

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Estudo randomizado comparando
hMG versus FSHr
quanto à qualidade embrionária em pacientes submetidas à Fertilização in Vitro

Aluna: Rita de Cássia Borges Chapon
Orientador: João Sabino Lahorgue da Cunha Filho

Dissertação de Mestrado

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Chapon, Rita

Estudo randomizado comparando hMG versus FSHr quanto à qualidade embrionária em pacientes submetidas à Fertilização in Vitro / Rita Chapon. -- 2014.

62 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. Infertilidade. 2. Fertilização in Vitro. 3. Indução da Ovulação. 4. Qualidade Embrionária. I. Lahorgue da Cunha Filho, João Sabino, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as mulheres que optaram pelo adiamento da maternidade em troca do estudo, da pesquisa, da formação profissional e de todas demais formas de evolução pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, por terem me ensinado as coisas mais importantes da vida e sem as quais eu não teria trilhado o mesmo caminho: respeito ao próximo, honestidade e comprometimento.

Agradeço ao meu irmão, que mesmo morando longe sempre soube se fazer presente nos momentos mais preciosos da minha vida.

Agradeço ao Fernando, meu amor, por todo carinho, apoio e compreensão pela escolha de vida que fiz.

Agradeço a toda equipe Insemine e Projeto Cegonha : secretárias, técnicas de enfermagem, embriologistas e médicos, pelo apoio e colaboração para a concretização desse trabalho.

E por fim, não tenho palavras para agradecer ao meu orientador, Prof. João Sabino, por toda inspiração desde os tempos de acadêmica da Faculdade de Medicina, a quem eu dedico o seguinte texto:

“ O Mundo

Um homem da aldeia de Neguá, no litoral da Colômbia, conseguiu subir aos céus. Quando voltou, contou. Disse que tinha contemplado, lá do alto a vida humana. E disse que somos um mar de fogueirinhas: - O mundo é isso – revelou. – Um montão de gente, um mar de fogueirinhas.

Cada pessoa brilha com luz própria entre todas as outras. Não existem duas fogueiras juntas iguais. Existem fogueiras grandes e fogueiras pequenas e fogueiras de todas as cores. Existe gente de fogo sereno, que nem percebe o vento, e gente de fogo louco, que enche o ar de chispas. Alguns fogos, fogos bobos, não alumiam e nem queimam; mas outros incendeiam a vida com tamanha vontade que é impossível olhar para eles sem pestanejar, e quem chegar perto brilha também.”

Eduardo Galeano, *O livro dos Abraços*.

RESUMO

Introdução A Fertilização in Vitro (FIV) é o principal tratamento para casais inférteis e tem como etapa inicial o processo de indução da ovulação.

Os fármacos utilizados para o estímulo ovariano contêm variadas combinações de hormônios (FSH, LH e hCG). Os mais utilizados no nosso meio são a gonadotrofina menopausal humana (hMG) e hormônio folículo estimulante recombinante (FSHr). Eles diferem na sua composição, tendo o hMG os hormônios FSH e LH em iguais proporções além de uma pequena parcela de hCG, enquanto o FSHr contém apenas o FSH. Sabe-se que a interação do LH e do FSH é fundamental para o ciclo ovulatório espontâneo, no entanto, já se comprovou a efetividade do rFSH na estimulação ovariana da FIV. Os estudos são controversos em relação a taxas de gestação e outros desfechos relacionados ao estímulo ovariano, como dose de gonadotrofinas utilizadas, número de oócitos capturados, número de embriões e qualidade embrionária.

Grande parte dos ensaios clínicos, publicados até então, pesquisou as diferenças entre essas duas medicações tendo como desfecho principal a taxa de gravidez ou o número de nascidos vivos após a FIV. No entanto, analisando com cuidado, vemos que a grande maioria desses estudos não recrutou um número suficiente de pacientes para detectar uma diferença estatisticamente significativa nesses desfechos. Ainda, os poucos estudos que arrolaram um número importante de pacientes se declararam patrocinados pela indústria farmacêutica, o que torna a análise de seus resultados prejudicada por um importante conflito de interesse.

Objetivo Comparar as gonadotrofinas rFSH e hMG no protocolo de fertilização in vitro com o antagonista do GnRH tendo como desfecho principal a qualidade embrionária. Os desfechos secundários incluídos foram número e tamanho de folículos ao final da indução da ovulação, dose de gonadotrofina utilizada, número de oócitos capturados, número de embriões e taxas de gestação.

Método Foi realizado um estudo randomizado onde foram recrutadas 168 mulheres com indicação de FIV. Foram randomizadas 85 pacientes para o uso de FSHr e 83 para o uso de hMG. Os embriões foram transferidos entre o

terceiro e o quinto dia após a fertilização in vitro. O escore de graduação embrionário (GES) foi realizado através de avaliação de todos os embriões por 3 vezes, nos tempos: 16 – 18 horas, 25 – 27 horas e 64 – 67 horas, sempre pelo mesmo embriologista. Para pontuação do GES, avaliaram-se: citoplasma, morfologia pronuclear, fragmentação, alinhamento nucleolar, posição do corpo polar, número de blastômeros/morfologia e simetria.

Resultados O escore total embrionário não diferiu entre os dois grupos (214.01 x 170.43, rFSH e hMG respectivamente, $P = 0.13$), no entanto encontramos um escore de melhor embrião significativamente mais alto no grupo do FSHr (77,33 x 65,07 $P = 0,03$). Também foi estatisticamente maior o número de embriões nesse mesmo grupo (4,17 x 3,26 $p=0,04$). Não houve diferença na dose de gonadotrofinas, no número de folículos ao final da indução, no número de oócitos capturados ou nas taxas de gestação.

Conclusão Concluímos que o tipo de gonadotrofina utilizada para o estímulo ovariano pode ter um impacto na qualidade embrionária. Esse achado pode ser relacionado à presença do LH, hipótese que deve ser explorada em novos estudos, para melhor compreensão e otimização do estímulo ovariano na FIV.

Palavras chave: Indução da ovulação, fertilização in vitro, FSHr, hMG, antagonista GnRH, escore embrionário

LISTA DE ABREVIATURAS

AFC – *antral follicle count* (contagem de folículos antrais)

AMH – *anti-Mullerian hormone* (hormônio anti-Mulleriano)

DP – Desvio padrão

EDT – Endometriose

FIV – Fertilização in vitro

FSH – *Follicle stimulating hormone* (hormônio folículo estimulante)

GnRH – *Gonadotropin releasing hormone* (hormônio liberador de gonadotrofinas)

GES – *Graduated Embryo Score* (Escore de Graduação Embrionário)

hCG – *Human chorionic gonadotropin* (gonadotrofina coriônica humana)

hMG – *human menopause gonadotropin* (gonadotrofina menopausal humana)

LH – *Luteinizing hormone* (hormônio luteinizante)

MII – Metáfase II

OHSS - *ovarian hiper stimulation syndrome* (síndrome do hiperestímulo ovariano)

SOP – Síndrome do ovário policístico

SUMÁRIO

1. Introdução
2. Revisão da Literatura
 - 2.1 Ciclo folicular
 - 2.2 Indução da Ovulação na Fertilização in Vitro
 - 2.3 Gonadotrofina Menopausal Humana (hMG)
 - 2.4 Hormônio folículo estimulante recombinante (FSHr)
 - 2.5 Escore Embrionário
3. Justificativa
4. Hipótese Nula
5. Objetivos
6. Referências Bibliográficas
7. Artigo
8. Conclusões
9. Perspectivas

ANEXOS/APÊNDICES

Anexo 1 – Escore de graduação embrionária (GES)

Apêndice 1 – Fotos de embriões com as respectivas pontuações

Apêndice 2 – Protocolo de manipulação dos embriões

Apêndice 3 – Protocolo de indução da ovulação

Apêndice 4 – Figura 1 do Artigo - CONSORT statement flow

Apêndice 5 – Tabela 1 do Artigo

Apêndice 6 – Tabela 2 do Artigo

Apêndice 7 – Termo de consentimento livre esclarecido

Apêndice 8 – Instrumento de coleta de dados

1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos vêm registrando um percentual crescente na prevalência da infertilidade feminina, passando de 7,4% em 2002 para percentuais entre 12% e 24% conforme trabalhos mais recentes (Slama, Hansen et al. 2012).

Entre outras causas, podemos citar o adiamento da maternidade pela mulher moderna, a qual investe cada vez mais tempo na sua vida acadêmica, alcançando a estabilidade profissional e, conseqüentemente, o desejo de gestar em uma fase mais tardia da sua vida, quando a fertilidade começa naturalmente a decrescer. Corroborando esse achado, pesquisas demonstram que a maioria das mulheres que procura assistência médica para gestar é composta por nulíparas na faixa etária de 35 a 44 anos (Kupka, Ferraretti et al. 2014).

Nesse cenário temos o aumento da procura pelas técnicas de reprodução assistida, destacando-se a fertilização in vitro (FIV) indicada na maioria das vezes para casos de infertilidade relacionada ao fator tubário e reserva ovariana diminuída, sendo esse, atualmente, o principal recurso para tratamento da infertilidade e alvo de estudo deste trabalho.

A FIV é composta por várias etapas que, resumidamente, compreendem o estímulo ovariano, a captura de oócitos, a fertilização em meio de cultura e por fim a transferência do embrião. Cada uma dessas etapas tem múltiplas variáveis que interferem no seu sucesso. Considerando o relativo curto tempo de experiência que se tem em relação a essa técnica, visto que o primeiro resultado de sucesso na FIV data de 1978 (Steptoe and Edwards 1978), podemos supor a dimensão do universo a ser pesquisado e melhor compreendido.

Dentre todas as etapas da FIV acima mencionadas, o estímulo ovariano é uma das mais estudadas e será o foco deste trabalho. As pesquisas são crescentes nessa área, não só por ser a etapa inicial, o que torna óbvia sua importância para o sucesso das demais fases do tratamento, mas também por ser uma das

mais complexas e por envolver muitas possibilidades de protocolos para sua execução.

Muitas formas de estímulo ovariano já foram testadas, datando de 1928 os primeiros estudos a respeito deste tema, décadas antes da primeira FIV ocorrer (Forsdike 1928).

A evolução do estímulo ovariano iniciou com o uso das primeiras gonadotrofinas extraídas do soro de éguas prenhas na década de 30, passando pela extração de gonadotrofinas da urina de mulheres na pós menopausa e chegando à moderna técnica de DNA recombinante, estabelecida na década de 90, a qual possibilitou a extração da gonadotrofina purificada do plasma humano (Fauser 1998).

Atualmente as gonadotrofinas mais utilizadas são a gonadotrofina menopausal humana (hMG), o FSH purificado (FSH-P), o FSH altamente purificado (FSH-HP) e o FSH recombinante (FSHr). No nosso trabalho estudaremos os protocolos que fazem uso de hMG e FSHr, por serem as gonadotrofinas mais utilizadas no nosso meio (van Wely, Kwan et al. 2011)

As gonadotrofinas em questão têm como principal diferença a sua composição, sendo hMG composta por FSH e LH em igual proporção, e uma pequena parcela de hCG. O FSHr é composto apenas por FSH (Stokman, de Leeuw et al. 1993).

Muitos estudos vêm tentando comparar os resultados da FIV, levando em consideração o tipo de gonadotrofina utilizada. Os dados são ainda conflitantes em relação aos desfechos clínicos como número e tamanho de folículos estimulados, número de oócitos capturados, taxas de clivagem, número e qualidade de embriões, taxas de gestação, dose de gonadotrofina utilizada, entre outros como taxas de aborto e de síndrome do hiperestímulo ovariano (OHSS). Ainda, causando maior complexidade e dificuldade nas pesquisas, os estudos se dividem entre o tipo de análogo do GnRH (agonista ou antagonista) utilizado nos protocolos de FIV, fármaco administrado para o bloqueio da ovulação durante o ciclo de estímulo ovariano.

A maioria dos estudos analisou as diferentes gonadotrofinas quando utilizado o protocolo com GnRH agonista, por ser o primeiro a ser empregado e assim ter na FIV maior tempo de experiência (Coomarasamy, Afnan et al. 2008). Com o surgimento do protocolo com GnRH antagonista na década de 90 as questões voltaram a se repetir, visto que uma diferente interação na forma de bloqueio ovulatório poderia modificar significativamente os desfechos estudados no outro protocolo. O benefício do uso desse novo análogo, o GnRH antagonista, encontra-se no fato de ocorrer a imediata supressão de secreção de gonadotrofinas pela hipófise após o início da terapia, resultando em uma fase de indução da ovulação com significativo menor tempo de duração e eficácia semelhante quando comparada ao protocolo com GnRH agonista (Xiao, Chang et al. 2013).

Consideramos que uma das principais dificuldades em realizar trabalhos de qualidade que avaliem as reais diferenças entre os protocolos de indução da ovulação é a dificuldade em atingir um número adequado de pacientes em estudo. Verificamos isso ao constatar que a grande maioria dos ensaios clínicos utiliza como desfecho principal taxas de gestação (Figen Turkcapar, Seckin et al. 2013) ou até mesmo o número de nascidos vivos, o que torna necessário um grande n para se encontrar diferença estatisticamente significativa nesses desfechos. Para um adequado poder de estudo com esses desfechos, cerca de 2.400 casos de FIV deveriam ser analisados (Westergaard, Bossuyt et al. 2011). Observamos que a maioria dos trabalhos não atinge esse número de pacientes, tendo seu poder significativamente reduzido. Ainda, aqueles que conseguem recrutar um número significativo de pacientes, declaram-se patrocinados pela indústria farmacêutica, o que os confere um importante conflito de interesse (Andersen, Devroey et al. 2006).

Decidimos por isso, adequar nosso desfecho ao número de pacientes que consideramos factível arrolar no nosso centro de estudos. Para isso, utilizamos como desfecho principal a qualidade embrionária, com o uso da avaliação de escore embrionário total e de melhor embrião, observados no terceiro dia após a fertilização. Além do menor número de pacientes necessário para um adequado poder de estudo, o desfecho escolhido tem reconhecida relação

direta com taxas de gravidez, principal objetivo da FIV (Kaur, Swarankar et al. 2014).

Considerando que o protocolo com GnRH antagonista vem sendo cada vez mais utilizado, nosso trabalho visou analisar a qualidade embrionária realizando um estudo randomizado comparando FSHr e hMG no estímulo ovariano da FIV. Nosso desfecho principal foi a avaliação de escore de qualidade embrionária total e de melhor embrião. Como desfechos secundários foram incluídos a análise de dose total de gonadotrofinas utilizadas, número e tamanho de folículos ao final do estímulo, número de oócitos capturados e taxas de gestação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES :

Esta revisão da literatura foi focada nos desfechos clínicos da fertilização *in vitro*, principalmente do desfecho qualidade embrionária, em relação ao uso das gonadotrofinas hMG e FSHr com protocolo com GnRH Antagonista.

A estratégia de busca fez uso das seguintes bases de dados: Pubmed, LILACS e Scielo, utilizando o portal de pesquisa do Periódico CAPES, no período de 1990 a 2014. As buscas foram realizadas utilizando os termos: *in vitro fertilization*, *hMG*, *rFSH*, *embryonic quality*, *GnRH antagonist*.

2.2 CICLO FOLICULAR

Em 1986, Gougeon descreveu o ciclo folicular propondo diferentes classes de folículos de acordo com seu tamanho, número de células da granulosa e presença de antro, características observadas de acordo com seu estágio de maturidade, conforme ilustra a clássica figura abaixo (Fig. 1) (Gougeon 1986).

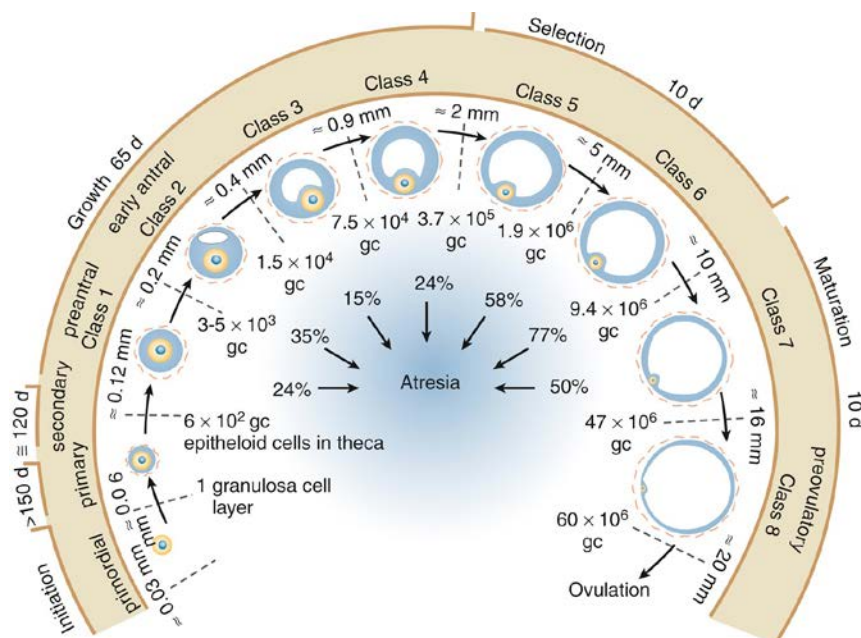


Fig 1. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1:81–87, 1986.

Os estágios iniciais de desenvolvimento do folículo não são responsivos às gonadotrofinas, sendo controlados por fatores intraovarianos. Os folículos primordiais permanecem em um estado quiescente desde o período intrauterino até que iniciem suas primeiras transformações com a modificação do formato das células da granulosa, crescimento do oócito, início de formação da zona pelúcida e surgimento das primeiras células da teca, alcançando assim, o estágio de formação do folículo primário (Westergaard, Byskov et al. 2007).

A seguir, com o aumento do número de células da granulosa e surgimento do antro, temos a evolução do folículo secundário para o folículo antral. Nesse estágio as células da granulosa passam a se tornar responsivas ao estímulo do FSH (Rodgers, Irving-Rodgers et al. 2001).

Embora todos os folículos tenham inicialmente igual potencial para alcançar a maturação final, somente alguns folículos antrais irão iniciar a fase de recrutamento de acordo com seu grau de responsividade ao FSH. Essa etapa é conhecida como recrutamento secundário ou gonadotrófico dependente (Fauser and Van Heusden 1997).

A partir dessa etapa, conforme a teoria das duas células e das duas gonadotrofinas, o LH e o FSH passam a ter papel fundamental para que ocorra o adequado recrutamento folicular e ovulação. As células da teca, sob o controle do LH, são responsáveis pela produção de androstenediona a qual é convertida a estradiol pela ação da enzima aromatase nas células da granulosa sob a regulação do FSH (Kobayashi, Nakano et al. 1990). Juntamente com o hCG (gonadotrofina derivada da placenta), esses hormônios regulam a produção de andrógenos, estrógenos, progesterona, oogênese, espermatogênese e também a manutenção da fase inicial da gestação (Mihm, Gangooly et al. 2011).

Baseado na análise de vários estudos, nessa etapa, a quantidade de folículos recrutados considerada adequada, seria em torno de dez folículos por ovário (Hodgen 1982; Pache, Wladimiroff et al. 1990). Esse critério será importante para entendermos os conceitos de reserva ovariana e hiperestímulo ovariano que serão abordados no próximo item, "Indução da Ovulação na FIV".

Com o recrutamento folicular ocorre a progressiva queda dos níveis de FSH induzida pelo do retrocontrole negativo realizado pela inibina B e estradiol, produzidos pelos folículos em recrutamento e em maior quantidade pelo folículo dominante. Nessa etapa todos os folículos entrarão na fase de atresia, à exceção do folículo com maior responsividade ao FSH que será selecionado como folículo dominante. (Zelevnik and Kubik 1986). As células da granulosa dos folículos antrais com maior nível de maturação passam a ser responsivas não só ao FSH mas também ao LH , o qual é indispensável no processo de seleção monofolicular e dominância do ciclo ovulatório.

Estruturalmente as três gonadotrofinas (LH, FSH e hCG) têm em comum a subunidade α e são diferenciadas pela subunidade β específica. Os receptores do LH reconhecem também o hCG enquanto que os receptores do FSH são específicos para o mesmo (Choi and Smitz 2014).

2.3 INDUÇÃO DA OVULAÇÃO NA FERTILIZAÇÃO IN VITRO

Na fertilização in vitro o estímulo ovariano é realizado pela administração de gonadotrofinas exógenas. Como já foi abordado, as atuais formulações incluem diferentes combinações de LH, FSH e hCG.

Desde 1928 quando o primeiro estímulo ovariano foi utilizado com gonadotrofinas extraídas da urina de mulheres grávidas várias formulações foram desenvolvidas existindo atualmente várias opções, entre as mais empregadas podemos destacar a gonadotrofina menopausal humana (hMG), o FSH purificado (FSH-P), o FSH altamente purificado (FSH-HP) e o FSH recombinante (FSHr). Nosso trabalho visa comparar o uso de hMG e FSHr , visto que são as opções para estímulo ovariano mais utilizadas atualmente.

As gonadotrofinas utilizadas no estímulo ovariano são administradas seguindo diversos tipos de protocolos de indução da ovulação. Abordaremos o protocolo que faz uso do GnRH antagonista como bloqueador da luteinização precoce. Nesse protocolo as gonadotrofinas (hMG ou FSHr) são administradas diariamente pela via subcutânea por um período médio de 10 a 14 dias variando de acordo com a duração do ciclo menstrual usual de cada paciente.

Esse estímulo visa a obtenção do maior número possível de oócitos maduros, em metáfase II (MII), sendo necessário para isso a realização de um hiperestímulo ovariano controlado. Durante a monitoração desse hiperestímulo, há a preocupação em evitar que ocorra a síndrome do hiper estímulo ovariano (*ovarian hiper stimulation syndrom - OHSS*) condição usualmente auto limitada mas que pode variar de grau leve a grave, podendo requerer até mesmo a internação da paciente em unidades de tratamento intensivo (Al-Inany, Youssef et al. 2011).

Para alcançar um estímulo ovariano adequado e seguro é necessária a análise de alguns parâmetros que irão ajudar a prever riscos e potencial de resposta ao tratamento. Deve ser realizada a avaliação da reserva ovariana, que pode ser feita através de contagem de folículos antrais (CFA) e da dosagem de hormônio antimulleriano (HAM), sempre associados ao principal fator prognóstico que é a idade da paciente (La Marca and Sunkara 2014). Essa análise permite avaliar as chances de resposta ao estímulo ovariano, risco de OHSS e escolha de dose inicial de gonadotrofina a ser empregada. Após iniciado o ciclo, a resposta ao estímulo ovariano é monitorada por ultrassonografias seriadas nas quais são medidos e contados os folículos em crescimento, sendo esses parâmetros utilizados para ajuste de dose e definição do momento certo para coleta dos oócitos por punção ovariana guiada por ecografia transvaginal (Kwan, Bhattacharya et al. 2014).

Um maior número de folículos recrutados visualizado durante a etapa de estímulo é um dos preditores de desfecho positivo ao final do ciclo, pois prevê o número de oócitos passíveis a serem capturados na punção ovariana (Drakeley 2014). Após a etapa de fertilização, outros desfechos que também refletem o grau de sucesso da etapa de estímulo ovariano foram analisados no nosso estudo, sendo eles o número de oócitos em MII, o número de embriões, escore embrionário total e escore do melhor embrião.

A escolha do tipo de gonadotrofina utilizada para o estímulo ovariano tem sido alvo de intenso debate não havendo ainda definição quanto a melhores desfechos na FIV com o uso de hMG ou FSHr. Duas metanálises da Cochrane realizadas em 2003 e 2011 não encontraram diferença nas taxas de gestação

quando comparados hMG e FSHr no protocolo GnRH agonista (Van Wely, Westergaard et al. 2003; Westergaard, Bossuyt et al. 2011). Outros estudos, porém com metodologia e análise estatística inferior, foram realizados comparando as duas gonadotrofinas no protocolo com GnRH antagonista e não foram detectadas diferenças quanto as taxas de gestação (Figen Turkcapar, Seckin et al. 2013). No entanto alguns estudos demonstraram diferença em alguns desfechos clínicos da FIV, como maior número de oócitos capturados e maior número de oócitos maduros a favor do uso do FSHr (Bosch, Vidal et al. 2008).

Assim, para definição do tipo e dose ideal de gonadotrofina utilizada para um adequado estímulo, se tem estudado e testado as várias possíveis combinações de fármacos indutores e bloqueadores da ovulação. Ainda não há consenso sobre qual o protocolo mais eficaz. Essa dificuldade se dá entre outras causas, pela heterogeneidade dos estudos em relação às características do grupo de pacientes (causa de infertilidade, idade, reserva ovariana) além de variações nos tipos de protocolo de FIV em cada estudo. Nosso trabalho avaliou o protocolo que faz uso do antagonista do GnRH, comparando o uso das gonadotrofinas FSHr e hMG quanto aos desfechos clínicos na FIV, tendo como principal desfecho a qualidade embrionária.

2.4 GONADOTROFINA MENOPAUSAL HUMANA (hMG) NA FERTILIZAÇÃO IN VITRO

Na década de 60 foram documentados os primeiros estudos envolvendo o uso de gonadotrofinas extraídas da urina de mulheres menopausadas LH e FSH resultando no composto denominado hMG (Lunenfeld, Rabau et al. 1963). Seu uso inicialmente foi aplicado nos casos de anovulação e logo demonstrou ser um potente estimulador ovariano visto a ocorrência de altas taxas de gestação múltipla e casos de síndrome do hiperestímulo ovariano. O potencial dessas complicações levou à necessidade da realização de monitoramento desse estímulo com adequado ajuste de doses durante o seu uso. Nos anos 70, quando ocorreu o nascimento do primeiro bebê pós FIV, em um ciclo

espontâneo, o hMG começou a ser utilizado como indutor de ovulação nos primeiros protocolos de FIV.

A composição do hMG é feita por FSH e LH bioativos na proporção de 1:1, acrescido de uma pequena porção de hCG necessária pra manutenção dessa bioatividade (Stokman, de Leeuw et al. 1993).

Muitos estudos tem sido realizados para tentar definir o real impacto do LH, ausente nas preparações com FSHr, na resposta ao estímulo ovariano avaliando desfechos foliculares e endócrinos. A maioria dos ensaios clínicos randomizados (ECRs) realizados até então, comparou as diferentes gonadotrofinas no protocolo com agonista GnRH, utilizado há mais tempo. Alguns estudos envolvendo esse protocolo mostraram que o uso do hMG no estímulo ovariano levaria a maiores taxas de nascidos vivos quando comparado com o FSHr. Em 2008 uma metanálise incluiu 12 ensaios clínicos randomizados, totalizando a análise de mais de 3.575 ciclos de FIV e mostrando uma taxa de gestação e de nascidos vivos significativamente maior no grupo que utilizou hMG, sem maior ocorrência de OHSS nesse mesmo grupo. No grupo que fez uso de FSHr foi constatado menor tempo de estímulo, menor dose total de gonadotrofinas e número de embriões significativamente mais baixo (Al-Inany, Abou-Setta et al. 2008) .

Por outro lado, quando se avaliam essas gonadotrofinas no protocolo com GnRH antagonista poucos ECRs são encontrados. Em 2012 foi publicado o maior ECR, até então, que comparou as gonadotrofinas em ciclos com transferência exclusiva de blastocistos. Foram analisados 749 ciclos de FIV sem detecção de diferença quanto às taxas de gestação, no entanto, quanto aos desfechos secundários, foi observado uma maior dosagem dos níveis séricos de FSH, LH e estradiol ao final da indução no grupo hMG enquanto um maior número de folículos com mais de 12 mm no sexto dia de indução e um maior número de oócitos recuperados na punção ovariana foram verificados no grupo FSHr. A dose total de gonadotrofinas utilizada foi maior no grupo hMG e não houve diferença quanto ao número ou qualidade de embriões no estágio de blastocisto no quinto dia após a fertilização (Devroey, Pellicer et al. 2012). Mais uma vez, na análise desses grandes ensaios clínicos, devemos levar em

consideração o conflito de interesses, uma vez que existe o patrocínio de laboratórios.

A atividade do LH parece ser o fator determinante para explicar as diferenças nos desfechos referentes ao hMG, já que o LH influencia diretamente tanto o crescimento como a maturação folicular. Além disso, também temos como diferencial nos compostos de hMG a presença do hCG. Embora esse último hormônio esteja presente em menor proporção, ele tem uma meia vida plasmática mais extensa que a do LH promovendo uma ocupação mais longa e estável dos receptores de LH (Casarini, Lispi et al. 2012). Assim, parte da ação do LH no hMG seria explicada pela presença do hCG, o que nos confere maior complexidade ainda no completo entendimento do mecanismo desses fármacos no estímulo ovariano.

2.5. HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE RECOMBINANTE (FSHr) NA FERTILIZAÇÃO IN VITRO

Embora os princípios fisiológicos nos indiquem que para o adequado recrutamento e crescimento folicular é necessária a atividade conjunta do FSH e LH, o FSHr, no qual não existe a atividade do LH, se mostrou igualmente eficaz na estimulação ovariana (van Wely, Kwan et al. 2012).

O desenvolvimento da técnica do DNA recombinante, possibilitou a identificação da subunidade beta específica do FSH, permitindo seu isolamento no plasma humano, bem como do LH e hCG recombinantes. Com essa técnica, o FSHr teria a vantagem de ser isento de constituintes desnecessários como aminoácidos e peptídeos urinários presentes nas formulações do hMG (Sohrabvand, Sheikhhassani et al. 2012).

No início da década de 90 foram relatados os primeiros casos de sucesso na FIV com o uso de FSHr no estímulo ovariano (Devroey, Van Steirteghem et al. 1992). Desde então, muitos estudos multicêntricos e metanálises incluindo um grande número de pacientes foram realizados e demonstraram sua eficácia e segurança. Duas metanálises publicadas em 2007 falharam em encontrar diferenças relevantes nos desfechos clínicos da FIV em relação a concentração

de LH na fase folicular final ou quando comparando o uso de FSHr isolado em relação a ciclos onde LH exógeno era adicionado (Baruffi, Mauri et al. 2007; Kolibianakis, Kalogeropoulou et al. 2007).

Alguns estudos demonstraram um perfil de maior segurança quanto ao risco de desenvolver OHSS com o uso de FSHr. Uma revisão sistemática da Cochrane realizada em 2000 comparou o uso de FSHr versus hMG em pacientes com síndrome do ovário policístico (SOP), reconhecido fator de risco para OHSS, submetidas ao estímulo ovariano. Foram analisados 14 ensaios clínicos randomizados e constatada uma redução na incidência de OHSS quando utilizado o FSHr na indução da ovulação. Entretanto, não houve diferença quanto à dose de gonadotrofina utilizada ou quanto às taxas de gestação (Nugent, Vandekerckhove et al. 2000).

Em 2010 foi publicado um estudo que comparou hMG e FSHr apenas em pacientes submetidas ao primeiro ciclo de FIV. Foram analisados 1.136 ciclos com uso do protocolo com GnRH agonista, não havendo diferença nas taxas de gestação entre os dois grupos. No entanto, a duração do período de estímulo ovariano e conseqüentemente a dose total de gonadotrofina utilizada no grupo hMG foram significativamente maiores. Um maior número de oócitos capturados e maior número de oócitos em MII foi detectado no grupo FSHr, bem como maior número de embriões e maior qualidade embrionária (Bjercke, Tanbo et al. 2010).

2.5. ESCORE EMBRIONÁRIO

A seleção de embriões com maiores chances de implantação tem fundamental impacto no sucesso do tratamento da FIV. Além da qualidade embrionária ter relação direta com as taxas de gestação (de los Santos, Arroyo et al. 2014), há também a preocupação em limitar o número de embriões transferidos evitando-se a gestação múltipla e todas suas comorbidades (Oron, Son et al. 2014).

Desde o surgimento da FIV vários estudos buscam padronizar a avaliação de embriões baseada na análise de características morfológicas e de desenvolvimento, como simetria de células e fragmentação (Boiso, Veiga et al.

2002). Essa avaliação visa categorizá-los em escalas de qualidade, não havendo ainda consenso sobre qual o melhor esquema de graduação (Racowsky, Vernon et al. 2010).

Um importante estudo publicado em 2001, analisou 1245 embriões em estágio de clivagem concebidos pós FIV com o objetivo de avaliar a habilidade do escore de graduação embrionário em prever a conversão para blastocisto, implantação e gestação. Foi encontrada uma correlação com o escore dado ao embrião no terceiro dia de clivagem e sua evolução para blastocisto. Entre os embriões com pontuação entre 90-100, 64% evoluíram para blastocisto, enquanto os pontuados entre 70-85 tiveram um percentual de evolução para blastocisto de apenas 31% (Fisch, Rodriguez et al. 2001). Esse estudo introduziu o uso do *Graded Embryo Score* (GES) como um eficiente classificador embrionário, amplamente utilizado pelos laboratórios de fertilização in vitro, incluindo o deste trabalho.

O GES avalia a morfologia pronuclear, clivagem precoce e morfologia no terceiro dia após a fertilização, buscando identificar embriões com alto potencial de conversão para blastocisto e por fim, implantação e gestação, graduando os embriões em um escore de 20 a 100 pontos. A capacidade para prever no terceiro dia após fertilização, quais embriões irão evoluir para blastocisto pode diminuir os custos laboratoriais referentes à cultura, incrementar eficiência e possibilitar a criopreservação precoce dos embriões supranumerários (Gardner and Balaban 2006). Desde que embriões com alta pontuação no GES alcancem taxas de implantação e gestação comparáveis às aquelas observadas com a transferência de blastocisto, não se recomenda a transferência de mais de dois embriões com escore 90 – 100. Transferir um único embrião baseado num alto GES pode reduzir as taxas de gestação múltipla em pacientes de alto risco, enquanto transferir 3 ou mais embriões pode ser apropriado em pacientes com somente embriões de baixo escore (van Loendersloot, van Wely et al. 2014).

Poucos estudos compararam as gonadotrofinas no estímulo ovariano tendo como desfecho principal qualidade embrionária. Uma pesquisa comparou os protocolos com GnRH agonista e com GnRH antagonista quanto aos níveis

estradiol no dia da administração do hCG, impacto em qualidade embrionária e taxas de gravidez, no entanto sem diferenciar as pacientes que fizeram de FSHr ou hMG. Foram analisados 350 ciclos de FIV não havendo sido detectada diferença quanto a taxas de gestação. No entanto, analisando o protocolo com GnRH antagonista foi observada uma correlação entre menores níveis de estradiol ao final do estímulo e menor escore embrionário, não encontrando essa relação na avaliação do grupo com GnRH agonista (Taskin, Atabekoglu et al. 2014). Um trabalho anterior também analisou níveis de estradiol ao final do estímulo e desenvolvimento embrionário, comparando pacientes que fizeram uso de FSHr ou hMG nos protocolos de FIV. Foram analisados marcadores de desenvolvimento embrionário em 2132 embriões de pacientes ovodadoras, havendo uma maior proporção de embriões com melhor desempenho evolutivo no grupo com FSHr, bem como maior número de embriões com alto escore e em associação com níveis mais elevados de estradiol. No entanto, apesar do elevado n, trata-se de um estudo retrospectivo (Munoz, Cruz et al. 2012).

Um estudo derivado de um dos maiores ensaios clínicos que compararam as gonadotrofinas FSHr e hMG (Andersen, Devroey et al. 2006), analisou a relação entre essas medicações e a qualidade embrionária em 731 ciclos de FIV. Nesse trabalho 7535 embriões foram avaliados no terceiro dia após a fertilização in vitro. Foi encontrada uma diferença significativa entre os escores de embriões de melhor qualidade com uma proporção de 11,3% entre as usuárias de hMG e de 9% entre as usuárias de FSHr ($P=0,04\%$). As taxas de implantação (48% versus 32%, $P = 0,038$) e de gestação (42% versus 27%, $P = 0.032$) também foram significativamente mais altas no grupo que fez uso de hMG quando comparados os embriões com maior pontuação. O grupo concluiu que houve um impacto das diferentes gonadotrofinas na qualidade embrionária e na capacidade de implantação, porém não devemos deixar de levar em consideração que se trata de um estudo derivado de um grande ECR patrocinado pela indústria farmacêutica (Ziebe, Lundin et al. 2007).

Estudos que comparem diferentes protocolos de gonadotrofinas e desenvolvimento embrionário ainda são muito escassos e sem padronização quanto ao tipo de avaliação embrionária.

Para termos uma ideia de poder estatístico de um estudo clínico, para detectarmos uma diferença entre os grupos de 25 para 20% de taxa de gravidez (20-25% de diferença), necessitaríamos de 1100 pacientes em cada braço do estudo. Nenhum dos ensaios clínicos, encontrados na presente revisão de literatura, comparando essas drogas possuem esse poder. Além disso, no momento do delineamento a escolha do desfecho primário é fundamental. Sub-análises estatísticas podem até apresentar uma diferença entre os grupos, mas não servem para conclusões definitivas se, *a priori*, os investigadores não detectaram esse objetivo antes do início do estudo.

3. JUSTIFICATIVA

Devido à crescente incidência de casais com problemas de infertilidade e o consequente aumento na demanda pela reprodução assistida, mais pesquisas para aprofundar o conhecimento, apurar a técnica e finalmente melhorar os desfechos reprodutivos são necessárias.

Diante da discordância dos resultados, da heterogeneidade dos estudos, do inadequado n da grande maioria dos trabalhos, do viés do patrocínio de laboratórios e da escassez de pesquisas que incluam a análise das diferentes gonadotrofinas no protocolo com antagonista do GnRH na FIV, se faz notável a importância de novos trabalhos nessa área.

Assim, nosso projeto tem o intuito de colaborar para um maior entendimento do mecanismo dessas diferentes medicações no desenvolvimento e recrutamento folicular e consequente repercussão na qualidade embrionária, imprescindível para o sucesso não só da fertilização in vitro mas também para muitos outros tratamentos de infertilidade.

4. HIPÓTESE NULA

O uso do FSHr e do hMG não diferem na indução da ovulação no protocolo com GnRH antagonista em relação à qualidade embrionária.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO PRIMÁRIO:

I – Escore embrionário total

II - Escore de melhor embrião

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:

I – Dose total de gonadotrofina utilizada ao final do estímulo ovariano

II - Número e tamanho de folículos ao final do estímulo ovariano

III – Número de oócitos capturados em MII

IV – Número de embriões

V – Taxas de gestação clínica (B-hCG sérico positivo 12 dias após a transferência do embrião)

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Inany, H. G., A. M. Abou-Setta, et al. (2008). "Efficacy and safety of human menopausal gonadotrophins versus recombinant FSH: a meta-analysis." Reprod Biomed Online **16**(1): 81-88.
- Al-Inany, H. G., M. A. Youssef, et al. (2011). "Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology." Cochrane Database Syst Rev(5): CD001750.
- Andersen, A. N., P. Devroey, et al. (2006). "Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial." Hum Reprod **21**(12): 3217-3227.
- Baruffi, R. L., A. L. Mauri, et al. (2007). "Recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-antagonist protocol: a meta-analysis." Reprod Biomed Online **14**(1): 14-25.
- Bjercke, S., T. Tanbo, et al. (2010). "Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing their first treatment cycle of IVF or ICSI." Acta Obstet Gynecol Scand **89**(8): 1053-1060.
- Boiso, I., A. Veiga, et al. (2002). "Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer." Reprod Biomed Online **5**(3): 328-350.
- Bosch, E., C. Vidal, et al. (2008). "Highly purified hMG versus recombinant FSH in ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists--a randomized study." Hum Reprod **23**(10): 2346-2351.
- Casarini, L., M. Lispi, et al. (2012). "LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signalling." PLoS One **7**(10): e46682.
- Choi, J. and J. Smitz (2014). "Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference." Mol Cell Endocrinol **383**(1-2): 203-213.
- Coomarasamy, A., M. Afnan, et al. (2008). "Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long

- down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis." Hum Reprod **23**(2): 310-315.
- de los Santos, M. J., G. Arroyo, et al. (2014). "A multicenter prospective study to assess the effect of early cleavage on embryo quality, implantation, and live-birth rate." Fertil Steril **101**(4): 981-987.
- Desforges-Bullet, V., C. Gallo, et al. (2010). "Increased anti-Mullerian hormone and decreased FSH levels in follicular fluid obtained in women with polycystic ovaries at the time of follicle puncture for in vitro fertilization." Fertil Steril **94**(1): 198-204.
- Devroey, P., A. Pellicer, et al. (2012). "A randomized assessor-blind trial comparing highly purified hMG and recombinant FSH in a GnRH antagonist cycle with compulsory single-blastocyst transfer." Fertil Steril **97**(3): 561-571.
- Devroey, P., A. Van Steirteghem, et al. (1992). "First singleton term birth after ovarian superovulation with rhFSH." Lancet **340**(8827): 1108-1109.
- Drakeley, A. (2014). "Re: Ultrasound for monitoring controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. W. P. Martins, C. V. R. Vieira, D. M. Teixeira, M. A. P. Barbosa, L. A. Dassuncao and C. O. Nastri. Ultrasound Obstet Gynecol 2014; 43: 25-33." Ultrasound Obstet Gynecol **43**(1): 13.
- Edwards, R. G., P. C. Steptoe, et al. (1980). "Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro." Br J Obstet Gynaecol **87**(9): 737-756.
- Fauser, B. C. (1998). "Developments in human recombinant follicle stimulating hormone technology: are we going in the right direction?" Hum Reprod **13 Suppl 3**: 36-46; discussion 47-51.
- Fauser, B. C. and A. M. Van Heusden (1997). "Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences." Endocr Rev **18**(1): 71-106.
- Figen Turkcapar, A., B. Seckin, et al. (2013). "Human Menopausal Gonadotropin versus Recombinant FSH in Polycystic Ovary Syndrome Patients Undergoing In Vitro Fertilization." Int J Fertil Steril **6**(4): 238-243.

- Fisch, J. D., A. A. Milki, et al. (1999). "Sibling embryo blastocyst development correlates with the in vitro fertilization day 3 embryo transfer pregnancy rate in patients under age 40." Fertil Steril **71**(4): 750-752.
- Fisch, J. D., H. Rodriguez, et al. (2001). "The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos." Hum Reprod **16**(9): 1970-1975.
- Forsdike, S. (1928). "Diagnosis and Treatment of Sterility in Women." Br Med J **2**(3536): 648-652.
- Gardner, D. K. and B. Balaban (2006). "Choosing between day 3 and day 5 embryo transfers." Clin Obstet Gynecol **49**(1): 85-92.
- Gougeon, A. (1986). "Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results." Hum Reprod **1**(2): 81-87.
- Hodgen, G. D. (1982). "The dominant ovarian follicle." Fertil Steril **38**(3): 281-300.
- Kaur, P., M. L. Swarankar, et al. (2014). "A comparative study between cleavage stage embryo transfer at day 3 and blastocyst stage transfer at day 5 in in-vitro fertilization/intra-cytoplasmic sperm injection on clinical pregnancy rates." J Hum Reprod Sci **7**(3): 194-197.
- Kobayashi, M., R. Nakano, et al. (1990). "Immunohistochemical localization of pituitary gonadotrophins and gonadal steroids confirms the 'two-cell, two-gonadotrophin' hypothesis of steroidogenesis in the human ovary." J Endocrinol **126**(3): 483-488.
- Kolibianakis, E. M., L. Kalogeropoulou, et al. (2007). "Among patients treated with FSH and GnRH analogues for in vitro fertilization, is the addition of recombinant LH associated with the probability of live birth? A systematic review and meta-analysis." Hum Reprod Update **13**(5): 445-452.
- Kupka, M. S., A. P. Ferraretti, et al. (2014). "Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHREdagger." Hum Reprod **29**(10): 2099-2113.
- Kwan, I., S. Bhattacharya, et al. (2014). "Monitoring of stimulated cycles in assisted reproduction (IVF and ICSI)." Cochrane Database Syst Rev **8**: CD005289.

- La Marca, A. and S. K. Sunkara (2014). "Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice." Hum Reprod Update **20**(1): 124-140.
- Lunenfeld, B., E. Rabau, et al. (1963). "[Treatment of amenorrhea by gonadotropic substances from women's urine]." Harefuah **64**: 289-292.
- Mihm, M., S. Gangooly, et al. (2011). "The normal menstrual cycle in women." Anim Reprod Sci **124**(3-4): 229-236.
- Munoz, M., M. Cruz, et al. (2012). "Dose of recombinant FSH and oestradiol concentration on day of HCG affect embryo development kinetics." Reprod Biomed Online **25**(4): 382-389.
- Nugent, D., P. Vandekerckhove, et al. (2000). "Gonadotrophin therapy for ovulation induction in subfertility associated with polycystic ovary syndrome." Cochrane Database Syst Rev(4): CD000410.
- Oron, G., W. Y. Son, et al. (2014). "The association between embryo quality and perinatal outcome of singletons born after single embryo transfers: a pilot study." Hum Reprod **29**(7): 1444-1451.
- Pache, T. D., J. W. Wladimiroff, et al. (1990). "Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle." Fertil Steril **54**(4): 638-642.
- Racowsky, C., M. Vernon, et al. (2010). "Standardization of grading embryo morphology." Fertil Steril **94**(3): 1152-1153.
- Rodgers, R. J., H. F. Irving-Rodgers, et al. (2001). "Dynamics of the membrana granulosa during expansion of the ovarian follicular antrum." Mol Cell Endocrinol **171**(1-2): 41-48.
- Scholtes, M. C. and G. H. Zeilmaker (1996). "A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization." Fertil Steril **65**(6): 1245-1248.
- Slama, R., O. K. Hansen, et al. (2012). "Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis." Hum Reprod **27**(5): 1489-1498.
- Sohrabvand, F., S. Sheikhhassani, et al. (2012). "Comparison of highly purified urinary versus recombinant FSH: Effect on ART outcomes in polycystic ovary syndrome." Iran J Reprod Med **10**(3): 229-236.

- Stephens, P. C. and R. G. Edwards (1978). "Birth after the reimplantation of a human embryo." Lancet **2**(8085): 366.
- Stokman, P. G., R. de Leeuw, et al. (1993). "Human chorionic gonadotropin in commercial human menopausal gonadotropin preparations." Fertil Steril **60**(1): 175-178.
- Taskin, E. A., C. S. Atabekoglu, et al. (2014). "Association of serum estradiol levels on the day of hCG administration with pregnancy rates and embryo scores in fresh ICSI/ET cycles down regulated with either GnRH agonists or GnRH antagonists." Arch Gynecol Obstet **289**(2): 399-405.
- van Wely, M., I. Kwan, et al. (2011). "Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles." Cochrane Database Syst Rev(2): CD005354.
- van Wely, M., I. Kwan, et al. (2012). "Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. A Cochrane review." Hum Reprod Update **18**(2): 111.
- Van Wely, M., L. G. Westergaard, et al. (2003). "Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle stimulation hormone for ovarian stimulation in assisted reproductive cycles." Cochrane Database Syst Rev(1): CD003973.
- Westergaard, C. G., A. G. Byskov, et al. (2007). "Morphometric characteristics of the primordial to primary follicle transition in the human ovary in relation to age." Hum Reprod **22**(8): 2225-2231.
- Westergaard, L. W., P. M. Bossuyt, et al. (2011). "WITHDRAWN: Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle stimulation hormone for ovarian stimulation in assisted reproductive cycles." Cochrane Database Syst Rev(2): CD003973.
- Xiao, J., S. Chang, et al. (2013). "The effectiveness of gonadotropin-releasing hormone antagonist in poor ovarian responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis." Fertil Steril **100**(6): 1594-1601 e1591-1599.
- Zelevnik, A. J. and C. J. Kubik (1986). "Ovarian responses in macaques to pulsatile infusion of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone: increased sensitivity of the maturing follicle to FSH." Endocrinology **119**(5): 2025-2032.

Ziebe, S., K. Lundin, et al. (2007). "Influence of ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patients undergoing IVF." Hum Reprod **22**(9): 2404-2413.

7. ARTIGO

Title Page

Title: Randomized controlled trial comparing embryonic quality in rFSH versus hMG IVF protocols with GnRH Antagonist

Running title: Comparing rFSH and hMG in embryonic quality

Authors:

*Rita de Cassia Borges Chapon – MD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Daniela Scherer da Silva – MD, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Emily De Conto - MD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Vanessa Krebs Genro – MD, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Carlos Augusto Bastos de Souza – MD, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

João Sabino Lahorgue da Cunha Filho – MD, PhD, Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding Author: rchapon@gmail.com

Journal

Este artigo será submetido à avaliação da revista “ *Human Reproduction - Online ISSN 1460-2350* ”.

Abstract

Objective: To compare embryonic quality and other clinical outcomes when using human menopause gonadotropin (hMG) or recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) to the ovarian stimulation in IVF cycles with the GnRH antagonist protocol.

Design : Open randomized single center study with infertile patients submitted to IVF comparing IVF outcomes between hMG and rFSH when controlled with GnRH antagonist.

Setting: A single private center of reproductive medicine in association with *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*.

Patients: Infertile women with normal ovarian reserve with IVF indication.

Intervention: The patients were randomized in two groups, 85 received rFSH and 83 received hMG to ovulation induction, both groups used GnRH antagonist to prevent ovulation.

Main Outcome Measure: Total embryonic score and best embryonic score.

Secondary outcomes: Total dose of gonadotropins, number and size of follicles in the end of the stimulation, number of mature oocytes, number of embryos, pregnancy rates.

Results: We found a significant difference in the score of the best embryo (77,33 x 65,07 p= 0,03) for the rFSH group and no difference in the total embryonic score (214.01 x 170.43, rFSH and hMG respectively, p =0.13). The number of embryos also differed (4,17 x 3,26 p=0,04) with higher values for

rFSH group. There was no statistical difference in pregnancy rates (31.7% x 30.6%, rFSH and hMG respectively, $p= 0,87$). No differences were found regarding the total dose of gonadotropins used, number and size of follicles or number of mature oocytes.

Conclusions: We observed a higher score of quality of the best embryo and a higher number of embryos in the group that used rFSH. The gonadotropins rFSH and hMG had the same efficacy when analyzing pregnancy rates in GnRH antagonist IVF protocol. There might exist some impact of LH in embryo quality, further studies are needed to better clarify this hypothesis.

Key Words: Infertility, in vitro stimulation, rFSH, hMG, GnRH antagonist, embryonic score

Introduction

The specific action of each gonadotropin in the folliculogenesis is still not completely understood. The difficulty to understand their differences is even greater when we verify the heterogeneity of the studies regarding the design, group of patients and the type of protocol used to prevent the ovulation (GnRH agonist or GnRH antagonist). Because the GnRH agonist was the first analog to be used in IVF cycles, there are more studies with this protocol. In recent years the GnRH antagonist has been even more utilized in IVF protocols, but there are a poor number of studies comparing rFSH and hMG when this protocol is used.

Some studies have demonstrated differences in clinical IVF outcomes, such as number of oocytes retrieved and number or quality of embryos when comparing FSHr and hMG in the ovarian stimulation. A correlation between the number of

retrieved oocytes (Bosch, Vidal et al. 2008) and a higher number of embryos (Bjercke, Tanbo et al. 2010) when using the FSHr have already been detected in some studies, but without detectable difference in the pregnancy rates.

Other researches demonstrated opposite results with better outcomes with hMG. In 2008 a metanalysis compared hMG and rFSH in the long GnRH agonist protocol. They analyzed seven randomized trials including 2259 IVF cycles and found a significant increase in live birth rate with hMG when compared to rFSH, with a relative risk of 1.18. (Coomarasamy, Afnan et al. 2008). None of these seven trials individually showed a statistically significant benefit towards hMG, although five of them showed a trend in favor of hMG.

Besides the lower number and heterogeneity of studies analyzing the GnRH antagonist protocol, we verify that most of the works are not well delineated. Most of these studies has used pregnancy rates as a major outcome, even when they do not enroll a significant number of patients to find statistical differences in the results. Thus resulting in an underpowered status, since the number of patients needed to find statistical differences in these outcomes would be 2400, what we did not find in this literature review. Hence, the few studies that enrolled a higher number of patients declare themselves sponsored by the pharmaceutical industry (Andersen, Devroey et al. 2006).

As embryonic quality is considered to be in direct correlation with pregnancy rates, we chose to set it as our major outcome. Few studies have compared this relevant predictor of IVF success and also, the number of patients needed to achieve a high statistical power is lower than the number needed to find

differences when comparing pregnancy rates, what makes it suitable for our research center.

Considering the controversial results until now and the lack of knowledge in this important field of reproductive techniques, we aim to better understand the differences in ovarian stimulation comparing embryonic quality with rFSH and hMG in GnRH antagonist protocol in IVF.

Materials and Methods

Design

It was conducted a randomized, open-label, single-center controlled study to compare hMG (Menopur®, Ferring Pharmaceuticals, Denmark) and rFSH (Puregon®, Organon Ltd., Irlanda) in patients undergoing ovarian stimulation for IVF / ICSI with the use of GnRH antagonist protocol. Patients were randomized 1:1 to receive rFSH or hMG according to randomized cards inside a black envelope with the name of the respective treatment. The present study was included in the Clinical Trials protocol registration system - NCT01946022.

Patients and Sample Size Estimation

Infertile patients from a single center of reproductive medicine with indication of IVF were randomized to receive hMG or rFSH to ovarian stimulation. The patients that met all the inclusion criteria including normal ovarian reserve (FSH <10; HAM between 1 and 3 ; AFC >12) and regular menses (25 -35 days) were

invited to participate in the study. The patients were excluded if they had endocrine pathologies, severe masculine factor (azoospermia) or ovarian cysts.

The sample size was estimated using a significance level of 0.05 and a power of 80% to detect a relevant difference in the embryonic quality between groups. It was based on previous study *“Highly purified hMG versus recombinant FSH in ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists – a randomized study. E. Bosch et al; Human Reproduction, 2008”* (Bosch, Vidal et al. 2008).

The study started after the approval of the Ethical Comitee. All patients where informed that the study would not interfere or present any risks for their treatment.

Intervention and Protocol

All the patients have had their ovarian reserve analyzed (HAM and AFC) and an ultrasound performed to exclude ovarian cysts and other pelvic abnormalities prior to start the treatment. Next the complete evaluation, the patients were asked to schedule an ultrasound in the beginning of the menstrual cycle (first three days). At this time, the patients started the ovarian stimulation with the previous randomized selected gonadotropin (rFSH or hMG) using a dose between 150 – 300 IU according with their AMH and AFC. This dose was maintained until day 6 of stimulation, when a second ultrasound was performed and the GnRH antagonist (0,25mg Ganirelix , Orgalutran ® Merck Sharp & Dohme, Australia) was initiated and continued until the end of the cycle. Seriated ultrasounds were performed every other day and the hCG (human chorionic gonadotropin, 5,000 IU Choriomon ® IBSA Institut Biochimique S.A. , Switzerland) was administered when at least three follicles reached the size of

17 mm in diameter. The oocyte retrieval was conducted 36 hours after the hCG administration.

The embryo evaluation was performed on day three after fertilization based on the Graduated Embryo Score (GES), (Fisch, Rodriguez et al. 2001). Three evaluations were performed occurring at 16 – 18 hours, 25 – 27 hours and 64 – 67 hours post insemination, by the same embryologist who was blinded for the intervention. The score was composed by the following criteria: nucleolar alignment along pronuclear axis, regular cleavage and degree of fragmentation at the first cell division, and cell number and morphology on day 3 after insemination. The maximum score was 100 (Fisch, Rodriguez et al. 2001). The total score was calculated by sum of embryo scores. The embryo transfer was conducted in the day 3 or 5, regarding the embryonic quality. The patients were advised to complete a pregnancy test done 12 days after the embryo transfer.

All of the data outcome (dose of gonadotropins, number and size of follicles, number and score of embryos) were registered during the cycles by a restricted and trained team of three doctors and two embryologists .

This research was not sponsored by the pharmaceutical industry.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using the SPSS 20 program, applying the T student –test for independent samples and the Levene test for equality of variances.

Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) for continuous variables, and as the mean and 95% confidence interval (95%CI) for categorical values.

Results

It was accessed to eligibility 265 patients, 77 were excluded because did not fulfill the inclusion criteria or did not want to participate in the study. It was randomized 188 patients, 85 patients were allocated to rFSH group and 83 patients to hMG group (Figure 1). There were no relevant differences in the demographic characteristics including mean age, body mass index (BMI) and ovarian reserve tests (Table I).

The major causes of infertility were tubal factor (35,7%), masculine factor excluding azoospermia (33,3%) and endometriosis (30,9%), without difference in the distribution between the studied groups.

All the patients had at least one embryo transferred on day 3. The maximum number of embryos to be transferred was decided in accordance to the wishes of the patient and her age. Patients under 30 years had only 1 embryo transferred, 31 to 35 years 1 to 2, over 36 years 1 to 3.

The total embryo score was the same for both groups but the best embryo score was significant higher for the rFSH group (77.33 ± 34.0 x 65.07 ± 33.2 $p = 0.03$). The total number of embryos was statistic different also in favor of the rFSH group ($4,17 \pm 3.1$ x 3.26 ± 2.4 $p = 0.04$).

The ovarian stimulation outcomes are shown in Table II. Difference in pregnancy rates was not observed with 27 (31%) and 25 (30.1%) pregnancies

for rFSH and hMG respectively ($p = 0.87$). Considering the others secondary outcomes, the total dose of administered gonadotropins, number of MII oocytes and size of follicles, no statistical difference was observed.

Discussion

Many studies have compared rFSH and hMG in IVF cycles regarding their effectiveness in ovarian stimulation. As hMG has a different composition, the presence of LH, it has been speculated that this would affect the outcomes in follicular recruitment, follicular growth, number and quality of embryos and finally , pregnancy rates.

There are few studies comparing rFSH and hMG for IVF with the GnRH antagonist protocol. Our group found some statistical differences in the pattern of ovarian stimulation of these two gonadotropins. We observed a higher number of embryos in the rFSH group as a best score of embryo quality in this same group despite the fact that no difference was detected in the number of retrieved MII oocytes. This could reflect a role of the LH activity in the follicular phase that may cause some impact in oocyte quality. It is already known that the LH is involved in the process of oocyte atresia, so this mechanism could also interfere in oocyte quality and thereafter in embryo quality.

Our findings are in accordance to the first clinical randomized trial that compared rFSH and hMG in GnRH antagonist cycles (Bosch, Vidal et al. 2008). They observed a lower number of oocytes retrieved with a mean difference of 3.1 in favor of hMG group and also a lower number of MII oocytes with a mean difference of 1.9, in the same group. The lower number of retrieved oocytes in hMG group was also explained by the LH effect during follicular phase and its

involvement in the atresia process. They found no differences in pregnancy rates.

These findings also coincides with studies that included the GnRH agonist protocol, including the Merit study (Andersen, Devroey et al. 2006) that analyzed 731 IVF cycles with a significant higher number of oocytes retrieved in the rFSH group. Despite the lower number of oocytes in the hMG group, and differently from our findings, they detected a best embryonic quality in this group. The influence of the long agonist protocol, that causes a more intense pituitary suppression than the GnRH antagonist, could have interfered in this controversial result. Although all this differences were observed, the pregnancies rates did not differed between rFSH or hMG and the study declared sponsored by pharmaceutical industry.

Our study found similar pregnancy rates for both groups, which is in accordance with the few studies that have included this specific IVF protocol (Bosch, Vidal et al. 2008; Devroey, Pellicer et al. 2012). Although the efficacy of both drugs did not differ, we found some particularities in their profile of ovarian stimulation that need to be better understood and will be further discussed.

The variability of IVF protocols and patients profile has complicated the studies in this field. Most of these studies included patients that used the GnRH agonist protocol, mainly the long protocol (Al-Inany 2000; Andersen, Devroey et al. 2006; Bjercke, Tanbo et al. 2010). The results are very controversial in terms of hormonal profile during the ovarian stimulation with some differences in follicular recruitment and embryonic quality . Platteau, in 2004, analyzed 727 IVF cycles with the GnRH agonist protocol and observed more oocytes

retrieved in the rFSH group despite a significant more positive beta-hCG test in the hMG group of IVF patients . This result was not observed in the subgroup analysis of the patients submitted to ICSI (Platteau, Smitz et al. 2004). They speculate that the LH activity could have a beneficial effect on the pregnancy rates in women undergoing IVF, when the female factor is the main cause of infertility.

Our study was conducted in a single center with a restricted number of researchers which gives the advantage of avoiding potential confounding factors and bias such as dose adjustment policy, ultrasound measures and embryo asses criteria. We intended to minimize the bias of the hormonal profile of the patients in the influence of the response to exogenous gonadotropins, so we included only women with regular menses, normal ovarian reserve tests and no endocrine pathologies.

There is a lack of information regarding if the LH activity in ovarian stimulation preparations improves or does not improve the outcomes in IVF. Is it beneficial for some specific population? A Cochane systematic review in 2007 analyzed 14 clinical trials (eleven of them using the GnRH agonist), including a total of 2612 patients and they compared rFSH versus rFSH plus recombinant LH (rLH) . There was no statistical difference in pregnancy rates, but three trials, that included only poor responders, showed significant increase in pregnancy rate, in favour of the co-administration of rLH (Mochtar, Van der et al. 2007).

All these findings needed to be confirmed so we could ask new questions in order to discover if it would be helpfull to add rLH or even hCG to rFSH to achieve better results, or if some specific population would benefit from this new

approach. In the future this would allow to individualize the use of gonadotropins and optimize this very important step in the IVF.

In conclusion, we had results that statistically differed in the number of embryos and best embryonic score in favor of the rFSH group. We suppose that gonadotropins might have some impact in oocyte and embryo quality, maybe because of some interference of the LH presence in hMG preparations. Further studies are needed to better explain these findings.

References

- Al-Inany, H. G. (2000). "Abstract format in the new millennium: time to pay more attention." Acta Obstet Gynecol Scand **79**(9): 810-811.
- Al-Inany, H. G., M. A. Youssef, et al. (2011). "Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology." Cochrane Database Syst Rev(5): CD001750.
- Andersen, A. N., P. Devroey, et al. (2006). "Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial." Hum Reprod **21**(12): 3217-3227.
- Baruffi, R. L., A. L. Mauri, et al. (2007). "Recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-antagonist protocol: a meta-analysis." Reprod Biomed Online **14**(1): 14-25.
- Bjercke, S., T. Tanbo, et al. (2010). "Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing their first treatment cycle of IVF or ICSI." Acta Obstet Gynecol Scand **89**(8): 1053-1060.
- Bosch, E., C. Vidal, et al. (2008). "Highly purified hMG versus recombinant FSH in ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists--a randomized study." Hum Reprod **23**(10): 2346-2351.
- Casarini, L., M. Lispi, et al. (2012). "LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signalling." PLoS One **7**(10): e46682.
- Choi, J. and J. Smitz (2014). "Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference." Mol Cell Endocrinol **383**(1-2): 203-213.
- Coomarasamy, A., M. Afnan, et al. (2008). "Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis." Hum Reprod **23**(2): 310-315.
- Devroey, P., A. Pellicer, et al. (2012). "A randomized assessor-blind trial comparing highly purified hMG and recombinant FSH in a GnRH

- antagonist cycle with compulsory single-blastocyst transfer." Fertil Steril **97**(3): 561-571.
- Devroey, P., A. Van Steirteghem, et al. (1992). "First singleton term birth after ovarian superovulation with rhFSH." Lancet **340**(8827): 1108-1109.
- Drakeley, A. (2014). "Re: Ultrasound for monitoring controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. W. P. Martins, C. V. R. Vieira, D. M. Teixeira, M. A. P. Barbosa, L. A. Dassuncao and C. O. Nastri. Ultrasound Obstet Gynecol 2014; 43: 25-33." Ultrasound Obstet Gynecol **43**(1): 13.
- Fisch, J. D., H. Rodriguez, et al. (2001). "The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos." Hum Reprod **16**(9): 1970-1975.
- Forsdike, S. (1928). "Diagnosis and Treatment of Sterility in Women." Br Med J **2**(3536): 648-652.
- Gardner, D. K. and B. Balaban (2006). "Choosing between day 3 and day 5 embryo transfers." Clin Obstet Gynecol **49**(1): 85-92.
- Gougeon, A. (1986). "Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results." Hum Reprod **1**(2): 81-87.
- Mochtar, M. H., V. Van der, et al. (2007). "Recombinant Luteinizing Hormone (rLH) for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles." Cochrane Database Syst Rev(2): CD005070.
- Munoz, M., M. Cruz, et al. (2012). "Dose of recombinant FSH and oestradiol concentration on day of HCG affect embryo development kinetics." Reprod Biomed Online **25**(4): 382-389.
- Nugent, D., P. Vandekerckhove, et al. (2000). "Gonadotrophin therapy for ovulation induction in subfertility associated with polycystic ovary syndrome." Cochrane Database Syst Rev(4): CD000410.
- Oron, G., W. Y. Son, et al. (2014). "The association between embryo quality and perinatal outcome of singletons born after single embryo transfers: a pilot study." Hum Reprod **29**(7): 1444-1451.
- Platteau, P., J. Smitz, et al. (2004). "Exogenous luteinizing hormone activity may influence the treatment outcome in in vitro fertilization but not in intracytoplasmic sperm injection cycles." Fertil Steril **81**(5): 1401-1404.
- van Loendersloot, L., M. van Wely, et al. (2014). "Selection of embryos for transfer in IVF: ranking embryos based on their implantation potential using morphological scoring." Reprod Biomed Online **29**(2): 222-230.
- Westergaard, L. W., P. M. Bossuyt, et al. (2011). "WITHDRAWN: Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle stimulation hormone for ovarian stimulation in assisted reproductive cycles." Cochrane Database Syst Rev(2): CD003973.
- Xiao, J., S. Chang, et al. (2013). "The effectiveness of gonadotropin-releasing hormone antagonist in poor ovarian responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis." Fertil Steril **100**(6): 1594-1601 e1591-1599.
- Zelevnik, A. J. and C. J. Kubik (1986). "Ovarian responses in macaques to pulsatile infusion of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone: increased sensitivity of the maturing follicle to FSH." Endocrinology **119**(5): 2025-2032.

Ziebe, S., K. Lundin, et al. (2007). "Influence of ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patients undergoing IVF." Hum Reprod **22**(9): 2404-2413.

Figure I: CONSORT statement flow diagram

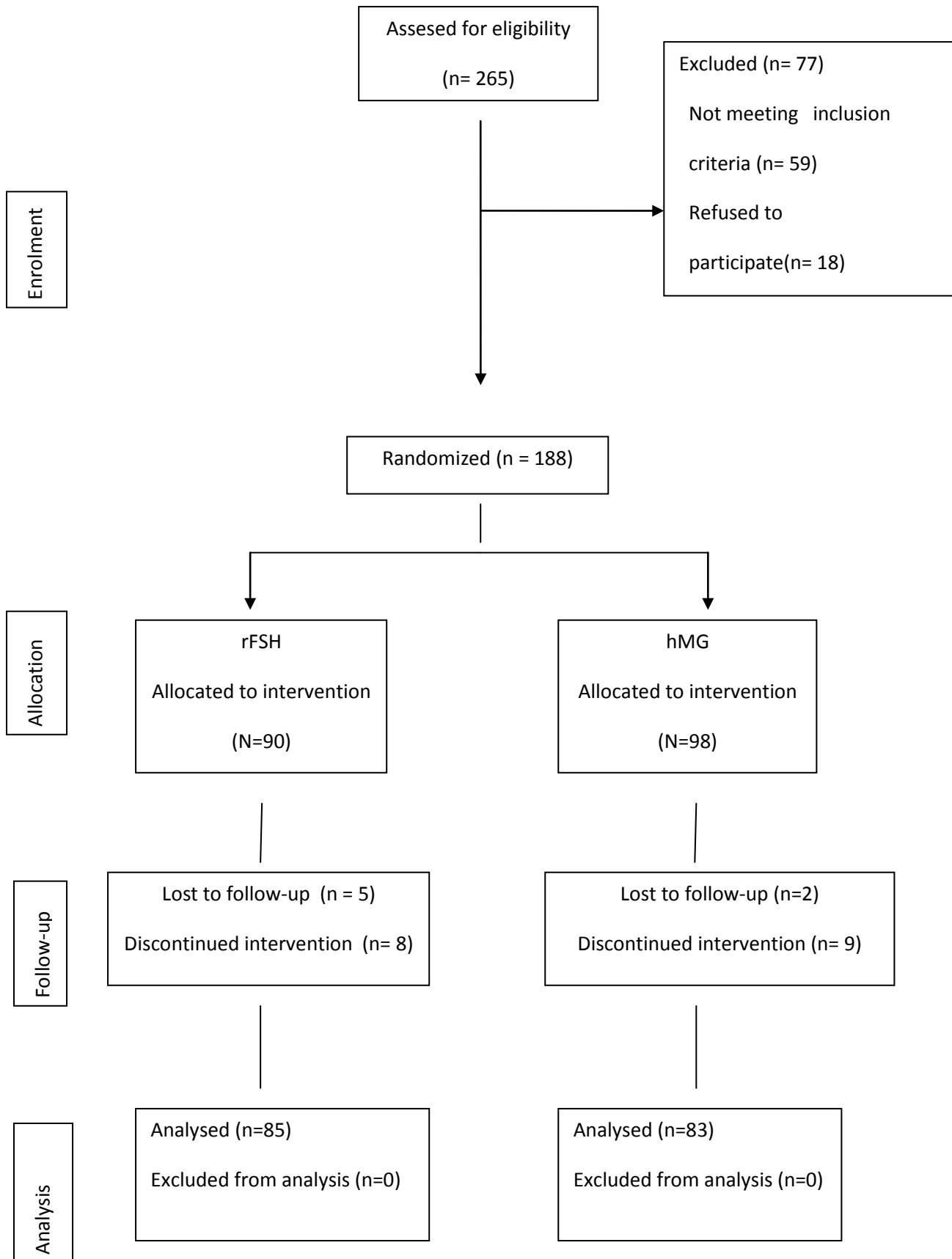


Table I – Baseline characteristics (values expressed by mean \pm Standard Deviation, and number (%) for categorical variables).

Baseline Parameters	rFSH (n=85)	hMG (n=83)
Age (years)	34.4 (\pm 2.5)	34.9 (\pm 2.3)
HAM (ng/ml)	4.3 (\pm 3.3)	3.5 (\pm 3.1)
FSH (mUI/l)	7.1(\pm 2.3)	6.4 (\pm 2.0)
AFC	12 (\pm 1.7)	14 (\pm 1.5)
BMI (m/ Kg²)	24.4 (\pm 1.6)	23.7 (\pm 1.8)
Primary cause of infertility		
Male Factor	29 (34.1%)	27 (32.5%)
Tubal Infertility	28 (32.9%)	32 (38.5%)
Endometriosis	28 (32.9%)	24 (28.9%)

Table II – Ovarian stimulation outcome (values expressed by mean ± SD).

	rFSH (n=85)	hMG (n=83)	P - value
Total gonadotrofin dose (IU)	3033 (± 663.5)	2976 (± 628.4)	0.58
Follicles 13-14 mm	0.99 (± 0.99)	1.01 (± 1.0)	0.92
Follicles 15-16 mm	3.45 (± 3.0)	3.62 (± 3.3)	0.73
Follicles >=17mm	5.24 (± 3.4)	4.76 (± 3.0)	0.35
Number of metaphase II	6.12 (± 3.1)	5.35 (± 2.5)	0.08
Number of embryos	4.17 (± 3.1)	3.26 (± 2.4)	0.04
Total embryo score	214.01 (± 162.4)	170.43 (± 176.6)	0.13
Best embryo score	77.33 (± 34.0)	65.07 (± 33.2)	0.03
Clinical pregnancy / randomized patient	27/85 (31.7%)	25/83 (30.1%)	0.87

CONCLUSÕES

Com base nos nossos resultados podemos concluir que:

Mulheres que usaram FSHr na sua indução para ovulação para FIV obtiveram maior escore médio de melhor embrião se comparado ao das mulheres que usaram hMG.

No entanto, não foi constatada diferença no escore embrionário total entre os dois grupos (FSH versus hMG).

A utilização de FSHr na indução da ovulação com uso de antagonista do GnRH também provoca um maior número de embriões viáveis para transferência, se compararmos aquelas mulheres que usaram apenas hMG.

Não houve diferença significativa no número de oócitos coletados entre os grupos, assim como no desenvolvimento da coorte folicular (medida pelo número e quantidade de folículos com mais de 12 mm no dia da administração do hCG).

A dose total de gonadotrofinas utilizada no estímulo ovariano não diferiu entre os grupos

As taxas de gestação foram semelhantes entre os dois grupos de pacientes.

PERSPECTIVAS

Não existem evidências sobre qual o melhor protocolo de indução da ovulação, supomos que o avanço das pesquisas será rumo à individualização do tratamento, de acordo com as diferentes causas de infertilidade, reserva ovariana e idade entre outras características pertinentes de cada paciente.

A partir dos resultados apresentados e atualizando a revisão da literatura, nosso grupo pretende aprofundar a análise das diferenças encontradas em relação à qualidade embrionária.

O estudo do mecanismo intracelular e da expressão gênica das células da granulosa, as quais provavelmente sofrem diferentes influências das duas gonadotrofinas utilizadas, nos parece ser um caminho interessante para melhor elucidar nossos achados.

Prevemos seguir com estudos originais em relação ao metabolismo hormonal intrafolicular para melhor compreender a ação das gonadotrofinas no estímulo ovariano.

Anexo 1 . Escore de graduação embrionário

Avaliação	Horas após inseminação	Parâmetro de desenvolvimento	Escore
1	16 – 18	Alinhamento do nucléolo ao longo do eixo pronuclear	20
2	25 – 27	Clivagem regular e simetria	30
		Fragmentação: ^a	
		ausente	30
		< 20%	25
		> 20%	0
3	64 – 67	Número de células e grau ^b :	
		7, I; 8, I; 9, I	20
		7, II; 9 II; 10, I; 11, I;	10
Escore total			100

^a: Se não houve clivagem até 25 – 27 horas, o grau de fragmentação foi avaliado no tempo 64 – 67 horas.

^b: Grau 1: blastômeros simétricos e ausência de fragmentação; grau 2: blastômeros desiguais/irregulares e fragmentação < 20%; grau 3: blastômeros irregulares e fragmentação > 20%. Modificado de Fisch, J. D., H. Rodriguez, et al. (2001). "The Graduated Embryo Score (Desforges-Bullet, Gallo et al.) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos." Hum Reprod **16**(9): 1970-5.

Apêndice 1: Fotos de embriões com as respectivas pontuações.



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



(g)

(a) Embrião de 20 pontos. Apresentou 2 pronúcleos entre 16-18 horas pós inseminação. Houve fragmentação após esse período. (b) Embrião de 40 pontos. (c) Embrião de 60 pontos. (d) Embrião de 80 pontos. (e) (f) (g) Embriões de 100 pontos.

Créditos: Daniela Scherer da Silva, Médica Veterinária, Embriologista do Centro de Reprodução Humana Insemine.

Apêndice 2: Protocolo de manipulação dos embriões.

Procedimento de Inseminação

1. Inseminar cada gota de 100µL (5 oócitos por gota) da placa de FIV, onde estão os oócitos, com cerca de 100000 espermatozóides (150000 no máximo), em um volume máximo de 4µl, sob lupa estereomicroscópica.

2. Incubar a placa (atmosfera a 6,0% de CO₂ em ar, 37°C e 100% de umidade relativa do ar) no intervalo de 5 – 18 horas.

Procedimento de Cultivo

1. Preparar no dia anterior à punção: placa de lavagem (placa de 60x15mm, com 9 gotas de 100µl de G1 PLUS, sob óleo mineral; placa de inseminação (placa de 60x15mm, com 6 gotas de 100µl de G-IVF PLUS, sob óleo mineral); equilibrar o meio e as gotas, em atmosfera a 6,0% de CO₂ em ar, a 37°C e 100% de umidade relativa do ar, no dia anterior a utilização.

2. Passar os oócitos, pelas gotas de lavagem com auxílio de estripper.

3. Dissociar sob lupa, as células da corona com ajuda do stripper.

4. Colocar cada oócito desnudo em cada gota da placa de CIV.

Avaliação da Fecundação

1. Observar os oócitos inseminados cerca de 16-18 horas após inseminação.

2. Avaliar a fecundação identificando a presença de 2 pronúcleos (PN) e a presença de 2 corpúsculos polares no espaço perivitelino conforme critério de pontos (Desforges-Bullet, Gallo et al.).

3. Separar os oócitos sem PN ou zigotos com número diferente de 2 PN.

Incubar.

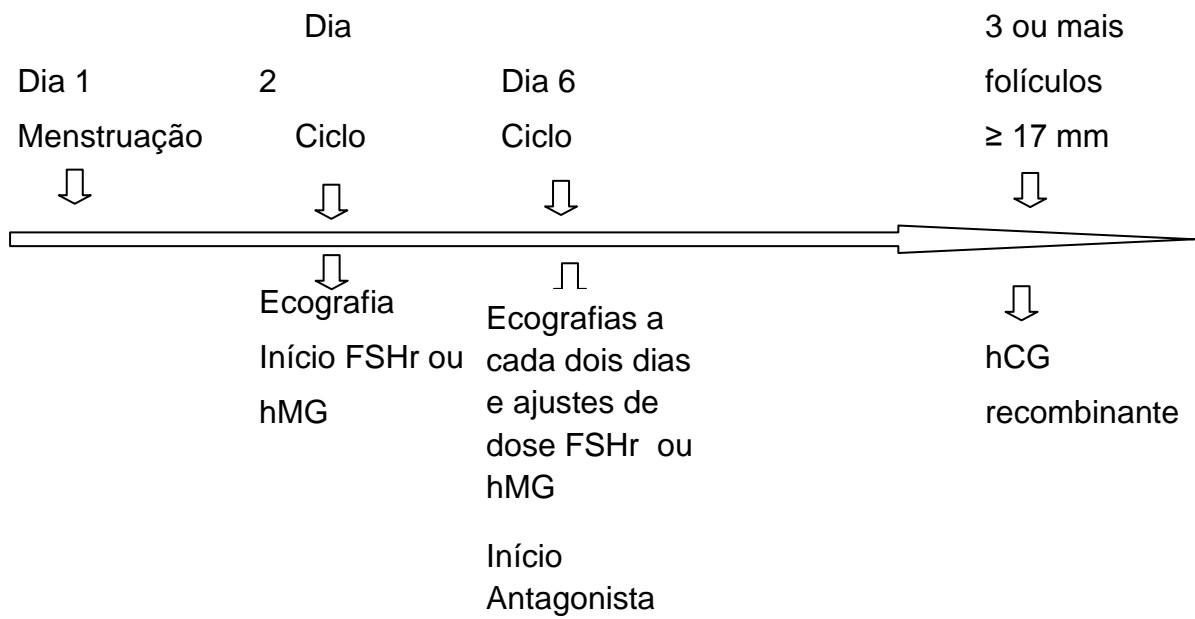
Avaliação da Clivagem

1. Observar clivagem precoce 25 – 27 horas após a inseminação.

2. Não observando clivagem precoce, avaliar nas 48 horas.

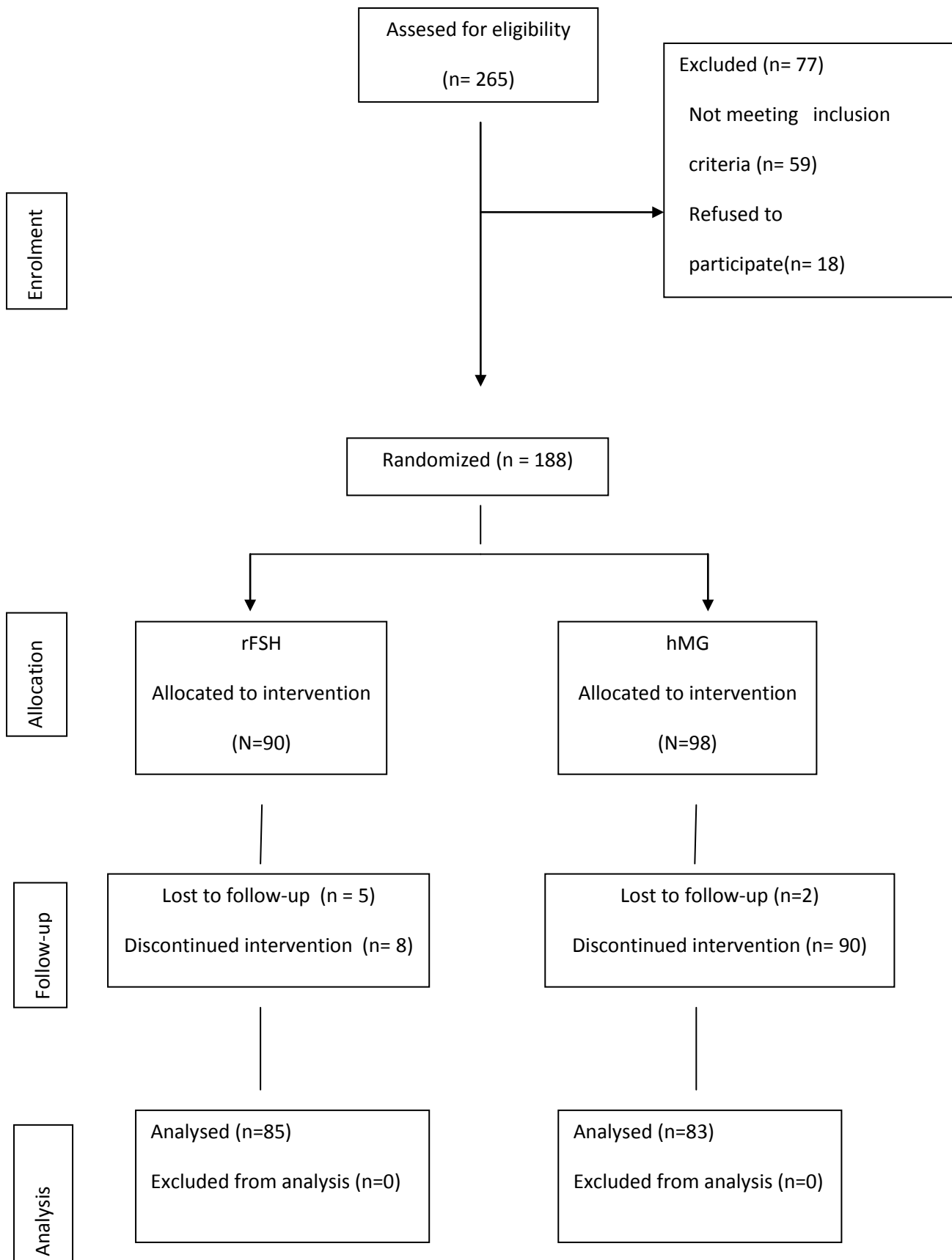
A avaliação do desenvolvimento embrionário baseia-se na classificação do GES.

Apêndice 3: Protocolo de indução da ovulação.



Apêndice 4 – Figura 1 do Artigo – CONSORT statement flow diagram

Figure I: CONSORT statement flow diagram



Apêndice 5 : Tabela 1 do artigo

Table I – Baseline characteristics (values expressed by mean \pm Standard Deviation, and number (%) for categorical variables).

Baseline Parameters	rFSH (n=85)	hMG (n=83)
Age (years)	34.4 (\pm 2.5)	34.9 (\pm 2.3)
HAM (ng/ml)	4.3 (\pm 3.3)	3.5 (\pm 3.1)
FSH (mUI/l)	7.1(\pm 2.3)	6.4 (\pm 2.0)
AFC	12 (\pm 1.7)	14 (\pm 1.5)
BMI (m/ Kg²)	24.4 (\pm 1.6)	23.7 (\pm 1.8)
Primary cause of infertility		
Male Factor	29 (34.1%)	27 (32.5%)
Tubal Infertility	28 (32.9%)	32 (38.5%)
Endometriosis	28 (32.9%)	24 (28.9%)

Apêndice 6 – Tabela 2 do Artigo

Table II – Ovarian stimulation outcome (values expressed by mean \pm SD).

	rFSH (n=85)	hMG (n=83)	P - value
Total gonadotrofin dose (IU)	3033 (\pm 663.5)	2976 (\pm 628.4)	0.58
Follicles 13-14 mm	0.99 (\pm 0.99)	1.01 (\pm 1.0)	0.92
Follicles 15-16 mm	3.45 (\pm 3.0)	3.62 (\pm 3.3)	0.73
Follicles \geq17mm	5.24 (\pm 3.4)	4.76 (\pm 3.0)	0.35
Number of metaphase II	6.12 (\pm 3.1)	5.35 (\pm 2.5)	0.08
Number of embryos	4.17 (\pm 3.1)	3.26 (\pm 2.4)	0.04
Total embryo score	214.01 (\pm 162.4)	170.43 (\pm 176.6)	0.13
Best embryo score	77.33 (\pm 34.0)	65.07 (\pm 33.2)	0.03
Clinical pregnancy / randomized patient	27/85 (31.7%)	25/83 (30.1%)	0.87

Apêndice 7 – Termo de consentimento livre esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidá-la para participar do estudo “**Estudo randomizado comparando hMG versus FSHr quanto à qualidade embrionária nas pacientes submetidas à Fertilização in Vitro**”, tendo como objetivo principal a realização de um trabalho científico para o estudo da qualidade dos embriões originados pela técnica da fertilização in vitro.

Este estudo tem como objetivo avaliar se existe alguma diferença nas características morfológicas dos embriões após a fertilização *in vitro* em mulheres que fizeram uso de um dos dois tipos de medicamentos para indução da ovulação: hMG e FSH recombinante.

Esses medicamentos são responsáveis pela realização do estímulo ovariano, responsável pela produção de vários folículos nos ovários estimulados, diferente do que ocorre no ciclo natural da mulher onde há apenas um folículo por vez. Assim, torna-se possível o crescimento de um maior número de folículos passíveis a serem puncionados, e conseqüentemente uma obtenção de um maior número de embriões. Ambas medicações tem a mesma segurança e eficácia para o seu tratamento.

Sua participação na pesquisa compreenderá as seguintes etapas:

- Consentir que o tipo de medicamento utilizado para estimulação ovariana (hMG ou FSH r) seja escolhido aleatoriamente dentre duas opções seguras e igualmente eficazes para o seu tratamento.
- Consentir a avaliação da qualidade dos embriões, da mesma forma que seria realizada no curso normal do seu tratamento. Apenas com a diferença que os resultados será registrados em um banco de dados sigiloso, sem a identificação das pacientes. Essa etapa não seria modificada, participando da pesquisa ou não.

Você terá benefícios indiretos ao participar desta pesquisa, pois estará ajudando na conquista de conhecimento e futuras melhorias nas técnicas de

fertilização in vitro. O seu tratamento de fertilização in vitro não será modificado pelo fato de participar deste estudo.

O resultado imediato desse trabalho não possui aplicação clínica, visto tratar-se de uma condição ainda sob investigação.

Permanecerá com a senhora uma cópia deste termo de consentimento e a equipe dessa pesquisa estará à disposição para qualquer esclarecimento nos contatos informados no final do texto.

Eu, _____
_____, RG: _____, fui informada dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvida, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disto, sei que novas informações, obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa em qualquer momento.

O profissional certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial. Fui informada que caso existam danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Não terei nenhum custo adicional em participar desta pesquisa e no caso de alguma complicação, essa será tratado pela equipe médica responsável (pesquisadores).

ASSINATURA _____ DA
PACIENTE: _____

ASSINATURA _____ DO _____ INVESTIGADOR:

LOCAL: _____ DATA: _____

PESQUISADOR: Dra. Rita de Cássia Borges Chapon – Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. João Sabino Lahorgue da Cunha Filho – Professor e Pesquisador do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

TELEFONE PARA CONTATO E DÚVIDAS: 51- 3359-8117 – Serviço de Ginecologia e Obstetrícia – HCPA

COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA - HCPA: 51- 3359-7640

Apêndice 8 – Instrumento de coleta de dados

Projeto de Mestrado – Rita Chapon

Nº: _____

Nome: _____

Idade: _____

Data: _____

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

Cor: Amarelo () Branco () Negro () Pardo ()

G__P__C__E__A__

Causa de Infertilidade: _____

Tempo de Infertilidade: _____

Tratamentos anteriores: _____

FSH: _____ CFA: _____ HAM: _____ TSH: _____ Prolactina: _____

Protocolo: () FSHr () hMG

Período de Indução: _____

Gonadotrofinas (UI): _____

Data Punção: _____ Data Transferência: _____

Embriões 3º dia pós FIV	Pontuação

Desfechos Secundários:

Nº de folículos \leq 12mm: _____

Nº de folículos 13-14 mm: _____

Nº folículos 15-16 mm: _____

Nº folículos \geq 17mm: _____

Nº de oócitos MII : _____

Nº de embriões total: _____

Escore embrionário Total: _____

Escore de melhor embrião: _____

Nº de embriões transferidos: _____

HCG no 12º dia pós FIV: _____

Ecografia TV: _____