1** (moderate correlation), **chart 2** (weak correlation) and **chart 3** (weak correlation) respectively. We analyzed associations between age and sHLA-G ( $r = -0.035$ ;  $p = 0.77$ ), AMH and sHLA-G ( $r = 0.16$ ;  $p = 0.23$ ), AMH and EMEG ( $r = -0.13$ ;  $p = 0.37$ ); age and EMEG ( $r = -0.84$ ;  $p = 0.51$ ); sHLA-G and total of oocytes retrieved ( $r = 0.012$ ;  $p = 0.92$ ); SHLA-G and mature oocytes ( $r = 0.96$ ;  $p = 0.006$ ), but it was not found correlation between these analyses. We conducted a categorical analysis of embryos above 70 points, to 80 points, 90 points and 100 points with the dosages of HLA-G and no correlation was found from the use of the Spearman's test, with a  $p > 0.05$ .

When the amount of HLA-G was analyzed and measured in the Group of women with endometriosis ( $5,32 \pm 4,47$ ) and women without endometriosis ( $5.96 \pm 4.82$ ), no significant difference was found ( $p = 0.59$ ) and this is shown in **chart 4**.

---

## DISCUSSION

The success of the use of assisted reproductive techniques depends on several factors and one of the most important is the evaluation and classification criteria of the embryo related to its quality. The improvement of these criteria contributes directly to the reduction of multiple pregnancy rates and morbidity and perinatal mortality and increased rates of implantation and pregnancy (19).

In this study, we associate the sHLA-G to the criterion of classification of embryonic quality GES so that concentrations could be an additional marker in the moment of choice of the embryo. The association between the evaluation criteria and GES and the concentration of sHLA-G has not been investigated yet, because many authors use it as a criterion of embryonic quality rating system in graduation (A, B, C and D) (3,4). HLA-G is investigated as a predictor of embryo quality because the production of these molecules is carried out by the granulosa cells. These cells provide growth factors to the oocytes in order to maintain the development and maturation, forming a microenvironment in which the sHLA-G are in close contact throughout the oocitary development. Given this context, sHLA-G could reflect the maturation oocitary process as well as the quality of the embryo (3,20).

Our study, doing the correlation between the average score of embryos generated and the concentration of sHLA-G in follicular fluid, we concluded that the analysis of sHLA-G in FF is a parameter that is not associated with embryo quality, this result confirms with a few studies. JEE B.C. et. al. to assess the morphological criterion Association (grade A, B, C and D) to the presence of sHLA-G in follicular fluid, it was concluded that sHLA-G may not be a predictor of embryo quality. This same group observed that these concentrations were strongly associated with normal fertilization rates, sHLA-G being the only one of the factors involved in the mechanisms of fertilization(16). Rizzo R et. al. showed that when performing maturation of oocytes in intimate contact with cumulus oophorus cells (COCs), these cells produce sHLA-G during the maturation oocitary process and the HLA-G was not detected in supernatant on culture of immature oocytes with COCs, suggesting the SHLA-G is part of the maturation oocitary process but is not the limiting factor (13).

---

It is observed that there is not a consensus in the literature on the role of HLA-G in assisted reproduction, while the classification of the embryo from morphological criterion is already well established. In previous studies, some authors found no correlation between the embryo and the concentration of sHLA-G (21), while others have shown that pregnancy rates were higher and rates of abortion were lower when the embryo selection was based from the morphological criterion and the concentration of sHLA-G in FF. Rebmann V. *et al*, (22) were showed, in multicenter study, that morphological grading is the most powerful predictor of pregnancy and the concentration of sHLA-G is considered a powerful tool of a better prognostic value compared to other factors such as age, the use of TRA and the number of embryos transferred, although it is important to remember that quality is not strictly related to the viability of the embryo and the potential for implantation (23-25).

To evaluate other important variable, which currently is part of the context of assisted reproduction, the AMH represents a endocrine parameter already well established in the literature as to its use for measuring, indirectly, the ovarian reserve. Our study has obtained a significant association and reverse of this hormone to the age women subject to the TRA. There is a decreasing reproductive capacity with increasing age, because this is by reducing the pool and follicular quality. This condition is well correlated in many studies that show a significant decrease of AMH concentration in serum of women over the years (8,9). This decreased follicular pool was represented in our study by a direct and significant correlation between serum AMH concentrations and the total number of oocytes retrieved and another significant correlation and inverse between the age and the total number of oocytes retrieved.

Knowing about the sHLA-G production by granulosa cells and on the amendments of these cells already described in the literature (26,27), the present study evaluated the concentration of sHLA-G in women with and without endometriosis in which was found a significant difference between these groups. This analysis was important to evaluate the concentration of sHLA-G between distinct groups, because of endometriosis is already known a possible physiological impairment of limiting structures of fertility and the group in which the infertile women belonged because of male and/or tubal and because of mechanical causa,



---

it was expected greater concentration of sHLA-G (27). From the results of this study the molecule HLA-G is not able to reflect the infertility of women with endometriosis, because there is no significant difference between the groups.

It is emphasized the type of test used for the measurement of HLA-G in fluids, because the results reported are quite controversial. In this study, to analyze the sHLA-G it was used a kit with a detection limit 0.6 Units/ml and therefore a greater sensitivity towards the ELISA Kits described in the literature. The increasing of this limit is directly related to the longer incubation (16-20 hours) of the antibodies in contact with samples of FF, enabling the detection of SHLA-G in virtually all samples analyzed (73 samples) in our study.

Dahl m. et. al., 2012, said, on the results, the need for more sensitive ELISA test for both studies with measurements on FF as in cultures of embryos (10). In order that the sHLA-G can play the role of a useful tool as positive prognostic factor on embryo transfer in IVF cycles, the improvement of the technique with the increased sensitivity observed in our study may be considered a step towards achieving this goal. From further studies in order to establish a cut-off point of quantitative measurements of concentrations of SHLA-G in FF, embryo culture and plasma and the correlation to quality outcomes of embryo implantation rate and/or pregnancy rate would provide its use as a routine procedure in assisted reproduction clinics (28).

We concluded that our study confirmed that the AMH is an important endocrine parameter to reflect the ovarian reserve. We accept the null hypothesis that the concentration of sHLA-G in women with and without endometriosis do not differ. Our study is a pioneer in linking the SHLA-G average morphological criterion assessed by score and opens a series of perspectives in terms of use of marker as choosing the best embryo.

Although the tests have evolved to detect sHLA-G, it is still controversial the use of sHLA-G in FF as prognostic marker of embryo quality on complementary use to morphological criteria. The increased sensitivity and specificity of the test, compared to studies in the literature, it was observed in our study that there was detection in all samples measured.

---

Based on this evidence, we have concluded that the clinical embryologists must continue to select embryos based on their morphology and that embryo assessment by GES must be more widely held in laboratories that use TRA.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

- We thank the Research Incentive Fund (FIPE) by to technical and scientific incentive of Porto Alegre Clinical Hospital, Brazil.
- Thanks to couples of Human Reproduction Center INSEMINA by providing us with samples arising from their assisted reproduction procedures.
- We are grateful to the professionals inseminate Human Reproduction Center where they performed the assisted reproduction techniques.

---

## REFERÊNCIAS

1. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009.
2. Abrão MS, Muzii L, Marana R. Anatomical causes of female infertility and their management. *Int. J. Gynaecol* 2013; 123: 18-24.
3. Pauli, S.A.; Berga, S.L.; Shang, W.; Session, D.R. Current status of the approach to assisted reproduction. *Pediatric Clinics of North America*, v. 56, p. 467-488, 2009.
4. VeecK, L., *Atlas of the human oocyte and early conceptus.*, ed. W. Wilkins. 1991, Baltimore.
5. *Manual de procedimentos de Laboratório de Reprodução Assistida*. 2006: Red Latinoamericana de Reproduccion Assistida.
6. Fisch J, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G. The graduate embryo scoring system (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rates from cleaved—stage embryos. *Hum Reprod*. 2001;16(9):1970–5.
7. Lukaszuk K, Liss J, Kunicki M, Jakiel G, Wasniewski T, Woclawek-Potocka I, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH) is a strong predictor of live birth in women undergoing assisted reproductive technology. *Reproductivebiology*. 2014. Vol.14(3).;176-181.
8. La Marca A, Volpe A. Anti-Mullerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool. *Clin Endocrinol* 2006;64:603–10.
9. La Marca A, Giulini S, Orvieto R, De Leo V, Volpe A. Anti- Mullerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. *Hum Reprod* 2005;20:1569–72.
10. Dahl M., Hviid F. V. T., Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. *Human Reproduction Update*, 2012. Vol.18, No1 pp.92-109.
11. Ellis SA, Palmer MS, McMichael AJ. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *J Immunol*. 1990;144:731-5.
12. Rizzo, R., and O. Baricordi. 2006. HLA-G Expression and Regulation in early embryos.

---

*Am. J. Reprod. Immunol.* 56: 02–04 (Abstr.).

13. Rizzo R., Canto B.M., Stignani M., Fadini R., Fumagalli D., Renzini M. M., Borgatti M., Gambari R., Baricordi R. O., Production of sHLA-G molecules by *in vitro* matured cumulus-oocyte complex. *International Journal of Molecular Medicine*, 2009. (24) pp.523-530.
14. LeMaoult, J., M. Le Discorde, N. Rouas-Freiss, P. Moreau, C. Menier, J. cCluskey, and E. D. Carosella. 2003. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. *Tissue Antigens* 62: 273–284.
15. Pascale P, Cabestre FA, Ibrahim EC, Lefebvre S, Khalil-Daher I, Vazeux G, Quiles RM, Bermond F, Dausset J, Carosella ED. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5:-G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 2000a;61:1138–1149.
16. Jee BC, Suh CS, Kim SH, Moon SY. Soluble Human Leukocyte Antigen G Level in Fluid from Single Dominant Follicle and the Association with Oocyte Competence. *Yonsei Med J.* 2011;52(6): 967-971.
17. Hunt JS, Jadhav L, Chu W, Geraghty DE, Ober C. Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:682–688.
18. Rebmann V, Pfeiffer K, Paüssler M, Ferrone S, Maier S, Weiss E, Grosse-Wilde H. Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue Antigens* 1999;53:14–22.
19. Wunder D.M., Birkhäuser M. H., Bersinger N. A., Soluble human leukocyte antigen-G (sHLA-G) in follicular fluid and embryo culture medium and its impact on pregnancy prediction in IVF-ICSI treatment. *Imuno-analyse et biologie spécialisée.* 2013; (28) : 43-50.
20. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. *Kuby immunology.* 6th ed. New York: W.H. Freeman, 2007.
21. Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, et al. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2005;20:138—46.
22. Rebmann V, Switala M, Eue I, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study. *Hum Reprod* 2010;25:1691–1698.
23. Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, Isiklar A. Blastocyst-stage transfer of

---

poor-quality cleavage-stage embryos results in higher implantation rates. *Fertil Steril* 2001;75:514-8.

24. Hsu MI, Mayer J, Aronshon M, Lanzendorf S, Muasher S, Kolm P, et al. Embryo implantation in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: impact of cleavage status, morphology grade, and number of embryos transferred. *Fertil Steril* 1999;72:679-85.

25. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997;12:1545-9.

26. Toya M, Saito H, Ohta N, Saito T, Kaneko T, Hiroi M. Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *FertilSteril*. 2000 Mar;73(2):344-50.

27. Cunha-Filho JS, Lemos NA, Freitas FM, Kiefer K., Faller M., Passos EP: Insulina-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis. *Human Reproduction* Vol. 18, No 2 pp. 423-428, 2003.

28. Rizzo R, Fuzzi B, Stignani M, Criscuoli L, Melchiorri L, Dabizzi S, et al. Soluble HLA-G molecules in follicular fluid: a tool for oocyte selection in IVF ? *J Reprod Immunol* 2007;74:133-42.

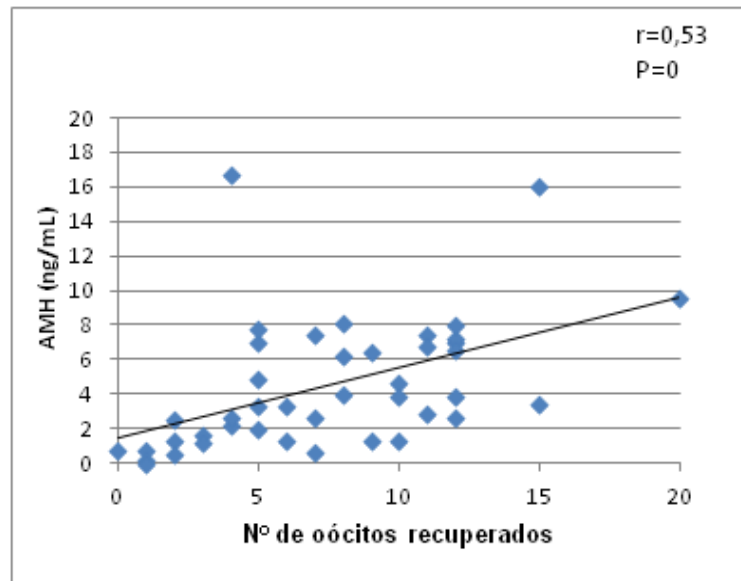
---

## Resultados

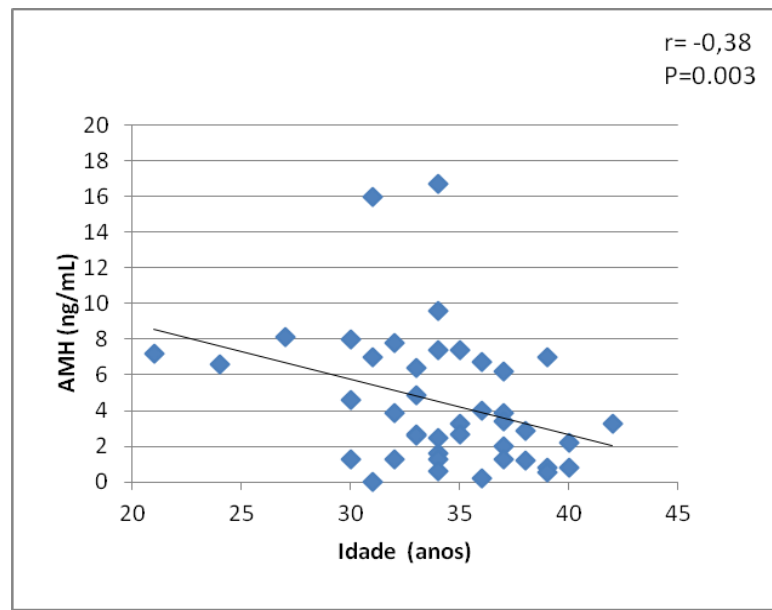
**Tabela2:** Variables population

<b>Parâmetro (n=73)</b>	<b>Mean ± SD</b>
Age (anos)	33.83 ± 3.82
FSH (UI/mL)	7.72 ± 3.23
Estradiol (pg/mL)	52.37 ± 3.50
TSH (mUI/L)	2.32 ± 1.98
Prolactin ( µg/L)	17.45 ± 12.74
AMH (ng/mL)	4.31±3.69
sHLA-G (U/mL)	5.66±4.64
Total induction protocol folicular (UI/mL)	2373.26±897.48
Follicles ≥ 17mm	5.06±3.91
Oocytes retrieved	7.11±4.61
Mature oocytes	5.71±4.09
embryos generated	3.21±2.89
Mean score of the generated embryos	60.45±26.53
Mean score of embryos transferred	69.56±26.48
Number of embryos transferred	1.67±0.8

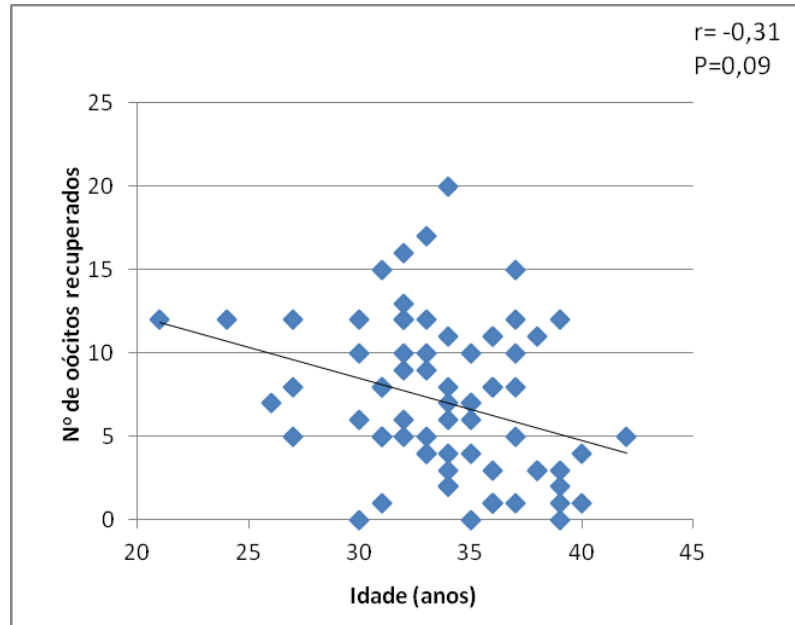
---

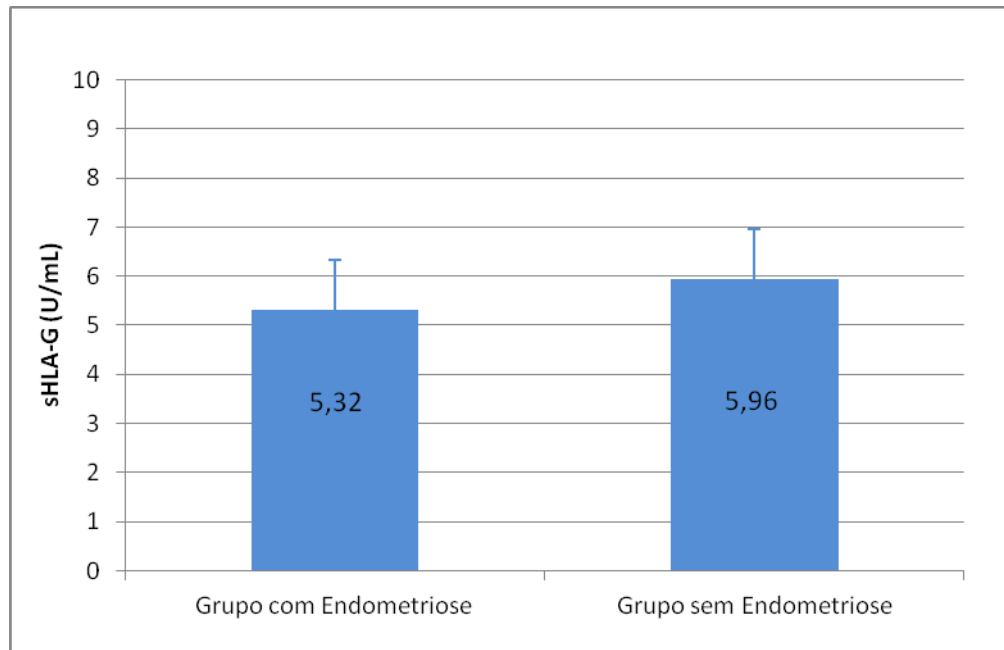
**Chart 1:** Correlation between AMH and oocytes retrieved



**Chart 2:** Correlation between AMH and age.

**Chart 3:** Correlation between oocyte N° and age.



**Table 4:** sHLA-G in groups with and without endometriosis.

(Média:colunas; Desvio padrão: linhas, Student t-test  $p=0,57$ )

---

## 8. CONCLUSIONS

- There is not correlation between sHLA-G concentrations measured in follicular fluid and the mean score obtained by GES criteria of generated embryos from women undergoing IVF.
- The sHLA-G is not configured in a biomarker of embryo quality.
- There is a correlation between anti-Mullerian hormone and the total number of oocytes retrieved in response to ovulation induction.
- There is an association between the anti-Müllerian hormone and ages of patients.
- There was not difference between the sHLA-G concentrations measured in the group of women with endometriosis and without endometriosis.

---

## 9. PERSPECTIVES

These results open up room for further studies to discuss the following questions:

- The study of other metabolites produced by granulosa cells remaining in the follicular fluid in intimate contact with the oocyte development and thus may reflect the oocyte quality and embryo;
- It was observed in our study, there was an increase in sensitivity of the test used to measure this molecule compared to other previous studies that used this same manufacturer test. It is expected that this combined with the increase in sensitivity is set in a cutoff sHLA-G concentrations measured in follicular fluid realcionado it to embryo quality, implantation rates and / or pregnancy rate;
- Conduct new studies which correlate the sHLA-G the technical, modern already available, assessment of embryo quality, such as; the Embryoscope Time-Lapse System. This technique is based on minimal human interference and ininterrupta observation in real-time through images in multiple planes, of embryo development. This system has enabled to decrease some of the considerable differences between the in vivo and in vitro environment, enabling the development of selection criteria due to the numerous embryo development in information provided by this system.
- Although there was not a difference between the production of sHLA-G measured in follicular fluid in women with endometriosis and without endometriosis, need to of new studies and the measurement of sHLA-G in other compartimentos such as endometrial eutopic / ectopic and in the supernatant of embryo cultures, women with this condition to assess the effect of the levels of sHLA-G.

---

## **10.ANEXOS**

**Anexo 1:** Instrumento de coleta de dados;

**Anexo 2:** Protocolo de indução da ovulação;

**Anexo 3:** Fluxograma da realização da técnica ELISA para mensurar sHLA-G;

**Anexo 4:** Placas com as amostras após a leitura;

## Anexo 1: Instrumento de coleta de dados

**Ficha de coleta de dados- Estudo da associação entre sHLA-G e GES**

Identificação:  
 Nome: \_\_\_\_\_  
 Data da coleta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

1. GRUPO : Caso ( ) Controle ( )

2. Causa de infertilidade:

(1) Endometriose por diag. por VLP  
 Tipo: \_\_\_\_\_ Grau: \_\_\_\_\_  
 (2) Fator tubário sem endometriose  
 (3) Endometriose + outra causa  
 Qual? \_\_\_\_\_

3. Histórico gestacional

Gestações: \_\_\_  
 Nascidos vivos: \_\_\_  
 Abortos espontâneos: \_\_\_  
 Óbitos fetais: \_\_\_

4. Dosegens hormonais basais

FSH 3ª dia ciclo  
 Estradiol  
 Progesterona  
 AMH  
 TSH  
 Prolactina

5. Dados ecográficos

Contagem de folículos antrais: \_\_\_

6. Indução ovulatória/coleta de óocitos

Nº de folículos > 17mm: \_\_\_\_\_  
 Nº de óocitos recuperadas: \_\_\_\_\_  
 Nº de óocitos maduros: \_\_\_\_\_  
 Nº de embriões gerados: \_\_\_\_\_  
 Escore embrionário 3ª dia: \_\_\_\_\_º de  
 embriões transferidos: \_\_\_\_\_

Qualidade Embrionária: \_\_\_\_\_

Critérios: \_\_\_\_\_

Evolução da gravidez: \_\_\_\_\_ semanas

7. Técnica de RA

(0) ICSI  
 (1) FIV convencional;

N de ciclos: \_\_\_\_\_  
 (2) Realizou FIV/ICSI anteriormente  
 N de ciclos: \_\_\_\_\_

8. Quantidade de gonadotrofina utilizada para indução de ovulação: \_\_\_\_\_

Protocolo utilizado:  
 (0) Protocolo 1  
 (1) Protocolo 2

9. Desfecho gestacional

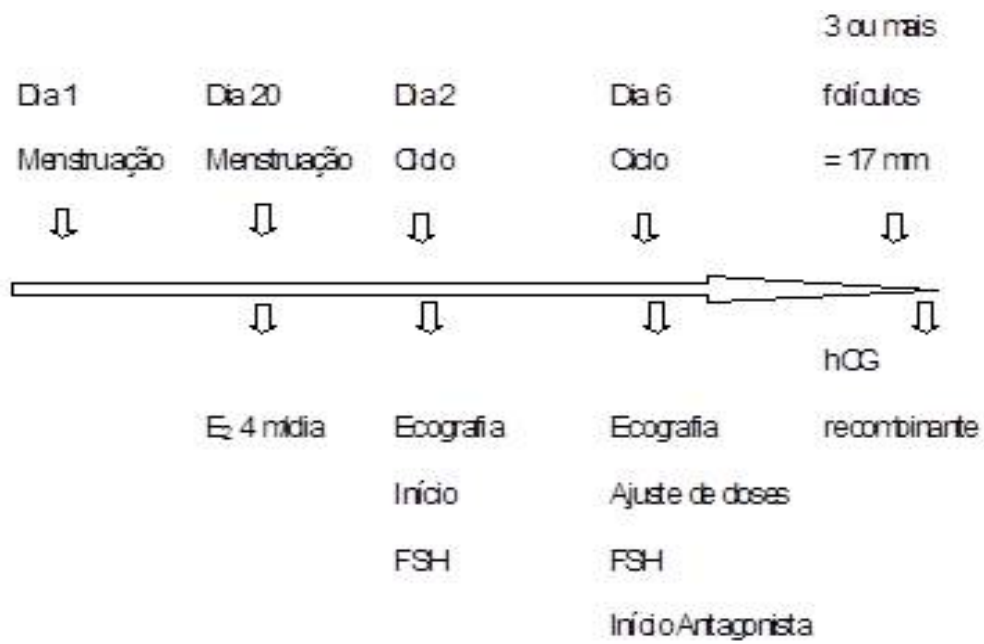
(1) HCG negativo  
 (2) HCG positivo sem embrião  
 (3) HCG positivo/embrião sem BCF  
 (4) HCG positivo/embrião com BCF  
 (5) Ecografia com Saco gestacional  
 (6) Aborto espontâneo

Data de punção dos Folículos: \_\_\_\_\_

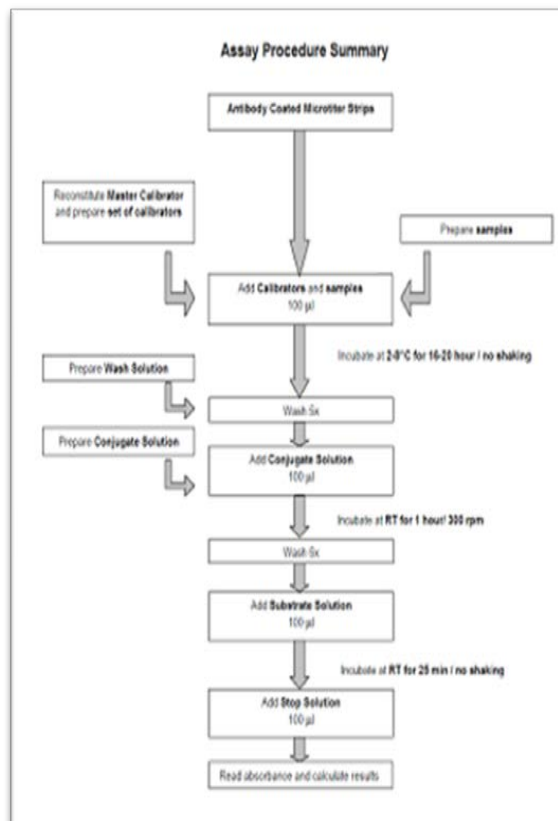
Data de armazenamento do FF \_\_\_\_\_

Data de mensuração de sHLA-G: \_\_\_\_\_

---

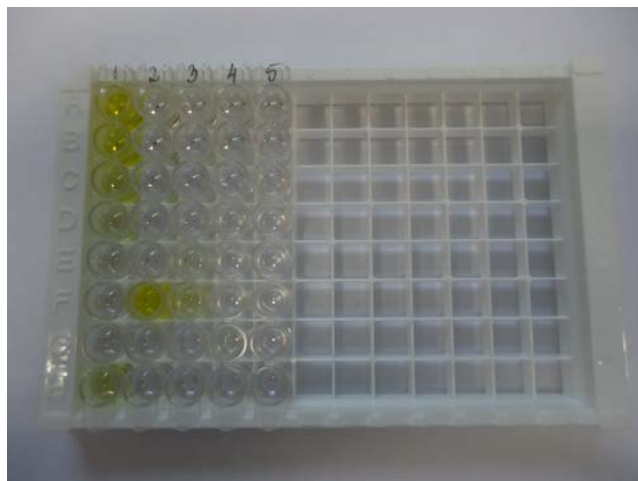
**Anexo 2: Protocolo de indução da ovulação**




**Anexo 3:** Fluxograma da realização da técnica ELISA para mensurar sHLA-G

---

**Anexo 4:** Leitora de ELISA e placas após a leitura



---

**STROBE Statement**—checklist of items that should be included in reports of observational studies

	<b>Page</b>	<b>Recommendation</b>
<b>Title and abstract</b>	45-46	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (b) <b>Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found</b>
<b>Introduction</b>		
Background/rationale	47-48	<b>Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported</b>
Objectives	46	<b>State specific objectives, including any prespecified hypotheses</b>
<b>Methods</b>		
Study design	49	<b>Present key elements of study design early in the paper (ok)</b>
Setting	49	<b>Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection (ok)</b>
Participants	49	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up ( não se aplica ) <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls ( não se aplica ) <b><i>Cross-sectional study</i>—Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants (ok)</b> (b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case
Variables	50-51	<b>Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable</b>
Data sources/ measurement	50-52	<b>For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group</b>
Bias	50-52	<b>Describe any efforts to address potential sources of bias</b>
Study size	NA	Explain how the study size was arrived at (estudo original)
Quantitative variables	52	<b>Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why</b>
Statistical methods	52	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <b><i>Cross-sectional study</i>—If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy (ok)</b> (e) Describe any sensitivity analyses

---

Continued on next page

### Results

Participants	NA	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	53	<b>(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders</b> (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest (c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
Outcome data	53	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time <i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure <b><i>Cross-sectional study</i>—Report numbers of outcome events or summary measures</b>
Main results	53	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included <b>(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized</b> (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
Other analyses	53	<b>Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses</b>

### Discussion

Key results	54-57	<b>Summarise key results with reference to study objectives</b>
Limitations	56	<b>Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias</b>
Interpretation	54-57	<b>Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence</b>
Generalisability	56-57	<b>Discuss the generalisability (external validity) of the study results</b>

### Other information

Funding	58	<b>Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based</b>
---------	----	--

\*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

**Note:** An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).