

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas

HOMOGENIZAÇÃO DA COORTE FOLICULAR PELA ADMINISTRAÇÃO DE
ESTRADIOL EM CICLOS DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA COM
ANTAGONISTA DE GnRH (PROTOCOLO DE DOSES MÚLTIPLAS)

Aluna: Dra. Letícia Funchal Terres
Orientador: Prof. João Sabino Lahorge da Cunha Filho

Dissertação de Mestrado

2005

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. João Sabino Lahorge da Cunha Filho, pelo estímulo, apoio e qualidade profissional inquestionáveis;

Ao Prof. Dr. Eduardo Pandolfi Passos, pelas oportunidades,

Ao Prof. Dr. Fernando Monteiro de Freitas, pelo exemplo profissional,

Aos acadêmicos bolsistas: Felipe Holanda, Nina Stein, Andréa Laranjeira e Virgínia Rosa, pelo trabalho árduo.

A meu amado esposo

LUCIANO, pela certeza do apoio e incentivo constantes;

Aos meus pais

CARLOS E GRAÇA, pela presença e confiança nos meus objetivos;

A minha irmã

CAROLINA, por ser a irmã que é.

Sumário

Lista de Abreviaturas	05
1. Introdução	06
2. Mecanismo de Ação	10
3. Estudos Clínicos	13
3.1. Eficácia	13
3.2. Desenvolvimento folicular	18
3.3. Efeito endometrial	22
3.4. Qualidade embrionária	24
3.5. Segurança e efeito pós-natal	26
4. Objetivos	28
5. Referências Bibliográficas	29
6. <i>Follicular cohort homogenization by the administration of oestradiol in controlled ovarian stimulation cycles with GnRH antagonist (multiple dose protocol): A clinical trial.</i>	34
7. <i>Homogenização da coorte folicular pela administração de estradiol em ciclos de estimulação ovariana controlada com antagonista de GnRH (protocolo de doses múltiplas): um ensaio clínico.</i>	49
8. Conclusões	65
9. Perspectivas Futuras	66

Lista de abreviaturas

FIV - fertilização *in vitro*

GnRH - gonadotropin-releasing hormone (hormônio liberador de gonadotrofinas)

LH - luteinizing hormone (hormônio luteinizante)

FSH - follicle-stimulating hormone (hormônio folículo-estimulante)

hMG - human menopausal gonadotropin (gonadotrofina menopáusic humana)

SHO - síndrome de hiperestimulação ovariana

hCG - human chorionic gonadotropin (gonadotrofina coriônica humana)

ICSI - injeção intracitoplasmática de espermatozoides

EGF - endothelial growth factor

IGF - insulin like growth factor

VEGF- vascular endothelial growth factor

CES - cálculo de um escore embrionário

MSTE - média do escore dos embriões transferidos

1. Introdução

A primeira fertilização *in vitro* (FIV) com sucesso foi realizada no ano de 1978, por Steptoe e Edwards. O nascimento da menina Louise Brown em Oldhan, Inglaterra foi um marco decisivo para o início de um progresso extraordinário no entendimento e no tratamento da infertilidade humana (Steptoe, 1978).

Inicialmente, o tratamento consistia em controle ecográfico de ciclos espontâneos e captação dos oócitos através de laparoscopia. Entretanto, as taxas de insucesso eram muito altas, pois o número de oócitos recuperados era pequeno.

Após alguns anos, os tratamentos de fertilização *in vitro* começaram a incluir a indução da ovulação, não mais se utilizando apenas o ciclo menstrual natural da mulher. O citrato de clomifeno é droga indutora de ovulação conhecida desde a década de 1960 e foi amplamente utilizada no início do desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida (Homburg, 2005). Por se tratar de um anti-estrogênico, o clomifeno bloqueia o *feedback* negativo do estradiol, estimulando a secreção de gonadotrofinas pela hipófise. Isto leva a uma maior quantidade de folículos e à produção estrogênica, com a liberação de LH na metade do ciclo e conseqüente ovulação.

Embora as taxas de ovulação com clomifeno sejam altas (70-90%), as taxas de gestação são bem mais baixas. Este efeito negativo parece estar relacionado aos altos níveis de hormônio luteinizante (LH), provavelmente precoces e, aos efeitos anti-estrogênicos sobre os oócitos (Messinis, 2005). Cerca de 30% das pacientes apresentavam pico de LH precoce, com conseqüente aumento da progesterona (luteinização precoce) e, portanto, com redução na receptividade endometrial para gestação.

O uso da FIV natural, um procedimento sem indução de ovulação para obter gestação, tem se mostrado eficaz e de baixo risco. Embora tenha sido descrito com

sucesso pela primeira vez em 1978 com o nascimento de Louise Brown, havia sido abandonado após a ampla utilização de FSH recombinante para a produção de mais oócitos. Além de seguro e efetivo, mostrou-se custo-efetivo em vários estudos. Seus custos chegam a apenas 23% dos custos de uma FIV tradicional (Nargund, 2001).

Uma revisão sistemática incluiu 20 estudos, sendo 12 séries de casos e 8 ensaios clínicos, comparando-se seus resultados com a FIV tradicional (Pelinck 2002). Parece ser um procedimento de baixo risco, com uma taxa de gemelaridade próxima de zero e com risco nulo de síndrome de hiperestimulação ovariana (SHO). Também tem as vantagens de consumir menos tempo por ciclo; implicar em menor estresse físico e provavelmente emocional; utilizar menos medicações e, portanto, ser mais barato. Os resultados indicam uma taxa de gestação em andamento, por ciclo iniciado, de 7,2% e de cerca de 16%, por transferência de embrião. Os resultados só não são melhores pelas altas taxas de cancelamento de ciclos (28,9%), devido a luteinização e ovulação precoce. Provavelmente, os resultados serão melhores com uma otimização na seleção das pacientes.

Sabendo-se que o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) tem um papel relevante e insubstituível no controle do ciclo reprodutivo feminino e que ele é secretado no hipotálamo de forma pulsátil, as pesquisas nesta área avançaram muito. O GnRH se liga a receptores específicos na hipófise e estimula a secreção das gonadotrofinas, hormônio luteinizante e hormônio folículo estimulante (FSH). Estas por sua vez, regulam a esteroidogênese e gametogênese ovarianas (Knobil, 1980).

Os esquemas terapêuticos de indução de ovulação com gonadotrofinas e análogos agonistas de GnRH vêm sendo utilizados nas últimas duas décadas, tendo por objetivo principal evitar o pico de LH prematuro. O mecanismo de ação do agonista do GnRH se dá através de uma liberação inicial maior de gonadotrofinas (efeito "*flare-up*"), esgotar os receptores e dessensibilizá-los ("*down regulation*"). Os agonistas de GnRH

são, atualmente, as drogas mais prescritas com este objetivo. Este tratamento aumenta as taxas de gestação basicamente por aumentar o número de oócitos e embriões obtidos, e não por melhorar a qualidade embrionária (Liu, 1992).

O surgimento dos antagonistas do GnRH é mais recente, há menos de 20 anos (Karten, 1986). Os antagonistas levam a uma inibição mais rápida do pico de LH, porque agem por ligação competitiva aos receptores de GnRH hipofisários, diferentemente do mecanismo de ação dos agonistas.

Os análogos agonistas são ainda as drogas mais utilizadas embora seu uso implique em maior tempo de tratamento, exigindo dose maior de gonadotrofinas para posterior estímulo ovariano e aumentando também o risco de SHO e sua morbidade. Além disso, associam-se com alguns para-efeitos sistêmicos como: fogachos, cefaléia, secreta vaginal e sangramento disfuncional (Ben-Rafael 1991 ; Rizk,1992).

Com o surgimento da nova geração de análogos antagonistas do GnRH, os quais são desprovidos de efeitos anafilactóides importantes, a administração em ciclos induzidos para fertilização *in vitro* pôde ser aventada, sem os para-efeitos dos análogos agonistas (Karten,1990). Devido a atividade competitiva nos receptores do GnRH, a inibição da liberação do LH e do FSH ocorre logo após sua administração, reduzindo a duração de tratamento (Dubourdieu, 1994).

Os dois análogos antagonistas mais conhecidos no mercado são o Cetrotrelix (Cetrotide®) e Ganirelix (Antagon® ou Orgalutran®). Ambos já estão em uso clínico e comprovaram segurança e eficácia em ensaios clínicos, com resultados similares aos agonistas (Diedrich, 1994; Felberbaum, 1996; Ganirelix Dose Finding Study Group, 1998; Albano, 2000; Borm, 2000; Olivennes, 2000). Não há evidência de diferença significativa em taxas de fertilização, qualidade embrionária e oócitos entre os dois tratamentos (agonistas e antagonistas). Uma vantagem adicional dos antagonistas parece ser a menor incidência de hiperestimulação ovariana (De Jong, 1998).

Há dois protocolos principais para indução da ovulação, descritos na literatura: dose única de 3,0 mg durante a fase folicular final (Olivennes, 1994; 1995; 1998; 2000) ou doses múltiplas (0,25 mg) a partir do meio da fase folicular (Diedrich, 1994; Albano, 1997; Ganirelix Dose Finding Study Group, 1998). O objetivo desta revisão bibliográfica é descrever os principais efeitos, a eficácia e a segurança destas novas drogas e analisar os ensaios clínicos que compararam o protocolo de doses múltiplas de antagonistas com o protocolo longo de agonistas de GnRH.

2. Mecanismos de Ação

O GnRH é o principal hormônio da reprodução, sendo um peptídeo que contém 10 aminoácidos e que é secretado pelo hipotálamo de maneira pulsátil. Liga-se a receptores específicos na membrana das células da hipófise e, por meio de reações cálcio-dependentes, regula a síntese e secreção do LH e do FSH. Foi isolado, identificado e sintetizado em 1971 e desde então houve um crescimento explosivo no interesse por suas aplicações (Lunenfeld, 2005).

Os análogos agonistas sintéticos têm grande afinidade pelos receptores de GnRH e meia-vida longa, de 1 a 8 horas, por causa das substituições de aminoácidos nas posições 6 e 10, o que previne a sua destruição pelas peptidases hipofisárias. São de 15 a 200 vezes mais potentes que o GnRH. Apresentam utilidade no tratamento de desordens estrógeno-dependentes, como miomatose, endometriose, sangramento uterino disfuncional, puberdade precoce isossexual e principalmente, nos tratamentos de infertilidade (Edwards 1995).

Os agonistas do GnRH têm ação inibitória no eixo hipófise-ovário. Após efeito *flare up* inicial (liberação de LH e FSH), ocorre dessensibilização dos receptores do GnRH e efeito *down-regulation* após 24 horas (Reissmann, 1995). É justamente esta inibição da liberação de LH e FSH que se deseja para induzir a ovulação na fertilização *in vitro*. Entretanto, sua desvantagem é a necessidade de administração prolongada para obter-se a dessensibilização e supressão hipofisária efetiva.

Os novos antagonistas do GnRH não apresentam os efeitos histamínicos dos similares precedentes, devido a modificações estruturais nas posições dos aminoácidos 1, 2, 3, 6 e 10. Não apresentam o efeito *down regulation*, com supressão reversível da secreção de gonadotropinas através de outro mecanismo. Ligam-se imediatamente aos

receptores do GnRH causando inibição de sua ação de maneira competitiva. Oito horas após sua administração, os níveis séricos de LH e FSH já se encontram diminuídos. A inibição do LH é mais acentuada e drástica que a do FSH, provavelmente pelas diferentes formas de regulação da secreção destes hormônios e por suas propriedades químicas distintas (Bouchard, 1994), Figura I.

Mecanismo de Ação: Antagonista Versus Agonista de GnRH

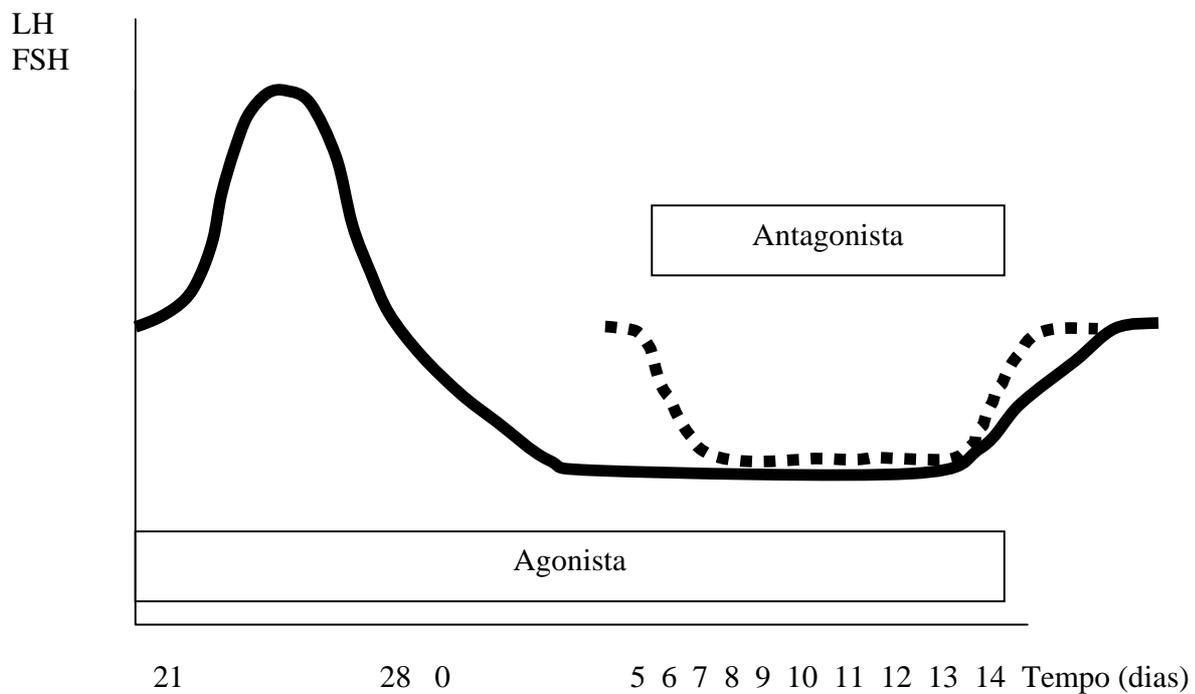


Figura I: Mecanismo de Ação Antagonista versus Agonista GnRH

(linha cheia: Agonista, linha pontilhada: Antagonista)

3. Estudos Clínicos

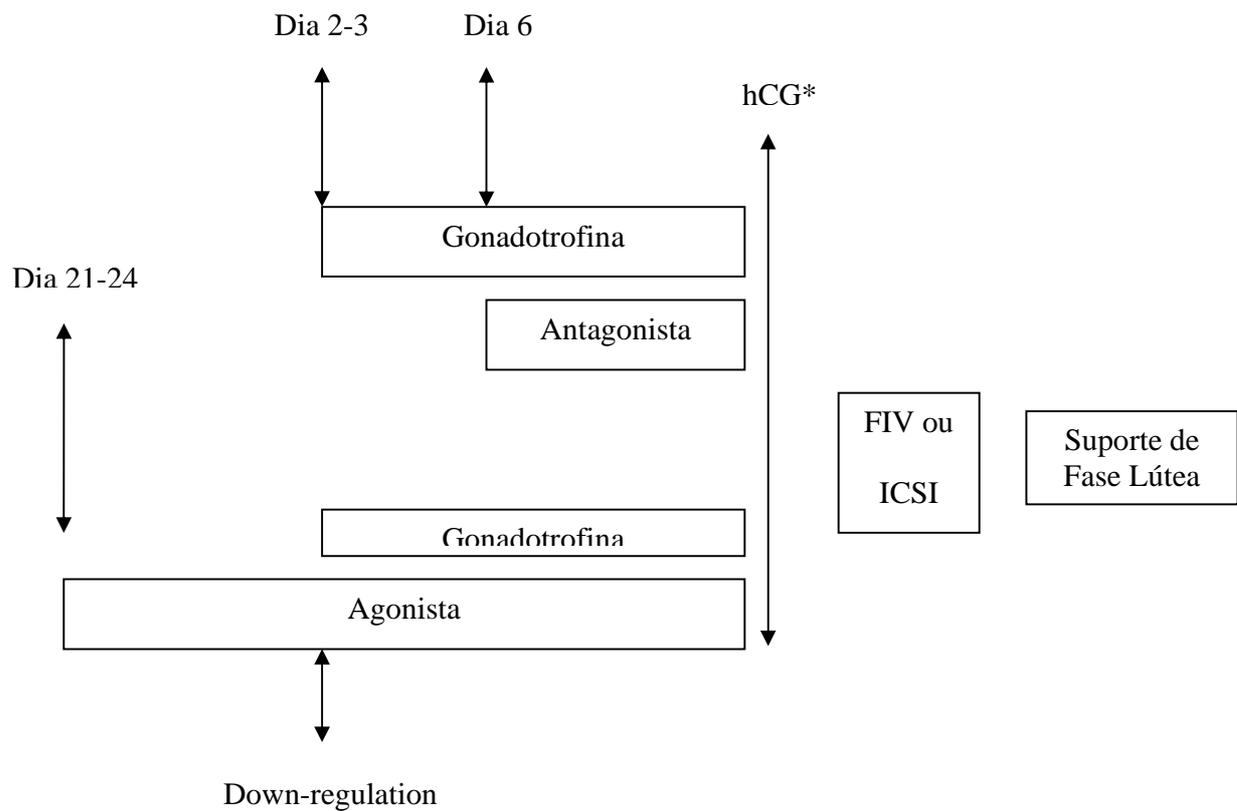
O protocolo com doses múltiplas de análogos antagonistas do GnRH foi desenvolvido para obter-se uma inibição da secreção do LH após administração de 0,25mg de antagonista do GnRH durante a estimulação ovariana (após o sexto dia de gonadotrofinas) (Albano, 1997). A eficácia e efetividade deste protocolo são bem estabelecidas e, além disso, os resultados de estímulo ovariano para FIV são comparáveis aos do protocolo longo com agonistas de GnRH.

3.1. Eficácia

Os protocolos com utilização de Cetrorelix ou Ganirelix foram propostos para evitar a liberação precoce de LH sem causar um bloqueio hipofisário muito acentuado, o que poderia influenciar negativamente os resultados da FIV. A maioria dos estudos de farmacocinética (Diedrich, 1994; Felberbaum, 1996; Albano, 1997; Ganirelix Dose Finding Study Group, 1998) iniciaram a utilização de gonadotrofinas (recombinante ou urinária) no segundo dia do ciclo menstrual e o antagonista no sexto dia da indução (período de maior risco para luteinização precoce), Figura II.

Vários autores compararam diferentes doses do antagonista (0,0625 até 3,0 mg/dia). A inibição da secreção endógena do LH foi eficaz em todos os grupos, com exceção dos que receberam doses < 0,1mg de antagonista/ dia. Os grupos tratados com 0,5mg e 0,25mg tiveram os melhores resultados reprodutivos durante a FIV (Albano, 1997; Ganirelix Dose Finding Study Group, 1998). Os autores concluíram que a dose mínima eficaz na prevenção da luteinização precoce é de 0,25mg/dia de antagonista do GnRH (Cetrorelix).

Esquema de uso de Antagonista X Agonista do GnRH



* ≥ 3 folículos ≥ 17 mm

Figura II: Esquema de Uso do Antagonista ou Agonista GnRH para indução da ovulação para FIV

O Ganirelix Study Group (Ganirelix Dose Finding Study Group, 1998) investigou a dose mínima eficaz e segura para obter bons resultados em ciclos induzidos para FIV. O grupo de mulheres que recebeu 0,25mg/dia do antagonista teve os melhores resultados reprodutivos, com taxa de gestação por transferência de embrião de 40,3%. Em estudo prospectivo não controlado fase III, houve a confirmação dos achados anteriores de que a dose mínima eficaz de antagonista é 0,25mg/dia durante a estimulação ovariana com gonadotrofina urinária (De Jong, 2001).

Com objetivo de comparar o uso de agonista (protocolo longo) com o uso de doses múltiplas de antagonista, Albano e cols. (Albano, 2000) publicaram os resultados referentes a 188 pacientes tratadas com o antagonista Cetorelix e 85 pacientes tratadas com o agonista Buserelina; ambos os grupos receberam Gonadotrofina Menopáusicas Humana (hMG). Houve transferência de embriões em 83,5% do grupo Cetorelix e em 79% do grupo Buserelina. A taxa de gestação clínica foi de 22,3% e de 25,9% por ciclo iniciado com Cetorelix e Buserelina respectivamente; tal diferença não foi estatisticamente significativa. A duração do tratamento com gonadotrofinas e os níveis séricos de estradiol, no dia da administração da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), foram menores no grupo do antagonista. Além disso, a SHO foi mais incidente em pacientes usando agonista.

O European Ganirelix Study Group (Borm, 2000) também realizou um ensaio clínico randomizado, multicêntrico, para investigar dois esquemas de tratamento para indução ovariana (antagonista *versus* agonista em protocolo longo) em 730 mulheres recebendo FSH recombinante. O antagonista Ganirelix, em comparação ao agonista Buserelina, apresentou duração média do tratamento menor (5 *versus* 26 dias), dose total de FSH administrado menor (1500 UI *versus* 1800 UI), período de estimulação mais curto, níveis séricos de estradiol no dia de administração do hCG mais baixos e menor

incidência de SHO (2,4% *versus* 5,9%), confirmando os resultados obtidos por Albano e cols (Albano, 2000). Quanto aos resultados da FIV, o número de embriões de boa qualidade, a taxa de fertilização (62,1% em ambos os grupos) e de embriões transferidos foram similares entre os dois esquemas de tratamento. A taxa de implantação foi menor no grupo Ganirelix que no grupo Buserelina, entretanto as taxas de gestação clínica por tentativa foram similares. Em 2001, outro ensaio clínico europeu multicêntrico (The European and Middle East Orgalutran Study Group, 2001), comparando dois esquemas de tratamento (Ganirelix e Triptorelina) em 236 mulheres, demonstrou que a dose média de FSH recombinante utilizada foi menor no protocolo do antagonista. Além disso, os autores evidenciaram que os níveis séricos de estradiol foram menores no grupo Ganirelix no dia do hCG. As taxas de fertilização (64% Ganirelix e 64,9% Triptorelina), o número médio de embriões de boa qualidade (2,7 e 2,9 respectivamente), as taxas de implantação (22,9% em ambos tratamentos) e, finalmente, as taxas de gestação em andamento por tentativa foram similares entre os dois tratamentos (31% e 33,9%, Ganirelix e Triptorelina, respectivamente).

O protocolo de dose única de antagonista mostrou-se uma opção simples, segura e eficaz e com resultados de FIV comparáveis aos esquemas com agonista. O risco de SHO, a dose total de gonadotrofina necessária para estimular a ovulação e o período de estimulação foram menores que no protocolo do agonista. Pacientes que receberam tratamento com antagonista apresentaram menores níveis séricos de estradiol durante a administração de hCG, provavelmente porque desenvolveram menor número de folículos e foram estimulados com uma dose menor de gonadotrofina.

O estudo multicêntrico realizado nos Estados Unidos e Canadá (The North American Ganirelix Study Group, 2001) mostrou que o número de oócitos e embriões foi semelhante entre os grupos (Ganirelix e Acetato de Leuprolide); as taxas de implantação

e fertilização também não diferiram, assim como os índices de gestação. Entretanto, pacientes que usaram antagonista tiveram menos reação colateral local.

O efeito da elevação dos níveis séricos de progesterona foi estudado em ciclos que utilizaram antagonistas do GnRH (Bosch, 2003). Noventa e quatro pacientes foram arroladas, sendo incluídas na análise apenas 81, devido à má resposta em 9 casos e grande risco de SHO em 4 casos (13 ciclos suspensos). Taxas de gestação e de implantação foram menores no grupo que apresentou progesterona acima de 1,2 ng/ml durante o estímulo ovariano.

Recentemente, foi publicada uma revisão sistemática comparando ciclos que utilizaram agonista e antagonista. Foram incluídos quatro estudos que utilizavam protocolo de múltiplas doses baixas (0,25mg) de antagonista e um estudo que utilizava dose única elevada (3mg). Não houve diferença quanto à prevenção de luteinização precoce ou síndrome de hiper-estímulo ovariano. Entretanto, pacientes que receberam antagonistas para FIV tiveram um número menor de oócitos recuperados e esta diferença pode ter proporcionado uma significativa redução na taxa de gestação clínica neste grupo (Al-Inahy H, 2004).

Interessante ressaltar a alta incidência de hiperestímulo ovariano em pacientes que utilizaram Ganirelix no estudo Canadense e Norte Americano (The North American Ganirelix Study Group, 2001); estes resultados influenciaram diretamente a análise final desta meta-análise.

3.2. Desenvolvimento folicular

É sabido que a administração de gonadotrofinas ocorre em um meio ambiente hormonal diferente em mulheres com ciclos com antagonista ou com agonista. Isso ficou bem demonstrado se compararmos os níveis séricos de FSH dos estudos Europeu e Norte Americano no início da fase folicular. Aquelas mulheres que receberam agonista apresentaram níveis séricos de FSH inferiores àquelas que receberam antagonista.

Logo, a coorte folicular é completamente diferente entre os dois grupos. Existe um preparo da coorte folicular nas pacientes que recebem agonista com a inibição da liberação interciclo do FSH e uma homogeneização dos folículos selecionáveis.

Para testar a hipótese de homogeneização da coorte folicular antes da indução da ovulação com antagonista foi realizado um ensaio clínico com 90 pacientes candidatas a FIV (Fanchin, 2003). Quarenta e sete pacientes receberam 4 mg de estradiol desde o vigésimo dia do ciclo anterior até o segundo dia do ciclo e 43 pacientes serviram de controle. Foram encontrados folículos com diâmetro médio menor e com discrepâncias de tamanho atenuadas no grupo do estradiol em relação ao grupo controle. Os autores concluem que a administração de estradiol na fase lútea precedente melhora a homogeneidade folicular, podendo aumentar o número de folículos com mais de 16mm de diâmetro.

Estudos com pacientes má-responderas são favoráveis ao uso de antagonistas como uma esperança para este tipo de pacientes. Em publicação na Human Reproduction, foram comparadas 24 pacientes utilizando anticoncepcional oral de baixa dosagem para homogeneização da coorte folicular associado a agonista do GnRH versus 24 pacientes utilizando antagonista do GnRH. Não foram encontradas diferenças entre os desfechos estudados (dosagem de FSH no terceiro dia, número de oócitos recuperados, número de embriões transferidos, quantidade de FSH e de hMG utilizadas, número total

de folículos, taxa de fertilização, taxa de implantação, gestação clínica /transferência). A única diferença encontrada foi na dosagem sérica de estradiol no dia da administração do hCG. Portanto, antagonistas seriam a alternativa para prevenção de luteinização precoce sem interferir na fase folicular precoce (Akman, 2001).

Outro estudo, com 42 pacientes má respondedoras foram divididas em dois grupos (protocolo múltiplas doses de cetorelix *versus* protocolo longo de agonistas GnRH). Não foram encontradas diferenças nas taxas de oócitos recuperados; número de oócitos fertilizados, número de pacientes que tiveram falha de fertilização; número de pacientes que realizaram transferência de embrião; número médio de embriões transferidos; escore cumulativo embrionário; taxa de gestação; gestações clínicas. As únicas diferenças estatísticas entre os grupos foram favoráveis aos análogos antagonistas, com menor número de dias de tratamento para estimular gestação e menor número de ampolas de hMG (Escudero, 2004).

Uma análise retrospectiva de 56 pacientes má-respondedoras submetidas a tratamento com agonistas (protocolo *flare-up*) foi realizada. Pacientes que falharam em obter gestação (n= 53) foram submetidas posteriormente ao protocolo de múltiplas doses de antagonistas. Embora as características da indução de ovulação e seus resultados não difiram entre os dois protocolos, o número de embriões transferidos foi significativamente maior no grupo de antagonistas. As taxas de gestação clínica e de implantação por transferência parecem maiores no grupo de antagonista, mas sem diferença significativa. Mas, a taxa de gestação em andamento por transferência foi realmente maior no grupo do antagonista (Fasouliotis, 2003).

Outro aspecto importante a ser considerado quanto ao desenvolvimento folicular em pacientes recebendo antagonista de GnRH é o uso de protocolo flexível, ou seja, individualizado. Em 2002, foi publicado um estudo com 60 pacientes recebendo cetorelix em 3 protocolos diferentes: doses múltiplas fixas, doses múltiplas individualizadas ou

dose única individualizada. O número de oócitos recuperados foi maior nos dois grupos de protocolo flexível e foi menor a quantidade de FSH utilizada no protocolo de dose múltipla flexível. Embora este estudo não tenha poder para o desfecho de número de oócitos, pois foi delineado com os desfechos primários de quantidade de cetorelix e número de visitas de monitoração, seus dados reforçam a hipótese de que o ajuste individual de medicação (antagonista do GnRH) otimiza a estimulação ovariana com maior número de oócitos recuperados com menor necessidade de FSH e sem aumento da necessidade de monitoração (Ludwig, 2002).

Em 2004 foi publicado um ensaio clínico multicêntrico, randomizado e com poder adequado para testar a diferença de número de oócitos recuperados entre protocolo fixo e flexível. Não houve diferenças no número médio de oócitos recuperados, na qualidade dos oócitos, na qualidade embrionária e nas taxas de gestação clínica e de gestação acima de 16 semanas. Embora não significativa foi identificada uma tendência a menores taxas de gestação no protocolo flexível. Na discussão do estudo foi aventada uma possível explicação para esta diferença que residiria no perfil hormonal e no tamanho dos folículos no momento da administração do antagonista. Possivelmente altos níveis de estradiol e LH associados a um início mais tardio do antagonista poderiam ter efeito negativo sobre as taxas de gestação devido à exposição prolongada do endométrio àqueles hormônios. Outro motivo para a redução das taxas de gestação seria um maior número de folículos de fase folicular média que poderiam sofrer uma parada de desenvolvimento, ou até mesmo atresia, no momento da administração de antagonista (Mochtar, 2004).

Outro fator hormonal que pode influir negativamente nas taxas de gestação é a exposição a altos níveis de LH e estradiol durante a fase folicular precoce. O protocolo fixo utilizava antagonista no quinto dia da indução, pois se acreditava que o risco de luteinização precoce antes disto era nulo. Com o uso de protocolo flexível e monitorização

ecográfica foi possível uma redução da dose administrada e do custo do tratamento. Entretanto, postergar a administração do antagonista do GnRH após o sexto dia de FSH, devido a ausência de folículos maiores de 15 mm pode expor o trato genital a níveis elevados de estradiol e LH. Esta exposição confirmou ter resultado negativo nas taxas de implantação (Kolibianakis, 2003)

Acredita-se que a administração de antagonista em ciclos de indução de ovulação deva ocorrer pelo menos no quinto dia. O uso mais precoce talvez fosse capaz de eliminar o problema da luteinização precoce. Entretanto, sabemos que a histologia endometrial no momento da punção oocitária é positivamente relacionada aos níveis de LH no início da indução e à duração do uso de FSH antes da administração de antagonista. Opostamente, a exposição à LH e a estradiol antes da administração de antagonista é negativamente associada à chance de obter gestação após a transferência embrionária. Kolibianakis publicou o primeiro estudo avaliando parâmetros hormonais e sua relação com o desenvolvimento folicular em 2005 (Kolibianakis, 2005). Conduziu um ensaio clínico randomizado, incluindo 30 pacientes em cada grupo. O primeiro grupo iniciava antagonista no sexto dia de indução e o grupo em estudo no primeiro dia, com dose fixa de FSH recombinante de 200 UI. O grupo de antagonista no primeiro dia apresentou menor exposição ao LH e estradiol ($p < 0.001$). Não foram encontradas diferenças no desenvolvimento folicular, com taxas de fertilização, implantação e gestação em andamento comparáveis. Portanto, parece ser possível utilizar antagonista mais precocemente sem prejuízo nos desfechos reprodutivos.

3.3. Efeito endometrial

Após a comprovação de eficácia clínica (Ganirelix dose-finding Study Group, 1998) e da ausência de diferenças significativas no número de oócitos recuperados, nas taxas de fertilização e na qualidade embrionária entre pacientes tratadas com agonistas e antagonistas do GnRH, alguns autores questionaram um provável efeito endometrial desta droga (Hernandez,2000).

O antagonista do GnRH é administrado em um momento em que as células endometriais estão passando por uma onda de mitoses para formar um endométrio maduro, portanto, o antagonista poderia inibir este processo com um efeito direto local, ou pela sua ação com redução dos níveis séricos de estradiol.

Este último efeito poderia ser evidenciado pela diminuição dos peptídeos *endothelial growth factor* (EGF) e *insulin like growth factor* (IGF) que são produzidos pelas células endometriais de uma maneira estradiol-dependente. Assim, o antagonista do GnRH pode destruir um circuito auto-parácrino (fatores de crescimento estrogênicos) que é essencial para a atividade mitótica endometrial e pode se manifestar por redução nas taxas de gestação e aumento nas taxas de aborto (Hernandez, 2000). A crítica que se faz a esta teoria é que mesmo em ciclos induzidos onde ocorre a diminuição dos níveis séricos de estradiol, as suas concentrações plasmáticas são supra-fisiológicas.

Um estudo realizado com mulheres submetidas à indução de ovulação para doação de oócitos avaliou o uso de suporte de fase lútea rotineiramente. Parece haver um encurtamento da fase lútea e uma redução dos níveis de LH quando não se utiliza deste suporte. Entretanto, a qualidade embrionária nestas situações não havia sido avaliada. Dez mulheres foram incluídas no estudo com indução de ovulação com FSH recombinante, ganirelix e hCG. Biópsia aspirativa endometrial foi realizada no dia da punção oocitária e 7 dias após. A histologia endometrial foi avaliada para fins de

informação descritiva da qualidade endometrial durante a fase lútea não suplementada em ciclos com FSH e antagonista de GnRH. Os resultados evidenciaram endométrios avançados em relação a data cronológica esperada na maioria dos casos (Kolibianakis, 2003).

O efeito antimitótico da estimulação ovariana sobre o endométrio relacionado ao uso de agonistas de GnRH e gonadotrofinas é notável quando comparados a ciclos naturais. Se este efeito também está presente no uso de antagonistas ainda não está definido. Assim, o estudo apresentado dá suporte ao uso de suplementação de fase lútea em ciclos com antagonistas do GnRH, mas adverte que o suporte de um endométrio já alterado pode não ter um grande benefício (Kolibianakis, 2003).

A importância da suplementação de fase lútea foi comprovada em outro ensaio clínico randomizado publicado em 2003. Quarenta pacientes utilizando FSH e antagonista para indução de ovulação foram randomizadas em três grupos com medicações diferentes para maturação oocitária (hCG recombinante, LH recombinante ou triptorelina). Não foi oferecido suporte de fase lútea para nenhum grupo. Após o recrutamento de pacientes já foi evidenciado um encurtamento significativo da fase lútea e taxas inaceitáveis de gestação, portanto o estudo foi suspenso com o número de pacientes já incluídas até aquele momento. O grupo que sofreu menor encurtamento da fase lútea foi o do hCG, presumivelmente devido a sua maior meia-vida e portanto suporte mais prolongado ao corpo lúteo. Os autores concluem que suporte de fase lútea é mandatório em pacientes submetidas à estimulação ovariana para FIV/ ICSI com antagonista utilizado concomitantemente (Beckers, 2003).

3.4. Qualidade embrionária

Nos tratamentos de reprodução humana, a indução da ovulação é uma das etapas cruciais para um resultado satisfatório. O número e a qualidade oocitária estão relacionados com o sucesso reprodutivo e com os resultados da FIV.

Para a obtenção de vários oócitos com boa chance de fertilização, ou seja, com boa qualidade, é fundamental que no final do seu desenvolvimento haja uma ação do LH (Testart, 1986). Este hormônio tem como principais efeitos a facilitação do desprendimento oocitário da parede folicular (células da granulosa e *cumulus ooforus*), assim como a entrada do oócito na segunda divisão meiótica que somente será finalizada com a sua fertilização pelo espermatozóide. Ciclos menstruais sem o pico de LH não conseguem obter oócitos de boa qualidade e, conseqüentemente, a chance reprodutiva é quase nula (Shoham, 1995).

A associação entre o aspecto morfológico dos embriões e as taxas de gestação é também relatada por diversos autores. O cálculo de um escore embrionário (CES) e a média do escore dos embriões transferidos (MSTE) são sugeridos por alguns autores (Terriou, 2001). Após 48 horas de cultivo avalia-se a clivagem, o estágio embrionário, a regularidade do tamanho e forma dos blastômeros, e a fragmentação celular, podendo então ser calculado o CES e a MSTE.

Em virtude da maior causa de falha de implantação ser a pobre qualidade embrionária, muitos pesquisadores têm desenvolvido métodos de obter uma melhor qualidade dos embriões transferidos e um aumento das taxas de gestação após FIV. Estas tentativas variam desde cultura combinada de embriões com células da trompa de Falópio; “assisted hatching” dos embriões antes da transferência, troca dos constituintes do meio de cultura e transferência de embriões no estágio de blastocisto (Takahashi, 2004).

Alguns autores já têm descrito as vantagens do uso de antagonistas para FIV. Apesar de haver um menor número de oócitos recuperados, tem-se associado a isto, menor estradiol sérico e maiores taxas de fertilização, maior número médio de embriões de boa qualidade, maiores taxas de gestação e menores taxas de SHO (Takahashi, 2004).

A melhor qualidade embrionária é uma hipótese para explicar estes resultados positivos. Em pacientes má-responderas, foram comparados os ciclos com agonista e posteriormente com antagonista. No protocolo com cetorelix, o número de pacientes cujos embriões chegaram a blastocisto no quinto dia foi significativamente maior e com uma taxa de gestação de 42%. Os autores concluem que o uso de antagonista em protocolos de hiperestimulação ovariana controlada melhora o desfecho de gestação em pacientes com múltiplas falhas de FIV/ ICSI prévias, provavelmente pela melhora da qualidade dos blastocistos gerados (Takahashi, 2004).

É evidente que existem interações entre os gametas e embriões precoces com a trompa de Falópio; e provavelmente existam atividades autócrina e parácrina envolvidas na implantação. Alguns autores detectaram citoquinas e fatores de crescimento pré e peri-implantação. O GnRH extra-hipotalâmico, como o endometrial, ovariano e miometrial, parece ter papel relevante nas diversas fases desde a fertilização (Casán, 2000).

Um estudo publicado em 2000, dosou GnRH em amostras de endométrio e trompa de Falópio de pacientes pré e pós-menopáusicas. Ficou comprovado pela primeira vez que existe produção de GnRH nas trompas de Falópio durante a fase lútea, concomitantemente ao encontro de espermatozóides e óvulo; com a finalidade de promover sua união e de nutrir os zigotos e embriões precoces (Casán, 2000). Aquela constatação justifica o uso de culturas de embrião em células de trompa de Falópio em busca de melhora da qualidade embrionária, como tem sido citado em diversos estudos (Takahashi, 2004).

Até o presente momento as taxas de gestação são similares entre pacientes que utilizaram antagonistas e agonistas (The Ganirelix dose finding, 1998; Borm, 2000; The European and Middle East Orgalutran Study Group, 2001; The North American Ganirelix Study Group, 2001); e somente encontra-se diferenças quando agrupadas em meta-análise (Al Inahy, 2004). Conclui-se que os antagonistas não parecem ter um efeito negativo sobre a qualidade e desenvolvimento embrionário e que o principal efeito seja na diferença da coorte folicular.

3.5. Segurança e efeito pós-natal

Após a vasta apresentação dos resultados do uso de antagonistas de GnRH nos protocolos de reprodução assistida, com resultados clínicos comparáveis aos dos agonistas em protocolo longo (terapia padrão) (Borm, 2000; The European and Middle East Orgalutran Study Group, 2001; The North American Ganirelix Study Group, 2001), surge a necessidade de comprovar-se a segurança a longo prazo, particularmente para as gestantes e sua prole.

Olivennes foi pioneiro ao publicar em 2001 os resultados preliminares do seguimento de 333 pacientes randomizadas em estudo multicêntrico (*ganirelix dose-finding study*) que realizaram FIV ou ICSI. De um total de 68 gestações intra-uterinas com vitalidade, foram seguidas 67 pacientes. O seguimento revelou uma taxa de aborto de 9%. Das 61 gestações acompanhadas, houve 2 perdas. A idade gestacional média de nascimento das gestações únicas foi de 39,4 semanas e 36,6 para gestações múltiplas. No total, 73 crianças nasceram vivas. Baixo peso (<2500g) foi relatado em 8,7% e 54,2% respectivamente nas gestações únicas e múltiplas. Uma malformação congênita maior (1,4%) e sete menores (6,8%) foram descritas. Os autores concluem que embora a amostra seja pequena, estes dados preliminares demonstram taxas de desfechos

obstétricos e neonatais adversos comparáveis às incidências relatadas nas gestações por FIV com agonistas (Olivennes, 2001).

Outro estudo relevante foi publicado em 2002 com uma análise dos dados de seguimento de pacientes dos estudos de fase 2 e fase 3 do desenvolvimento do ganirelix até o momento da publicação (Boerrigter, 2002). Foram comparados os dados de 340 gestações em andamento (acima de 16 semanas) após o uso de ganirelix e 134 gestações após o uso de agonistas de GnRH em protocolo longo. Também foram avaliados os desfechos neonatais de 432 crianças no grupo do ganirelix e 184 no grupo de agonistas. Quanto aos desfechos obstétricos observados não foram identificadas diferenças entre os grupos quanto à taxa gestação gemelar; perdas fetais entre 16-26 semanas; percentual de recém-nascidos vivos e mortalidade neonatal. Não foram evidenciadas diferenças quanto a complicações gestacionais e de parto, no total e quando separadas por gestação única ou múltipla. Os desfechos neonatais também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, no geral e separadamente por gestação única, gemelar ou tripla. A conclusão dos autores após a revisão dos dados e de literatura é de que a estimulação ovariana controlada com antagonistas do GnRH (ganirelix) para FIV ou ICSI demonstrou ser segura para as gestantes e seus recém-nascidos. (Boerrigter, 2004).

3.6. OBJETIVOS

Geral

* Comparar ciclos que utilizaram agonistas do GnRH versus ciclos que utilizaram estradiol e antagonistas do GnRH para fertilização *in vitro*.

Específicos

* Comparar os seguintes desfechos em relação aos ciclos que utilizaram agonista ou estradiol associado a antagonistas de GnRH para indução da ovulação e fertilização *in vitro*:

- Número de oócitos maduros (desfecho primário)
- Taxas de fertilização e implantação
- Número de embriões transferidos
- Taxas de gestação
- Frequência de síndrome de hiperestímulo ovariano
- Quantidade de gonadotrofina utilizada

REFERÊNCIAS:

1. Akman MA, Erden HF, Tosun SB, Bayazit N, Aksoy E, Baheci M; Comparison of agonistic flare-up protocol and antagonistic multiple dose protocol in ovarian stimulation of poor responders: results of a prospective randomized trial. ***Hum Reprod* 2001; 16: 868-870.**
2. Albano C, Smitz J, Camus M, et al. Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation. ***Fertil Steril* 1997; 67: 917-922.**
3. Albano, C., Felberbaum, R.E., Smitz, J. *et al.* Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetrorelix and the LHRH-agonist buserelin. ***Hum. Reprod* 2000; 15: 526–531.**
4. Al-Inahy H, Aboulghar M. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception (Cochrane Review). ***In: The Cochrane Library, Issue 4, 2004. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltda.***
5. Beckers NGM, Macklon NS, Eijkemans MJ, Ludwig M, Felberbaum RE, Diedrich K, Bustin S, Loumaye E, Fauser BCJM. Nonsupplemented Luteal Phase Characteristics after the administration of Recombinat Human Chorionic Gonadotropin, Recombinat Luteinizing Hormone, or Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Agonist to Induce Final Oocyte Maturation in in Vitro Fertilization Patients after Ovarian Stimulation with Recombinant Follicle-Stimulating Hormone and GnRH Antagonist Cotreatment. ***J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4186-4192.**
6. Ben-Rafael Z, Lipitz S, Bider D, et al. Ovarian hyporesponsiveness in combined gonadotropin-releasing hormone-agonist and menotropin therapy is associated with low serum follicle-stimulating hormone levels. ***Fertil Steril* 1991; 55: 272-275.**
7. Boerrigter PJ, de Bie JJ, Mannaerts BMJL, van Leeuwen BP, Passier-Timmermans DPJ; Obstetrical and neonatal outcome after controlled ovarian stimulation for IVF using the GnRH antagonist ganirelix. ***Hum Reprod* 2002; 17:2027-2034.**
8. Borm, G. and Mannaerts, B. Treatment with the gonadotropin-releasing hormone antagonist ganirelix in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone is effective, safe and convenient: results of a controlled, randomized, multicentre trial. The European Orgalutran Study Group. ***Hum Reprod* 2000; 15: 1490–1498.**
9. Bosch E, Valencia I, Escudero E, Crespo J, Simon C, Remohí J, Pellicer A; Premature luteinization during gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles and its relationship with in vitro fertilization outcome. ***Fertil Steril* 2003; 80:1444-1449.**

10. Bouchard P, Charbonnel B, Caraty A, et al. The role of LHRH during the periovulatory period: a basis for the use of LHRH antagonists in ovulation induction. In M. Filicori and C. Flamigni (Eds), ***Ovulation: Basic Science and Clinical Advances. Elsevier Science BV International Congress Series 1046, 1994.***
11. Casán EM, Raga F, Bonilla-Musoles F, Polna ML. Human Oviductal Gonadotropin-releasing Hormone: Possible Implications in Fertilization, Early Embryonic Development and Implantation. ***J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:1377-1381.***
12. Cunha Filho, JS; Lemos, N; 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 gonadotropin-releasing hormone antagonist. ***Fertil Steril 2005; 83:902-907.***
13. De Jong D, Macklon NS, Eijkemans MJ, et al. Dynamics of the development of multiple follicles during ovarian stimulation for in vitro fertilization using recombinant follicle-stimulating hormone (Puregon) and various doses of the gonadotropin-releasing hormone antagonist ganirelix (Orgalutran/Antagon). ***Fertil Steril 2001; 75: 688-693.***
14. De Jong, D., Macklon, N.S., Mannaerts, B.M.J.L. *et al.* High dose gonadotropin releasing hormone antagonist (ganirelix) may prevent ovarian hyperstimulation syndrome caused by ovarian stimulation for in-vitro fertilization. ***Hum Reprod 1998; 13: 573-575.***
15. Diedrich, K., Diedrich, C., Santos, E. *et al.* Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist cetorelix during ovarian stimulation. ***Hum Reprod 1994; 9: 788-791.***
16. Dubourdieu S, Charbonnel B, d'Acremont MF et al. Effect of a GNRH antagonist (Nal-Glu) during the periovulatory period: The LH surge requires secretion of gonadotropin-releasing hormone. ***J Clin Endocrin Metab 1994; 78: 343-347.***
17. Edwards Rg, Brody SA 1995. ***Principles and Practice of Assisted Human Reproduction. W.B. Saunders Company. USA.***
18. Escudero E, Bosch E, Crespo J, Simon C, Remohí J, Pllicer A; Comparison of two different starting multiple dose gonadotropin-releasing hormone antagonist protocols in a selected group of in vitro fertilization- embryo transfer patients. ***Fertil Steril 2004; 81:562-566.***
19. Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schonauer LM, Kadoch IJ, Cohen-Bacri P, Frydman R, Coordination of early antral follicles by luteal estradiol administration provides a basis for alternative controlled ovarian hyperstimulation regimens. ***Fertil Steril 2003;79:316-321.***
20. Fanchin R, Salomon L, Castelo-Branco A, Olivennes F, Frydman N, Frydman R, Luteal estradiol pre-treatment coordinates follicular growth during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists. ***Hum Reprod 2003; 18: 2698-2703.***

21. Faoulotis S, Laufer N, Sabbagh-Ehrlich S, Lewin A, Hurwitz A, Simon A; Gonadotropin-releasing hormone antagonist (GnRH) versus GnRH-agonist in ovarian stimulation of poor responders undergoing IVF. ***J Assist Reprod Genet* 2003; 20:455-460.**
22. Felberbaum, R., Reissmann, T., K pker, W. *et al.* Hormone profiles under ovarian stimulation with human menopausal gonadotropin (hMG) and concomitant administration of the gonadotropin releasing hormone (GnRH)-antagonist Cetrorelix at different dosages. ***J Assist Reprod Genet* 1996;13: 216–222.**
23. Felberbaum R, Diedrich K. Ovarian stimulation for IVF/ICSI with gonadotrophins and GnRH analogues: agonist and antagonist. ***Hum Reprod* 1999; 14:207-221.**
24. Hernandez,ER. Embryo implantation and GnRH antagonists (Embryo implantation: the Rubicon for GnRH antagonists). ***Hum Reprod* 2000; 15:1211-1216.**
25. Homburg R. Clomiphene citrate- end of an era? A mini- review. ***HumReprod* 2005; 8:2043-2051.**
26. Karten MJ, Hoeger CA, Hooh Wa, et al. The development of safer antagonists: strategy and status. Recent progress on LH-RH and Gonadal peptides. Bouchard P, Haour F, Franchimont P, Schatz B. Eds; ***Elsevier, Paris Session II:147-58,1990.***
27. Karten, M.J. and Rivier, J.E. (1986) Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. ***Endocr Rev*, 7, 44–46.**
28. Knobil, E..The neuroendocrine control of the menstrual cycle. ***Recent Prog Horm Res* 1980; 36: 53–88.**
29. Kolibianakis EM, Albano C, Kahn J, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem AC, Devroey P. Exposure to high levels of luteinizing hormone and estradiol in the early follicular phase of gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles is associated with a reduced chance of pregnancy. ***Fertil Steril* 2003; 79:873-880.**
30. Kolibianakis EM et al. Abnormal endometrial development occurs during the luteal phase of nonsupplemented donor cycles treated with recombinant follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone antagonists. ***Fertil Steril* 2003; 80:464-466.**
31. Kolibianakis EM et al. Initiation of gonadotrofin-releasing hormone antagonist on day 1 as compared to day 6 of stimulation: effect on hormonal levels and follicular development in *in vitro* fertilization cycles. ***The Journal of Clinic Endocr & Metab* 2005; 88:5632-37.**
32. Liu HC, Lai YM, Davis O, et al. Improved pregnancy outcome with gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a) stimulation is due to the improvement in oocyte quantity rather than quality. ***J Assist Reprod Genet* 1992; 9: 338-342.**

33. Ludwig M, Katalinic A, Banz C, Schröder AK, Löning M, Weiss JM, Diedrich K. Tailoring the GnRH antagonist cetrorelix acetate to individual patients' needs in ovarian stimulation for IVF: results of prospective, randomized study. ***Hum Reprod* 2002; 17:2842-2845.**
34. Lunenfeld B 2005. ***GnRH Analogs in Human Reproduction. Taylor & Francis, 2005, United Kingdom.***
35. Messinis IE. Ovulation induction: a mini review. ***Hum Reprod Advance Access July 8 2005.***
36. Mochtar MH, on behalf of The Dutch Ganirelix Study Group. The effect of an individualized GnRH antagonist protocol on folliculogenesis in IVF/ICSI. ***Hum Reprod* 2004; 19:1713-1718.**
37. Nargund G, Waterstone J, Bland JM, Philips Z, Parsons J, Campbell S. Cumulative conceptions and live birth rates in natural (unstimulated) IVF cycles. ***Hum Reprod* 2001; 16: 259-262.**
38. Nikolettos N, Al-Hasani S, Felberbaum R, Demirel LC, Kupker W, Montzka P, Xia YX, Schopper B, Sturm R, Diedrich K; Gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol: a novel method of ovarian stimulation in poor responders. ***Eur J Obst Gyn Repr Biol* 2001;97:202-207.**
39. Olivennes F, Alvarez S, Bouchard P, et al. The use of a new GNRH antagonist (Cetrorelix) in IVF-ET with a single dose protocol: a dose finding study of 3 versus 2 mg. ***Hum Reprod* 1998; 13 : 2411-2414.**
40. Olivennes F, Fanchin R, Bouchard P, et al. Scheduled administration of GNRH antagonist (Cetrorelix) on day 8 of in vitro fertilization cycles: a pilot study. ***Hum Reprod* 1995; 10: 1382-1386.**
41. Olivennes F, Fanchin R, Bouchard P, et al. The single or dual administration of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix in an in Vitro fertilization embryo transfer program. ***Fertil Steril* 1994; 62:468-476.**
42. Olivennes, F., Belaisch-Allart, J., Emperaire, J.C. *et al.* Prospective, randomized, controlled study of in-vitro fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist (cetrorelix) or a depot formula of an LH-RH agonist (triptorelin). ***Fertil Steril* 2000; 73: 314–320.**
43. Olivennes, F; Mannaerts B, Struijs M, Bonduelle M, Devroey P. Perinatal outcome of pregnancy after GnRH antagonist (ganirelix) treatment during ovarian stimulation for conventional IVF or ICSI: a preliminary report. ***Hum Reprod* 2001;, 16:1588-1591.**
44. Pelnick MJ, Hoek A, Simons AHM, Heineman MJ. Efficacy of natural cycle IVF: a review of the literature. ***Hum Reprod Update* 2002; 8:129-139.**

45. Reissmann T, Felberbaum R, Diedrich K, et al. Development and applications of Luteinizing hormone-releasing antagonists in the treatment of infertility: an overview. ***Hum Reprod* 1995; 10:1974-1981.**
46. Rizk B and Smitz J. Ovarian hyperstimulation syndrome after superovulation using LH-RH agonists for IVF and related procedures. ***Hum Reprod* 1992; 7: 320-327.**
47. Shoham Z, Schacter M, Loumaye E, Weissman A, MacNamee M, Insler V. The luteinizing hormone surge--the final stage in ovulation induction: modern aspects of ovulation triggering. ***Fertil Steril* 1995;64:237-251.**
48. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the implantation of human embryo. ***Lancet* 1978;2:366.**
49. Takahashi K, Mukaida T, Tomiyama T, Goto T, Oka C. GnRH antagonist improved blastocyst quality and pregnancy outcome after multiple failures of IVF/ICSI-ET with a GnRH agonist protocol. ***J Assist Reprod Genet* 2004; 21:317-22.**
50. Testart J. Cleavage stage of human embryos two days after fertilization in vitro and their developmental ability after transfer into the uterus. ***Hum Reprod* 1986; 1:29.**
51. Terriou P, Sapin JL, Giorgette C, Hans E, Spach JL, Roulier R. Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. ***Fertil Steril* 2001; 75:525-531.**
52. The European and Middle East Orgalutran Study Group. Comparable clinical outcome using the GnRH antagonist ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH surges in women undergoing ovarian stimulation. ***Hum Reprod* 2001; 16: 644-51.**
53. The Ganirelix Dose Finding Study Group. A double-blind, randomized, dose-finding study to assess the efficacy of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). ***Hum Reprod* 1998; 13: 3023-3031.**
54. The North American Ganirelix Study Group. Efficacy and safety of ganirelix acetate versus leuprolide acetate in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. ***Fertil Steril* 2001; 75:38-45.**

FOLLICULAR COHORT HOMOGENIZATION BY THE ADMINISTRATION OF OESTRADIOL IN CONTROLLED OVARIAN STIMULATION CYCLES WITH GnRH ANTAGONIST (MULTIPLE DOSE PROTOCOL)

Cunha Filho, JS *; Terres, LF; Holanda, F; Arbo, E; Freitas, F; Facin AC, Souza CAB, Salazar C, Passos, EP.

Gynecology / Human Reproduction Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre

UFRGS

* Correspondence should be addressed to: Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Rua Ramiro Barcellos, 2350, Porto Alegre, RS, Brasil. CEP 90035-003

Presented at 21st Annual Meeting of ESHRE, Copenhagen, Denmark, 19-22 June 2005
and published at Human Reproduction 20 (suppl 1): i106.

ABSTRACT:

Background: The use of GnRH antagonists may present a decrease in the number of oocytes retrieved in comparison with cycles induced with GnRH agonists. This is a result of a heterogeneous follicular cohort in the beginning of the follicular phase and may compromise the reproductive results. The administration of oestradiol in the luteal phase can coordinate the selectable follicles and, theoretically, increase the number of mature oocytes in the GnRH antagonist cycles in an attempt to reach better clinical results.

The aim of the present paper is to investigate if the administration of estradiol in GnRH antagonist cycles can coordinate the preantral follicles, improving its homogeneity and causing the number of mature oocytes to be comparable to cycles of controlled ovarian stimulation (COS) with GnRH agonists.

Methods: A quasi-experimental study was conducted with 55 patients that were eligible for IVF-ICSI from January/2003 to December/2004, with the administration of 4 mg/day of estradiol from the twentieth day to the second day of the following cycle, before COS with GnRH antagonist multiple dose protocol (group 1). Fifty-five patients submitted to IVF-ICSI in 2001-2002 with the use of agonist were allocated as a control group (group 2). The primary outcome was the number of retrieved oocytes.

Results: Patients were similar in terms of age and other clinical characteristics. No differences were found in the number of mature oocytes retrieved (group I mean 8.1 ± 4.7 and group II 7.4 ± 4.5) or in the oocyte quality. The other reproductive outcomes were similar.

Conclusions: The use of estradiol associated to the GnRH antagonist may coordinate the selectable follicles and increase the rates of mature oocytes causing the reproductive results to be comparable to the results with the use of agonists.

Key words: GnRH antagonists, follicular cohort, homogenization, oestradiol.

INTRODUCTION:

The standard therapy for induction of ovulation for assisted fertilization consists in the administration of GnRH agonists during the previous luteal phase with the purpose of avoiding a precocious luteinization. Recently we have had the possibility of inhibiting a precocious liberation of the LH by GnRH antagonists administration.

The GnRH antagonists cause direct and immediate hypophysary suppression, which is the opposite of the agonists that require prolonged administration to obtain the same effect. Therefore, the antagonists can be administered immediately before the expected LH peak, and only a few days of treatment are necessary. Most of the studies suggest administration beginning on the sixth day of FSH use for around 4 to 5 days (Albano et al; 1997, European Orgalutran Study Group; 2000, European Middle East Orgalutran Study Group; 2001).

During controlled ovarian stimulation cycles (COS) associated with the use of antagonists, these showed themselves to be equally effective as the agonists in the prevention of precocious luteinization. However, it was recently demonstrated that in cycles with antagonist there is a lower number of oocytes retrieved and lower serum oestradiol levels. Though this profile may have a favorable effect on the frequency of the ovarian hyperstimulation syndrome, it is responsible for lower levels of clinical pregnancies when compared to the utilization of agonists (Al-Inahny and Alboulghar; 2002).

The lower number of mature oocytes probably should be related to a heterogeneous antral follicular cohort (Olivennes, 2002). The inter-cycle increase of FSH during the late luteal phase is one of the most important steps in follicular development and recruitment (Klein, 1996). We know that the secretion of FSH can be inhibited by the administration of estrogen during the luteal phase, which reduces the size and increases the homogeneity of the selectable follicles on the third day. Theoretically, the

administration of estradiol could increase the number of mature oocytes in the GnRH antagonist cycles in an attempt to reach better clinical results (Fanchin, 2003).

The objective of the present study is to check if the administration of oestradiol during COS controlled with GnRH antagonist can coordinate the antral follicles, improving its homogeneity and causing the number of mature oocytes to be comparable to COS with GnRH agonists.

MATERIALS AND METHODS:

Design

Quasi-experimental study was performed during the period from january/ 2003 to december/ 2004, with historic controls of the period from january/ 2001 to december/ 2002.

Patients

Patients eligible for IVF/ICSI that came to the Human Reproduction Center at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The criteria of inclusion were the following: women between the age of 18 and 39 with a body mass index from 18 to 27 Kg/m² and weight between 50 and 90 Kg, and with menstrual cycles with a duration from 24 to 35 days. The exclusion criteria were the following: contraindication to the use of GnRH antagonist, polycystic ovaries syndrome, history of poor response to the FSH, previous oophorectomy, more than three attempts of IVF/ICSI, BMI>27 Kg/m².

Ovulation Induction

Included patients in the study group received oestradiol (4mg po daily) from the twentieth day to the second day of the following cycle and the COS was performed according the GnRH antagonist flexible protocol. The control group was made up of patients submitted to IVF/ICSI using a long protocol of GnRH agonist (leuprolide acetate 1 mg/day after the

twentieth day of the menstrual cycle) during 2001-2002. The historical controls followed the same criteria of exclusion and pairwise comparisons were made by age. Both groups received recombinant FSH in an initial dose of 150 IUs after the third day.

Ecographic monitoring was carried out after 5 days from the beginning of the stimulation with recombinant FSH and with a daily frequency up to the administration of the hCG. When at least three follicles were larger than 18 mm, the patients received the last injection of antagonist for the study group, and 10,000 IU hCG IM were administered to both groups. The transference of embryos was done 72 hours after the retrieval of the oocytes. The support of luteal phase was realized with 600mg/day of micronized progesterone.

Approval was received from the Research Ethical Committee from Hospital de Clínicas de Porto Alegre and all of the patients were included only after they were informed about the procedures and signed an informed consent.

Statistical analysis

The primary outcome of the study was to evaluate the difference in the number of mature oocytes between the two groups. Secondary outcomes were the following: rates of fertilization and implantation; number of embryos in the second day of culture; number of embryos transferred; gestation rates; ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) and associated complications; quantity of gonadotropin used and the ovulation induction time. Gestation was defined as an intrauterine gestation with at least one fetus with a heartbeat detected by ultrasound after 6 weeks of the embryo transference.

The calculation of sample size was done previously to beginning the study, considering $P\beta$ 80% and $P\alpha$ 5%. According to previous studies and taking into consideration an average number of oocytes retrieved of 10, with a standard deviation of 5

and a difference between the groups of 3 oocytes, an n was calculated of 50 patients under study and 50 controls.

Category variables were compared with chi-square test. Continuous variables were compared with Student t or Mann-Whitney test, depending on its characteristics. We considered the differences to be statistically significant when $P < 0.05$.

RESULTS

One hundred ten patients were included: 55 patients in the study group (GnRH antagonist) and 55 controls (GnRH agonist). The mean age (\pm SD) of the control group was 32.8 ± 4.4 years and of the study group was 32.6 ± 4.0 years, without statistical difference. There are also no differences as to the causes of infertility among the groups, as demonstrated on table I. The parity of the patients and the duration of the infertility also did not present differences between the groups.

Only patients with tubal cause or masculine indication were included, which made a total of 66 patients that were submitted to IVF (tubal cause) and 44 to ICSI (masculine cause), and there was no significant difference between the groups ($P > 0.05$). The IVF/ICSI results were presented in table II. No differences were found in the number of mature oocytes and the number of oocytes retrieved. The oocyte quality was similar in both groups. The rates of fertilization, implantation, and gestation, and the number of embryos transferred did not present differences between the groups ($p > 0.05$). The number of days of induction and the total dose of gonadotropins were also similar in both groups. Another secondary outcome evaluated was the incidence of OHSS that was also similar between the groups. Six women of the study group and four from the control group presented OHSS ($P = 0.742$, exact test of Fisher), and no patients needed to be hospitalized.

DISCUSSION

Our study demonstrated that there was no difference between the GnRH antagonist-oestradiol group and the GnRH agonist group as for the primary outcome: the number of mature oocytes. There were also no differences when comparing the other reproductive outcomes.

Clinical trials that compared cycles with agonists versus antagonists presented similar reproductive results, though there is a small decrease in the number of oocytes retrieved in cycles with antagonists (Olivennes et al, 2000, European Orgalutran Study Group, 2000, European Cetrorelix Study Group, 2000, North American Ganirelix Study Group, 2001, European and Middle East Orgalutran Study Group, 2001). A plausible and recognized explanation is the lowering of the inhibin A and estradiol levels at the end of the luteal phase with a consequential increase of the FSH inter-cycle (Klein, 1996). This increase of FSH does not occur with patients submitted to ovulation induction with GnRH agonists that, by the action of the medication itself, has a reduction of the FSH levels and consequently a homogenization of the follicular cohort (Olivennes, 2002).

However, women that used antagonist do not have their follicular cohort prepared and may present an unfavorable hormonal environment with discrepancies between the selectable follicles (Fanchin, 2003). These discrepancies could be the issues responsible for the differences found in relation to the number of retrieved oocytes.

Fanchin conducted a study published in 2003 in an attempt to prove that the differences in size between the antral follicles were a result, at least partially, to the precocious and progressive exposure to the FSH. So a random clinical trial was carried out with the use of oestradiol in the luteal phase versus a control group without medication. The administration of oestradiol had already shown to be effective in reducing the secretion of endogenous FSH (Zelevnik, 1981; de Ziegler, 1998). The ecographic and hormonal results in the third day of the following cycle proved the authors' hypothesis, with

a reduction in the follicular diameter and discrepancies. These results demonstrate that the use of oestradiol in the luteal phase preceding the cycle of induction with antagonist can be an instrument for the synchronization of the follicular growth in COS cycles (Fanchin, 2003).

In order to test the hypothesis of homogenization of the follicular cohort before the ovulation induction with antagonist, a clinical trial with 90 patients that were candidates for IVF was carried out by the same group of investigators (Fanchin, 2003). Forty-seven patients received 4mg of oestradiol beginning on the twentieth day of the previous cycle up to the second day of the cycle, and 43 patients served as controls. Follicles with a smaller average diameter and with discrepancies of reduced size were found in the group of oestradiol as compared to the control group. The authors concluded that the administration of oestradiol in the previous luteal phase improves the follicular homogeneity, which is in accordance with our results.

Another aspect that is important to be considered as to the follicular development in patients receiving GnRH antagonist is the use of a flexible or individualized protocol. In 2002 a study with 60 patients receiving cetrorelix under 3 different protocols was published: fixed multiple doses, individualized multiple doses, or individualized single dose. The number of oocytes retrieved was largest in the two groups of flexible protocol and the quantity of FSH used was lower in the protocol of flexible multiple dose. The results reinforce the hypothesis that the individual adjustment of GnRH antagonist medication optimizes the ovarian stimulation with a greater number of oocytes retrieved with lowering the need of FSH without increasing the need for monitoring (Ludwig M, 2002).

Several clinical trials published in the beginning of this decade have similar results. They show that the use of antagonists reduces the treatment time with gonadotropins and the total dose used, as well as serum oestradiol levels (European Cetrorelix Study Group,

2000; European Orgalutran Study Group, 2000). They also demonstrate the absence of a difference between antagonist and agonist in terms of reproductive outcomes (European Orgalutran Study Group, 2000; North American Ganirelix Study Group; European and Middle East Study Group, 2001).

However, with a systematic revision, the fixed protocol with antagonists demonstrated a lowering in the number of oocytes retrieved with a lower clinical gestation rate in relation to the cycles that used GnHR agonists and the idea of reducing the ovarian hyperstimulation syndrome in relation to the agonists was not confirmed (Al-Inany, 2004). Recently, we demonstrate there were no differences in inhibin A and VEGF in the follicular fluid of patients submitted to IVF with GnRH antagonist, comparing with natural cycles. (Cunha Filho, 2005). These results confirm the safety and effectiveness of the medication. Some possible biases (measurement and confusion) of our study were controlled during the recruitment, measurement and statistical analysis as described below: i) our primary outcome was the number of mature oocytes that is an unequivocal laboratory endpoint, ii) all patients were matched by age that is the main prognostic factor associated with almost all reproductive outcomes. Moreover, iii) we selected only patients who strictly matched the inclusion criteria.

In conclusion, our study had enough proof to recommend the utilization of oestradiol in the luteal phase that proceeds the cycle of COS with GnRH antagonists in order to homogenize the follicular cohort and increase the number of retrieved oocytes. However, we thought it would be pertinent carry out a prospective random clinical trial in order to confirm our findings.

Acknowledgments

We would like to thank Ana Angélica Gratão and Luciane Baptista for the activities developed in our lab.

REFERENCES

- 1) Albano C, Felberbaum RE, Smitz J, Riethmüller-Winzen H, Engel J, Diedrich K and Devroey P on behalf of the European Cetorelix Study Group (2000) Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetorelix and the LHRH-agonist buserelin. ***Hum Reprod* 15(3), 526-531.**
- 2) Albano C, Smitz J, Camus M, Rietmuller-Winzen H, Van Steirteghem A and Devroey P (1997) Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetorelix during controlled ovarian hyperstimulation. ***Fertil Steril* 67, 917-922.**
- 3) Al-Inany H, Aboulghar M (2002) Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception. A Cochrane Review. ***Hum Reprod* 17, 874-885.**
- 4) Cunha-Filho JS, Lemos N, Stein N, Laranjeira A and Passos EP (2005) 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* 83(4), 902-907.**
- 5) De Ziegler D, Jaaskelainen AS, Brioschi PA, Fanchin R and Bulletti C (1998) Synchronization of endogenous and exogenous FSH stimuli in controlled ovarian hyperstimulation (COH). ***Hum Reprod* 13, 561-564.**
- 6) European Middle East Orgalutran Study Group (2001) Comparable clinical outcome using the GnRH antagonist ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH surges in women undergoing ovarian stimulation. ***Hum Reprod* 16, 644-51.**

- 7) European Orgalutran Study Group, Borm, G and Mannaerts, B (2000) Treatment with the gonadotropin-releasing hormone antagonist ganirelix in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone is effective, safe and convenient: results of a controlled, randomized, multicentre trial. ***Hum Reprod* 15, 1490–1498.**
- 8) Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schonauer LM, Kadoch IJ, Cohen-Bacri P, Frydman R (2003) Coordination of early antral follicles by luteal estradiol administration provides a basis for alternative controlled ovarian hyperstimulation regimens. ***Fertil Steril* 79(2), 316-21.**
- 9) Fanchin R, Salomon L, Castelo-Branco A, Olivennes F, Frydman N, Frydman R (2003) Luteal estradiol pre-treatment coordinates follicular growth during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists. ***Hum Reprod* 18(12), 2698-2703.**
- 10) Klein NA, Battaglia DE, Fujimoto VY, Davis GS, Bremner WJ and Soules MR (1996) Reproductive aging: accelerated ovarian follicular development associated with a monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal older women. ***J Clin Endocrinol Metab* 81, 1038-1045.**
- 11) Ludwig M, Katalinic A, Banz C, Schröder AK, Löning M, Weiss JM, Diedrich K (2002) Tailoring the GnRH antagonist cetrorelix acetate to individual patients`needs in ovarian stimulation for IVF: results of prospective, randomized study. ***Hum Reprod* 17(11), 2842-2845.**
- 12) Olivennes F, Belaisch-Allart J, Empeaire JC, Dechaud H, Alvarez S, Moreau L, Nicollet B, Zorn JR, Bouchard P and Frydman R (2000) Prospective, randomized, controlled study of in vitro fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone-releasing hormone

(LHRH) antagonist (cetorelix) or a depot formula of an LHRH agonist (triptorelin). ***Fertil Steril* 73(2), 314-320.**

13) Olivennes, F; Cunha Filho, JS; Fanchin, R; Bouchard, P; Frydman, R (2002) The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation. ***Hum Reprod Update* 8, 279-290.**

14) The North American Ganirelix Study Group: Fluker M, Grifo J, Leader A, Levy M, Meldrum D, Muasher SJ, Rinehart J, Rosenwaks Z, Scott RT, Schoolcraft W et al (2001) Efficacy and safety of ganirelix acetate versus leuprolide acetate in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. ***Fertil Steril* 75, 38-45.**

15) Zeleznik, AJ (1981) Premature elevation of systemic estradiol reduces serum levels of follicle-stimulating hormone and lengthens the follicular phase of the menstrual cycle in rhesus monkeys. ***Endocrinology* 109, 352-355.**

Table I: Clinical characteristics (values are expressed as means and SD)

	Group 1	Group 2	<i>P value</i>
	Oestradiol + Antagonist	Agonist	
	(n= 55)	(n= 55)	
Age (y)	32.8±4.4	32.6±4.0	0.784
Duration of infertility (y)	5.2±3.0	5.4±2.5	0.784
Main causes of infertility			
Masculine (ICSI)	27	37	0.081
Anatomic (IVF)	28	18	

Table II: IVF/ ICSI results (values are expressed as means and SD)

	Group 1	Group 2	<i>P value</i>
	Oestradiol + Antagonist	Agonist	
	(n= 55)	(n= 55)	
No of total oocytes retrieved	8.1±4.7	7.4±4.5	0.448
Fertilization rates	70%	72%	0.876
No of embryos transferred	2.7±1.2	2.7±1.2	0.917
FSH administered (IU)	1786.50±602.10	1620.83±346.50	0.093
Implantation rate	22%	21%	0.863
Clinical pregnancy	29%	27%	1.0

HOMOGENIZAÇÃO DA COORTE FOLICULAR PELA ADMINISTRAÇÃO DE ESTRADIOL EM CICLOS DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA COM ANTAGONISTA DE GnRH (PROTOCOLO DE DOSES MÚLTIPLAS)

Cunha Filho, JS *; Terres, LF; Holanda, F; Arbo, E; Freitas, F; Facin AC, Souza CAB, Salazar C, Passos,EP.

Serviço de Ginecologia / Setor de Reprodução Humana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

* Correspondência deve ser endereçada a: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcellos, 2350, Porto Alegre, RS, Brasil.

Apresentado no 21º Encontro Anual da Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) e publicado na Human Reproduction 20(suppl 1): i106.

RESUMO:

Introdução: O uso de antagonistas de GnRH pode apresentar uma diminuição no número de oócitos recuperados, se compararmos a ciclos induzidos com agonistas do GnRH. Isto é resultado de uma coorte folicular heterogênea no início da fase folicular podendo comprometer os resultados reprodutivos. A administração de estradiol na fase lútea pode coordenar os folículos selecionáveis e, teoricamente, aumentar o número de oócitos maduros nos ciclos de antagonista de GnRH, buscando melhores resultados clínicos.

Objetivos: Verificar se a administração de estradiol, em ciclos com antagonista de GnRH pode coordenar os folículos antrais precoces, melhorando a sua homogeneidade e fazendo com que o número de oócitos maduros seja comparável a ciclos de estimulação ovariana controlada com agonistas de GnRH.

Material e Métodos: Foi conduzido um estudo quase experimental com 55 pacientes elegíveis para FIV-ICSI de janeiro de 2003 a dezembro de 2004, com a administração de estradiol 4 mg/dia do vigésimo dia ao segundo dia do ciclo seguinte, com antagonista. 55 pacientes submetidas a FIV – ICSI no ano de 2001-2002, com o uso de agonista foram alocadas como controle. O desfecho primário foi número de oócitos recuperados.

Resultados: Não foram encontradas diferenças no número de oócitos recuperados e maduros, e na qualidade oocitária. Os demais desfechos reprodutivos foram similares.

Conclusões: O uso de estradiol associado ao antagonista de GnRH pode coordenar os folículos selecionáveis e aumentar as taxas de oócitos maduros, tornando os resultados reprodutivos comparáveis aos resultados com o uso de agonistas.

INTRODUÇÃO:

A terapia padrão para indução de ovulação para fertilização assistida consiste na administração de agonistas de GnRH durante a fase lútea precedente com a finalidade de evitar a luteinização precoce. Recentemente temos a disponibilidade de inibir a liberação precoce do LH pela administração de antagonistas do GnRH

Os antagonistas de GnRH causam supressão hipofisária direta e imediata, ao contrário dos agonistas, que exigem administração prolongada para obter tal efeito. Assim, os antagonistas podem ser administrados imediatamente antes do pico de LH esperado, sendo necessários apenas alguns dias de tratamento. A maioria dos estudos prevê administração a partir do sexto dia de uso de FSH, por cerca de 4 a 5 dias. (Albano et al; 1997, European Orgalutran Study Group; 2000, European Middle East Orgalutran Study Group; 2001).

Em ciclos de estimulação ovariana controlada associada ao uso de antagonistas, estes se mostraram igualmente eficazes aos agonistas na prevenção de luteinização precoce e com taxas de cancelamento de ciclos comparáveis. Entretanto, foi demonstrado recentemente, que em ciclos com antagonista há um menor número de oócitos recuperados e menores níveis de estradiol. Embora este perfil possa ter efeito favorável na frequência da síndrome de hiperestimulação ovariana, é responsável por menores taxas de gestação clínica quando comparado a utilização dos agonistas (Al-Inahny and Alboulghar; 2002).

O menor número de oócitos maduros provavelmente deve estar relacionado a uma coorte folicular antral heterogênea (Olivennes, 2002). O aumento interciclo de FSH, durante a fase lútea tardia, é um dos mais importantes passos no desenvolvimento e recrutamento folicular (Klein, 1996). É sabido que a secreção de FSH pode ser inibida pela administração de estrogênio durante a fase lútea, o que reduz o tamanho e aumenta

a homogeneidade dos folículos selecionáveis no terceiro dia. Teoricamente, a administração de estradiol poderia aumentar o número de oócitos maduros nos ciclos de antagonista de GnRH, buscando melhores resultados clínicos (Fanchin, 2003).

O objetivo do presente estudo é verificar se a administração de estradiol, durante ciclos de estimulação ovariana controlada com antagonista de GnRH pode coordenar os folículos antrais precoces, melhorando a sua homogeneidade, e fazendo com que o número de oócitos maduros seja comparável a ciclos de estimulação ovariana controlada com agonistas de GnRH.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Delineamento

Estudo quase experimental realizado no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2004, com controles históricos do período de janeiro/ 2001 a dezembro/ 2002.

Pacientes

Pacientes elegíveis para FIV/ICSI que procuraram o Serviço de Ginecologia/ Setor de Reprodução Humana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os critérios de inclusão foram os seguintes: mulheres de 18 a 39 anos, com índice de massa corporal de 18-27 Kg/ m² e peso entre 50 e 90 Kg, com ciclos menstruais com duração de 24-35 dias. Os critérios de exclusão são: contra-indicação ao uso de antagonistas de GnRH, síndrome de ovários policísticos, história de má resposta ao FSH, ooforectomia prévia, mais de três tentativas de FIV /ICSI, IMC>27 Kg/ m².

Indução de Ovulação

As pacientes incluídas (grupo em estudo) receberam estradiol (4mg via oral diárias) do vigésimo dia ao segundo dia do ciclo seguinte e estimulação ovariana controlada com

protocolo flexível de antagonista de GnRH. O grupo controle era formado por pacientes submetidas a FIV/ ICSI usando protocolo longo de agonista de GnRH (acetato de leuprolide 1mg/dia após o vigésimo dia do ciclo menstrual) no ano de 2001-2002. Os controles históricos seguiam os mesmos critérios de exclusão e foram pareados por idade. Ambos os grupos receberam FSH recombinante em dose inicial de 150 UI após o terceiro dia.

Monitorização ecográfica foi realizada após 5 dias do início da estimulação com FSH recombinante e com frequência diária até a administração do hCG. Quando pelo menos três folículos estavam maiores de 18 mm, as pacientes recebiam a última injeção de antagonista para o grupo em estudo, e era administrado hCG 10.000 UI IM para os dois grupos. A transferência de embriões era realizada 72 horas após a punção dos oócitos. O suporte de fase lútea foi realizado com progesterona micronizada 600mg/dia.

Foi obtida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e todas as pacientes foram incluídas após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Análise estatística

O desfecho primário do estudo foi avaliar a diferença no número de oócitos maduros entre os dois grupos. Desfechos secundários foram: taxas de fertilização e implantação; número de embriões no segundo dia de cultura; número de embriões transferidos; taxas de gestação; síndrome de hiperestímulo ovariano e complicações associadas; quantidade de gonadotrofina utilizada e tempo de indução de ovulação. Gestação foi definida como gestação intra-uterina com pelo menos um feto com batimento cardíaco ao ultra-som após 6 semanas da transferência embrionária.

O cálculo de tamanho de amostra foi realizado previamente ao início do estudo, considerando um $P\beta$ 80% e um $P\alpha$ 5%. De acordo com estudos anteriores, levando-se

em consideração um número médio de oócitos recuperados de 10, com desvio padrão de 5 e uma diferença entre os grupos de 3 oócitos, foi calculado um n de 50 pacientes em estudo e 50 controles.

Variáveis categóricas foram comparadas com teste de qui-quadrado. Variáveis contínuas com teste t de Student ou Mann-Whitney, dependendo de suas características. Consideramos estatisticamente significativas as diferenças quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Foram incluídas 110 pacientes, sendo 55 pacientes no grupo de estudo (antagonista de GnRH) e 55 controles (agonista de GnRH). A média de idade (\pm desvio-padrão) do grupo controle foi 32.8 ± 4.4 anos e do grupo em estudo 32.6 ± 4.0 anos, sem diferença estatística. Não houve também diferenças quanto as causas de infertilidade, como demonstrado na tabela I. A paridade das pacientes e a duração da infertilidade também não apresentou diferença entre os grupos.

Foram incluídas apenas pacientes com causa tubária ou indicação masculina, no total, 66 pacientes foram submetidas a FIV (causa tubária) e 44 a ICSI (causa masculina), não havendo diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$). Os resultados de FIV/ ICSI estão apresentados na tabela II. Não foram encontradas diferenças no número de oócitos maduros e número de oócitos recuperados. A qualidade oocitária foi similar nos dois grupos. As taxas de fertilização, implantação e gestação e número de embriões transferidos não apresentaram diferenças entre os grupos. O número de dias de indução e a dose total de gonadotrofinas também foram similares nos dois grupos. Outro desfecho secundário avaliado foi a incidência de hiperestímulo ovariano que também foi similar entre os grupos. Seis mulheres do grupo em estudo e quatro do grupo controle apresentaram síndrome de hiperestímulo ovariano ($P = 0,742$, teste exato de Fisher), nenhuma paciente necessitou internação hospitalar.

DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que não há diferença entre o grupo de antagonista de GnRH associado a estradiol e o grupo de agonista de GnRH quanto ao desfecho primário: o número de oócitos maduros. Não houve também diferenças na comparação dos demais desfechos reprodutivos.

Ensaio clínico que compararam ciclos com agonistas versus antagonistas apresentaram resultados reprodutivos similares, entretanto, existe uma discreta diminuição do número de oócitos recuperados em ciclos com antagonistas (Olivennes et al, 2000, European Orgalutran Study Group, 2000, European Cetorelix Study Group, 2000, North American Ganirelix Study Group, 2001, European and Middle East Orgalutran Study Group, 2001). Uma explicação plausível e reconhecida é a diminuição dos níveis de inibina A e estradiol no final da fase lútea com conseqüente aumento do FSH interciclo (Klein, 1996). Este aumento de FSH não ocorre nas pacientes submetidas a indução de ovulação com agonistas do GnRH que, pela ação da própria droga, têm uma redução dos níveis do FSH, e conseqüentemente uma homogeneização na coorte folicular (Olivennes, 2002).

No entanto, mulheres que utilizaram antagonista não têm a sua coorte folicular preparada e podem apresentar um meio ambiente hormonal desfavorável, com discrepâncias entre os folículos selecionáveis (Fanchin, 2003). Estas discrepâncias poderiam ser as responsáveis pelas diferenças encontradas em relação ao número de oócitos recuperados.

Fanchin conduziu um estudo publicado em 2003, buscando provar que as diferenças de tamanho entre folículos antrais resultavam, ao menos parcialmente, da exposição precoce e progressiva ao FSH. Foi realizado então um ensaio clínico randomizado com o uso de estradiol na fase lútea versus um grupo controle sem medicação. A administração de estradiol já se mostrara eficaz de reduzir a secreção de

FSH endógeno (Zeleznik, 1981; de Ziegler, 1998). Os resultados ecográficos e hormonais no terceiro dia do ciclo seguinte comprovaram a hipótese dos autores, com redução do diâmetro folicular e das discrepâncias entre os mesmos no grupo de uso de estradiol, mas não nos controles. Estes resultados demonstram que o uso de estradiol na fase lútea precedente ao ciclo de indução com antagonista pode ser um instrumento para sincronização do crescimento folicular nos ciclos de estimulação ovariana controlada. (Fanchin, 2003).

Para testar a hipótese de homogeneização da coorte folicular antes da indução da ovulação com antagonista foi realizado um ensaio clínico com 90 pacientes candidatas a FIV (Fanchin, 2003). Quarenta e sete pacientes receberam 4 mg de estradiol desde o vigésimo dia do ciclo anterior até o segundo dia do ciclo e 43 pacientes serviram de controle. Foram encontrados folículo com diâmetro médio menor e com discrepâncias de tamanho atenuadas no grupo do estradiol em relação ao grupo controle. Os autores concluem que a administração de estradiol na fase lútea precedente melhora a homogeneidade folicular, estando de acordo com os nossos resultados.

Outro aspecto importante a ser considerado quanto ao desenvolvimento folicular em pacientes recebendo antagonista de GnRH é o uso de protocolo flexível, ou seja, individualizado. Em 2002, foi publicado um estudo com 60 pacientes recebendo cetorelix em 3 protocolos diferentes: doses múltiplas fixas, doses múltiplas individualizadas ou dose única individualizada. O número de oócitos recuperados foi maior nos dois grupos de protocolo flexível e foi menor a quantidade de FSH utilizada no protocolo de dose múltiplas flexível. Os resultados reforçam a hipótese de que o ajuste individual de medicação antagonista do GnRH otimiza a estimulação ovariana com maior número de oócitos recuperados com menor necessidade de FSH e sem aumento da necessidade de monitoração (Ludwig M, 2002).

Os grandes ensaios clínicos publicados no início desta década têm resultados semelhantes. Comprovam que o uso de antagonistas reduz o tempo de tratamento com gonadotrofinas e a dose total utilizada assim como os níveis séricos de estradiol (European Cetorelix Study Group, 2000; European Orgalutran Study Group, 2000). Demonstram também a ausência de diferença entre antagonistas e agonistas quanto aos desfechos reprodutivos (European Orgalutran Study Group, 2000; North American Ganirelix Study Group; European and Middle East Study Group, 2001).

Entretanto, em uma revisão sistemática, o protocolo fixo com antagonistas demonstrou diminuição no número de oócitos recuperados com uma taxa de gestação clínica menor em relação aos ciclos que utilizaram agonistas do GnRH e não comprovou-se a idéia de redução da síndrome de hiperestímulo ovariano em relação aos agonistas (Al-Inany, 2004).

Recentemente, nosso grupo demonstrou a ausência de diferença nos níveis de inibina A e VEGF no fluido folicular de pacientes utilizando antagonistas de GnRH e pacientes em ciclos naturais. Estes resultados confirmam a segurança e eficácia desta medicação (Cunha Filho, 2005).

Alguns possíveis vieses do nosso estudo (aferição e confusão) foram controlados durante o recrutamento, aferição e análise estatística como descrito a seguir: 1) nosso desfecho primário foi o número de oócitos maduros, que é um desfecho inequívoco a nível laboratorial; 2) todas as pacientes foram pareadas por idade, que é o mais importante fator prognóstico associado com quase a totalidade dos desfechos reprodutivos. Ainda, 3) nós selecionamos apenas pacientes que cumpriam adequadamente os fatores de inclusão.

Concluindo, nosso estudo tem poder suficiente para recomendar a utilização de estradiol na fase lútea que precede o ciclo de estimulação ovariana controlada com antagonistas de GnRH com o intuito de homogenizar a coorte folicular e aumentar o

número de oócitos recuperados. Entretanto, é pertinente que se conduza um ensaio clínico randomizado com poder para confirmar nossos achados.

Agradecimentos

Nós agradecemos a Ana Angélica Gratão e Luciane Baptista pelas atividades desenvolvidas em nosso laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albano C, Felberbaum RE, Smitz J, Riethmüller-Winzen H, Engel J, Diedrich K and Devroey P on behalf of the European Cetrorelix Study Group (2000) Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetrorelix and the LHRH-agonist buserelin. *Hum Reprod* **15(3)**, 526-531.
2. Albano C, Smitz J, Camus M, Rietmuller-Winzen H, Van Steirteghem A and Devroey P (1997) Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* **67**, 917-922.
3. Al-Inany H, Aboulghar M (2002) Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception. A Cochrane Review. *Hum Reprod* **17**, 874-885.
4. Cunha-Filho JS, Lemos N, Stein N, Laranjeira A and Passos EP (2005) 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* **83(4)**, 902-907.
5. De Ziegler D, Jaaskelainen AS, Brioschi PA, Fanchin R and Bulletti C (1998) Synchronization of endogenous and exogenous FSH stimuli in controlled ovarian hyperstimulation (COH). *Hum Reprod* **13**, 561-564.
6. European Middle East Orgalutran Study Group (2001) Comparable clinical outcome using the GnRH antagonist ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH

- surges in women undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod* **16**, 644-51.
7. European Orgalutran Study Group, Borm, G and Mannaerts, B (2000) Treatment with the gonadotropin-releasing hormone antagonist ganirelix in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone is effective, safe and convenient: results of a controlled, randomized, multicentre trial. *Hum Reprod* **15**, 1490–1498.
 8. Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schonauer LM, Kadoch IJ, Cohen-Bacri P, Frydman R (2003) Coordination of early antral follicles by luteal estradiol administration provides a basis for alternative controlled ovarian hyperstimulation regimens. *Fertil Steril* **79(2)**, 316-21.
 9. Fanchin R, Salomon L, Castelo-Branco A, Olivennes F, Frydman N, Frydman R (2003) Luteal estradiol pre-treatment coordinates follicular growth during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists. *Hum Reprod* **18(12)**, 2698-2703.
 10. Klein NA, Battaglia DE, Fujimoto VY, Davis GS, Bremner WJ and Soules MR (1996) Reproductive aging: accelerated ovarian follicular development associated with a monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal older women. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 1038-1045.
 11. Ludwig M, Katalinic A, Banz C, Schröder AK, Löning M, Weiss JM, Diedrich K (2002) Tailoring the GnRH antagonist cetrorelix acetate to individual patients' needs in ovarian stimulation for IVF: results of prospective, randomized study. *Hum Reprod* **17(11)**, 2842-2845.
 12. Olivennes F, Belaisch-Allart J, Emperaire JC, Dechaud H, Alvarez S, Moreau L, Nicollet B, Zorn JR, Bouchard P and Frydman R (2000) Prospective, randomized, controlled study of in vitro fertilization-embryo

transfer with a single dose of a luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist (cetorelix) or a depot formula of an LHRH agonist (triptorelin). ***Fert il Steril 73(2), 314-320.***

13. Olivennes, F; Cunha Filho, JS; Fanchin, R; Bouchard, P; Frydman, R (2002) The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation. ***Hum Reprod Update 8, 279-290.***
14. The North American Ganirelix Study Group: Fluker M, Grifo J, Leader A, Levy M, Meldrum D, Muasher SJ, Rinehart J, Rosenwaks Z, Scott RT, Schoolcraft W et al (2001) Efficacy and safety of ganirelix acetate versus leuprolide acetate in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. ***Fertil Steril 75, 38-45.***
15. Zeleznik, AJ (1981) Premature elevation of systemic estradiol reduces serum levels of follicle-stimulating hormone and lengthens the follicular phase of the menstrual cycle in rhesus monkeys. ***Endocrinology 109, 352-355.***

Tabela I: Características Clínicas (valores expressos em média e desvio-padrão)

	Grupo 1	Grupo 2	P
	Estradiol + Antagonista	Agonista	
	(n= 55)	(n= 55)	
Idade (anos)	32.8±4.4	32.6±4.0	0.784
Duração da	5.2±3.0	5.4±2.5	0.784
infertilidade (anos)			
Principais causas			
de infertilidade			
Masculina (ICSI)	27	37	0.081
Anatômica (IVF)	28	18	

Tabela II: Resultados de FIV/ ICSI (média de desvio-padrão)

	Grupo 1	Grupo 2	P
	Estradiol + Antagonista	Agonista	
	(n= 55)	(n= 55)	
No total de oócitos recuperados	8.1±4.7	7.4±4.5	0.448
Taxas de fertilização	70%	72%	0.876
No de embriões transferidos	2.7±1.2	2.7±1.2	0.917
FSH administrado (IU)	1786.50±602.10	1620.83±346.50	0.093
Taxa de implantação	22%	21%	0.863
Gestação clínica	29%	27%	1.0

CONCLUSÕES

- Demonstramos que a administração de estradiol durante a fase lútea precedente a hiperestimulação ovariana para FIV com uso de antagonista do GnRH coordena a corte folicular e acarreta em um número de oócitos maduros comparáveis a utilização de agonistas do GnRH.
- Os demais desfechos reprodutivos avaliados, como taxas de fertilização, implantação, gestação, hiperestímulo ovariano, número de embriões transferidos, quantidade de FSH utilizada também não apresentaram diferenças.
- A utilização de estradiol em ciclos induzidos com antagonistas do GnRH para FIV é eficaz e segura na prevenção da luteinização precoce e tem resultados reprodutivos comparáveis ao uso dos agonistas do GnRH.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora nosso estudo tenha tido o cuidado de controlar diversos vieses que poderiam afetar os resultados, sugerimos a realização de um ensaio clínico randomizado para a confirmação dos nossos achados, tendo em vista que nosso delineamento foi um estudo quase experimental.

Os efeitos endometriais, embrionários e foliculares dos antagonistas de GnRH devem ser melhor estudados. Em maio de 2005 foi publicado na *Fertility and Sterility* (Danforth, *Fertil Steril* 2005; 83:1333-1338) um estudo em cobaias submetidas à quimioterapia, comparando o uso de agonistas e antagonistas de GnRH com o objetivo de reduzir os danos quimioterápicos nos folículos primordiais. Os agonistas demonstraram não ter efeito sobre o número de folículos primordiais e inclusive, reduziram a depleção causada pelo agente quimioterápico (ciclofosfamida). Entretanto, os antagonistas, tanto em administração sistêmica ou local, diretamente no ovário, causaram uma destruição significativa destes folículos. Estes resultados devem ser avaliados em outras espécies.