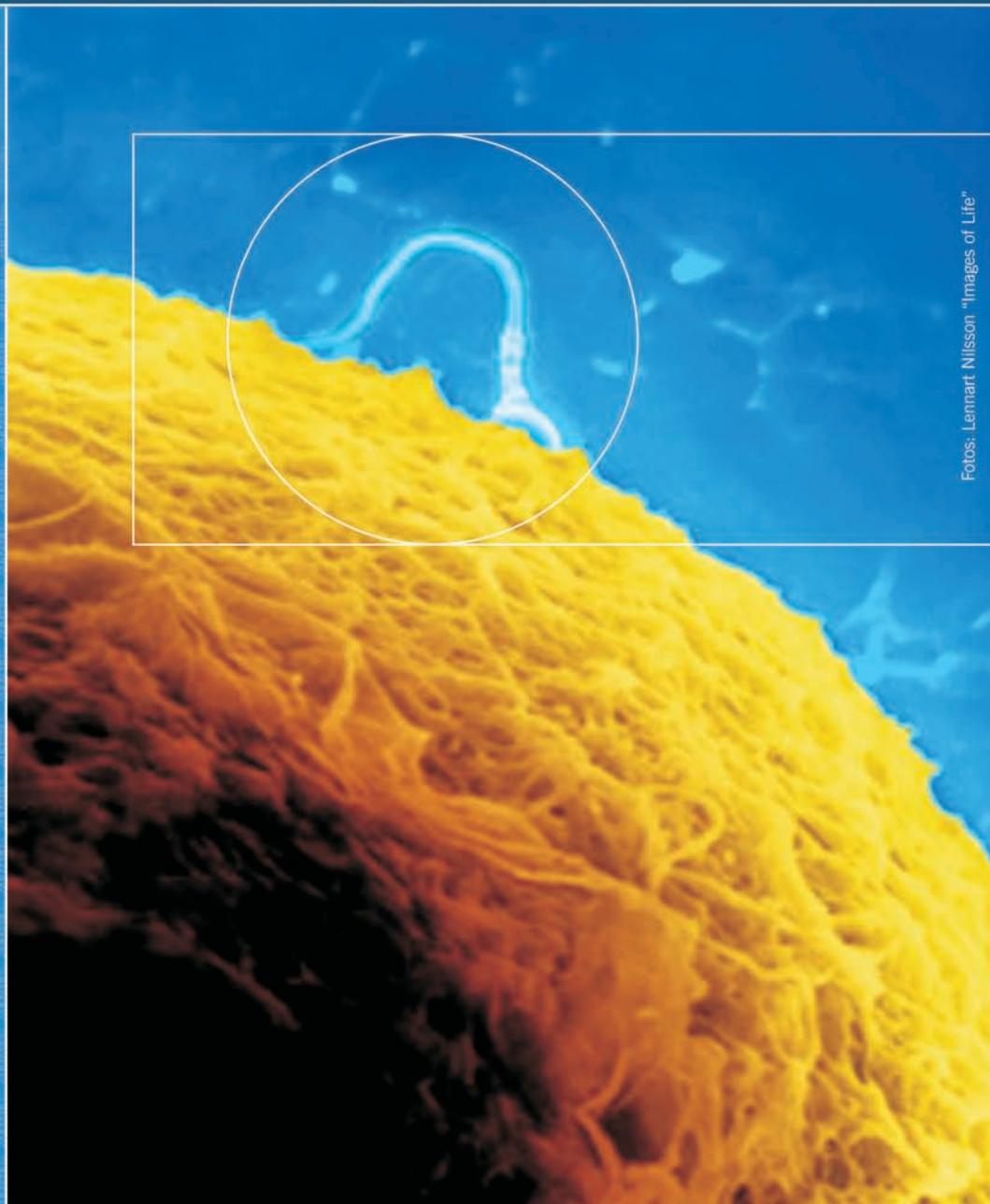


Volume 10
Número 4
Outubro / Novembro / Dezembro 2006
ISSN 1517-5693



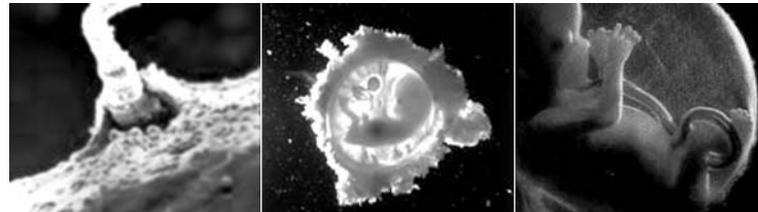
JBRA

**JORNAL BRASILEIRO DE
REPRODUÇÃO
ASSISTIDA**



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"

ORGÃO DA
SOCIEDADE BRASILEIRA
DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



JBR JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

CORPO EDITORIAL NACIONAL

Editor	Clínica	Região
Maria do Carmo Borges de Souza		RJ
Consultor Editorial		
José Gonçalves Franco Júnior		SP
Assistente Editorial		
Christina de Albuquerque da Rocha		RJ
Fernanda Freitas Oliveira Cardoso		RJ
Editores Associados		
Edson Borges Junior	FERTILITY	SP
João Batista Alcântara Oliveira	CRH - Ribeirão Preto	SP
Selmo Geber	ORIGEN	MG
Weydson Barros Leal		PE
Conselho editorial		
Adelino Amaral Silva	GENESIS	DF
Alessandro Schuffner	ANDROLAB	PR
Alvaro Petracco	FERTILITAT	RS
Ana Cristina Allemand Mancebo	G&O BARRA	RJ
Aroldo Camargos	UFMG	MG
Bela Zausner	GENESE	BA
Bruno Scheffer	IBRA	MG
Carlos André Henriques	G&O BARRA	RJ
Claudia G. Petersen	CRH - Ribeirão Preto	SP
Condesmar Marcondes Filho	NÚCLEO REPRODUÇÃO	SP
Dirceu Mendes Pereira	PROFERT	SP
Eduardo Pandolfi Passos	SEGIR - UFRGS	RS
Elvio Tognotti		SP
Humberto Ikuo Shibasaki		MT
João Pedro Junqueira Caetano	PRÓ-CRIAR / MATER DEI	MG
Joaquim Roberto Lopes		BA
Jonathas Borges Soares	PROJETO ALFA	SP

Jorge Hallak	REPROFERTY	SP
Leila Montenegro Silveira Farah	FERTILITY	SP
Lídio Jair Ribas Centa	ANDROLAB	PA
Luíz Fernando Dale	CENTRO DE MEDICINA DA REPRODUÇÃO	RJ
Marcos Sampaio	ORIGEN	MG
Mariangela Baldalotti	FERTILITAT	RS
Marilza Vieira Rudge	UNESP Botucatu	SP
Mario Cavagna		SP
Newton Eduardo Busso	UNIFERT	SP
Paulo Franco Taitson	IRH	MG
Paulo Sefarini	HUNTINGTON	SP
Paulo Spinola	CEPARH	BA
Renzo Antonini Filho	INSTITUTO DE SAÚDE DA MULHER	MG
Ricardo Melo Marinho	MATER DEI	MG
Roberta Wonchockier	PROJETO ALFA	SP
Roger Abdelmassih	Clinica e Centro de Reprodução Humana	SP
Rosana Maria dos Reis	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto	SP
Sidney Glina	Hospital Israelita Albert Einstein	SP
Silvana Chedid	CEPERH	SP

CORPO EDITORIAL INTERNACIONAL

Anne R. Greenlee		EUA
Claudia Borrero		Colômbia
Claudio Chillik		Argentina
David L. Keefe		EUA
Esther Pollak de Fried		Argentina
Francisco Riskey		Venezuela
Iván Valencia Madera		Equador
Juan Manuel Montoya		Colômbia
Karen Sermon		Bélgica

I – Informações Gerais

O Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida (JBRA) é uma publicação oficial de comunicação da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA – www.sbra.com.br), com periodicidade quadrimestral, e mais um suplemento com os trabalhos do Congresso Brasileiro da SBRA. Aceita trabalhos básicos e clínicos da área de Reprodução nas seguintes línguas: português, espanhol e inglês. As matérias para publicação devem ser inéditas, na forma de artigos originais, artigos de atualização, relatos de caso, opiniões.

Os textos devem vir acompanhados de carta assinada pelos autores, e serão encaminhados para avaliação por membros do Conselho Editorial, a serem designados pelo Editor. Após esta avaliação, os trabalhos são reencaminhados aos autores para possíveis correções, retornando ao avaliador para então serem aprovados ou não à publicação.

Os trabalhos devem ser enviados para:

Maria do Carmo Borges de Souza
 Editora do Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida
 Av. das Américas, 4666 - Centro Médico BarraShopping salas 312/313 - CEP 22649-900
 Rio de Janeiro - RJ – Brasil
 E-mail: journalsbra@cmb.com.br
 Fone: (21) 2430-9060 Fax: (21) 2430-9070
 Home Page: <http://www.sbra.com.br>

II – Apresentação dos Trabalhos

Os trabalhos devem ser enviados por e-mail: journalsbra@cmb.com.br e/ou disquete, digitados em espaço simples, páginas separadas, numeradas, formatado em Word para Windows/98 com letra Times New Roman no 12.

Primeira Página

Título do artigo em português e inglês
 Nome do(s) autor(es)
 Afiliação dos autores
 Nome do serviço onde foi executado o trabalho
 Endereço, número do telefone, fax e internet do autor principal
 Indicação de financiamentos relacionados ao trabalho

Segunda Página

Abstracts (o resumo deve, obrigatoriamente, ser escrito na língua do texto e em inglês)

Caso o artigo seja em inglês, fazer um resumo em português.

Key words / Palavras-chave: ver <http://decs.bvs.br>

Terceira e demais páginas

Texto

Artigos originais: São trabalhos resultantes de pesquisa científica apresentando dados originais de descobertas com relação a aspectos experimentais ou observacionais de característica médica, bioquímica e social, e inclui análise descritiva e ou inferências de dados próprios. Sua estrutura é a convencional que traz os seguintes itens: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Resumo com unitermos e Referências. Os artigos originais que envolvem experimentação devem declarar aprovação prévia por Comitê de Ética.

Artigos de revisão: São trabalhos que têm por objetivo resumir, analisar, avaliar ou sintetizar trabalhos de investigação já publicados em revistas científicas. Apresenta síntese e análise crítica da literatura levantada e não deve ser confundido com artigo de atualização.

Artigos de atualização ou divulgação de autores convidados (opiniões) são trabalhos que relatam informações geralmente atuais sobre tema de interesse para determinadas especialidades, uma nova técnica ou método, por exemplo, e que tem características distintas de um artigo de revisão visto que não apresentam análise crítica da literatura.

Relatos de caso: São artigos que representam dados descritivos de um ou mais casos explorando um método ou problema através de exemplo. Apresenta as características do indivíduo estudado, com indicação de sexo, idade e pode ser realizado em humano ou animal. Devem obedecer a seqüência: Introdução, Descrição do caso, Discussão ou Conclusão, Resumo com unitermos e Referências.

Cartas ao leitor - o envio de cartas ao editor comentado, discutindo ou criticando os artigos publicados no JBRA serão bem recebidas e publicados desde que aceitas pelo Conselho Editorial. Recomenda-se tamanho máximo de uma página, incluindo referências bibliográficas. Sempre que possível, uma resposta dos autores será publicada junto com a carta.

Leitura recomendada aos autores - * BIREME – www.bireme.br

III – Referências

As referências devem estar em ordem alfabética, com base no último sobrenome do autor principal seguido das iniciais. As citações serão identificadas no texto pelo sobrenome do autor e data (Steptoe, 1978), não mais que dois autores podem ser citados por referência (Edwards & Steptoe, 1980), no caso de mais de dois autores, usar et al. (Van Steirteghem et al., 1988).

1. Artigos em periódicos

Edwards R. G., Steptoe P. C., Purdy J. M. – Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown “in vitro”. Br. J. Obstet. Gynaecol., 87: 737-756, 1980.

2. Capítulos de Livros

Simpson J. L. – Gonadal dysgenesis and sex abnormalities: phenotypic-karyotypic correlations. In: Vallet H. L. and Porter I. H. Genetic Mechanisms of Sexual Development. New York:Academic Press, p.365-377, 1979.

3. Livros

Wolf D. P., Quigley M. M. (eds) – Human “in vitro” fertilization and embryo transfer. New York: Plenum Press, 1984.

OBS: Não fazer citações das referências através de números. Exemplo: Na pesquisa o fator imunológico (1).

IV – Ilustrações

As tabelas, gráficos, figuras e fotografias devem ser enviadas em folhas separadas, numeradas em algarismos romanos e com legendas individualizadas, ao final do trabalho.

As fotografias devem ser em preto e branco, sendo que as despesas com eventual reprodução de fotografias coloridas devem ser discutidas. Poderão também ser enviadas via internet.

DIRETORIA DA SBRA - 2005/2006

Presidente: Maria do Carmo Borges de Souza

1º Vice-Presidente: Eduardo P. Passos

2º Vice-Presidente: Ricardo Baruffi

1º Secretário: João Batista Alcantara Oliveira

2º Secretária: Madalena Caldas

1º Tesoureiro: Assumpto Iaconelli Júnior

2º Tesoureiro: Luiz Fernando Dale

Departamento de Publicações

Editora: Maria do Carmo Borges de Souza

1º Secretária: Christina de Albuquerque da Rocha

2º Secretária: Fernanda Freitas de Oliveira Cardoso

Comissão de Atividades Internacionais

Marcos Sampaio

Departamento Científico

Adelino Amaral Silva

Newton Eduardo Busso

Comissão de Ética e Defesa de

Prerrogativa

Bella Zaurner

Lídio Jair Ribas Centa

Dirceu Henrique M. Pereira

Comissão de Educação Continuada

Antonio Helio Oliani

Aroldo Camargos

Roberta Wonchocquier

Conselho Fiscal

Joaquim Roberto C. Lopes

Condesmar Marcondes Filho

Fabio Macedo

Luiz Eduardo Viana Diniz

Comissão de Cadastramento e Avaliação

Edson Borges

Jonathas Borges

Conselho Consultivo

Selmo Geber

Alvaro Petracco

Edson Borges

José Gonçalves Franco Júnior

Paulo Serafini

Roger Abdelmassih

Comissão de Comunicação

Lister de Lima Salgueiro

Lia Ferragut

Paulo Taitson

EDITORIAL**O Jornal da SBRA, órgão de divulgação da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida**

Maria do Carmo Borges de Souza, Christina de Albuquerque da Rocha, Fernanda Freitas de Oliveira Cardoso _____ 6

ARTIGO ORIGINAL**O Emprego de Hormônio Luteinizante Recombinante Associado ao Hormônio Folículo-estimulante Recombinante nos Protocolos de Estimulação Ovariana com Antagonista do GnRH.**

Ricardo L.R. Baruffi, Ana L. Mauri, Cláudia G. Petersen, Valéria Felipe, Anice M.C. Martins, João Cornicelli, Mario Cavagna, João B. A. Oliveira, José G. Franco Jr _____ 9

Nossa Experiência com HMG em Protocolos de Indução Ovulatória Após Bloqueio com Agonista do GnRH.

_____ 17

Segredo na Filiação : Anonimato e Acesso às Origens no Brasil e na França

Renata Lira dos Santos Aléssio; Emilie Bazin; Sophie Meunier ___ 20

ARTIGO DE REVISÃO**Biologia Molecular na Espermatogênese**

Marcos Meseguer; Jose A. Martínez-Conejero; Cristiano Busso; Marco Antonio Barreto Melo; Jose Remohí; Nicolás Garrido _____ 24

Criopreservação de Oócitos: uma Visão Biológica

Moacir Netto Ladeira, Ariani Colombo dos Santos & Philip Wolff ___ 30

Uma Revisão Sistemática Sobre o uso de Agonistas e Antagonistas do GnRH em Pacientes Más Responderas à Estimulação Ovariana

JG Franco Jr, RLR Baruffi, AL Mauri, CG Petersen, V Felipe, J Cornicelli, M Cavagna, JBA Oliveira _____ 34

Uso da Suplementação de LH Recombinante na Estimulação Ovariana com Protocolos de FSH Recombinante e Agonistas Do GnRH: Uma Revisão da Literatura.

JBA Oliveira, AL Mauri, CG Petersen, AMC Martins, J Cornicelli, M Cavagna, A Pontes, RLR Baruffi, JG Franco Jr _____ 40

Associação de ICSI e Doação Temporária de Útero como Estratégia no Tratamento de Pacientes com Síndrome de Mayer-rokitansky-Kuster-Hauser: Relato de Caso e Revisão da Literatura.

Patrícia Diniz*, Marcelo A. Costa Lima, Flávia Areas, Simone Nogueira, Sérgio L. Simões, Luis Fernando Dale _____ 49

EVENTOS

_____ 53

O Jornal da SBRA, órgão de divulgação da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida

A cada ano que se finda, olhando para trás, vemos que o saldo tem sido positivo. Nosso periódico reflete uma produção brasileira crescente e que se importa em marcar sua presença, acreditando e dando força a publicação que, sem dúvida também se impõe pela qualidade da interação com seus próprios contribuidores.

Desde a Editoria, passando pelo Corpo Editorial, Autores, Produção Gráfica e até a chegada aos Leitores, o trabalho tem sido grande, sempre na busca de uma apresentação perfeita, mas não “engessada”, sempre buscando opções, caminhos

de questionamentos e de maior abrangência na comunicação científica.

Esperamos que todos aproveitem os artigos que finalizam as contribuições deste ano. Que possam ajudar a todos em suas decisões clínicas ou que aumentem a necessidade de ler e buscar mais. E, aceitamos fazer parte de sua busca. Mandem trabalhos.

E um Feliz Ano Novo para todos.

Maria do Carmo Borges de Souza
Christina de Albuquerque da Rocha
Fernanda Freitas de Oliveira Cardoso

O Emprego de Hormônio Luteinizante Recombinante Associado ao Hormônio Folículo-estimulante Recombinante nos Protocolos de Estimulação Ovariana com Antagonista do GnRH.

The use of Recombinant Luteinizing Hormone in Addition to Recombinant Follicle-stimulating Hormone in Ovarian Stimulation with the GnRH-antagonist Protocol.

Ricardo L.R. Baruffi¹, Ana L. Mauri^{1,2}, Cláudia G. Petersen^{1,2}, Valéria Felipe¹, Anice M.C. Martins², João Cornicelli¹, Mario Cavagna³, João B. A. Oliveira¹, José G. Franco Jr^{1,2}

¹ Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Junior, Ribeirão Preto, SP

² Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP

³ Faculdade de Medicina da Universidade de Santo Amaro, São Paulo, SP

Correspondência:
José Gonçalves Franco Junior
Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Junior,
Ribeirão Preto
Av. Prof. João Fiusa, 689 - CEP 14025-310
Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil
Fone/FAX: 55-16-3911.1100
E-mail: crh@crh.com.br ou franco@crh.com.br
email:selmogebber@origen.com.br

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to verify the efficacy of recombinant LH supplementation for controlled ovarian stimulation in GnRH-antagonist protocol for assisted reproductive technologies cycles. Search strategies included on-line surveys of databases from 1990 to 2006. In this review and meta-analysis, the observed advantages for the LH supplementation protocol were a higher serum estradiol levels on the day of hCG administration and a higher number of mature oocytes. However, there were no differences observed in the total amount of r-FSH administered, days of stimulation, number of oocyte retrieved, the clinical pregnancy rate per oocyte retrieval, the implantation rate and miscarriage rate. This result demonstrates that the association of r-LH with r-FSH may prevent any decrease in estradiol after antagonist administra-

tion and a significant higher number of mature oocytes was obtained. Nevertheless, additional randomized controlled trials are needed confirm these observations.

Key Words: ovarian stimulation, recombinant FSH, recombinant LH, GnRH antagonist

RESUMO

O objetivo deste estudo foi de verificar a eficiência da suplementação com LH recombinante no protocolo de estimulação ovariana com antagonista do GnRH e FSH recombinante, através de revisão de literatura e meta-análise. As pesquisas na literatura médica incluíram os anos de 1990 a 2006. As vantagens observadas para a suplementação com r-LH foram uma maior concentração de estradiol no dia da administração do hCG e um maior número de oócitos maduros obtidos. Entretanto, não foram observadas diferenças na quantidade total de r-FSH administrada, dias de estimulação, número de oócitos coletados, taxa de gravidez clínica por punção, taxas de implantação e de aborto. Nossa investigação sugere que

Recebido em 27/05/2006
Aceito em 10/08/2006

a associação de r-LH com r-FSH pode prevenir a queda nos níveis de estradiol após a administração do antagonista, e que um número significativamente maior de oócitos maduros pode ser obtido. Entretanto, outros estudos prospectivos e randomizados são necessários para confirmar tais observações.

Unitermos: estimulação ovariana, FSH recombinante, LH recombinante, antagonista do GnRH.

INTRODUCTION

The pharmacology of ovarian stimulation has been strongly influenced by the two-cell two gonadotrophin theory. This way, follicular stimulation protocols historically have included both follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) in an attempt to mimic normal physiology (Sills et al., 1999). During recent years, the effect of LH on follicular maturation and pregnancy outcome during the course of ovarian stimulation in relation to assisted reproduction has received increasing attention. This interest reflects the fact that modern stimulation protocols have resulted in LH concentrations substantially lower than those observed in the natural cycle and in previously used protocols. The introduction of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonists in the mid-1980s successfully circumvented the problems of a premature LH surge. During the same period of time, there has been a gradual shift from human menopausal gonadotrophin (HMG) with equal amounts of FSH and LH-like activity over pure urinary derived FSH preparations to recombinant human FSH (r-FSH), without LH activity (Humaidan et al., 2004). In addition, the recent introduction of GnRH antagonists offers the opportunity to control the endogenous LH surge in a rapid and more convenient way. Indeed, GnRH antagonists act on a gonadotrophin secretion through an immediate competitive blockade of GnRH receptors and have induced a marked decrease in serum LH levels, and a less pronounced decreased in FSH secretion (Albano et al., 1997).

Some studies have suggested that the suppression of the endogenous LH secretion does not seem to affect the majority of women undergoing assisted reproduction and stimulation with recombinant FSH. However, other studies have indicated that a group of normogonadotrophic women down regulated and stimulated with pure FSH preparations may experience so low LH concentrations that parameters of the IVF treatment are compromised (Humaidan et al., 2004).

Based on the above considerations, this meta-analysis aims to compare the efficacy of recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction and stimulation with recombinant FSH for protocols of ovarian stimulation with antagonists in IVF/ICSI cycles.

MATERIALS AND METHODS

Criteria for considering studies for this meta-analysis

All published and ongoing randomized controlled trials (RCT) comparing the effect of recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction and stimulation with recombinant FSH were analyzed.

Types of outcome measures

The primary outcome measures used for this meta-analysis were the number of days of stimulation, the total amount of r-FSH administered, serum estradiol levels on the day of hCG administration, the number of retrieved and mature (MII) oocytes. The secondary outcomes were clinical pregnancy rate (CPR) per oocyte retrieval, implantation rate and miscarriage rate.

Identification of studies

Search strategies included on-line surveys of databases (MEDLINE, EMBASE, Science Citation Index, Cochrane Controlled Trials Register and OVID) from 1990 to 2006. There was no language restriction. The following Medical Subject Headings and text words were used: "ovarian stimulation", "recombinant FSH", "recombinant LH", "GnRH antagonist", "GnRH agonist" and "randomized controlled trial". The principal inclusion criterion was randomized controlled trial.

Validity assessment and data extraction

Each trial was assessed independently by two reviewers and ranked for its methodology rigor and its potential to introduce bias. Missing data were obtained from the authors when possible.

Statistical analysis

Data management and analysis were conducted using the StatsDirect statistical software (Cheshire, UK). Effectiveness was evaluated using the Mantel-Haenszel method. A confidence interval for the Mantel-Haenszel odds ratio in StatsDirect was calculated using the Robins, Breslow and Greenland variance formula. A chi-square test statistic was used with its associated probability that the pooled odds ratio (OR) was equal to one. The StatsDirect also gives the option to base effect size calculations on weighted mean difference (WMD) as described in the Cochrane Collaboration Handbook (Mulrow and Oxman, 1996). The measure of heterogeneity was evaluated by Cochran's Q and the Breslow-Day test. A non-significant result (i.e. lack of heterogeneity) indicates that no trial has either an OR or WMD that is statistically significantly worse or better than the overall common OR or WMD obtained by pooling the data. The fixed effects model was used for OR and WMD. Since a fixed effects model has been employed here it is important to acknowledge that inferences refer only to the particular studies included in the analysis. Meta-analysis used in this way is simply a device to pool the information from the various studies to provide a composite finding, but only for those studies. In the alternative random effect model, the individual studies are regarded as a random sample from the (infinite) population of studies. Global inferences would then be permissible, but the random errors used would then need to reflect inter-study variation. Since each of our analyses contained only five studies, we decided to derive our inferences from a fixed effects model.

RESULTS

Search results

Five trials fulfilled the inclusion criteria. A multiple low-dose regimen (Cetrorelix-0.25mg) was applied in three and a fixed dose (Cetrorelix-3.0mg) regimen was applied in two.

Description of the studies included:

Acevedo et al. (2004): 42 young voluntary donors were randomly assigned with a computer-generated list to the GnRH antagonist alone protocol (n=20) or the GnRH antagonist + r-LH (n=22). The donors were healthy, age ranged from 18 to 35, and with normal menstrual cycle. Donors with polycystic ovary disease (PCO), endometriosis, hydrosalpinx and severe male factor infertility were excluded from this study. Twenty donors were subjected to a step-down protocol in which LH activity was suppressed with a GnRH antagonist. On the third or fourth day of their menstrual period, a fixed dose of 225IU/

day of r-FSH (Gonal-F[®], Serono, Madrid, Spain) was given for 5 days. At day 6 of ovarian stimulation, 0.25mg/day of GnRH antagonist (Cetrotide[®], Serono, Spain) was subcutaneously injected until hCG was given. Twenty-two donors were subjected to the same GnRH antagonist + r-FSH step-down protocol, except when the GnRH antagonist was initiated, 75IU/day r-LH (Luveris[®], Serono, Spain) was added and maintained until GnRH antagonist was discontinued.

Cédric-Durnerin et al. (2004) A total of 200 patients that were submitted to oocyte pick-up from three centers were enrolled in this study. Ovulatory women were included with the following criteria: age 19-38 years; body mass index (BMI)<30; normal ovulatory function assessed by hormonal determinations at day 3 of a spontaneous cycle. All patients with history of low (<5 oocytes) or high (>15 oocytes) ovarian response in a previous IVF/ICSI attempt were excluded from the study. Pre-treatment with an oral contraceptive pill (levonorgestrel 0.15 mg + ethynylestradiol 30µg) was given during the cycle prior to the IVF/ICSI procedure. Three days after pill discontinuation, stimulation was started by daily injection of 150-300IU of r-FSH (Gonal

F[®], Serono SA, France). The starting dose was chosen according to patient's age (150IU/day, age ≤ 35 years; 225 IU/day, age > 35 years), BMI (starting dose increased by 75IU/day if BMI was 27 to 30) and ovarian responsiveness in previous cycles. This dose was maintained constant for 5 days. From day 6 of the stimulation, r-FSH doses were individually adjusted according to hormonal determinations and ultrasound data. When the follicle reached 14-16mm diameter, patients received a single injection of cetrotirelix 3.0 mg (Cetrotide[®], Serono SA, France) and received (n=107) or not (n=94), according to randomization, a daily injection of 75IU r-LH (Luveris[®], Serono SA, France) from the time of cetrotirelix injection up to hCG administration. In both groups, r-FSH dose adjustment was not allowed at the time of cetrotirelix administration. If criteria for triggering ovulation were not met within 4 days after cetrotirelix administration, additional injections of cetrotirelix 0.25mg per day were performed until hCG administration. Randomization for r-LH supplementation was performed in Centre 1 on day 1 of the stimulation by means of serially numbered, opaque, sealed envelopes. The allocation sequence was generated by a random permutation table and was concealed from clinicians enrolling participants. In Centres 2 and 3, patients were randomized when they received their prescription according to the even on uneven year of the woman's birth. This latter quasi-randomization procedure was applied for clinician's convenience and explains the unequal number of patients in each group for these centers. Neither patients nor clinicians were blinded to r-LH administration. Patients were included in the study for only one cycle.

Sauer et al. (2004) This was an open label, randomized, multi-centre study. In the present study, three groups of patients were compared: Group A- GnRH agonist + r-FSH, Group B- GnRH antagonist + r-FSH and group C- GnRH antagonist + r-FSH + r-LH. Since the association of r-LH is relevant for this meta-analysis, only (data) comparison between group B and C were considered. A total of 42 infertile women (Group B, n=21 and Group C, n=21) (aged 18-39 years) who were planning to undergo ICSI were recruited and were eligible for inclusion if all of the following criteria were satisfied within three menstrual cycles prior to randomization: regular menstrual cycles, BMI <35, both ovaries present, no clinic signs of pelvic or uterine abnormalities, normal cervical cytology, wash-out period completed for any previous IVF drug protocols and FSH concentration in the normal range. The principal exclusion criteria included clinically significant systemic disease, infection with human immunodeficiency virus, hepatitis C or B viruses, the

presence of endometriosis or medical conditions likely interfere with the study. Women were also excluded if previous assisted reproduction cycle had failed through insufficient response to gonadotrophin stimulation or absence of motile spermatozoa, or if they had undergone three or more consecutive assisted reproduction cycles without a clinical pregnancy, or had a history of extrauterine pregnancy or abnormal gynaecological bleeding. Patients were randomly using a computer-generated. All patients took an oral contraceptive (Orthocept 21[®], Ortho-McNeill, Raritan, NJ, USA) from the first day of menses for 14-28 days. Women in group B and C received an injection of cetrotirelix (Cetrotide[®]; Serono Inc., USA), 3 mg sc, on day 7 of de FSH stimulation cycle. If the patient did not achieve follicle maturation by day 11, an injection of cetrotirelix, 0.25 mg sc, was administered on day 11 and on each proceeding day up to, but not including, the day of r-hCG administration. The patients received r-FSH (Gonal-F[®]; Serono Inc., USA) 225IU sc 5 days after the last oral contraceptive. From day 6, the dose was individualized according to patient response, with doses in the range 75-450IU/daily. Women in group C received r-LH (Luveris[®]; Serono Inc., USA), 150 IU sc, on days 7-10 following the cetrotirelix injection and at the same time as the r-FSH injection.

Griesinger et al. (2005) The present study was a prospective, randomized, open, single-centre, group-comparative clinical trial assessing a starting dose of 150IU r-FSH versus 150IU r-FSH plus 75IU r-LH (2:1) for controlled ovarian stimulation in the GnRH-antagonist multiple-dose protocol. The randomization process was conducted by drawing sealed envelopes and patients were free to start ovarian stimulation within the next three spontaneous menstrual cycles after randomization. Main inclusion criteria were: indication for treatment with IVF or ICSI; age between 20 and 39 years; BMI between 18 and 35; regular menstrual cycle; ranging from 24 to 35 days, intra-individual cycle variability of ≤3 days. Main exclusion criteria were: >3 previous unsuccessful assisted reproduction techniques attempts; poor response to gonadotrophin stimulation defined as <3 preovulatory follicles; history of ovarian hyperstimulation syndrome grade II-III; polycystic ovarian syndrome; any other endocrine disorder; no natural luteal phase prior to treatment cycle; abnormal uterine cavity; presence of a clinically significant systemic disease. Ovarian stimulation started on day 2 of the natural cycle with r-FSH (Gonal-F[®]; Serono, Geneva Switzerland) in the control group (n=54), and 150IU r-FSH (Gonal-F) plus 75IU r-LH (Luveris[®]; Serono, Geneva Switzerland) in the study group (n=54). After 5 days of gonadotrophin treatment, GnRH antagonist cetrotirelix 0.25mg (Cetrotide[®]; Serono, Geneva Switzerland) administration was started. Gonadotrophin and antagonist treatment was continued up to and including the day of hCG administration. From day 6 onwards, the r-FSH dosage could be increased to 225IU or 300 IU according to the ovarian response. In case of a dose increment to 300IU r-FSH in the study group, the r-LH was concomitantly adjusted to 150IU.

Levi-Setti et al. (in press) Forty patients undergoing ovarian stimulation for ICSI were included in this investigation. Indication for treatment was male-factor fertility, including only patients with ejaculated spermatozoa and excluding patients with frozen or testicular sperm. All patients were normo-ovulatory, with regular menstrual cycles ranging from 25 to 35 days, aged ≤ 37years, had a BMI <25, and had basal FSH measurements <12IU/ml, measured no more than three cycles before starting the induction therapy. Patients with previous surgery or endometriomas at transvaginal ultrasound were excluded from the study. In all patients, a pre-treatment with an oral contraceptive (Minulet[®]; Wyeth, Aprilia-Latinia, Italy) was used. On day 2 of the cycle starting the administration

of 225IU r-FSH (Gonal-F®; Serono, Rome, Italy). When follicles reached the mean diameter of 14 and 15mm, the administration of cetrotrelis (Cetrotide®; Serono) was initiated in a daily dose of 0.25 mg sc. At this time, the patients were randomly allocated by a computer-generated list to one of two groups: in group I (n=20), ovarian stimulation was performed with the combination of 225IU of r-FSH alone was continued, and in group II (n=20) ovarian stimulation was performed with the combination of 150 IU of r-FSH and 75 IU of r-LH (Luveris, Serono). In the group II, the dose of r-FSH was reduced to give to the two groups of patients the same amount of gonadotrophins.

PRIMARY OUTCOME

-Days of stimulation (Table 1): All studies were included. The mean days of stimulation was not significantly different in the 225 women using r-LH than in the 209 women not using (p=0.65; WMD:0.07 95% CI -0.24, 0.37). There was no heterogeneity in this comparison (Cohran Q:4.49, df:4, p:0.34).

-Total of r-FSH administered (Table 2): Four studies were included (Griesinger et al., 2005; Sauer et al., 2004; Acevedo et al., 2004; Cédric-Durnerin et al., 2004). The mean amount of r-FSH administered was not significantly different in the 205 women using r-LH than in the 189 women not using (p=0.87; WMD:8.51, 95% CI-98.2, 115.2). There was no heterogeneity in this comparison (Cohran Q:3.18, df:4, p:0.36).

-Serum estradiol levels on the day of hCG administration (Table 3): All studies were included. Significant higher serum estradiol level was found in 221 women using r-LH than in 205 women not using (p<0.0001; WMD: 514, 95% CI 368, 660). There was no heterogeneity in this comparison (Cohran Q:1.85, df: 4, p=0.76).

-Number of oocytes retrieved (Table 4): Four trials reported this data (Levi-Setti et, in press; Griesinger et al., 2005; Acevedo et al., 2004; Cédric-Durnerin et al., 2004). The mean number of oocytes retrieved was not significantly different in the 201 women using r-LH than in 185 women not using (p=0.34; WMD:0.41, 95% CI -0.44, 1.3). There was no heterogeneity in this comparison (Cohran Q:0.75, df:3, p:0.85).

-The number of mature oocytes (MII) (Table 5): All studies were included. Significant higher number of mature oocytes was retrieved in 214 women using r-LH than in 193 women not using (p=0.0098; WMD:0.88, 95% CI 0.21, 1.54). There was no heterogeneity in this comparison (Cohran Q:6.19 df:4, p:0.18).

SECONDARY OUTCOME

-Clinical pregnancy rate oocyte retrieval (Table 6): Four studies were included (Levi-Setti et al., in press; Griesinger et al., 2005; Sauer et al., 2004; Cédric-Durnerin et al., 2004). The CPR per oocyte retrieval procedure was not significantly different transfer in cycles using r-LH (59/200, 29.5%) than in cycles not using (59/186 31.7%) (p=0.69; OR:0.89, 95% CI 0.57, 1.39). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day:0.95, df:3, p:0.81; Cochran Q:0.94, df:3, p=0.81).

-Implantation rate (Table 7): Three studies were included (Levi-Setti et al., in press; Griesinger et al., 2005; Cédric-Durnerin et al., 2004). The implantation rate was not significantly different in the cycles using r-LH 58/357 (16.2%) than in cycles not using 54/336 (16.1%) (p=0.96; OR:0.99 95% CI-0.66, 1.48). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day:2.16, df:2, p=0.34; Cochran Q:2.13, df:2, p=0.34).

-Miscarriage rate (Table 8): Two trials were included (Levi-Setti et al., in press; Cédric-Durnerin et al., 2004). The miscarriage rates were not significantly different in the pregnancies after used r-LH (6/41, 14.6%) than in that did not used (5/36, 13.9%) (p=0.82; OR:1.06, 95% CI-0.29, 3.8). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day:0.03, df:1, p=0.86; Cochran Q: 0.03, df:1, p=0.86).

DISCUSSION

The results that support the hypothesis that an exogenous LH supplementation in the form of r-LH is effective in improving the ovarian response in stimulation for assisted reproduction cycles in patients undergoing IVF/ICSI and using a GnRH antagonist protocol is unclear. Most data available in the medical literature suggest that recombinant gonadotrophins are clearly more efficient than urinary gonadotrophins in inducing multiple follicular growth and maturation (Daya, 2002). The advantages of r-FSH are its excellent consistency from batch to batch and the fact it is free from contaminating human proteins. Although the role of LH in ovulation induction remains controversial, and it is well established that FSH alone can induce follicular growth, small amounts of LH are necessary to promote adequate estradiol secretion and also to allow the follicle to luteinize when exposed to hCG (Couzinet et al., 1988). The action of LH on follicular development is likely not limited to providing androgen substrate for aromatization, but it also exerts a direct effect on the stimulation and modulation of folliculogenesis (Filicori et al., 2001).

On the other hand, the GnRH antagonists are GnRH molecules with amino acid modifications at positions 1,2,3,6,10 and they immediately block the GnRH receptor in a competitive fashion and hence reduce LH and FSH secretion within a period of 8h. The inhibition of LH secretion is more pronounced than that of FSH, this being most likely due to the different forms of gonadotrophin regulation, the prolonged FSH half-life or the immunoactive and bioactive forms of FSH (Matikainen, 1992). GnRH antagonist administration induces a fast and profound pituitary suppression, with a clear advantage in terms of premature LH avoidance. Nevertheless, LH activity is quickly and dramatically reduced in the phase in which this hormone activity is crucial: follicle, which have been recruited in a physiological FSH and LH environment, are dramatically deprived of their LH sustenance (Alvigi et al., 2006).

Garcia-Velasco et al (2001) observed that GnRH antagonist therapy in women undergoing ovarian stimulation had a significant effect on ovarian follicular steroidogenesis. The mean oestradiol concentration in follicular fluid was significantly lower in patients treated with a GnRH antagonist than in those treated with GnRH agonist. Lindheim and Morales (2003) in 37 donor cycles, starting GnRH antagonist administration on day 6 of stimulation, reported that 35% of cycles had a decrease in serum oestradiol prior to hCG administration and 93% of them showed a decrease in serum oestradiol at >3 days after GnRH antagonist administration. In addition, clinical pregnancy rate per initiated cycle [14% (2/14) versus 54% (14/26)], ongoing pregnancy rate per initiated cycle [7% (1/14) versus 46% (12/26)] and implantation rate (4 versus 24%) were all significantly less (p<0.05) following a decrease in serum oestradiol after initiation of GnRH antagonist. They concluded that the use of GnRH antagonists has an unpredictable effect on oestradiol production during follicular recruitment, which appears to adversely affect pregnancy outcome if a decline in oestradiol occurs. The interaction of the antagonist (at clinical working doses) with its receptors and the initiation of any intra-cellular signaling cascade that could affect gene transcription need further demonstration

Table 1 - Cycles with and without LH supplementation: Days of stimulation

Trail	r-FSH +r-LH		r-FSH		WMD	95%CI fixed
	n	mean±sd	n	mean±sd		
Levi-Setti 2005	20	9.8±0.95	20	10.3±1.25	-0.5	-1.19, 0.19
Griesinger 2005	55	12.0±2.4	54	11.4±2.1	0.6	-0.25, 1.45
Sauer 2004	21	9.4±1.7	21	9.3±1.1	0.1	-0.77, 0.97
Acevedo 2004	22	9.7±2.1	20	9.3±1.6	0.4	-0.74, 1.54
Cédrin-Durnerin 2004	107	11.8±1.7	94	11.7±1.5	0.1	-0.34, 0.54
Total.	225		209			
Pooled effect size Fixed effects (Mulrow-Oxman)					0.07	-0.24, 0.37

Z (test WMD + differs from 0)= 0.44 p = 0.65

Non-combinability of studies

-Cohran Q = 4.496929 (df = 4) p = 0.34

Table 2 - Cycles with and without LH supplementation: Amount of r-FSH administered

Trail	r-FSH +r-LH		r-FSH		WMD	95%CI fixed
	n	mean±sd(UI)	n	mean±sd(UI)		
Griesinger 2005	55	2082.8±695.7	54	1875.4±646.4	207.4	-44.8,459.6
Sauer 2004	21	2214.2±612	21	2228.6±359.8	-14.4	-318.0,289.2
Acevedo 2004	22	1738±407.2	20	1807.1±97.05	-69.1	-252.3,114.1
Cédrin-Durnerin 2004	107	2235±729	94	2239±620	-4	-192.5,184.5
Total.	205		189			
Pooled effect size Fixed effects (Mulrow-Oxman)					8.51	-98.2,115.2

Z (test WMD + differs from 0)= 0.156 p=0.87

Non-combinability of studies

-Cohran Q = 3.183282 (df = 4) p=0.3642

Table 3 – Cycles with and without LH supplementation: Serum estradiol levels on the day of hCG administration

Trail	r-FSH +r-LH		r-FSH		WMD	95%CI fixed
	n	mean±sd (pg/ml)	n	mean±sd (pg/ml)		
Levi-Setti 2005	18	1825±545	20	1253±490	572	243, 901
Griesinger 2005	54	1924.7±1256.4	54	1488±824	436.4	35.6, 837
Sauer 2004	20	2440.5±1181.7	17	1540±951.2	900.5	201, 1600
Acevedo 2004	22	1596±988	20	989.6±597	606.4	106, 1106
Cédrin-Durnerin 2004	107	1476±787	94	1012±659	464	162, 666
Total.	221		205			
Pooled effect size Fixed effects (Mulrow-Oxman)					514	368, 660

Z (test WMD + differs from 0)= 6.9 p<0,0001

Non-combinability of studies

-Cohran Q = 1.853585 (df = 4) p= 0.76

Table 4 - Cycles with and without LH supplementation: number of retrieved oocytes.

Trail	r-FSH +rec LH		r-FSH		WMD	95%CI fixed
	n	mean±sd	n	mean±sd		
Levi-Setti 2005	18	9.9±2.6	18	9.2±2.9	0.7	-1.2, 2.5
Griesinger 2005	54	7.9±5.3	54	7.7±5.1	0.2	-1.8, 2.2
Acevedo 2004	22	9.3±3.6	20	8.2±3.5	1.1	-1.1, 3.2
Cédric-Durnerin 2004	107	9.9±4.7	93	9.8±4.7	0.1	-1.2, 1.40
Total.	201		185			
Pooled effect size Fixed effects (Mulrow-Oxman)					0.41	-0.44, 1.3

Z (test WMD + differs from 0)= 0.945 p = 0.34

Non-combinability of studies

-Cohran Q= 0.756465 (df=3) p= 0.85

Table 5 – Cycles with and without LH supplementation: number of mature oocytes (MII)

Trail	r-FSH +r-LH		r-FSH		WMD	95%CI fixed
	n	mean±sd	n	mean±sd		
Levi-Setti 2005	18	6.9±2.1	18	6.5±2.4	0.4	-1.1, 1.9
Griesinger 2005	46	6.57±4.17	41	6.49±4.26	0.08	-1.7, 1.8
Sauer 2004	21	14.6±9.5	21	13.7±6.8	0.9	-4.1, 5.9
Acevedo 2004	22	7.4±1.6	20	5.2±2.4	2.2	0.98, 3.4
Cédric-Durnerin 2004	107	8.2±4.1	93	7.8±4.0	0.4	-0.73, 1.53
Total.	214		193			
Pooled effect size Fixed effects (Mulrow-Oxman)					0.88	0.21, 1.54

Z (test WMD + differs from 0)= 2.58 p = 0.0098

Non-combinability of studies

-Cohran Q = 6.196684 (df = 4) p= 0.18

Table 6 - Cycles with and without LH supplementation: Clinical pregnancy rate per oocyte retrieval.

Trail	r-FSH + r-LH	r-FSH	%Weights	Odds ratio	95%CI fixed
Levi-Setti 2005	7/18	6/18	8.8	1.3	0.26, 6.2
Griesinger 2005	8/54	12/54	24.6	0.61	0.20, 1.8
Sauer 2004	10/21	11/21	13.9	0.83	0.21, 3.3
Cédric-Durnerin 2004	34/107	30/93	52.7	0.98	0.52, 1.8
Total.	59/200	59/186			
Pooled odds ratio Fixed effects (Mantel-Haenszel,Robins-Breslow-Greenland)				0.89	0.57, 1.39

Chi² (test odds ratio differs from 1) = 0.15 p = 0.69

Non-combinability of studies

-Breslow-Day= 0.95 (df= 3) p= 0.81

-Cochran Q= 0.94 (df= 3) p= 0.81

Table 7 - Cycles with and without LH supplementation: implantation rate

Trail	r-FSH + r-LH	r-FSH	%Weights	Odds ratio	95%CI fixed
Levi-Setti 2005	11/54	8/49	14.3	1.3	0.43, 4.2
Griesinger 2005	8/99	15/109	28.2	0.55	0.19, 1.5
Cédric-Durnerin 2004	39/204	31/178	57.5	1.12	0.64, 2.0
Total.	58/357	54/336			
Pooled odds ratio Fixed effects (Mantel-Haenszel, Robins-Breslow-Greenland)				0.99	0.66, 1.48

Chi² (test odds ratio differs from 1) = 0.002 p = 0.96

Non-combinability of studies

-Breslow-Day = 2.16 (df=2) p = 0.34

-Cochran Q= 2.13 (df=2) p = 0.34

Table 8 - Cycles with and without LH supplementation: Miscarriage rate

Trail	r-FSH + r-LH	r-FSH	%Weights	Odds ratio	95%CI fixed
Levi-Setti 2005	1/7	1/6	20.3	0.83	0.01, 78.3
Cédric-Durnerin 2004	5/34	4/30	79.7	1.12	0.21, 6.3
Total.	6/41	5/36			
Pooled odds ratio Fixed effects (Mantel-Haenszel, Robins-Breslow-Greenland)				1.06	0.29, 3.8

Chi² (test odds ratio differs from 1) = 0.05 p = 0.82

Non-combinability of studies

-Breslow-Day = 0.03 (df=1) p = 0.86

-Cochran Q= 0.03 (df=1) p = 0.86

and clarification at the molecular level. Some of the indirect (E2-mediated) action through which the GnRH antagonist could impact cell function, and ultimately implantation rates, can be substantiated and evaluated in a clinical setting. For example, it is well established that the production of some growth factors and peptides involved differentiation and mitosis of the oocyte, the embryo, the endometrium, and the granulosa cells, are estrogen dependent. Because the hypoestrogenic environment that develops may compromise cell function, maintaining the E2 synthesis could lessen some of the indirect (E2-mediated) GnRH antagonist action at the ovarian or endometrial levels (Acevedo et al., 2004)

In this meta-analysis, a good effect of r-LH supplementation in ovarian stimulation was observed in the serum estradiol levels on the day of hCG administration. Significant higher serum estradiol level was found in 221 women using r-LH than in 205 women not using ($p < 0.0001$; WMD: 514, 95% CI 368, 660). This result demonstrates that the association of r-LH with r-FSH may prevent a decrease in estradiol after antagonist administration. In addition, significant higher number of mature oocytes was retrieved in 214 women using r-LH than in 193 women not using ($p = 0.0098$; WMD: 0.88, 95% CI -0.21, 1.54). Further prospective studies are required to substantiate these facts.

On the other hand, these good results were not observed in total of r-FSH administered ($p = 0.87$; WMD: 8.51, 95% CI -98.2, 115.2), days of stimulation ($p = 0.65$; WMD: 0.07 95% CI -0.24, 0.37), number of oocyte retrieval ($p = 0.34$; WMD: 0.41, 95% CI -0.44, 1.3), the CPR per oocyte retrieval ($p = 0.69$; OR = 0.89, 95% CI -0.57, 1.39), the implantation rate ($p = 0.96$; OR = 0.99 95% CI -0.66, 1.48) and miscarriage rate ($p = 0.82$; OR = 1.06, 95% CI -0.29, 3.8).

In conclusion, considering all the outcomes, probably there is no reason to be concerned that the use of r-LH supplementation could impose harmful effect. Moreover, our results demonstrated that the association of r-LH with r-FSH may prevent any decrease in estradiol after antagonist administration and a significant higher number of mature oocytes were offered for laboratory work. Nevertheless, additional randomized controlled trials are needed to further confirm these results.

REFERÊNCIAS

1. Acevedo B, Sanchez M, Gomez JL, Cuadros J, Ricciarelli E, Hernandez ER. - Luteinizing hormone supplementation increases pregnancy rates in gonadotrophin-releasing hormone antagonist donor cycles. Fertil Steril 82: 343-347, 2004.
2. Albano C, Smitz J, Camus M, Riehmuller-Winzen H, Van Steirteghem A, Devroy P. - Comparison of different doses of gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation. Fertil Steril 67: 917-922, 1997.
3. Alviggi C, Clarizia R, Mollo A, Ranieri A, De Placido G. - Who needs LH in ovarian stimulation? Reprod Biomed OnLine 12: 599-607, 2006.
4. Cédric-Durnerin I, Grange-Dujardin D, Laffy A, Parneix I, Massin N, Galey J, Théron L, Wolf JP, Conord C, Clément P, Jayot S, Hugues JN. - Recombinant human LH supplementation during GnRH antagonist administration in IVF/ICSI cycles: a prospective randomized study. Hum Reprod 19: 1979-1984, 2004.
5. Couzinet B, Lestrat N, Brailly S, Forest M, Schaison G. - Stimulation of ovarian follicular maturation with pure follicle-stimulation hormone in women with gonadotrophin deficiency. J Clin Endocrinol Metab 66: 522-526, 1988.
6. Daya S. - Updated meta-analysis of recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) versus urinary FSH for ovarian stimulation in assisted reproduction. Fertil Steril 77: 711-714, 2002.
7. Filicori M, Cognigni GE, Taraborrelli S, Spettoli D., Ciampaglia W, Tabarelli

- de Fatis C, Pocognoli P, Cantelli B, Boschi S. - Luteinizing hormone activity in menotropins optimizes folliculogenesis and treatment in controlled ovarian stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1156-1161, 2001.
8. Garcia-Velasco JA, Isaza V, Vidal C, Landazábal A, Remohi J, Simón C, Pellicer A. - Human ovarian steroid secretion in vivo: effects of GnRH agonist versus antagonist (cetorelix). *Hum Reprod* 16: 2533-2539, 2001.
 9. Griesinger G, Schultze-Mosgau A, Dafopoulos K, Schroeder A, Schroer A, von Otte S, Hornung D, Diedrich K, Felberbaum R. - Recombinant luteinizing hormone supplementation to recombinant follicle-stimulating hormone induced ovarian hyperstimulation in the GnRH-antagonist multiple-dose protocol. *Hum Reprod* 20:1200-1206, 2001.
 10. Humaidan P, Bungum M, Andersen YC. - Effects of recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and stimulation with recombinant FSH: an opening study. *Reprod Biomed Online* 8: 635-643, 2004.
 11. Levi-Setti PE, Cavagna M, Bulletti C. - Recombinant gonadotrophins associated with GnRH antagonist (cetorelix) in ovarian stimulation for ICSI: Comparison of r-FSH alone and in combination with r-LH. *European J Obst Gynecol Reprod Biol*, In Press, Available online 27 December 2005, doi: 10.1016/j.ejor.2005.11023
 12. Lindheim SR, Morales AJ. - GnRH antagonists followed by a decline in serum estradiol results in adverse outcomes in donor oocyte cycles. *Hum Reprod* 18: 2048-2051, 2003.
 13. Matikainen T, Ding YQ, Vergara M, Huhtaniemi I, Couzinet B, Schaison G. - Differing responses of plasma bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone to gonadotrophin-releasing hormone antagonist and agonist treatments in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 820-825, 1992.
 14. Mulrow CD, Oxman AD (eds) - *Cochrane Collaboration Handbook*, Oxford: Cochrane Collaboration, 1996.
 15. Sauer MV, Thornton MH, Schoolcraft W, Frishman GN. - Comparative efficacy and safety of cetorelix with or without mid-cycle recombinant LH and leuprolide acetate for inhibition of premature LH surges in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 9: 487-493, 2004.
 16. Sills ES, Levy DP, Moomjy M, McGee M, Rosenwaks Z. - A prospective, randomized comparison of ovulation induction using highly purified follicle-stimulating hormone alone and with recombinant human luteinizing hormone in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 14: 2230-2235, 1999.

“Não recebo a revista.”

**Você é sócio?
Seu pagamento está em dia?
Seu endereço mudou?**

**Se há dúvidas, consulte o seu
cadastro e fale conosco**

www.sbra.com.br

Nossa Experiência com HMG em Protocolos de Indução Ovulatória Após Bloqueio com Agonista do GnRH.

Our Experience With HMG For Ovarian Stimulation Following GnRH Agonist Suppression.

RESUMO

Atualmente, surgiu a preocupação com as concentrações séricas de LH ativo quando se utiliza o protocolo longo de indução GnRH agonista em combinação com rFSH. Acredita-se que níveis baixos desse hormônio prejudicam os resultados das TRA, uma vez que é necessária uma concentração sérica mínima de LH ativo para a obtenção do desenvolvimento folicular normal e maturação oocitária adequada. Estudos mostram que há uma grave supressão de níveis séricos normais de LH nas pacientes induzidas somente com rFSH, prejudicando os resultados do tratamento da infertilidade. Sendo assim, esse trabalho teve por objetivo comparar o número de oócitos maduros recuperados após o emprego de protocolos de indução ovulatória com agonista do GnRH com rFSH associados ou não ao suplemento de hMG. 89 ciclos foram realizados e divididos em dois grupos: grupo I - ciclos de estimulação com GnRH agonista + rFSH + hMG e grupo II - com GnRH agonista + rFSH. Os análogos foram iniciados no 22º dia do ciclo e mantidos até o bloqueio. Durante os primeiros 5 dias, todas as pacientes receberam 300UI de rFSH. Após o 5º dia, pacientes do grupo I receberam 300UI de hMG e as do grupo II 300 UI de rFSH. Na presença de dois folículos com 16 – 17 mm, foi administrado o hCG, sendo a punção realizada 34 horas depois. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao número de oócitos maduros e embriões aptos para transferência, concluindo que hMG pode ser adicionado ao protocolo de indução sem prejuízo na qualidade e quantidade de oócitos maduros com número adequado de embriões aptos para transferência.

Palavras-chave: hMG e FSH, protocolo longo, indução ovariana, agonista

ABSTRACT

During recent years, it has been much debated whether suppression of LH levels during ovarian stimulation is beneficial, harmless, or harmful in relation to the ART. These discrepancies reflect that the exact requirements of LH for normal follicular development and oocyte maturation are not known. Trial have shown that severe suppression of midfollicular LH levels in the serum occurs in women treated with rFSH, resulting in

significantly depressed levels of circulating E_2 as well as in a poorer outcome of ART as compared with women treated with hMG. The aim of the present study was compare the number of mature oocytes observed that women treated with GnRH agonist followed rFSH with addition or not the hMG. 89 cycles was included and separated in two groups: group I - cycles stimulated with GnRH agonist + rFSH + hMG and group II - cycles with GnRH agonist + rFSH. The analogues was initiated at 22° day of the cycle and maintained until the blockade. During the first 5 days of ovarian stimulation, all the patients were treated with rFSH (300IU). After, the group I's patients were treated with hMG (300IU) and group II's patients were treated with rFSH (300IU). When two follicles with 16 – 17mm were observed, hCG was administrated. The pick-up was realized 34 hours after hCG. There was no significant difference in the numbers of mature oocytes picked-up and number of embryos to transfer. It was concluded that hMG added with ovarian stimulation's long protocol offered adequate number of mature oocytes and normal embryos to transfer.

Key words: hMG and FSH, long protocol, ovarian stimulation, agonist

INTRODUÇÃO

A indução ovariana caracterizada “step-down” com GnRH agonista acompanhada de gonadotrofinas exógenas teve grande aplicabilidade na última década no tratamento hormonal de mulheres submetidas às técnicas de reprodução assistida (TRA). Durante o mesmo período, a utilização de componentes urinários que contêm a mesma concentração de FSH e LH ativos, hMG, diminuiu enquanto aumentava a aplicabilidade de FSH urinário (uFSH), que apresenta concentração mínima de LH ativo, e FSH recombinante (rFSH), totalmente isento de LH ativo (Westergaard et al, 2001). Atualmente, surgiu a preocupação com as concentrações séricas de LH ativo e, conseqüentemente, em relação à síntese de estradiol (E_2) quando se utiliza o protocolo longo de indução GnRH agonista em combinação com FSH. Acreditava-se que níveis baixos desses hormônios prejudicariam os resultados das TRA. No entanto, pesquisadores mostraram que é necessária uma concentração sérica mínima de LH ativo para a obtenção do desenvolvimento folicular normal e maturação oocitária adequada, uma vez que menos de 1% dos receptores foliculares são específicos para LH. Os bons resultados obtidos com GnRH agonista somado ao rFSH em pacientes normogonadotróficas sem suplementação

Recebido em 09/06/2006
Avaliado e aceito em 04/12/2006

de LH exógeno comprovam essa teoria, sugerindo que ciclos bloqueados apresentam níveis endógenos de LH suficientes para a foliculogênese normal (Westergaard et al, 2001, Wely et al., 2003).

No entanto, estudos comparando FSH e hMG após aplicação de GnRH agonista mostraram uma grave supressão de níveis séricos normais de LH (< 1UI/L) somente nas pacientes induzidas com FSH, diminuindo o nível de E₂ circulante e prejudicando os resultados do tratamento da infertilidade. Além disso, baixos níveis de LH e E₂ aumentam o risco de aborto precoce sugerindo uma participação desses hormônios após a implantação (Westergaard et al, 2001).

Esses dados sugerem que protocolos de indução deveriam incluir suplementação com LH ativo, hMG ou LH recombinante, mesmo para pacientes normogonadotróficas. No entanto, segundo Wely et al. (2003), a suplementação com LH exógeno para esse grupo de oócitos recuperados no dia da punção do grupo I (9,9 ± 8,2) foi comparado com o grupo de pacientes aumentaria os níveis de concentração sérica desse hormônio provocando baixas taxas de fertilização e aumento da ocorrência de abortos espontâneos.

Tendo em vista as várias possibilidades de indução, esse trabalho tem por objetivo comparar o número de oócitos maduros recuperados após o emprego de protocolos de indução ovulatória com agonista do GnRH com rFSH associados ou não ao suplemento de hMG.

MATERIAIS E MÉTODOS

Oitenta e nove ciclos foram incluídos neste estudo e divididos em dois grupos de acordo com o protocolo de indução: grupo I - 67 ciclos de estimulação com rFSH + hMG após bloqueio com agonista e grupo II - 22 com rFSH após bloqueio com agonista.

Em ambos os grupos, os análogos (lupron ou synarel) foram iniciados no 22º dia do ciclo com duas aplicações diárias até o bloqueio, correspondente ao primeiro dia de sangramento, ou com níveis séricos de estradiol abaixo de 100 pmol com ausência de folículos durante a ultra-sonografia.

Durante os primeiros 5 dias, todas as pacientes receberam 150UI de rFSH duas vezes ao dia por 5 dias. Após o 5º dia, pacientes do grupo I receberam 150UI de hMG em duas tomadas diárias e as do grupo II continuaram a receber 300 UI de rFSH. Dosagens séricas de estradiol e monitorização

com ultra-sonografia foram realizadas em todas as pacientes. Quando pelo menos dois folículos atingissem 16 – 17 mm, 250 µg hCG recombinante foi administrado. Punção folicular ocorreu 34 horas após a administração de hCG.

Os dois grupos foram avaliados com relação ao número de folículos no dia do hCG, número de oócitos puncionados assim como o de oócitos maduros e imaturos observados, quantidade de embriões com fertilização normal e embriões transferidos.

RESULTADOS

Não houve diferença estatística quando a idade média (± desvio padrão) das pacientes foi comparada entre os grupos (33,4 ± 4,7 e 34,7 ± 3,3; respectivamente, grupos I e II; p>0,05) (Tabela I).

Os dois grupos foram comparados quanto ao número de folículos no dia do hCG, número de oócitos puncionados assim como o de oócitos maduros e imaturos observados, quantidade de embriões com fertilização normal e embriões transferidos, como mostra a Tabela I.

Não houve diferença estatística quando a quantidade média de folículos no dia do hCG (± desvio padrão) foi comparada entre os grupos (12,6 ± 5,0 e 10,6 ± 5,0; respectivamente grupos I e II: p>0,05). O mesmo ocorreu quando o número médio de oócitos recuperados no dia da punção do grupo I (9,9 ± 8,2) foi comparado com o grupo II (8,8 ± 6,0) com p>0,05. Mesmo quando aplicado o teste Kruskal Wallis, os resultados das medianas entre os grupos não apresentaram diferença estatística (8,0 e 7,0; grupos I e II respectivamente) (Tabela I).

Foram comparados os números de oócitos em metáfase II (MII), em metáfase I (MI) e em prófase I (PI) entre os grupos com dois testes estatísticos diferentes. Quando usado o t de student, a quantidade média de oócitos MII observada (± desvio padrão) não diferiu estatisticamente entre os grupos I e II (7,3 ± 6,1 e 6,5 ± 5,0, p>0,05; respectivamente). O mesmo ocorreu com a comparação da quantidade média de MI e PI em ambos os grupos (MI: 1,5 ± 1,9 e 1,5 ± 1,7; PI: 0,9 ± 1,6 e 0,7 ± 0,8; p>0,05; respectivamente nos grupos I e II). Quando usado o teste Kruskal Wallis, os resultados das medianas dos oócitos MII, MI e PI não diferiram estatisticamente (MII: 6,0 e 5,0, MI: 1,0 e 1,0, PI: 0,7 e 0,7; p>0,05, respectivamente nos grupos I e II) (tabela I).

Tabela I – Resultados obtidos após bloqueio com agonista e estimulação ovariana com ou sem a adição de hMG em pacientes de bom prognóstico com FSH basal < 10 e idade ≤ 35 anos.

	Agonista + Gonal + hMG	Agonista + Gonal	P
Número de ciclos realizados	67	22	
Idade (± desvio padrão) (*)	33,4 ± 4,7	34,7 ± 3,3	0,263
Folículos no dia hCG (*)	12,6 ± 5,0	10,6 ± 5,0	0,114
Oócitos (média ± desvio) (*)	9,9 ± 8,2	8,8 ± 6,0	0,494
Oócitos (mediana) (**)	8,0	7,0	0,797
MII(média ± desvio) (*)	7,3 ± 6,1	6,5 ± 5,0	0,542
MII (mediana) (**)	6,0	5,0	0,631
MI (média ± desvio) (*)	1,5 ± 1,9	1,5 ± 1,7	0,878
MI (mediana) (**)	1,0	1,0	0,738
PI (média ± desvio) (*)	0,9 ± 1,6	0,7 ± 0,8	0,391
PI (mediana) (**)	0,7	0,7	0,865
Embriões com fertilização normal (*)	5,5 ± 4,8	5,8 ± 3,9	0,751
Embriões transferidos (*)	2,9 ± 1,6	3,1 ± 1,6	0,551

(*) Teste t de Student ; (**) Kruskal-Wallis. Nível de significância p<0,05.

Com relação à quantidade média de embriões com fertilização normal (\pm desvio padrão) não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II (5,5 \pm 4,8 e 5,8 \pm 3,9, respectivamente; $p > 0,05$). Assim como com relação ao número médio de embriões transferidos (\pm desvio padrão), 2,9 \pm 1,6 e 3,1 \pm 1,6, com $p > 0,05$ (Tabela I).

DISCUSSÃO

A decisão sobre qual gonadotrofina utilizar em combinação com o análogo do GnRH é difícil. Considerando-se duas meta-análises apresentadas por Wely et al. (2003) comparando uFSH e hMG, não há diferença com relação à taxa de gestação entre ambos os protocolos. No entanto, quando se compara uFSH e rFSH, as taxas de gestação por ciclo, gestação por embriões transferidos e gestação continuada por ciclo são significativamente maiores com a aplicação do recombinante.

Alguns autores, como Out et al. (1995) e Jacob et al. (1998), sugerem que ambas as drogas, rFSH e hMG, são equipotentes, não havendo assim diferença estatisticamente significativa entre os seus resultados. Acreditam que possíveis resultados estatisticamente diferentes estejam diretamente relacionados com a dose hormonal utilizada.

Estudos randomizados mostram uma diferença não significativa na porcentagem de oócitos MII e número de oócitos totais recuperados assim como na qualidade embrionária e taxa de gestação quando se compara rFSH e hMG. No entanto, outros pesquisadores mostram a eficiência do rFSH em comparação ao hMG com relação às taxas de gestação continuada e implantação (Goldfarb & Desai, 2003).

Os resultados de Bergh et al. (1997) discordam em absoluto com os dados apresentados pelos autores citados acima. Após observarem 200 pacientes submetidas à Fertilização *in vitro* (FIV) clássica induzidas com doses equivalentes de hMG e rFSH, mostraram um número maior de oócitos recuperados quando a indução foi realizada com rFSH, no entanto as taxas de gestação continuada foram similares em ambos os grupos.

Por muitas décadas, GnRH agonista foi utilizado para indução ovariana em combinação com gonadotrofinas na prevenção de um pico de LH prematuro, induzindo a liberação inicial de gonadotrofinas ("flare up") antes do bloqueio total da hipófise, reduzindo significativamente a taxa de ciclos cancelados em comparação com induções realizadas apenas com gonadotrofinas (Ortmann et al., 2001, Cheung et al., 2005). No entanto, a utilização desse análogo requer altas doses de gonadotrofinas por um longo período de indução (Cheung et al., 2005).

Recentemente, GnRH antagonistas foram introduzidos nos protocolos de indução ovariana, agindo no bloqueio rápido dessa glândula sem que haja "flare-up" (Ortmann et al., 2001). Por essa característica farmacológica, os antagonistas podem ser administrados mais tardiamente nos ciclos auxiliando na prevenção de picos prematuros de LH, não interferindo na fase folicular e, assim, não prejudicando o recrutamento dos folículos (Cheung et al., 2005).

Estudos comparativos entre ambos análogos de GnRH mostraram diferença não significativa com relação à taxa de fertilização, de qualidade embrionária e qualidade oocitária. No entanto, o tratamento com antagonista apresentou menor incidência de hiperestímulo ovariano (Ortmann et al., 2001).

Os protocolos longos de indução somados ao rFSH apresentam custo mais elevado do que quando introduzido o hMG na indução ovariana. Em Cleveland, Ohio, uma ampola de hMG custa, aproximadamente, dois terços o valor da ampola do rFSH (\$40 vs \$60). No final da indução, o preço médio gasto utilizando rFSH é aproximadamente 30% maior do que ciclos induzidos com hMG (Goldfarb & Desai, 2003).

Apesar de existirem controvérsias entre os estudiosos da área, muitos trabalhos realizados mostraram a eficiência do hMG na indução ovariana, não ocorrendo prejuízos com relação ao número de oócitos totais e maduros punccionados, assim como ao número de embriões adequados para transferência e taxa de gestação quando comparados com a indução com rFSH. Sendo assim, protocolos alternativos podem ser aplicados em pacientes que dispõem de baixo nível econômico, não apresentando por isso diferenças significativas nos resultados do tratamento.

Esse trabalho retrospectivo mostrou que não há diferença estatisticamente significativa quanto ao número de folículos no dia do hCG, número de oócitos no dia da punção, quantidade de oócitos maduros e imaturos observados, número de embriões com fertilização normal e embriões transferidos quando se compara a indução com ou sem adição de hMG ao protocolo GnRH agonista mais rFSH, concluindo que hMG pode ser adicionado ao protocolo de indução sem prejuízo na qualidade e quantidade de oócitos maduros com número adequado de embriões aptos para transferência, apresentando assim a possibilidade de protocolos alternativos com custos menores para grupos de pacientes com baixa renda.

LISTA DE ABREVIÇÕES

1. E₂: Estradiol
2. FSH: Hormônio Folículo - Estimulante
3. GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofina
4. hCG: Gonadotrofina Coriônica Humana
5. hMG: Gonadotrofina Menopausal Humana
6. LH: Hormônio Luteinizante
7. MI: Metáfase I
8. MII: Metáfase II
9. PI: Prófase I
10. TRA: Técnicas de Reprodução Assistida
11. rFSH: Hormônio Folículo Estimulante Recombinante
12. uFSH: Hormônio Folículo Estimulante urinário

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bergh C., Howles C.M., Borg K., Hamberger L., Josefsson B., Nilsson L et al. Recombinant human follicle stimulating hormone (r-FSH; Gonal F) versus highly purified urinary FSH (Metrodin HP): results of a randomized comparative study in women undergoing assisted reproductive techniques. *Human Reproduction*, 12: 2133-2139, 1997.
2. Cheung L.P., Lam P.M., Lok I.H., Chiu T.T.Y., Yeung S.Y., Tjer C.C., Haines C.J. - GnRH antagonist versus long GnRH agonist protocol in poor responders undergoing IVF: a randomized controlled trial. *Human Reproduction*, 20: 616-621, 2005.
3. Goldfarb J.M. & Desai N. - Follitropin- versus human menopausal gonadotropin in an *in vitro* fertilization program. *Fertility and Sterility*, 80: 1094-1099, 2003.
4. Jacob S., Drudy L., Conroy R., Harrison R.F. Outcome from consecutive *in-vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection attempts in the final group treated with urinary gonadotrophins and the first group treated with recombinant follicle stimulating hormone. *Human reproduction*, 13: 1783-1787, 1998.
5. Ortmann O., Weiss J.M., Diedrich K. - Embryo implantation and GnRH antagonist. *Human Reproduction*, 16: 608-611, 2001.
6. Out H.J., Mannaerts B.M., Driessen S.G., Bennink H.J. - A prospective, randomized, assessor-blind multicenter study comparing recombinant and urinary follicle-stimulating hormone (Puregon versus Metrodin) in *in-vitro* fertilization. *Human Reproduction*, 10: 2534-2540, 1995.
7. Wely M.V., Westergaard M.D., Bossuyt P.M.M., Veen F.V.D. - Effectiveness of human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle-stimulating hormone for assisted reproductive cycles: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 80: 1086-1093, 2003.
8. Westergaard L.G., Erb K., Laursen S.B., Rex S., Rasmussen P.E. - Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle-stimulating hormone in normogonadotropic women down-regulated with a gonadotropin-releasing hormone agonist who were undergoing *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*, 76: 543-549, 2001.

Segredo na Filiação : Anonimato e Acesso às Origens no Brasil e na França

Secret in the Filiation: Anonymity and Access to the Origins in Brazil and France

**Renata Lira dos Santos Aléssio¹;
Emilie Bazin²; Sophie Meunier³**

¹Mestranda em Psicologia Social pela Université de Provence, França.

²Mestranda em Psicologia Clínica e Psicopatologia pela Université de Provence, França.

³Mestranda em Psicologia Social pela Université de Provence, França.

Correspondencia:

Renata Lira dos Santos Aléssio
35, cours Franklin Roosevelt 13001 Marseille France
Telefone 0033 0488019083
Email: renatalira@yahoo.com.br

Financiamento:

Renata L. dos S. Aléssio é bolsista do Programa Alban – Programa de Bolsas de Alto Nível da União Européia para a América Latina / processo número E05M055420BR.

RESUMO

As práticas de assistência médica à reprodução humana têm produzido um contexto crescente de paternidades e maternidades dissociadas. As dimensões biológica e social da filiação são questionadas e o recurso a doadores de gametas suscita demandas de anonimato e segredo. Os pais devem revelar o segredo sobre o modo de concepção aos seus filhos? O que deve prevalecer neste caso: o direito da criança de conhecer sua origem ou o direito dos pais de proteger suas vidas privadas? O presente artigo tem como objetivo analisar a partir de uma abordagem comparativa entre a França e o Brasil, a questão do segredo e do anonimato na filiação produzida pelas novas tecnologias de concepção. A quebra do segredo com a manutenção do anonimato se mostram uma saída ética face aos dilemas das novas configurações familiares.

Palavras-chave: segredo, anonimato, reprodução assistida

ABSTRACT

The new reproductive technologies have produced an increasing context of dissociated paternities and maternities. The biological and social dimensions of the filiation are questioned and the donors of gametes excite demands of anonymity and secret. Must parents disclose the secret of these conceptions to their children? What case must prevail: the right of the child

to know its origin or the right of the parents to protect their private lives? The present article has as objective to analyze the secret and the anonymity in the filiation produced for the new technologies of conception by means of a comparative approach between France and Brazil. The secret in addition with the maintenance of the anonymity could be an ethical exit face to the dilemma of the new familiar configurations.

Key-words: secret, anonymity, reproductive technologies

INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, o campo da saúde reprodutiva viveu um enorme progresso científico a partir da medicalização dos casais sem filhos. Passamos de uma infertilidade irremediável a uma reprodução dissociada da sexualidade e instrumentalizada (Salam, 1998). Atualmente esta modalidade de reprodução exige a intervenção de um ator social: o médico.

De acordo com Bateman & Salem, este evento “criou em torno dos embriões uma rede de atores cada vez mais complexos e suscita novas questões concernindo a hierarquização dos participantes e seus argumentos defendidos” (1999, p. 53). Segundo alguns autores, estas técnicas quando destituídas de limites podem engendrar rupturas simbólicas importantes na regulação social da filiação. Pesquisadores ingleses, por exemplo, desejavam melhorar a qualidade de embriões *in vitro* a partir da fecundação de óvulos extraídos de fetos humanos abortados. As crianças nascidas nesta modalidade seriam assim filhas de mulheres que nunca chegaram a nascer. De acordo com Le Breton (1996) podemos estar diante de práticas que negam o simbólico e com isso a condição humana sempre ligada ao limite.

Recebido em 03/07/2006
Aceito em 13/08/2006

Na França, a lei de Bioética de 2004 limita o acesso às técnicas de reprodução ao destiná-las apenas a casais (homem e mulher) legalmente unidos e em idade de procriar: “a assistência médica à reprodução é destinada a responder à demanda parental de um casal. Tem como objetivo remediar a infertilidade de caráter patológico e medicamente diagnosticada ou de evitar a transmissão a uma criança ou a um membro do casal de uma doença de uma gravidade particular”. De acordo com Novaes (1996) esta lei procura conferir um caráter “natural” à técnica médica, restringindo-a a casais heterossexuais confrontados com a esterilidade clínica. Entretanto, esta mesma lei engendra mudanças radicais ao instituir práticas que modificam as relações de filiação e parentesco de uma forma nunca prevista pela “natureza”, como no caso de doação de embrião onde a criança tem uma dupla filiação biológica materna, por exemplo.

A autora constata ainda que o reforço dado ao caráter “natural” da tecnologia é enfatizado pela exigência de um pai e de uma mãe na base do projeto parental. Porém, enquanto uma mulher francesa possui o direito individual de adotar e mesmo de abortar, ela não pode gerar uma vida através da assistência médica à procriação. Neste sentido, uma criança já nascida pode ser criada apenas pela mãe, enquanto que para um embrião a presença de um casal é obrigatória. O direito francês favorece o acesso a uma filiação no caso da adoção e privilegia a inscrição do embrião numa família tradicional em caso de assistência médica à reprodução.

No Brasil, o debate legislativo sobre a regulamentação da reprodução assistida nasce dez anos após a prática ser iniciada no país (Diniz, 2003). O projeto de lei (PL) 1184/2003 que dispõe sobre as tecnologias de reprodução aguarda discussão e tramita atualmente no congresso, sendo a última ação realizada no dia 28/12/05. Projeto proposto inicialmente em 1993, recebeu substitutivos e a ele foram pensados cerca de seis outros que dizem respeito à regulamentação das tecnologias de reprodução.

O único documento que enquadra a prática no país é a Resolução 1358/1993 do Conselho Federal de Medicina (CFM). Segundo o CFM toda mulher tem direito de submeter-se a uma reprodução assistida. São autorizadas ainda a doação de gametas, a doação de embriões e a maternidade de substituição (as doadoras temporárias de útero devem pertencer a família da demandante, não pode haver qualquer remuneração). A maternidade de substituição é proibida na França.

As situações de reprodução com recurso a doadores de gametas ou ao dom de embrião lançam pais e filhos em campos de tensão emocional que precisam ser levadas em consideração. No contexto francês, o CCNE (Comitê Consultativo Nacional de Ética para as ciências da vida) apela à transparência em relação às origens como atitude desejável em relação à criança. A busca das origens é considerada uma etapa natural e necessária no processo de construção da personalidade e pode se revelar um processo patológico quando revestida de não-ditos geradores de sentimentos desestabilizadores, como a culpa.

No Brasil, alguns projetos de lei como o PL 120/2003 e o PL 4686/2004 procuram garantir à pessoa nascida através das tecnologias conceptivas, o direito de acesso às origens. Entretanto, um erro conceitual fundamental compromete a intenção do legislador. Trata-se da diferença entre segredo e anonimato na concepção. Assim, segundo o PL 4686/2004 “entendemos que a possibilidade de o ser conviver com a verdade decorrente do conhecimento de sua origem genética representa uma forma de proteção muito mais digna do que uma existência fundada na mentira ou negação da verdade, suscetível de produzir lesão ao indivíduo”.

Segredo e anonimato são assim confundidos como sendo

o mesmo fenômeno. Porém, no caso das tecnologias de reprodução, o anonimato do doador existe para os pais e para a criança, enquanto que o segredo do modo de concepção é compartilhado pela equipe médica e pelos pais. Assim, o segredo concerne à modalidade de concepção enquanto que o anonimato diz respeito à identidade do doador. É o segredo que esconde a negação da verdade, e não o anonimato, como sugere o projeto de lei acima citado.

Para a criança, é o segredo sobre a concepção que resta uma verdade escondida, podendo atingir dimensões desestruturantes na medida em que impede a verificação de possíveis suspeitas, agravadas ainda pelo tempo. Entretanto, sabemos que quanto mais cedo for revelado o modo de concepção, menos necessidade de quebrar o anonimato a criança vivenciará. É o segredo e a reticência em falar sobre a concepção que criam o imperativo da quebra do anonimato, o que não acontece quando a pessoa constrói sua personalidade numa relação de confiança e sabe desde cedo que a modalidade de seu nascimento não é um segredo. Nestas condições, o que podemos aconselhar aos pais, atirados entre o desejo de mascarar a ajuda médica e o bem estar de seu filho?

O caso da doação de gametas

Na França, a doação de espermatozoides é regulada pelos CECOS (Centros de Estudo e Conservação de Embriões e Esperma Humanos) que foram criados em 1973. Existem 23 centros públicos e um de caráter privado que são encarregados da coleta e do armazenamento de gametas. Com a finalidade de preservar eticamente a dignidade de doadores e receptores, os doadores não sabem se sua doação levou a uma reprodução assistida e os receptores não conhecem a identidade do doador. A lei de bioética de 2004 estabelece alguns critérios relativos ao doador: ter menos 45 anos, ser pai de ao menos uma criança, ter boa saúde, ser casado e ter o consentimento por escrito de sua esposa. A doação de esperma deve ser voluntária e anônima. O doador não possui algum direito de paternidade em relação aos possíveis filhos e filhas nascidos a partir de sua doação. Esta interdição evidencia a dissociação entre filiação biológica e filiação social, isto é, o genitor não é reconhecido como pai. Para dar início ao processo de reprodução assistida, o casal receptor deve assinar um consentimento livre, informado e esclarecido. O homem não poderá contestar a paternidade da criança a nascer, uma vez que é reconhecido como pai legítimo. Em outras palavras, a filiação é garantida de maneira definitiva e irrevogável. O anonimato do doador figura apenas para o casal, uma vez que a equipe médica possui o acesso aos dados identificadores do doador (antecedentes médicos, pessoais e familiares).

Segundo o CCNE “ a doação de esperma permite reparar a ferida que constitui a esterilidade masculina e ajuda a superar o luto da paternidade biológica. Entretanto, não impede um sentimento de exclusão em face desta paternidade puramente social. São necessários generosidade e amor para que se aceite um terceiro” (2006, p. 13). O casal receptor passa por entrevistas psicológicas de forma a garantir um espaço de palavra e de escuta. As entrevistas abordam principalmente o luto face à infertilidade, o papel do pai no seio da família e o segredo sobre a forma de concepção.

Estudos realizados pelos CECOS mostram que crianças nascidas a partir de inseminação artificial com doador não apresentam alguma desestabilidade psicológica devido ao modo pelo qual foram concebidas. Pelo contrário, tendem a destacar a “coragem” dos pais e não apresentam algum desejo de quebra de anonimato ou de busca pelas origens biológicas.

No Brasil a resolução 1358/92 do Conselho Federal de Medicina estabelece que a doação não tem caráter comercial ou lucrativo e assegura o sigilo das identidades de doadores e receptores, mesmo nos casos em que informações médicas foram demandadas. Enquanto na França o legislador esforça-se por estabelecer leis que garantam a inscrição legítima da criança na família, dissociando o genitor do pai, no Brasil, a busca por uma “verdade biológica” é ressaltada diante do projeto social de filiação como sugere o PL 4686/2004.

Segundo este projeto de lei a pessoa nascida a partir de técnicas de fertilização heterólogas (com doação de gametas) “tem o direito de saber quem são seus pais biológicos”. A tensão entre características físicas e identidade social aparece pela superposição entre o papel de genitor e o papel de pai. Cabe à sociedade brasileira se questionar: quais os reais benefícios que a quebra do anonimato do doador proporciona? Em outras palavras, será que o princípio do não anonimato contribui para a idéia de que você é hoje o que já estava determinado (unilateralmente) por um conjunto de genes do qual pouco se sabe sobre?

A visão determinista do desenvolvimento humano segundo a qual o indivíduo é forjado de dentro para fora e não através da interação entre os pares se traduz no pressuposto de que o homem é determinado antes por sua natureza de que por sua cultura (Salem, 1997). Assim, o PL 4686/2004 preconiza “o conhecimento da verdade biológica a respeito da origem do indivíduo gerado nestas condições mostra-se imprescindível, já que com o avanço incontestável da Engenharia Genética é possível saber com segurança a identidade genética do ser humano. (...) Busca-se, com tal direito, a compreensão das características físicas, psíquicas e comportamentais, até então desconhecidas (...)”.

O que é uma identidade genética e mais ainda, que segurança ela é capaz de garantir sobre uma “verdade” humana? Que respostas, o conjunto de genes humanos pode fornecer sobre comportamentos “desconhecidos”? Desconhecidos de quem, por quem?

Assim, emerge deste suposto direito às origens genéticas uma representação de pessoa humana enquanto um indivíduo anterior às relações sociais, um ser único e irreduzível cuja identidade exclui por definição a alteridade e pior, nega a construção contínua e essencialmente relacional das características psicossocio-culturais que nos constituem (Salem, 1997).

O pressuposto de ser humano pré-social, biologicamente determinado encontra-se presente também nas fichas preenchidas por doadores nas clínicas e bancos de sêmen (Costa, 2004). Enquanto na França em nenhum caso o doador deve informar dados subjetivos como religião ou nível de estudos, em alguns bancos de sêmen brasileiros o doador informa não só sua religião e escolaridade, mas até seus “hobbies”. Para alguns médicos, essa é uma forma de criar uma “identificação” da parte do receptor em relação ao doador (Costa, 2004). Ora, qual o sentido desta suposta identificação? Estamos diante da noção de que a criança já trará o “selo de garantia” de bons modos e do “status” social elevado medido pela escolaridade e pelo passa-tempo dos genes que recebeu.

A doação de óvulos se mostra ainda mais complexa. A lei francesa proíbe a doação não anônima, entretanto, como sugere o CCNE, este tipo de doação é praticado no seio da família. Os casais encontram doadoras de modo mais fácil entre os familiares, uma vez que contrariamente à doação de esperma que não necessita procedimento medical, para obter os óvulos a mulher sofre uma intervenção médica custosa do ponto de vista físico e psicológico. A procura de doadora na família responde ainda a um desejo de manutenção da

herança genética. Assim, o papel de genitor da doadora é camuflado pela gravidez da receptora. A criança nasce de uma dupla maternidade biológica, que pode ser psicologicamente negada e disfarçada no caso de doação de óvulos entre parentes.

Neste sentido, convém perguntar: quais são as conseqüências psicológicas para uma criança que escuta de seu entorno que sua “mãe” é a “titia”, ou a “priminha”, mas que ela foi gerada na barriga da “verdadeira mãe”? Que sentimentos futuros esta criança pode vivenciar quando adolescente ou adulta: culpa, vergonha pelo seu modo de concepção? A doação de óvulos anônima parece ser ainda o melhor procedimento de proteção à identidade em constituição, como no caso da doação de esperma.

Neste sentido, a quebra do anonimato pode incentivar na criança a prioridade de uma “verdade biológica” de sua origem ao invés da criação de laços de confiança entre a mesma e seus pais. Assim, o respeito ao anonimato dos doadores é uma condição *sine qua non* para uma prática baseada em princípios éticos de respeito à pessoa humana, pois o mais importante para a criança é se inscrever numa família e não numa cadeia de produção.

A doação de embrião

Os casais que se submetem às tecnologias de reprodução são freqüentemente confrontados à situação de embriões supranumerários, resultantes da fecundação, mas que são congelados para serem transferidos em um projeto parental posterior. Os casais que não desejam mais crianças podem doar seus embriões para outros. Na França, doadores e receptores são anônimos, assinam separadamente consentimentos e são submetidos a uma enquête social, a decisão de trazer ao mundo o embrião sai assim da intimidade do casal para tocar a esfera pública. No Brasil apesar do CFM abordar a doação de “pré-embrião” pouco se conhece sobre esta prática em termos de número de embriões transplantados ou características dos receptores e/ou das receptoras.

No caso francês, o CCNE aconselha que seja dada a oportunidade de acesso aos dados não identificadores ao adulto que procura informações, ou seja, acesso às origens com a manutenção do anonimato. Uma prudência especial é recomendada em relação às informações de possíveis irmãos e irmãs biológicas oriundas do primeiro projeto parental. Mas, o anonimato do casal doador se mostra problemático nos laboratórios franceses. A conservação de palhetas de esperma é feita com um número que não permite o acesso aos dados identificadores. Entretanto, no caso de doação de embrião, dado que o embrião se inscrevia em um projeto parental, ele é conservado com o nome do casal genitor (Saias, 1996). Assim, uma modificação no processo de estocagem reduziria a possibilidade de acesso aos dados identificadores dos genitores.

Outra problemática concerne à informação sobre a idade da genitora no momento da fecundação do embrião. De fato, este é um elemento que pode ser julgado como indispensável pelo médico do casal (o que coloca em cheque o não acesso a dados identificantes), pois o óvulo tem a idade da doadora e um óvulo mais velho é mais suscetível a problemas genéticos. Além disso, a busca pela similitude genética em termos de características fenotípicas é quase impossível no caso de doação de embrião: o embrião a ser transplantado é uma pessoa potencial sobre a qual não temos alguma informação. Desta forma, o segredo sobre a filiação é certamente insustentável e se apresenta particularmente perigoso: que sentimentos uma pessoa poderá vivenciar através da descoberta involuntária e/ ou tardia do seu modo de concepção?

A legislação francesa sobre a doação de embrião parece ainda manifestar o desejo institucional de se desembaraçar de um dilema moral nascido do experimentalismo das tecnologias de reprodução: a destruição de embriões humanos. Na França um casal não pode receber uma dupla doação de gametas e não pode se submeter a um novo tratamento até que seus embriões congelados tenham sido implantados ou descartados.

Os casais brasileiros e franceses encaram de forma solitária (são os únicos responsáveis) a manutenção de seus embriões supranuméricos, involuntários e congelados nos laboratórios. É, sobretudo o caráter involuntário do embrião excedente que não permite à sociedade julgar como um abandono o que nunca foi um projeto parental.

De acordo com Delaisi de Parseval (1996) estigmatizar os pais como “pais que abandonaram é um absurdo, pois são casais que mais que outros talvez querem ter filhos!”. Neste sentido, a idéia de “adoção pré-natal”, defendida na França, é impertinente, já que não estamos diante do abandono de uma criança. Além disso, faz-se necessário no Brasil e no mundo, estudos que se interessem aos sentimentos vividos pelos casais doadores de embriões, seja para outro casal seja para pesquisa científica, quando é o caso.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todo projeto de parentalidade deve respeitar o direito à dignidade de pais e filhos. Neste sentido, uma informação verdadeira e transparente sobre as origens é necessária para o desenvolvimento de vínculos estáveis entre a família. A rompimento do mistério é aconselhado, pois é muito difícil preservar um não-dito desta ordem que ganha dimensões devastadoras sob a identidade social de pais e filhos com o passar do tempo.

Assim, os pais devem ser os protagonistas da quebra do segredo de forma a evitar a cada uma das partes sentimentos de culpa e vergonha. A possibilidade de pesquisa das origens deve ser uma diretriz assegurada pela legislação brasileira, todavia o direito ao anonimato do doador deve ser mantido em todas as circunstâncias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bateman, S., Salem, T. L'embryon en suspens. Cahiers du Genre : de la contraception à l'enfantement, l'offre technologique en question .Paris : Harmattan, 1999.
- Costa, R. G. – O que a seleção de doadores de gametas pode nos dizer sobre a noção de raça. Physis: Revista de Saúde Coletiva. 14 (2) : 235-255, 2004
- Delaisi de Parseval, G. - La demande parentale dans l'assistance médicale à la procréation. In : Feuillet-Le Mintier B. L'embryon humain, approche multidisciplinaire. Paris : Economica, p. 203-210, 1996.
- Diniz, D. – Tecnologias reprodutivas conceptivas, o estado da arte do debate legislativo brasileiro. J Bras Rep Assist 7 (3): 10-19, 2003.
- França, - Loi de Bioéthique n° 2004-800 du 6 août 2004, Journal Officiel du 7 août 2004.
- Le Breton, D. - L'embryon médicalement assisté. In : Feuillet-Le Mintier B. L'embryon humain, approche multidisciplinaire. Paris : Economica, p. 9-24, 1996.
- Novaes, S. - Parents et médecins face à l'embryon : relations de pouvoir et décision. In : Feuillet-Le Mintier B. L'embryon humain, approche multidisciplinaire. Paris : Economica, p.185-192, 1996.
- Saias, J. - Don de gamètes. Communication présentée au séminaire Assistance Médicale à la Procréation, Hôpital de la Conception, Marseille, 28-31 mars, 2006.
- Salam, H. - De l'avortement à la fécondation in vitro : débat autour de l'identité de l'embryon humain, Thèse de Doctorat, Paris : EHESS, 1998.
- Salem, T. - As novas tecnologias reprodutivas: o estatuto do embrião e a noção de pessoa. Mana: estudos em antropologia, 3: 75-93, 1997.

“Não recebo a revista.”

Você é sócio?
Seu pagamento está em dia?
Seu endereço mudou?

Se há dúvidas, consulte o seu cadastro e fale conosco

www.sbra.com.br

Biologia Molecular na Espermatogênese

“Molecular Biology in Spermatogenesis”

Marcos Meseguer^{1,2}
 Jose A. Martínez-Conejero^{1,2}
 Cristiano Busso^{1,2}
 Marco Antonio Barreto Melo^{1,2}
 Jose Remohí^{1,2}
 Nicolás Garrido^{1,2}

¹ Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI)
² FIVIER (Fundación IVI para el Estudio de la Reproducción).

Endereço para correspondência:
 Dr. Marcos Meseguer, Instituto Valenciano de Infertilidad, C/
 Guardia Civil nº 23, 46020, Valencia. Teléfono: 34 963624399;
 Fax 34 963694735; e-mail: marcos.meseguer@ivi.es

ABSTRACT

Molecular biology techniques have suffered important advances in the past decade and its practical applications are getting more present each day. The studies involving male gametogenesis show a subtle relationship between molecular findings and clinical features and fenotypes. Genetic alterations are related to male infertility like spermatogenesis failure, impaired gonadotropin releasing and deferent duct agenesis. The molecular study of the spermatic cells shows that impairment of DNA packing and its integrity leads to defects in the pro-nucleus formation and, thus, interferes with in vitro fertilization outcome. These studies also show that there is an increase in DNA anomalies and increased apoptosis in spermatozoids from thawed semen. Flow cytometry can identify enriched cell populations and allow their selection before an ICSI treatment. Through these techniques, it will be possible to develop the palliative or assisted reproduction treatments needed for the couples where there is a male factor to achieve pregnancy without risks.

ABSTRACT (PORTUGUÊS)

As técnicas de biologia molecular sofreram importantes avanços na última década e sua aplicação prática é cada dia mais presente. Os estudos realizados envolvendo a gametogênese masculina mostram nítida correlação entre achados moleculares e quadros clínicos e fenotípicos. Alterações genéticas estão relacionadas com a infertilidade masculina como falha na espermatogênese, alterações de secreção de gonadotrofinas e ausência de ductos deferentes. O estudo molecular das células espermáticas mostra que alterações no empacotamento e na

integridade do DNA podem levar a defeitos na formação do pro-núcleo masculino e, portanto, na performance da fertilização *in vitro*. Mostra também que existe aumento de anomalias no DNA e aumento de apoptose nos espermatozoides de amostras de sêmen congelado. A citometria de fluxo pode identificar populações de células espermáticas enriquecidas e permitir sua seleção antes de um tratamento de ICSI. Através destas técnicas se pode desenvolver ou se desenvolverão os tratamentos paliativos ou de reprodução assistida necessários para que os casais nos quais os homens estejam afetados possam ter descendência sem correr riscos.

Key Words: Spermatogenesis, male infertility, DNA, Molecular Biology

ESPERMATOGÊNESE, INFERTILIDADE MASCULINA, DNA, BIOLOGIA MOLECULAR

INTRODUÇÃO

A espermatogênese é um processo biológico que pode resumir-se em três fases consecutivas: na primeira delas, ocorrem proliferação e renovação das espermatogônias, graças a mitoses sucessivas, que resultarão, por um lado em novas células madre e, por outro, em células que avançarão na espermatogênese. Estas darão lugar a espermatócitos, que entrarão em processo de diferenciação citológica que concluirão com a meiose, o que reduzirá sua carga genética dando espermátides haplóides. Finalmente, as espermátides entrarão no processo de espermiogênese, no qual é formado o acrossomo, a cauda e ocorre empacotamento do DNA, resultando finalmente no espermatozóide haplóide maduro.

Durante a década passada, as ferramentas da biologia molecular moderna proporcionaram descobertas únicas no conhecimento da espermatogênese.

Recebido em 05/05/2006
 Avaliado e aceito em 04/12/2006

A investigação citogenética em homens inférteis mostra que as anormalidades cromossômicas autossômicas e sexuais podem ser responsáveis por deficiências na espermatogênese. Junto com a infertilidade de origem cromossômica, as anomalias meióticas ou espermatóicas sugerem a presença de mutações gênicas que interferem na evolução da espermatogênese e levam à formação de espermatozoides anormais. Através da Biologia Molecular se pode demonstrar a existência de essas mutações. Estas técnicas permitem que se conheça o defeito de células germinais portadoras de uma anomalia cromossômica particularmente quando esta é equilibrada e envolve autossomos, e não os cromossomos sexuais (Guichaoua & Luciani, 2003).

Existe necessidade de que ocorram mudanças na cromatina durante a espermatogênese, formando espermatozoides nuclearmente maduros que sejam capazes de fecundar um óvulo e dar lugar a um pronúcleo masculino. Essas mudanças podem ser analisadas pelo estudo do DNA.

A cromatina das células somáticas geralmente difere da cromatina dos espermatozoides, e esta diferença é baseada principalmente na ploidia, já que somente um jogo completo de cromossomos está incluído no núcleo de cada espermatozoide, enquanto existem duas cópias de cada cromossomo no núcleo das células somáticas. Além disso, outra diferença existente é o nível de empacotamento de cromatina dos espermatozoides, já que nestes ocorre uma mudança nas histonas de união do DNA por proteínas de transição que, por sua vez, serão substituídas por protaminas nas espermátides (Green *et al.*, 1994).

Após a entrada de um espermatozoide em um ovócito, a nucleoplasmína presente no citoplasma do gameta feminino produzirá a separação das protaminas por meio da redução das pontes de dissulfeto estabelecidas com o ácido nucléico, fazendo com que ocorra a descondensação do núcleo e aumente seu tamanho, formando o pronúcleo masculino, que se combinará com o feminino no processo de fecundação (Philpott *et al.*, 1991; Philpott *et al.*, 1992).

Com essa informação podemos concluir que, em cada etapa da espermatogênese, existe uma situação concreta do DNA, extremamente controlada e que qualquer alteração poderia dificultar o processo reprodutivo.

CONTROLE GÊNICO DA ESPERMATOGÊNESE

Com o sequenciamento do genoma humano (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001: (Venter *et al.*, 2001)) e a implementação dos programas funcionais em grande escala, tem-se a oportunidade de identificar novos genes implicados na espermatogênese. Atualmente, somente as mutações pontuais no gene receptor de andrógenos (RA) representam um dos poucos defeitos gênicos realmente associados com uma falha espermatogênica. A realização de estudos em ratos *knock out* (onde se anula seletivamente a expressão de um determinado gene) mostra que muitos genes codificados tanto nos cromossomos sexuais como nos autossômicos estão implicados na diferenciação das células germinais, meiose ou nas etapas sucessivas da espermiogênese (Tabela I).

O estudo físico, genético e funcional do cromossomo Y permitiu especial atenção à região Yq11, onde parecem estar localizados alguns genes da espermatogênese (fatores de azoospermia "AZF") (Maclahlan *et al.*, 1998). Aproximadamente 15% dos homens em que se diagnostica uma oligozoospermia severa ou uma azoospermia são portadores de microdeleções nesta zona, por perda de segmentos específicos de DNA que

levam à perda de genes vitais para a produção espermatóica (Chandley *et al.*, 1998). Concretamente foram localizadas três regiões determinadas AZFa, AZFb e AZFc (Quershi *et al.*, 1996; Vogt *et al.*, 1996). Dos genes, o DAZ (ausente na azoospermia) e o RBM1 (domínio de união ao RNA) codificam proteínas de união ao RNA e se acredita que desempenham um papel importante na espermatogênese (Moro *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001). Se situam nas regiões AZFc e AZFb respectivamente. A maioria das microdeleções observadas nos pacientes se produzem na região AZFc e se associam às patologias descritas anteriormente. Os homens com deleções maiores nas regiões AZFa y AZFb têm normalmente defeitos espermatóicos como o bloqueio de células germinais (bloqueio de maturação) ou a síndrome de células de Sertoli "only" e são normalmente azoospermicos (Vogt *et al.*, 1996).

As mutações que impedem totalmente a função do receptor de andrógenos (AR) originam o que está definido como síndrome de feminilização testicular ou síndrome de insensibilidade androgênica completa, onde um indivíduo 46XY está completamente feminizado ao nascer (Loy *et al.*, 2001). Além disso, determinadas mutações pontuais podem resultar em uma falha de espermatogênese (Yong *et al.*, 2000). Os aumentos de longitude da região de repetição de trinucleotídeos (CAG), localizada no éxon 1 do gene AR, que codifica um tramo de glutaminas no domínio da ativação da transcrição do AR, se relaciona diretamente com um elevado risco de apresentar uma espermatogênese deficiente ou uma menor masculinização (Loy *et al.*, 2001). Recentemente, em um estudo de homens com falha de espermatogênese bem documentada (Mifsud *et al.*, 2001), se observou que homens com 26 ou mais repetições de CAG em seu AR tem 7 vezes mais possibilidades de serem azoospermicos que aqueles com menos de 26 repetições. Estes achados são compatíveis com o fenótipo da Doença de Kennedy, uma alteração neuromuscular degenerativa ligada ao cromossomo X, causada por mais de 40 repetições CAG no gene AR onde os indivíduos são inférteis devido a uma atrofia testicular e a uma oligozoospermia importante (La Spada *et al.*, 2002). A chamada expansão CAG nesta patologia e em outras relacionadas com o mesmo fenômeno está associada com a "antecipação", o que significa que a idade em que a doença se manifesta diminui nas sucessivas gerações. Este fenômeno pode ser explicado pela instabilidade das repetições anormalmente expandidas, o que as torna mais susceptíveis de produzir extensões ainda maiores por cada cruzamento desigual ou por adições extra de repetições em cada cadeia simples pela DNA polimerase durante a replicação meiótica do DNA nas linhas germinais masculina e feminina. Assim, o fenômeno da antecipação deve ser considerado, já que o ICSI com espermatozoides de homens com 15 a 28 repetições CAG no seu AR (que estão dentro da normalidade), as transmite de maneira estável aos seus filhos. Não obstante, para homens inférteis com maior longitude de repetições (29 a 39), o grau de instabilidade da seqüência CAG no espermatozoide não é conhecido, de maneira que se desconhece a possibilidade nestes homens com maior número de repetições, de transmitir alelos AR portadores da doença a suas filhas, que causarão a Doença de Kennedy em 50% de sua segunda geração de mulheres. Independentemente das repetições CAG, substituições de aminoácidos no domínio de união ao ligando do receptor AR que implicam os resíduos 727, 798 e 886 originam problemas na espermatogênese através de um novo mecanismo. Neste caso, a patogenicidade não se transmite por uma união deficiente do ligando e sim mediante uma interação defeituosa entre proteínas do domínio receptor com as encarregadas de mediar o processo de ativação da transcrição (Yong *et al.*, 2000).

Tabela I. Genes candidatos a estarem implicados na espermatogênese. Dados revelados a partir de fenótipos de ratos *knock out*.

Mutante da Ataxia Telangectasia	Fragmентаções dos cromossomos meióticos
Proapoptótico Bax	Detenção premeiótica
Antiapoptótico Bc16	Apoptose aumentada durante a Meiose I
Proteín Kinasa IV dependente de Ca+2/Calmodulina	Defeito no alongamento espermático
Receptor de Tirosin Kinasa c-ros-huérfano	Angulação ou enredamento da cauda do espermatozóide
Subunidade catalítica de casein kinasa II	Globozoospermia
Elemento de resposta modulador do AMP cíclico	Detenção precoce da espermátide
Ciclina A1	Anormalidades na sinapse a meiose I
Ausente na azoospermia (Deleted in azoospermia-like, Dazla)	Teratozoospermia nos heterozigotos e perda das células germinais na Meiose I precoce nos homozigotos.
Dmc1-RecA específico de meiose	Detenção na fase zigóteno. Falha no pareamento dos cromossomos homólogos
MLH1-enzima reparador de DNA mal pareado	Detenção da Meiose
Microrquidia (morc)	Detenção em Zigóteno-paquítenu durante a meiose I.
Gene homólogo de Mouse Vasa (Mvh)	Detenção de células germinais em fase de Zigóteno e diminuição da colonização de células germinais primordiais
Enzima conjugadora de ubiquitina-RAD6B (hr6b).	Defeito na condensação pós-meiótica da cromatina.
Proteína do complexo sinaptonemico (SCP3)	Falha de sinapse cromossômica
Translocado em liposarcoma (TLS)	Falha de pareamento dos cromossomos homólogos
Proteína fosfolipase tipo t Cy2 (PP1cy2)	Defeitos da meiose e perda de espermátides.

ASPECTOS GENÉTICOS DA INFERTILIDADE MASCULINA

O avanço do conhecimento genético diminuiu o emprego do termo “infertilidade idiopática” para classificar aqueles homens estéreis nos quais a causa de sua infertilidades é desconhecida, já que muitos fatores genéticos adquirem maior protagonismo em seu fenótipo. Além dos diretamente relacionados com a espermatogênese existem outros genes implicados na infertilidade masculina e que incluem fundamentalmente as alterações genéticas associadas a alterações na ação ou na secreção das gonadotrofinas ou no nexo genético entre a fibrose cística e a ausência bilateral congênita dos condutos deferentes (Huyt *et al.*, 2002).

ALTERAÇÕES GENÉTICAS RELACIONADAS COM A DEFICIÊNCIA DA ATIVIDADE GONADOTRÓFICA

Estas alterações geralmente caem em duas amplas categorias: 1) aquelas relacionadas com a secreção ou com a ação do GnRH hipotalâmico, 2) Alterações primárias na secreção e na ação hipofisária de LH e FSH.

A primeira está relacionada com os sintomas comuns associados ao hipogonadismo hipogonadotrópico (HH) idiopático que incluem criptorquidia, ausência de desenvolvimento puberal, infantilismo sexual e diversos graus de hipospádias e alterações na descida dos testículos. Existe uma ampla gama de apresentações clínicas do HH dependendo do grau de ausência do GnRH, os casos mais severos manifestam-se com os sintomas anteriormente mencionados e os mais leves com desenvolvimento sexual incompleto cuja variabilidade será proporcional aos níveis de GnRH.

Geneticamente, o HH é uma alteração heterogênea em que um terço dos indivíduos possuem historia familiar positiva. Dentro deste grupo, aproximadamente 20% tem um padrão de herança ligada ao cromossomo X (Waldstreicher *et al.*, 1996). Através do mapeamento genético, a variante ligada ao cromossomo X da síndrome de Kallman foi associada a uma mutação no gene KALIG – 1 de localização Xp22.3 (Hardelin

et al., 1993). Se sugere que a proteína codificada por este gene regula a migração dos neurônios produtores de GnRH y olfativos e seu desenvolvimento.

A segunda categoria consiste em um conjunto de mutações genéticas que inativam as sub-unidades Beta do FSH e do LH e dos genes que codificam seus receptores. Os indivíduos apresentam hipogonadismo e hipoplasia das células de Leydig (Bhasin *et al.*, 2000).

ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE A FIBROSE CÍSTICA (FC) E A AUSÊNCIA BILATERAL CONGÊNITA DOS CONDUTOS DEFERENTES (ABCCD)

Está descrito que de 25% ou mais dos pacientes inférteis apresentam azoospermia, nos quais 1/3 é obstrutiva. Dos assim diagnosticados, 25% apresentam ABCCD (prevalência em 2% dos homens inférteis) (Patricio & Leonard, 2000).

As mutações em ambos os alelos do gene regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (RTFC) resultam normalmente em ABCCD com uma alteração variável da função respiratória normal (Chillon *et al.*, 1995). Para aqueles homens inférteis com ABCCD, é necessário o estudo da mulher se o casal está planejando submeter-se a um tratamento de reprodução assistida. Ainda que estejam identificados mais de 800 mutações do gene RTFC, a maioria dos laboratórios oferece estudos para as mutações mais freqüentes, incluindo a deleção de três pares de bases no éxon 10 (delta F508) e substituições únicas de bases R117H, G542X, N1303K, G551D, V520F, R553X e A455F. Se a mulher é portadora de mutação do RTFC, então a prole procedente de reprodução assistida com espermatozoides testiculares teria a mesma possibilidade de ter portadores heterozigotos e afetados depois do diagnóstico pré-natal. A opção do diagnóstico pré-implantacional (PGD) da FC para determinar o estado genético dos embriões destes casais é, hoje em dia, uma opção viável (Verlinsky *et al.*, 1999). Mediante esta técnica, somente os portadores heterozigotos seriam transferidos ao útero materno e assim dar a oportunidades aos casais de iniciar a gestação com a segurança de que o concepto não

estará afetado pela FC. O aconselhamento genético é também parte importante do processo de decisão já que diferentes combinações de mutações RTFQ produzem amplo espectro de fenótipos que variam desde severo e moderado até a ausência de sintomas.

BIOLOGIA MOLECULAR DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS: ANÁLISE DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO

O estudo do DNA necessita para ser levado a cabo adequadamente, a utilização de moléculas fluorescentes que se unam a ele de forma eficaz e relativamente reversível (Gledhill *et al.*, 1990). Segundo o tipo de molécula e o tipo de vínculo estabelecido com o DNA, os fluorocromos podem ser divididos em: intercalantes da dupla hélice de DNA, como o laranja de acridina (Golan *et al.*, 1997; Samocha-Bone *et al.*, 1998), o iodeto de propídio e a elipticina, todos eles altamente mutagênicos, dado que sua união ocorre entre os nucleotídeos. O segundo grupo é formado por moléculas que se unem externamente ao DNA, de forma que sua mutagenicidade é muito inferior, como o Hoechst 33342 (Fugger *et al.*, 1998), a mitramicina e a cromomicina A3 (Bianchi *et al.*, 1996). Finalmente, outras formas de união ao DNA seriam as do DAPI (diamidino-2-fenilindol) (Hacker-Klom *et al.*, 1985) e da 7-amino-actinomicina D.

EMPACOTAMENTO E INTEGRIDADE DO DNA

Alguns estudos hipotetizam que uma falha na condensação nuclear ou na resposta à descondensação induzida podem ser causas de desordens no desenvolvimento do pronúcleo masculino (Golan *et al.*, 1997), e podem ser estudados pelo ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA).

Este ensaio consiste na indução por calor ou condições ácidas *in vitro* e o estudo de sua reação como preditor de uma união anormal das pontes de dissulfeto da protamina e da condensação nuclear, o que poderia ser importante para diagnosticar o potencial fértil em reprodução assistida (Spanò *et al.*, 2000). Também foram relacionadas as alterações neste aspecto com abortos de repetição (Drudy *et al.*, 1996).

Alguns autores propuseram que estes testes deveriam estar incluídos no espermograma de rotina (Sukcharoen, 1995; Samocha-Bone *et al.*, 1998).

A citometria de fluxo se mostra como técnica válida para medir o estado de empacotamento do DNA *in vivo*, assim como sua capacidade para ser descondensado artificialmente *in vitro*.

A base dos estudos de descondensação é a acessibilidade dos diferentes fluorocromos marcadores de DNA de aceder a este, de maneira que a acessibilidade é maior quanto mais descondensado se encontra e, como conseqüência, menor quanto mais condensado se encontra o DNA. Portanto, nos estudos realizados com citometria de fluxo, o incremento da fluorescência emitida com valor maior que o normal é sintoma de hipocondensação, enquanto que a diminuição da fluorescência é sintoma de hipercondensação. Os dois casos mostram situações possivelmente patológicas relacionadas ao empacotamento anormal da cromatina e possivelmente relacionadas à infertilidade.

Por outro lado, um DNA "saúdável" deve responder adequadamente à condensação induzida, mimetizando assim a situação do espermatozóide ao entrar no oócito.

Outro aspecto a ser considerado nos estudos do DNA se refere à integridade e à presença de outras rupturas na cadeia. A forma de estudar esta situação por citometria de fluxo requer a utilização de uma técnica de biologia molecular chamada

TUNEL (Gorzycza *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 1997), graças a esta técnica se adicionam, por parte de uma transferase terminal específica exógena, nucleotídeos marcados com biotina em cada final 3'-OH da cadeia. Posteriormente, se unirá uma adivina covalentemente a um fluorocromo de maneira que uma elevada fluorescência refletirá o número diretamente proporcional de rupturas. Este sinal pode também ser medido por um citômetro de fluxo, sendo indetectável quando não existam rupturas de DNA, já que somente existe um final 3'-OH.

A presença de DNA descondensado em porcentagem elevada de espermatozoides pode ser especialmente relevante na injeção intracitoplasmática, já que os critérios de seleção dos espermatozoides estão baseados na morfologia e não existe forma de conhecer a situação de seu DNA *in vivo*, somente podendo-se trabalhar com probabilidades.

Cabe ressaltar que diversos estudos epidemiológicos foram realizados por diferentes grupos utilizando esta metodologia para examinar as influências que os tóxicos ambientais como o estireno e os pesticidas, hábitos tóxicos como o tabaco, as condições laborais e os tratamentos anti-tumorais (Spanò *et al.*, 1998; Potts *et al.*, 1999) têm sobre a espermatogênese.

Recentemente, realizaram-se estudos utilizando estes sistemas nos diferentes métodos de laboratório, empregados para a capacitação e congelação de sêmen. Os resultados revelaram incremento nas porcentagens de anomalias do DNA (tanto na desintegração *in vitro* como em sua integridade) após a criopreservação (Spanò *et al.*, 1999; Pasteur *et al.*, 1991) e após a centrifugação em gradientes de Percoll (Zini *et al.*, 1999), ainda que outros autores tenham descrito melhora após a capacitação das amostras com swim-up (Spanò *et al.*, 1999) e também com a filtração através de fibra de vidro e gradientes (Larson *et al.*, 1999).

Finalmente, outros trabalhos tentaram estabelecer o estudo da apoptose no sêmen em bioensaio, concluindo que aproximadamente 20% dos espermatozoides ejaculados são apoptóticos e que a concentração de espermatozoides é menor naqueles que apresentam maior incidência deste fenômeno, sugerindo que a detecção da apoptose nas mostras de sêmen poderia ser método útil na determinação da qualidade seminal (Oosterhuis *et al.*, 2000).

Atualmente existem diversos testes para medir a ruptura ou fragmentação do DNA do espermatozóide. Entre eles está o teste de dispersão da cromatina (SCD) (Halosperm[®]) que se baseia na descondensação induzida do núcleo do espermatozóide.

Nosso grupo estudou a relevância deste fenômeno analisando as mesmas amostras de sêmen que se utilizaram nos tratamentos de reprodução assistida. Por um lado estudou-se a correlação entre os parâmetros seminais básicos e por outro a correlação com o sucesso dos tratamentos de IIU e FIV/ICSI.

A fragmentação do DNA se correlaciona negativamente com a mobilidade espermática, ainda que o processo de capacitação por swim-up não mostra melhora significativa na integridade do DNA.

Tanto nos tratamentos de IIU como nos de FIV não se observaram diferenças nas médias de fragmentação de DNA entre aquelas pacientes que conseguiram gravidez e as que não. Não obstante quando nos aprofundamos nos dados dos ciclos de FIV/ICSI observamos relação inversa entre a fragmentação do DNA e a taxa de fecundação, a sincronia pronuclear e a qualidade embrionária em dia 5 de desenvolvimento embrionário.

O estudo da fragmentação do DNA pode ser de especial interesse em pacientes com má qualidade embrionária em ciclos de FIV/ICSI como fator de causalidade. (Muriel *et al.*, 2006)

ESTUDO DA ESPERMATOGÊNESE

Existem suficientes estudos utilizando a citometria de fluxo para comparar seus resultados com os obtidos por determinações histopatológicas analisando a espermatogênese, demonstrando tanto sua utilidade, como os benefícios em termos de reprodutibilidade, sensibilidade e rapidez. Os resultados mostraram boa correlação com os estudos anatomopatológicos (Mallidis & Baker., 1994; Kostakopoulos *et al.*, 1997), demonstrando que estas técnicas podem ser empregadas como substituto da histologia clássica no estudo de rotina das biópsias testiculares.

O estudo do funcionamento da espermatogênese pode ser facilmente realizado em biópsias ou em ejaculado de homens portadores de patologias como a varicocele (Bonnanni *et al.*, 1997), lesões graves da espinha dorsal, testículos não descendidos, obstruções anatômicas ou funcionais do trato genital (Hirsch *et al.*, 1994), para a predição da recuperação de espermatozoides na eletroejaculação (Hellstrom *et al.*, 1989), no impacto dos tratamentos em pacientes com câncer e na predição da espermatogênese pós-câncer (Fossa *et al.*, 1994).

O diagnóstico por este método é tão sensível como a biópsia diagnosticada por patologista e ainda mais representativa, objetiva e rápida (em até 90 minutos), sendo especialmente importante em azoospermicos nos quais, com a utilização de aspirados testiculares obtidos com agulha e seringa se podem detectar focos espermatogênicos nas gônadas de forma pouco invasiva (Bonnanni *et al.*, 1997).

Estas provas podem ser realizadas utilizando tintura de DNA, que revela a ploidia do sêmen ou das células que compõem o testículo, após desagregação com métodos mecânicos ou enzimáticos (Garrido *et al.*, 2001).

Assim se consegue obter diferentes picos ao representar a fluorescência em histograma, onde cada um deles representa células de determinadas características: sub-haplóides, haplóides condensadas, diplóides e inclusive tetraplóides, através de pequenas modificações no equipamento, diminuindo a voltagem do fotomultiplicador para “deslocar” o histograma para a esquerda e permitir alcançar sua zona (Figura 1) (Garrido *et al.*, 2002).

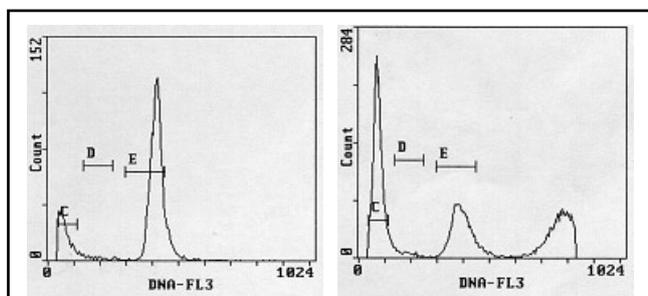


Figura 1. Histogramas de DNA de sêmen humano normal e sua correspondente distribuição de freqüências acumuladas (dados dos autores). No eixo X se representa o conteúdo relativo de DNA (dividido em 256 canais) e no eixo Y, o número de células por canal. As populações achadas foram: (C) região sub-haplóide < n (debris); (D) pico n de espermatozoides maduros haplóides ou espermátides; (E) pico 2n de espermatozoides diplóides, (F) pico >2n inclui células diplóides na fase de síntese de DNA, e tetraplóides (4n). 1) Mostra pós-capacitação, como controle haplóide 2) Controle diplóide: células sanguíneas, 3) Ejaculado com células redondas, leucócitos, determinado por tintura de Giemsa, 4) Biópsia de paciente azoospermico, onde não foram achados espermatozoides, demonstrando-se uma existência mínima de espermátides, células diplóides e células tetraplóides.

A citometria de fluxo baseada na análise do DNA pode inclusive ser aplicada com a intenção de separar diferentes sub-populações celulares para caracterizar etapas celulares molecularmente diferentes da espermatogênese depois de realizar o “cell sorting” sendo capaz de isolar os picos anteriormente descritos de células haplóides, incluindo espermátides redondas e alargadas, diplóides e tetraplóides, considerando tanto o conteúdo do DNA como seu empacotamento (Mays-Hoopers *et al.*, 1995, Hacker-Klom *et al.*, 1999). É também possível comprovar a pureza das populações separadas por outros métodos (Blanchard *et al.*, 1991).

Esta técnica poderia converter-se no tratamento de eleição em pacientes azoospermicos secretores com deficiências extremas na espermatogênese, onde algumas áreas do testículo ainda conservam parte da espermatogênese, incluindo pacientes com “Sertoli cell only”, criptorquidias, atrofia testicular, bloqueio de maturação espermática e síndrome de Klinefelter, permitindo-nos analisar e separar grande quantidade de células rapidamente para criar populações enriquecidas em células haplóides para serem microinjetadas, sempre que se possa utilizar marcador adequado para o DNA que não prejudique a viabilidade dos espermatozoides nem ponha em perigo a integridade da descendência.

A relação entre análise do DNA e qualidade do sêmen e infertilidade também está descrita (Hacker-Klom *et al.*, 1999) e se concluiu que alta concentração de debris celulares, > 5% de espermatozoides diplóides ou cromatina espermática mal condensada estão relacionados com fertilidade alterada.

CONCLUSÕES

Graças às atuais técnicas diagnósticas de biologia molecular disponíveis para o estudo da espermatogênese, foram detectadas alterações neste processo que até então haviam passado despercebidas.

Estas alterações encontradas em nível molecular são a explicação do estado de infertilidade de importante número de homens.

Ainda, do conhecimento destas técnicas, se puderam desenvolver-se ou desenvolver-se-ão os tratamentos paliativos ou de reprodução assistida necessários para que os casais em que o homem esteja afetado possam ter descendência sem correr riscos.

O diagnóstico pré-implantacional é hoje em dia uma destas poderosas ferramentas. Entretanto, ainda são necessários grandes esforços para caracterizar por completo as origens das diferentes causas da infertilidade masculina para a qual, sem dúvida, as técnicas de biologia molecular terão papel decisivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Bhasin S., Mallidis C., *et al.* The genetic basis of infertility in men. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, 14: 363-388, 2000.
2. Bianchi P.G., Manicardi G.C. *et al.* Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Repr.*, 2(3):139-144, 1996.
3. Blanchard Y., Lavault M.T. *et al.* Preparation of spermatogenic cell populations at specific stages of differentiation in the human. *Mol Repr Dev.*, 30(3): 275-282, 1991.
4. Bonnanni G., Calcagno A. *et al.* DNA flow cytometry of left and right testes in normospermic patients affected by left varicocele. *Hum Rep.*, 12(1):64-67, 1997.
5. Chandley A.C. Genetic contribution to male infertility. *Hum Reprod.*, 13(Suppl 3): 76-83, 1998.
6. Chillon M., Casals T. *et al.* Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of vas deferens. *N Engl J Med.*, 332: 1475-86, 1995.
7. Drudy L., McCaffrey M. *et al.* Spermatozoal DNA flow cytometry and recurrent miscarriage. *Arch Androl.*, 37(3): 143-147, 1996.

8. Fossa S.D., Silde J. *et al.* Pre-treatment DNA ploidy of sperm cells as predictive parameter of post-treatment spermatogenesis in patients with testicular cancer. *Br J Urol.*, 74(3):359-365, 1994.
9. Fugger E.F., Black S.H. *et al.* Births of normal daughters after MicroSort sperm separation and intrauterine insemination, *in vitro* fertilization, or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Repr.*, 13(9):2367-2370, 1998.
10. Garrido N., Meseguer M. *et al.* Caracterización de las poblaciones celulares del eyaculado y biopsia de testículo mediante el análisis del DNA por citometría de flujo. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana.*, 18 (4): 265-6, 2001.
11. Gledhill B.L., Evenson D.P. *et al.* Flow cytometry and sorting of male germ cells. In: Melamed M.R., Lindmo T. and Mendelsohn M.L. (eds). *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Second Edition, Wiley- Liss, New York; 531-551, 1990.
12. Golan R., Shochat L. *et al.*
13. Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using acridine orange staining. *Mol Hum Repr.*, 3(1):47-54, 1997.
14. Gorzyca W., Traganos F. *et al.* Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ denaturation in abnormal sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res.*, 207(1): 202-205, 1993.
15. Green G.N., Balhorn R. *et al.* Synthesis and processing of mammalian protamines and transition proteins. *Mol Repr Dev.*, 37:255-263, 1994.
16. Guichaoua M.R. & Luciani J.M. Genetic aspects of male infertility. *Rev Prat.*, 43(8): 960-4, 1993.
17. Hacker-Klom U., Kleinhans G. *et al.* Flow cytometric analysis of the mal-descended testis. *Andrologia.*, 17(4): 389-394, 1985.
18. Hacker-Klom U.B., Gödhe W. *et al.* DNA flow cytometry of human semen. *Hum Repr.*, 14(10):2056-2512, 1999.
19. Hardelin J.P., Leveilliers J. *et al.* Xp22.3 deletions in isolated familial Kallman's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*, 76(4): 827-831, 1993.
20. Hellstrom W.J., Stone A.R. *et al.* The clinical application of aspiration deoxyribonucleic acid flow cytometry to neurologically impaired men entering an electroejaculation program. *J Urol.*, 142(2):309-312, 1989.
21. Hirsch I.H., Sedor J. *et al.* Objective assessment of spermatogenesis in men with functional and anatomic obstruction of the genital tract. *Int J Androl.*, 17(1):29-34, 1994.
22. Huyn T., Mollard R. *et al.* Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Upd.*, 8(2): 183-98, 2002.
23. Kostakopoulos A., Georgulakis J. *et al.* Deoxyribonucleic acid flow cytometry in the assessment of spermatogenesis. *J Urol.*, 158(1):79-81, 1997.
24. La Spada A.R., Wilson E.M. *et al.* Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature.*, 352: 77-99, 1991.
25. Larson K.L., Brannian J.D. *et al.* Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum Repr.*, 14(8): 2015-2019, 1999.
26. Lin Y.M., Chen C.W. *et al.* Expression patterns and transcript concentrations of the autosomal DAZL gene in testes of azoospermic men. *Mol Hum Reprod.*, 7(11): 1015-22, 2001.
27. Loy C.J. & Young E.L. Sex, infertility and the molecular biology of the androgen receptor. *Curr Opin Obstet Gynecol.*, 13(3): 315-21, 2001.
28. MacLahlan R.I., Mallidis C. *et al.* Genetic disorders and spermatogenesis. *Reprod Fertil Dev.*, 10: 97-104, 1998.
29. Mallidis C. & Baker H.W. Fine needle aspiration biopsy of the testis. *Fertil Steril.*, 61(2):367-375, 1994.
30. Mays-Hoopes L.L., Bolen J. *et al.* Preparation of spermatogonia, spermatocytes, and round spermatids for analysis of gene expression using fluorescence activated cell sorting. *Biol Repr.*, 53:1003-1011, 1995.
31. Mifsud A., Sim C.K. *et al.* Trinucleotide (GAG) repeat polymorphism in the androgen receptor gene: molecular markers of risk of male infertility. *Fertil Steril.*, 75:275-281, 2001.
32. Moro E., Ferlin A. *et al.* Male infertility caused by de novo partial deletion of the DAZ cluster on the Y chromosome. *J Clin Endocrinol Metab.*, 85: 1069-1073, 2000.
33. Muriel L., Garrido N. *et al.* Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of invitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.*, 83; 371-383, 2006.
34. Garrido N., Meseguer M. *et al.* Flow cytometry in human reproductive biology. *Gynecological Endocrinology.*, 16:505-521, 2002.
35. Oosterhuis G.J., Mulder A.B. *et al.* Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil. Steril.*, 74(2): 245-250, 2000.
36. Pasteur X., Sabido O. *et al.* Quantitative assessment of chromatin stability alteration in human spermatozoa induced by freezing and thawing. A flow cytometric study. *Anal Quant Cytol Histol.*, 13(6):383-390, 1991.
37. Patricio P. & Leonard D.G.B. Mutations of the cystic fibrosis gene and congenital absence of the vas deferens. In: Berlin, Germany. *The genetic basis of male infertility*. Springer-Verlag, McElravey K, (ed.), 175-186, 2000.
38. Philpott A. & Leno G.H. Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell.*, 69: 759-767, 1992.
39. Philpott A., Leno G.H. *et al.* Sperm decondensation in *Xenopus* eggcytoplasm is mediated by nucleoplasmin. *Cell.*, 65:569-578, 1991.
40. Potts R.J., Newbury C.J. *et al.* Sperm chromatin change associated with male smoking. *Mutat Res.*, 423(1-2):103-111, 1999.
41. Quershij S.J., Ross A.R. *et al.* Polymerase chain reaction for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically-determined spermatogenic failure in men. *Mol Hum Reprod.*, 2: 775-779, 1996.
42. Samocha-Bone D., Lewin L.M. *et al.* *In vitro* human spermatozoa nuclear decondensation assessed by flow cytometry. *Mol Hum Repr.*, 4(2):133-137, 1998.
43. Spanò M., Kolstad A.H. *et al.* The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Asclepios. Hum Repr.*, 13(9):2495-2505, 1998.
44. Spanò M., Cordelli E. *et al.* Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Mol Hum Repr.*, 5(1):29-37, 1999.
45. Spanò M., Bonde J.P. *et al.* Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish first pregnancy planner study team. *Fertil Steril.*, 73(1): 43-50, 2000.
46. Sukcharoen N. Evaluation of sperm DNA normality by acridine orange staining technique. *J Med Assoc Thai.*, 78(2): 82-88, 1995.
47. Sun J.G., Jurisicova A. *et al.* Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol Repr.*, 56:602-607, 1997.
48. Venter J.C., Adams M.D. *et al.* The sequences of the human genome. *Science.*, 293: 1304-1351, 2001.
49. Verlinsky Y. & Kulley A. *Preimplantation Genetic Diagnosis*. *Reprod Med Rev.*, 7: 1-10, 1999.
50. Vogt P.B., Edelman A. *et al.* Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.*, 5: 933-943, 1996.
51. Waldstreicher J., Seminare S.B. *et al.* The genetic and clinical heterogeneity of gonadotrophin-releasing hormone deficiency in the human. *J Clin Endocrinol Metab.*, 81: 4388-4395, 1996.
52. Yong E.L., Lim L.S. *et al.* Androgen receptor polymorphisms and mutations in male infertility. *J Endocrinol Invest.*, 23: 573-577, 2000.
53. Zini A., Mak V. *et al.* Potential adverse effect of semen processing on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril.*, 72(3): 496-499, 1999.

Criopreservação de Oócitos: uma Visão Biológica

Oocytes Criopreservation: a Biologic Point of View

**Moacir Netto Ladeira¹,
Ariani Colombo dos Santos¹
& Philip Wolff^{1,2,3,4,5}**

¹Biogenecs – Centro Avançado em Biologia Molecular e Genética Forense, ²Invitrogenese – Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Assistida ³Centro de Reprodução Humana da

Faculdade de Medicina do ABC ⁴Clinimater – Reprodução Humana. ⁵Criogenesis – Biotecnologia e Terapia Celular

Endereço para correspondência:
moacir@biogenecs.com.br

RESUMO

Durante os últimos trinta anos diversos métodos de criopreservação de gametas, embriões e tecidos germinativos foram desenvolvidos cujo principal objetivo é preservar a fertilidade.

A metodologia aplicada a criopreservação de oócitos ainda é considerada experimental. Contudo, os resultados positivos nos dão esperança de que dentro em breve esta metodologia será empregada rotineiramente nos serviços de Reprodução Humana.

A proposta deste artigo é discutir do ponto de vista biológico, as novas abordagens da criopreservação de oócitos em relação aos métodos existentes e ressaltar a importância do profissional cada vez mais capacitado e o emprego da criobiologia como ciência.

ABSTRACT

Over the last 30 years methods of cryopreservation of gametes, embryos and germinative tissues had been developed whose main objective is to preserve the fertility.

The applied methodology of oocyte cryopreservation still is considered experimental. However, the positive results give us hope and the inside that soon this methodology will be used routinely in Human Reproduction clinics.

The proposal of this article is to argue from the biological point of view the new approaches of the oocyte cryopreservation in relation to the existing methods and to enhance the importance of the embryologist and the use of cryobiology as an applied science.

Key Words: *slow cooling/cryopreservation/oocytes/vitrification.*

INTRODUÇÃO

Durante os últimos trinta anos diversos métodos de criopreservação de oócitos, embriões, sêmen e tecidos germinativos foram desenvolvidos cujo principal objetivo é preservar a fertilidade (Elliott e Whelan, 1977; Leibo, 1986; Mazur, 1990; Shaw e Jones, 2003; Vajta e Kuwayama, 2006), mas pelo fato de nem sempre apresentarem resultados satisfatórios os investimentos no campo da criobiologia em reprodução humana, foram deixados em segundo plano (Vajta e Kuwayama, 2006).

Os processos de criopreservação podem ser facilmente implantados na rotina clínica após um curto treinamento sem a necessidade da compreensão biológica dos fenômenos envolvidos (Vatja e Kuwayama, 2006). Contudo, com o progressivo desenvolvimento tecnológico no campo da biotecnologia reprodutiva, sofisticação dos meios de cultivo de embriões e produtos comercialmente disponíveis, este quadro esta mudando.

Vatja e Kuwayama (2006) em recente revisão da literatura vislumbram o surgimento de uma nova era nas tecnologias envolvendo criopreservação de oócitos e embriões de mamíferos. Além disso, acreditamos também que os processos de criopreservação poderão ser utilizados de forma cada vez mais otimizada, não só para armazenar gametas e embriões excedentes, mas também para criopreservar tecidos germinativos, (fragmentos ovarianos e epitélio germinativo masculino) células tronco de origem embrionária e de cordão umbilical, estas células poderão ser utilizadas em programas terapêuticos no futuro não muito distante.

A proposta deste artigo é discutir as novas abordagens da criopreservação de oócitos em relação aos métodos existentes e realçar a importância do profissional cada vez mais capacitado e o emprego da criobiologia como ciência, aplicada na rotina das clínicas de Reprodução Assistida.

Recebido em 02/05/2006
Avaliado e aceito em 03/12/2006

CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS

Em 1986 foi reportada a primeira gravidez após criopreservação de oócito maduro (Chem, 1986). Desde então, a metodologia que, ainda é considerada experimental, vem oferecendo resultados cada vez mais promissores.

Do ponto de vista biofísico sabe-se que todos os oócitos e embriões (incluindo os espermatozoides) sofrem um considerável dano morfológico e funcional durante o processo de criopreservação. A extensão destas crioinjúrias depende de fatores que incluem o tamanho e a forma das células, a permeabilidade das membranas, qualidade e sensibilidade do oócito e embrião a baixas temperaturas.

Todos estes fatores são extremamente variáveis e dependem do estágio de desenvolvimento embrionário e se estes foram originados *in vitro* ou *in vivo* e são tidos como espécie-específicos, (Vatja e Kuwayama, 2006).

Independentemente da fase de criopreservação (gametas, pró-núcleo, fases de clivagem - D2, D3 ou Blastocisto), as células que são submetidas a grandes variações de temperatura, têm seu potencial de vida diminuído em relação às células que não são submetidas aos processos de criopreservação.

A preservação de células germinativas ou embriões a temperaturas inferiores a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ sofrem um grande estresse. Este estresse pode ser osmótico ocorrendo durante o processo de desidratação, efeitos da toxicidade das soluções crioprotetoras e os eventuais danos que estes causam nas membranas celulares, sem contar com a formação de cristais de gelo que também interferem na integridade das membranas celulares. Estes danos gerados nas membranas acarretam na perda de função do sistema de transporte intracelular, alterando a regulação do pH intracelular ou em casos mais severos as membranas das mitocôndrias podem ser afetadas acarretando em distúrbios no processo de fosforilação oxidativa, fenômeno essencial para a captação de energia das células na fase de desenvolvimento pré-implantacional (Lane et al., 2002).

Segundo Lane et al., 2002 a criopreservação pode também aumentar as taxas de peroxidação lipídica pelo aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio como radicais hidroxila e ânions superóxidos.

Atualmente a criopreservação de oócitos humanos representa uma opção atrativa para os tratamentos de infertilidade e pacientes jovens que irão ser submetidas a quimio ou radioterapia. Contudo, a criopreservação de oócitos ainda é uma metodologia experimental e os oócitos em metáfase II criopreservados, também são susceptíveis aos danos originados pelo resfriamento e reaquecimento.

Podemos observar diferentes formas de alterações nos oócitos como, por exemplo: danos ao fuso meiótico e instabilidade dos cromossomos de se ligarem ao fuso (Pickering et al., 1990; Hardy et al., 2002).

Além disso, os mecanismos da citoarquitetura envolvidos com a extrusão dos corpúsculos polares, migração dos pró-núcleos e a citoquinase ficam comprometidos com as metodologias atualmente empregadas (Gook, et al., 1993; Fabbri et al., 2001). Durante as etapas de resfriamento, seja por protocolos lentos ou ultra-rápidos podem ocorrer fraturas na zona pelúcida e reação cortical prematura (Trounson e Kirby, 1989).

Atualmente, a grande questão da criopreservação de oócitos humanos é a sua taxa de sobrevivência e as diferentes metodologias empregadas para criopreservar oócitos humanos (Fabbri et al., 2001). A literatura postula que as taxas de sobrevida dos oócitos em metáfase II estão acondicionadas

a temperaturas ultrabaixas podendo ser afetados morfológica e biofísicamente. Entre os fatores morfológicos a controvérsia gira em torno de se criopreservar os oócitos na presença ou ausência das células do cúmulo. Às células do cúmulo é atribuída propriedade protetora aos agentes criopreservantes. Por outro lado, pouco se sabe sobre a ação benéfica de criopreservar os oócitos desnudados ou não (Mandelbaum et al., 1988; Gook et al., 1993; Fabbri et al., 2001).

Do ponto de vista biofísico, o principal fator que afeta a conservação dos oócitos é a formação de cristais de gelo que podem perfurar as membranas causando a lise celular (Fabbri et al., 2001; Shaw e Jones, 2003). Pelo fato do oócito ser a maior célula do corpo humano, é a que contém o maior volume de água, o que requer maior tempo de exposição aos agentes criopreservantes até que o balanço osmótico adequado seja atingido durante o processo de desidratação imposto ao oócito (Fabbri et al., 2001).

O PROCESSO FÍSICO-QUÍMICO DA CRIOPRESERVAÇÃO: CONGELAMENTO LENTO E CONGELAMENTO RÁPIDO (VITRIFICAÇÃO)

A maioria das soluções crioprotetoras utilizadas tanto para embriões como para oócitos são feitas em meios fisiológicos onde é adicionado um ou dois agentes crioprotetores permeáveis às membranas celulares, que são responsáveis pela troca das moléculas de água que estão ligadas a proteínas essenciais como: DNA, RNA, proteínas de membranas, entre outras, importantes para manter a viabilidade celular, um agente não permeável, geralmente um açúcar, que auxilia na desidratação celular antes e durante o resfriamento celular e proteína que aumentam a estabilidade das membranas, assim como o açúcar, e diminuem a toxicidade dos agentes crioprotetores (Shaw e Jones, 2003).

Os principais crioprotetores permeáveis de membranas utilizados entre outros são: Dimetil Sulfoxido (DMSO), Glicerol, etileno glicol, propileno glicol e acetamida (Rall et al., 1987; Shaw e Jones, 2003; Pedro et al., 2005). Os açúcares mais comumente associados às soluções crioprotetoras são: a sacarose, frutose e trealose e as proteínas são: a albumina sérica humana ou bovina (fração V) e Soro Sintético Substituto ou Soro Fetal Bovino / Humano para mamíferos em geral (Carroll et al., 1993). Outros elementos como álcool polivinil (PVA) e o Ficol também podem ser adicionados as soluções crioprotetoras (Shaw e Jones, 2003).

Os agentes crioprotetores permeáveis geralmente são tóxicos e podem causar um choque osmótico letal ao sistema. Não é fácil controlar este choque osmótico, uma vez que a semipermeabilidade seletiva da membrana que circunda a(s) célula(s) permite que a água, o crioprotetor e outros solutos entrem e saiam da célula em velocidades diferentes. Desta forma a maneira que o crioprotetor é carregado para o interior da célula é fundamental para a habilidade da célula tolerar o processo de desidratação e de modo genérico pode ser a explicação do porque utilizar protocolos de concentração gradual das soluções crioprotetoras ao invés de utilizar protocolos em uma etapa única de exposição a estes fatores (Shaw e Jones, 2003).

Quando oócitos ou embriões são retirados do meio de cultivo isotônico e colocados em soluções hipertônicas, contendo concentrações molares altas (1 ou 2 M) de crioprotetor, as células inicialmente encolhem rapidamente em resposta a alta osmolaridade extracelular e porque a velocidade de

saída de água da célula é maior do que a permeação do crioprotetor para o interior da célula (Prudencio et al., 2005). Neste momento as células tendem a flutuar na gota onde se encontram e após 1 ou 2 minutos afundam novamente para o substrato da placa e podem-se observar alterações na forma, cor e granulação das células. Estas alterações morfológicas estão diretamente associadas com a viabilidade das células, aquelas células que não sofreram maiores modificações visuais, são as que têm maior potencial de sobrevivência. Classicamente o método de escolha da maioria dos centros de reprodução humana é o resfriamento lento ou equilibrado. Neste procedimento o crioprotetor é adicionado ao meio de cultivo ou a uma solução fisiológica e as células são resfriadas de acordo com seu tamanho e sua permeabilidade. Neste protocolo procura-se estabelecer o equilíbrio entre o tempo de resfriamento e as taxas de perda de água (desidratação) e as taxas de incorporação de água e formação de cristais de gelo. Para oócitos e embriões humanos acredita-se que a velocidade ótima de resfriamento esteja entre 0,3 a 2°C / minuto (Elliott e Whelan, 1977; Shaw e Jones, 2003; Gao e Critser, 2004).

Entre -4 e -9 °C induz-se a formação do núcleo de gelo (“seeding”), que é a redução brusca de temperatura na periferia da solução que está sendo resfriada (Foued et al., 1998) provocando a liberação de energia (em forma de calor) e conseqüentemente um aumento da temperatura na região central da solução, onde está a célula a ser criopreservada, permitindo desta forma, que a célula perca um pouco mais de água em detrimento a entrada de agentes crioprotetores ocasionado pelo aumento da osmolaridade da solução (Shaw e Jones, 2003). Após o “seeding” as células continuam sendo resfriadas até -80 - 90 °C quando são transferidas para o nitrogênio líquido e estocadas a priori indefinidamente.

Alternativamente aos métodos de resfriamento lento ou equilibrado pode-se optar pelo processo não equilibrado de criopreservação denominados de congelamento rápido, ultra-rápido e vitrificação. Os protocolos de congelamento não equilibrados diferem do congelamento lento quanto ao processo de desidratação e permeação do crioprotetor que tem início antes do resfriamento das células e o processo de resfriamento celular que ocorre geralmente em um único passo, da temperatura ambiente a temperatura do nitrogênio líquido (-196 °C).

Tratando-se especificamente da metodologia de vitrificação que nada mais é do que um processo termodinâmico onde o aumento da viscosidade determina que os fluidos crioprotetores adquiram propriedades mecânicas de um sólido amorfo semelhante ao vidro, mantendo as propriedades físicas químicas do fluido, sem a formação de cristais de gelo e minimizando as lesões osmóticas, porém nesta técnica utiliza-se alta concentração de crioprotetores, que tem efeito tóxico (Rall e Fahy, 1985; Shaw e Jones, 2003).

A vitrificação pode ser obtida de duas formas: aumentando-se a velocidade da condução de temperatura no sistema e pelo aumento da concentração dos crioprotetores. Desta forma é possível alcançar um resfriamento muito rápido (na ordem de 15000 - 30000 °C / min - (Fahy et al., 1984; Martino et al., 1996; Arav e Zeron, 1997; Vajta et al., 1997).

Para que os danos biológicos sejam mínimos é necessária uma boa estratégia para passarmos rapidamente pela zona crítica de resfriamento (15 °C a -5 °C) evitando as injúrias por resfriamento (“chilling injuries”) (Liebermann et al., 2002).

Ao colocarmos as células direto no nitrogênio líquido (-196 °C), este se encontra no ponto de ebulição. Quando as células são imersas no nitrogênio líquido ocorre um aumento

da temperatura e ocorre um extensivo aumento da ebulição produzindo vapor que envolve as células. Este vapor de nitrogênio líquido acaba tendo um papel isolante, diminuindo a transferência de temperatura que resulta na diminuição da taxa de resfriamento e aumentando o risco de formação de cristais de gelo (Liebermann et al., 2002).

Por outro lado, para atingirmos taxas de resfriamento maiores, é melhor que a transferência de temperatura ocorra através do líquido ao invés do vapor de N₂, uma vez que a condutividade na forma líquida é maior que no vapor (Liebermann et al., 2002). Oócitos criopreservados em nitrogênio líquido apresentando temperaturas abaixo do ponto de ebulição (-200 - 205 °C) apresenta melhores resultados (Shaw e Jones, 2003; Vajta e Kuwayama, 2006).

A maioria dos protocolos diretos de criopreservação pode ser realizada sem grandes infra-estruturas ou equipamentos sofisticados, a baixo custo, onde é possível trabalhar tanto com o nitrogênio na forma de vapor ou na forma líquida. Contudo, pesquisas sugerem que trabalhar com a forma viscosa do nitrogênio (“nitrogen slush”) poderia ser ainda mais eficiente, uma vez que as taxas de resfriamento seriam ainda maiores do que nas formas descritas acima (Shaw e Jones, 2003).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O congelamento rápido e a vitrificação podem ser uma boa escolha para um serviço de referência em Reprodução Humana quando comparados aos métodos de criopreservação utilizando protocolos lentos, exclusivamente pelo fato da técnica ser de baixo custo financeiro e apresentarem resultados satisfatórios. Sabe-se que o no processo de vitrificação não ocorre à formação de cristais de gelo e as injúrias causadas pelo resfriamento também são minimizadas (Liebermann et al., 2002).

A publicação do primeiro nascido vivo a partir de oócitos criopreservados ocorreu há 19 anos (Chen, 1986; Van Uem et al., 1987), desde então, a cada ano os resultados estão sendo cada vez mais promissores. O aumento de mulheres que deixam para engravidar após os 35 anos ou mesmo aos avanços terapêuticos na cura do câncer exigem, profissionais cada vez mais capacitados para desenvolver tecnologias cada vez mais adequadas para obtermos oócitos viáveis após o descongelamento.

Recentemente foi descrita a técnica do Cryotop, cujos resultados descritos atingem 91% de sobrevivência após descongelamento, 50% de blastocistos formados e 10 nascidos vivos após 29 transferências de embriões (Kuwayama et al., 2005; Vajta e Kuwayama, 2006). Além desta técnica outras são empregadas com o intuito de minimizar o contato do nitrogênio com os oócitos e os eventuais danos gerados, bem como a forma de carregar a “embalagem” onde serão armazenados os oócitos (palhetas de vidro, palhetas abertas e estiradas, crioloop, criotip e até mesmo grades utilizadas em microscopia eletrônica) foi e continua sendo empregadas (Liebermann et al., 2002; Shaw e Jones, 2003; Kuwayama et al., 2005; Vajta e Kuwayama, 2006).

Porcu et al., 1999, analisaram 1769 oócitos criopreservados em metafase II, tendo como resultado taxas de sobrevivência de 54,1% pós descongelamento. Kuleshova e Lopata (2002) apontam uma taxa de nascidos vivos por oócito criopreservado variando entre 1 a 10% e mais recentemente Oktay et al., (2006) reporta em estudo de meta-análise taxas de 1,9 e 2,0% para nascidos vivos por oócito criopreservado por congelamento lento e vitrificação, respectivamente.

Em toda a literatura científica, até o presente momento, são relatados menos de 100 nascidos vivos utilizando oócitos

criopreservados através das técnicas de congelamento lento e vitrificação (Oktay et al., 2006; Vajta & Nagy, 2006).

No Brasil a experiência em criopreservação de oócitos ainda é muito limitada. Contudo, resultados positivos foram apresentados por grupos de excelência em Reprodução Humana Assistida brasileiros. Estes grupos reportaram nascimentos de bebês saudáveis a partir de oócitos criopreservados. Independentemente da casuística, foram apresentados taxas de sobrevivência oocitária pós descongelamento, de fertilização, clivagem e taxas de gravidez significativas, demonstrando todo o potencial de desenvolvimento biotecnológico no campo da Reprodução Humana (Azambuja et al., 2005; Azambuja et al., 2006; Petraco et al., 2006; Fioravanti et al., 2006).

É necessário que os Centros de Reprodução Humana brasileiros invistam na área de embriologia clínica aplicada. O Embriologista Clínico não pode e não deve ser apenas um simples técnico de laboratório com excelente habilidade manual seguindo protocolos previamente estipulados. O conhecimento profundo do fenômeno biológico e suas implicações são fundamentais para alcançarmos resultados cada vez melhores para que o Brasil passe a gerar conhecimento ao invés de comprar tecnologia.

Além disso, o desenvolvimento de novos métodos e atividades de inovação tecnológica no campo da criobiologia e reprodução humana assistida se tornam necessário para desenvolvermos e implementarmos novos produtos ou processos tecnologicamente novos ou aperfeiçoados. Esta inovação tecnológica é um processo dinâmico que depende de investimento em recursos humanos que seguramente proporcionarão resultados cada vez melhores.

REFERÊNCIAS

- Arav A and Zeron Y. - Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is affected by the composition and concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions *Theriogenology*, 47: 341, 1997.
- Azambuja R, Badalotti M, Teloken C, Michelon J, Petracco A. Successful birth after injection of frozen human oocytes with frozen epididymal spermatozoa. *Reprod Biomed Online*, 11(4):449-51, 2005.
- Azambuja R, Petracco A, Okada L, Michelon J, Badalotti F, Badalotti M. Criopreservação de oócitos utilizando meio de congelamento a base de colina. *JBRA – Edição Especial* pg 25 (PO18), 2006.
- Carroll J, Wood MJ, Whittingham DG. - Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules. *Biol Reprod*. 48(3):606-12, 1993.
- Chen C. - Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*, 1:884-886, 1986.
- Elliott, K e Whelan, J (eds). - The freezing of mouse embryos. CIBA Foundation Symposium 52. Elsevier, Amsterdam, pp 340, 1997.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C.- Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod.*, 16(3):411-6, 2001.
- Fahy GM, McFarlane DR, Angell CA and Meryman HT. - Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21 407-426, 1984.
- Fioravanti J, Smith GD, Alegretti JR, Rossi LM, Ribeiro MA, Serafini P, Motta ELA. Nossa experiência com vitrificação de oócitos em metáfase II. *JBRA – Edição Especial*, pg 29 (PO25), 2006.
- Gao D, Critser JK. - Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J*;41(4):187-96, 2000.
- Gook DA, Osborn SM, Johnston WI - Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod.*, 8(7):1101-9, 1993.
- Hardy K, Wright C, Rice S, Tachataki M, Roberts R, Morgan D, Spanos S, Taylor D. - Future developments in assisted reproduction in humans. *Reproduction*, 123(2):171-83, 2002
- Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril.*, 78(3):449-54, 2002.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. - Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*, 11(5):608-14, 2005
- Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. - Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod.*, 67(6):1671-80, 2002.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Tibi C, Cohen J, Salat-Baroux J. - Solutions provided by the freezing of embryos and questions posed by the freezing of human oocytes *Rev Fr Gynecol Obstet* . 83(10):619-22, 1988.
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP - Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling *Biology of Reproduction* 54 1059-1069, 1996.
- Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril.*, 86(1):70-80, 2006.
- Pedro PB, Yokoyama E, Zhu S, Yoshida N, Valdez Jr DM, Tanaka M, Edashige K and Kasai M - Permeability of Mouse Oocytes and Embryos at Various Developmental Stages to Five Cryoprotectants. *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 51, No. 2, 2005.
- Petracco A, Azambuja R, Okada L, Michelon J, Oliani A, Badalotti M. Comparison of embryo quality between sibling embryos originating from frozen or fresh oocytes. *Reprod Biomed Online.*, 13(4):497-503, 2006.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. - Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril.*, 54(1):102-8, 1990.
- Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM, Venturoli S, Flamigni C. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol.*, 169(1-2):33-7, 2000.
- Rall WF, Wood MJ, Kirby V, Whittingham DG. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J Reprod Fertil*; 80: 499-504, 1987.
- Rall, WF e Fahy, GM. - Ice free cryopreservation of mouse embryos at - 196 °C by vitrification. *Nature*, 313:573-575, 1985.
- Shaw J. M. e Jones G. M.. - Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, v. 9. p. 583 – 605, 2003.
- Trounson A. e Kirby C. - Problems in the cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling in dimethyl sulfoxide. *Fertil Steril.*, 52:778-786, 1989.
- Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T and Callesen H - Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the Open Pulled Straw (OPS) method *CryoLetters* 18 191-195, 1997.
- Vajta G, Nagy ZP Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online.*, 12(6):779-96, 2006
- Van Uem JF, Siebzehnruhl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N. - Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* . 28;1(8535):752-3, 1987.
- Zheng P, Schramm RD, Latham KE. - Developmental regulation and in vitro culture effects on expression of DNA repair and cell cycle checkpoint control genes in rhesus monkey oocytes and embryos. *Biol Reprod.*, 72(6):1359-69, 2005.

Uma Revisão Sistemática Sobre o uso de Agonistas e Antagonistas do GnRH em Pacientes Más Responderas à Estimulação Ovariana

A Systematic Review on the Use of GnRH Agonists and Antagonists in Patients with Poor Response to Ovarian Stimulation Supression.

JG Franco Jr^{1,4}, RLR Baruffi¹, AL Mauri^{1,2}, CG Petersen^{1,2}, V Felipe¹, J Cornicelli¹, M Cavagna³, JBA Oliveira¹

¹ Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Junior, Ribeirão Preto, SP.

² Pós-graduanda, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP.

³ Faculdade de Medicina da Universidade de Santo Amaro, São Paulo, SP.

⁴ Correspondência:

Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Junior
Av. Prof. João Fiusa, 689 - CEP 14025-310

Ribeirão Preto – São Paulo - Brasil

Fone/FAX: 55-16-3911.1100

E-mail: crh@crh.com.br ou franco@crh.com.br

de Infertilidad, C/ Guardia Civil nº 23, 46020, Valencia.

Teléfono: 34 963624399; Fax 34 963694735; e-mail:

marcos.meseguer@ivi.es

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to make a systematic review of the medical literature in order to compare the efficacy of GnRH antagonists and agonists for poor responders to ovarian stimulation. According to the data collected, the use of GnRH antagonist protocols showed better results in comparison to long protocols with a GnRH agonist regarding the following aspects:

lower cycle cancellation rate due to poor ovarian response;

higher number of oocytes retrieved;

higher clinical pregnancy rate per initiated cycle.

Nevertheless, these results were not observed when the flare-up protocols of GnRH agonists were used. Moreover the number of oocytes retrieved with GnRH agonist was significantly higher in relation to the GnRH antagonist.

Keywords: *poor responders, ovarian stimulation, GnRH agonist, GnRH antagonist*

RESUMO

A presente investigação teve como objetivo fazer uma revisão sistemática da literatura médica visando comparar a eficácia de agonistas e antagonistas do GnRH em más responderas à estimulação ovariana. Os dados de literatura mostraram

melhores resultados com os protocolos de antagonistas do GnRH, em comparação com GnRH agonistas aplicados na 2ª fase do ciclo menstrual (protocolo longo), no que se refere aos seguintes aspectos:

menor taxa de cancelamento de ciclos por má resposta ovariana;

maior número de oócitos coletados;

maior taxa de gravidez por ciclo iniciado.

Entretanto, essas vantagens não foram observadas quando os agonistas do GnRH foram utilizados com o protocolo de "flare-up". Além disso, o número de oócitos coletados nos protocolos com GnRH agonista "flare-up" foi significativamente superior aos obtidos com GnRH antagonistas.

Unitermos: más responderas, estimulação ovariana, agonistas do GnRH, antagonistas do GnRH.

INTRODUCTION

Recruitment and development of multiple follicles in response to ovarian stimulation are the key factors leading to successful treatment by IVF/ICSI and embryo transfer. Garcia et al. (1983) first described as a poor responder the patient with peak estradiol levels <300 pg/ml and a decreased follicular response, expressed as fewer retrieved and fertilized oocytes and also fewer transferred embryos.

Poor ovarian response, on the other hand, is usually associated with poor pregnancy rates and many of these cycles are cancelled without proceeding to egg collection (Keay et al., 1997). Several strategies have been suggested to prevent cycle

Recebido em 10/05/2006
Avaliado e aceito em 05/12/2006

cancellation, such as decreasing the dosage and timing of gonadotrophin-releasing hormone agonists (GnRH-a) (Scott and Navot, 1994) or the use of GnRH-a flare-up regimens (Surrey et al., 1998). This procedure should theoretically eliminate excessive ovarian suppression while taking advantage of the additional gonadotrophin stimulus provided by the agonistic effect of the GnRH-a.

The introduction of GnRH antagonists into clinical practice might be a new hope for poor responder patients (Craft et al., 1999). GnRH antagonists act promptly and only a few hours of administration are required to prevent the LH surge, which is the most common cause for cancellation in poor responder patients. The action of the GnRH antagonist does not result in early folliculogenesis inhibition, which is a critical point for patients with a limited cohort of follicles (Akman et al. 2000, 2001).

The objective of this review is to compare the efficacy of GnRH antagonist to that of a GnRH agonist as adjuvant medicine for protocols of ovarian hyperstimulation in poor ovarian responder patients in IVF/ICSI cycles.

MATERIALS AND METHODS

Criteria for considering studies for this review

All published, unpublished and ongoing randomized controlled trials (RCT) comparing a GnRH antagonist with GnRH-a in ovarian hyperstimulation protocols for poor responders were analyzed.

Types of outcome measures

The primary outcome measures used for this systematic review were cycle cancellation rate (CCR) due to poor response and the number of retrieved and mature oocytes. The secondary outcomes were clinical pregnancy rate (CPR) per cycle initiated, CPR per oocyte retrieval and CPR per transfer.

Identification of studies

Search strategies included on-line surveys of databases (MEDLINE, EMBASE, Science Citation Index, Cochrane Controlled Trials Register and OVID) from 1990 to 2006. There was no language restriction and grey literature was included (BioMedCentral, Gateway, TrialsCentral, OMNI, etc.). The following Medical Subject Headings and text words were used: "poor responder", "ovarian stimulation", "GnRH antagonist", "GnRH agonist" and "randomized controlled trial". The principal inclusion criterion was randomized controlled trial.

Validity assessment and data extraction

Each trial was assessed independently by two reviewers and ranked for its methodology rigor and its potential to introduce bias. Missing data were obtained from the authors when possible.

Statistical analysis

Data management and analysis were conducted using the StatsDirect statistical software (Cheshire, UK). Effectiveness was evaluated using the Mantel-Haenszel method. A confidence interval for the Mantel-Haenszel odds ratio in StatsDirect was calculated using the Robins, Breslow and Greenland variance formula. A chi-square test statistic was used with its associated probability that the pooled odds ratio (OR) was equal to one. The StatsDirect also gives the option to base effect size calculations on weighted mean difference (WMD) as described in the Cochrane Collaboration Handbook (Mulrow and Oxman, 1996). The measure of heterogeneity (non-com-

binability) was evaluated by Cochran's Q and the Breslow-Day test. A nonsignificant result (i.e. lack of heterogeneity) indicates that no trial has an OR or WMD that is statistically significantly worse or better than the overall common OR or WMD obtained by pooling the data. The fixed effects model was used for odds ratio (OR) and effect size (WMD).

Search results

Six trials fulfilled the inclusion criteria. In all studies, the multiple low-dose (0.25 mg) antagonist regimen was applied (cetorelix: 4, ganirelix: 2). In 3 trials, a long protocol with a GnRH agonist (leuprolide: 2, buserelin: 1) starting in the mid-luteal phase of the preceding cycle was used as a reference treatment. In the 3 remaining trials, a flare-up protocol with a GnRH agonist (triptorelin: 1, leuprolide: 2) was used as reference treatment.

RESULTS

Description of the studies included

Akman et al. (2001) conducted a prospective RCT (randomization by consecutive number method) including a total of 48 poor responder patients described from previous cycles (at least two failed IVF attempts) and who presented one of following reasons: baseline follicle stimulating hormone (FSH) concentrations > 15 mIU/ml or estradiol concentration on the day of human chorionic gonadotrophin (HCG) injection <500 pg/ml or less than four mature oocytes retrieved. The patients were divided into two groups: I – 24 patients in 24 cycles in which leuprolide acetate (Lucrin, Abbott, France) at the dose of 40 µg s.c. per day was initiated on cycle day 2 followed by exogenous gonadotrophins (Metrodin HP, Serono Laboratories, Switzerland) on cycle day 3; II – 24 patients in 24 cycles in which ovarian stimulation included a GnRH antagonist (Cetrotide, Asta Medica, Germany), 0.25 mg daily, administered during the late follicular phase.

D'Amato et al. (2004) conducted a prospective RCT. The protocols of ovulation induction were randomly assigned to all patients on the basis of the day of the week of their first appointment (Monday and Thursday: long protocol with GnRH analog; Wednesday and Friday: study protocol). The patients were defined as poor responders by their ovarian response (number of mature oocytes retrieved ≤ 3) to a standard long protocol with a GnRH agonist administered for at least two previous IVF/ICSI cycles, when 37% of cycles were canceled because of a weak E2 rise and inadequate follicular growth after a mean FSH dose of 4,750 IU per cycle. Sixty women (group 1) underwent controlled ovarian hyperstimulation with a single dose of leuprolide acetate (Enantone, Takeda, Italy) administered in the midluteal phase. Eighty-five women (group 2) received a GnRH antagonist (Cetrotide, Serono Pharma) in a multidose fashion (2 to 3 ampules per cycle) from the time when at least a single follicle of 16 mm in diameter was observed and/or E2 levels exceeded 1000 pg/ml until the time when the follicle reached ≥ 18 mm diameter, when HCG was injected.

Malmusi et al. (2005) conducted a prospective RCT (randomization list). The poor responders (no ovarian response when ≥ 300 IU of FSH were administered for ≥ 15 days or low number of oocytes ≤ 4) were randomized into two groups. The first group consisted of 30 patients in 30 cycles in which triptorelin, 0.1 mg (Decapeptyl, Ipsen, France) was initiated on the 1st day of menstruation, followed by exogenous gonadotrophins (Gonal-F, Serono, Switzerland) administered from the 2nd day of menstruation. The second group consisted

of 25 poor responders (25 cycles) in whom the exogenous gonadotrophins (Gonal-F, Serono, Switzerland) were started on the first day of the menstrual cycle, followed by ganirelix (Orgalutran, Organon, Netherlands), 0.25 mg, administered daily until HCG injection when the leading follicle reached 14 mm in diameter. In each group, all patients initially received 450 IU of recombinant human FSH and the dose was adjusted individually according to the response of the ovaries.

Marci et al. (2005) conducted a prospective RCT (randomized 1:1). The poor responders (estradiol concentrations < 600 pg/ml on the day of HCG administration and a number of retrieved oocyte < 3 after a previous standard long protocol with GnRH-a) were divided into two groups. Group A patients (n=30) were stimulated with a standard long protocol using down-regulation with GnRH-a, one injection of 3.75 mg (Enantone, Takeda, Italy), and a subcutaneous injection of recombinant FSH (Gonal-F, Serono, Italy) at a dose of 375 IU daily from day 3 of the next cycle. In group B (n=30), ovarian stimulation started at day 2 with r-FSH at a dose of 375 IU. The GnRH antagonist cetrorelix (Cetrotide, Serono Laboratories, Switzerland), 0.25 mg per day, was then administered when the two lead follicles had reached 14 mm in diameter, irrespective of the day of the cycle, and continued until day of HCG injection.

Cheung et al. (2005) The paper reports a prospective, randomized controlled trial (computer-generated random) concealed in opaque envelopes. A research nurse coordinated the randomization process and distribution of medication throughout the treatment cycles. Doctors and embryologists involved in the study were blinded to the treatment allocation. Poor responders were classified as patients who had exhibited a poor ovarian response with < 3 mature follicles on a long GnRH agonist protocol in their previous IVF cycles or those with repeated high basal levels of FSH > 10 IU/l. The patients were randomly allocated to receive a GnRH antagonist or an agonist. All patients received the oral contraceptive pill (Nordette, Wyeth; 30 µg of ethinyl estradiol and 150 µg of levonorgestrel), one tablet daily, for the rest of the cycle for a total of 21 days. The control group (n=32) received a long GnRH-a protocol. Buserelin acetate (Suprecur, Hoechst AG, Germany) nasal spray was given at a daily dose of 600 µg starting at the mid-luteal phase of the preceding cycle, and co-administered during the final week of oral contraception pre-treatment. Buserelin was continued until the day of HCG administration. The study group (n=31) received a fixed multi-dose (0.25 mg daily) GnRH antagonist protocol (Cetrotide, Serono Laboratories, Switzerland) from day 6 of stimulation until the day of HCG.

Schmidt et al. (2005) The paper reports a prospective, randomized controlled trial. Computer-generated randomization was used for patient assignment to two treatment protocols at a 1:1 ratio. Sealed envelopes were used for protocol allocation. A poor responder was defined as a woman with serum peak estradiol level ≤ 850 pg/ml and/or ≤ 4 preovulatory follicles ≥ 15 mm in average diameter present on the day of human chorionic gonadotrophin administration during a previous cycle. A total of 48 patients were randomized to one of two groups: ganirelix acetate (group A; n=24) or microdose leuprolide flare-up (group B; n=24). On cycle day 2, patients randomized to group A received 300 IU of recombinant FSH every morning and 150 IU of human menopausal gonadotrophin (hMG) every evening for 5 days. A multidose regimen of ganirelix was used with daily morning injections until, and including, the day of HCG administration. The patients randomized to group B received leuprolide acetate with a regimen of 40 µg SC every 12 hours. The FSH and hMG dosing, monitoring, and individualized dosing adjustments were the same as for group A.

Primary outcome measures

In the 3 trials that had used long protocols of GnRH agonists as a reference treatment, we observed advantages for the GnRH antagonists protocol with respect to lower CCR due to poor ovarian response (p:0.0002; OR 0.29, 95% CI 0.14, 0.57) (Table 1), a higher number of retrieved oocytes (p<0.0001; WMD:1.98, 95% CI 1.56, 2.40) (Table 2) and a higher number of mature oocytes (p<0.0001; WMD:1.58, 95% CI 1.18, 1.97) (Table 3).

However, when we studied only the 3 trials that had used the flare-up protocol of GnRH agonists as reference treatment, a statistic significantly lower number of retrieved oocytes (p:0.0118; WMD: -0.67, 95% CI -1.19, -0.15) was observed in the GnRH antagonist protocol when compared with the GnRH agonist (Table 2). In addition, no differences were observed regarding CCR due to a poor ovarian response (p:0.87; OR 1.014, 95% CI 0.47, 2.19) (Table 1) or number of mature oocytes (p:0.41; WMD: -0.216, 95% CI -0.73, 0.30) (Table 3).

Secondary outcome measures

In the 3 trials with a long protocol of GnRH agonist as a reference treatment it was observed that the antagonist protocol had higher CPR per initiated cycle (p:0.03; OR 2.34, 95%CI 1.11, 4.94) (Table 4). However, these differences were not observed in the CPR per oocyte retrieval (p:0.14; OR 1.88, 95% CI 0.87, 4.05) or CPR per transfer (p:0.19; OR 1.78, 95% CI 0.82, 3.84).

On the other hand, in the 3 trials that used the flare-up protocol of GnRH agonists as reference treatment, no other differences were observed in the GnRH antagonist protocol with respect to secondary outcome measures: CPR per initiated cycle (p:0.80; OR 0.82, 95% CI 0.35, 1.90), CPR per oocyte retrieval (p:0.74; OR 0.78, 95% CI 0.32, 1.90), CPR per transfer (p:0.97; OR 0.89, 95% CI 0.27, 2.20).

DISCUSSION

Poor ovarian response to gonadotrophin remains a significant problem in assisted conception. There have been various reports formulating the ideal stimulation protocol for poor ovarian responders. It has been documented that cycle cancellation is common for this particular group of patients, mostly due to premature LH surges or to an inadequate ovarian response (Akman et al., 2001).

The lack of a uniform definition of 'poor responders' makes it difficult to compare treatment outcomes and develop and assess protocols for prevention and management (Surrery and Schoolcraft, 2000; Kailasam et al., 2004). This fact could be observed in this meta-analyses since the authors used different criteria for the selection of the population defined as poor responder: Akman et al. (2001): FSH, oestradiol and number of mature oocytes; D'Amato et al., 2004: number of mature oocytes and/or FSH dose ≥ 4750 IU with no ovarian response; at least two failures in IVF/ICSI cycles; Malmusi et al. (2005): no ovarian response when ≥300 IU of FSH were administered for ≥15 days or low number of oocytes ≤4; Marci et al. (2005): oestradiol concentrations <600 pg/ml on the day of HCG administration and <3 oocytes retrieved after a previous standard long protocol with GnRH-a; Cheung et al.: <3 mature follicles in a long GnRH-a protocol in their previous IVF cycles or those with repeated high basal concentrations of FSH >10 IU/l; Schmidt et al. (2005): serum peak oestradiol concentration ≤850 pg/ml and or ≤4 preovulatory follicles ≥15 mm in average diameter present on the day of HCG administration during a previous cycle. An international standardization of criteria to define poor ovarian responders should be an important future measure. This aspect could be a possible limit for the results of this meta-analysis.

Table 1. GnRH antagonist versus GnRH-a (long protocol and flare-up) : cycle cancellation rate due to poor response

Trail	GnRH antagonist	GnRH agonist	%Weights	Odds ratio	95% CI
Long protocol					
Cheung et al., 2005	10/31	11/32	21.8	0.90	(0.27, 2.94)
Marci et al., 2005	1/30	4/30	11.5	0.22	(0.004, 2.51)
D'Amato et al., 2004	4/85	20/60	66.6	0.098	(0.023, 0.32)
Pooled odds ratio = 0.29 (0.1479 to 0.569) Fixed effects (Mantel-Haenszel, Robins-Breslow-Greenland) Chi2 (test odds ratio differs from 1) = 13.5 p = 0.0002 Non-combinability of studies Breslow-Day = 8.47 (df=2) p = 0.0145 Cochran Q = 8.05 (df=2) p = 0.0179					
Flare-up					
Akman et al., 2001	2/24	2/24	14.3	1.00	(0.07, 14.94)
Malmusi et al., 2005	7/25	6/30	30.7	1.55	(0.37, 6.63)
Schmidt et al., 2005	10/24	12/24	54.9	0.71	(0.19, 2.57)
Pooled odds ratio = 1.014 (0.468 to 2.19) Fixed effects (Mantel-Haenszel, Robins-Breslow-Greenland) Chi ² (test odds ratio differs from 1) = 0.025 p = 0.87 Non-combinability of studies Breslow-Day = 0.8175 (df=2) p = 0.6645 Cochran Q = 0.8132 (df=2) p = 0.6658					

Table 2. GnRH antagonist versus GnRH-a (long protocol and flare-up) : number of oocyte retrieved

Trial	GnRH antagonist	mean±sd	GnRH agonist	mean±sd	Mean diff	95% CI (fixed)
Long protocol						
Cheung et al., 2005	19	5.89±3.02	21	5.62±4.17	0.27	(-2.0, 2.54)
Marci et al., 2005	29	5.6±1.6	26	4.3±2.2	1.3	(0.29, 2.30)
D'Amato et al., 2004	81	5.56±1.13	40	3.36±1.3	2.2	(1.74, 2.65)
Fixed effects (Mulrow-Oxman) Pooled effect size WMD = 1.98 (1.56 to 2.40) Z (test WMD + differs from 0) = 9.21 p<0.0001 Non-combinability / Cochran Q = 4.75 (df=2) p = 0.09						
Flare-up						
Akman et al. 2001	20	4.5±1.8	20	5.5±2.0	-1	(-2.18, 0.18)
Malmusi et al., 2005	18	2.5±1.2	24	3.5±1.4	-1	(-1.80, -0.19)
Schmidt et al., 2005	13	8.9±0.9	11	9.0±1.2	-0.1	(-0.94, 0.74)
Fixed effects (Mulrow-Oxman) pooled effect size WMD = -0.67 (-1.19 to -0.15) Z (test WMD + differs from 0) = -2.51 p = 0.0118 Non-combinability / Cochran Q = 2.65 (df=2) p = 0.26						

Table 3. GnRH antagonist versus GnRH-a (long protocol and flare-up) : number of mature oocyte

Trail	GnRH antagonist	mean±sd	GnRH agonist	mean±sd	Mean diff	95% CI fixed
Long protocol						
Cheung et al., 2005	19	5.32±2.73	21	5.0±3.26	0.32	(-1.55, 2.19)
D'Amato Et al., 2004	81	4.29±0.95	40	2.65±1.12	1.64	(1.25, 2.02)
Fixed effects (Mulrow-Oxman)		Pooled effect size		WMD = 1.58 (1.18 to 1.97)		
Z (teste WMD + differs from 0) = 7.84		p < 0.0001				
Non-combinability / Cohran Q = 1.85 (df =1)		p = 0.17				
Flare-up						
Akman et al., 2001	20	4.0±1.8	20	4.5±1.9	-0.5	(-1.65, 0.65)
Malmusi et al., 2005	18	1.7±1.2	24	3.2±1.5	-1.5	(-2.34,-0.65)
Schmidt et al., 2005	13	7.7±0.9	11	6.5±1.1	1.2	(0.40,1.99)
Fixed effects (Mulrow-Oxman)		Pooled effect size		WMD = -0.216 (-0.73 to 0.30)		
Z (teste WMD + differs from 0) = -0.82		p = 0.41				
Non-combinability / Cohran Q = 21.36 (df =2)		p < 0.0001				

Table 4. GnRH antagonist versus GnRH-a (long protocol and flare-up) : clinical pregnancy rate per cycle initiated

Trial	GnRH antagonist	GnRH agonist	%Weights	Odds ratio	95% CI
Long protocol					
Cheung et al., 2005	5/31	3/32	25.5	1.85	(0.32, 13)
Marci et al., 2005	5/30	2/30	17.2	2.8	(0.40, 31.3)
D'Amato et al., 2004	18/85	6/60	57.2	2.41	(0.83, 7.9)
Pooled odds ratio = 2.34 (1.10 to 4.94)					
Fixed effects (Mantel-Haenszel, Robins-Breslow-Greenland)					
Chi² (test odds ratio differs from 1) = 4.36 p = 0.0367					
Non-combinability of studies					
Breslow-Day = 0.133 (df=2) p = 0.9355					
Cochran Q = 0.13 (df=2) p = 0.9356					

In none of the analyzed trials the age was a criterion for patient's inclusion or exclusion, or even was used as a criterion of poor responder. On the other way, as expected in RCT, in all studies the women ages among the analyzed groups did not present significant statistic difference: Akman et al. 2001: agonist flare-up protocol: mean age: 38 years (28-46) X antagonist protocol: mean age 38.5 years (28-44); D' Amato et al., 2004: agonist long protocol: mean age 33.02 ± 3.09 years (27-39) X antagonist protocol: mean age 34.01 ± 2.89 years (27-39); Malmusi et al., 2005: agonist flare-up protocol: mean age 36.6.02 ± 0.8 years X antagonist protocol: mean age 36.2 ± 1.2 years; Marci et al., 2005: agonist long protocol: mean age 39.0 ± 3.1 years X antagonist protocol: mean age 38.8 ± 2.9 Years; Cheung et al., 2005 agonist long protocol: mean age 36.3 ± 2.6 years X antagonist protocol: mean age 36.3 ± 3.0 years; Schmidt et al., 2005: all patients were between 25 and 43 years, mean age were similar between the two groups). Despite it was not possible to include the data from all trials in the statistical analysis, the general observation showed differences. However, it should be stressed that trials conducted on diverse populations may better reflect the natural heterogeneity of treatment effectiveness found in daily practice.

The presence of randomization was the primary criterion used to select all the papers of this meta-analysis. An interesting fact observed was the difference among authors with respect to the randomization process (Akman et al. 2001, consecutive number method; D'Amato et al., 2004: days of week; Malmusi et al., 2005: randomization list; Marci et al., 2005: consecutive number method; Cheung et al., 2005: computer-generated randomization; Schmidt et al., 2005: computer-generated randomization). True randomization involves selecting patients by a random process, such as the use of a random-numbers table. Quasi-random methods such as sorting by days of the week, birth dates, or medical record numbers, are reasonable in most cases, although investigators need to test for any bias that might result.

This investigation showed that the use of GnRH antagonist protocols gives better results (a lower CCR due to poor ovarian response, higher number of oocytes retrieved, higher number of mature oocytes retrieved and a higher CPR per initiated cycle) in comparison with long protocols of GnRH-a for controlled ovarian hyperstimulation for poor responders in IVF/IISCI cycles

More recently, with the discovery of extrapituitary GnRH receptors in the human ovary (Janssens et al., 2000), there

has been some concern that the non-physiological level of GnRH-a given to achieve down-regulation may have a direct, deleterious effect on the ovary, and contribute to the poor response to ovarian stimulation in some patients undergoing IVF/ICSI cycles. To overcome the extra-suppression hypothesis while preventing the premature LH surges, various researchers have advocated decreasing the dosage and the timing of GnRH-a, such as in microdose GnRH-a agonist and flare-up regimens (Scott and Navot, 1994; Surrey et al., 1998). In this study, the 3 trials with GnRH-a as a reference treatment did not use a microdose regimen.

Tarlatzis et al. (2003) reported that flare-up GnRH-a protocols (including all dosage varieties) produce better results than standard long luteal protocols in patients with poor ovarian response.

In this study, when the review was performed with the trials that had used flare-up protocols of GnRH-a as reference treatment, a statistically significant lower number of retrieved oocytes was observed in the GnRH antagonist protocol when compared with the GnRH agonist. However, no other difference was observed with the GnRH antagonist protocol in any of the outcomes analyzed (CCR due to poor ovarian response, number of mature oocyte, CPR per initiated cycle, CPR per oocyte retrieval, CPR per transfer).

Garcia-Velasco et al (2001) observed that GnRH antagonist therapy in women undergoing ovarian stimulation had a significant effect on ovarian follicular steroidogenesis. The mean estradiol concentration in follicular fluid was significantly lower in patients treated with a GnRH antagonist than in those treated with GnRH-a. In that study, an interesting observation was the fact that, with similar FSH doses (GnRH antagonist and GnRH-a groups) and with a significantly reduced period of stimulation, fewer oocytes were retrieved in antagonist-treated women. However, this was a matching study and not a randomized controlled clinical trial.

Lindheim and Morales (2003) in 37 donor cycles, starting GnRH antagonist administration on day 6 of stimulation, reported that 35% of donor cycles had a decrease in serum estradiol prior to hCG administration and 93% of them showed a decrease in serum estradiol at > 3 days after GnRH antagonist administration. They concluded that the use of GnRH antagonists has an unpredictable effect on estradiol production during follicular recruitment which appears to adversely affect pregnancy outcome if a decline in estradiol occurs.

At present, the relationship between a GnRH antagonist and a negative effect on ovarian follicular steroidogenesis (decreased estradiol levels, low number of oocytes) is unclear. Nevertheless, some variables could be interfering with his problem such as total dose, different length of the down-regulation period, and individual sensitivity to the drug.

To our knowledge, this is the first systematic review comparing a GnRH antagonist against GnRH-a in ovarian stimulation protocols for poor responders. Nevertheless, additional randomized controlled trials with better planning are needed to further confirm these results, since the randomized studies available for this meta-analysis involved reduced sample numbers and varied widely in the definition of poor ovarian response, and heterogeneity (trial GnRH-ant versus GnRH-a agonist protocols with respect to number of mature oocytes).

REFERENCES

- Akman MA, Erden HF, Tosun SB et al. - Addition of GnRH antagonist in cycles of poor responders undergoing IVF. *Hum. Reprod.* 15: 2145-2147, 2000.
- Akman MA, Erden HF, Tosun SB et al. - 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.* 16: 868-870, 2001.
- Al-Inany H, Aboulghar M. - GnRH antagonist in assisted reproduction: a Cochrane Review. *Hum. Reprod.* 17: 874-885, 2002.
- Cheung L, Lam P, Lok IH, Chiu TT, Yeung S, Tjer C, Haines CJ. - GnRH antagonist versus long GnRH agonist protocol in poor responders undergoing IVF: a randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 20: 616-621, 2005.
- Craft I, Gorgy A, Hill J, Menon D, Podsiadly B. - Will GnRH antagonists provide new hope for patients considered 'difficult responders' to GnRH agonist protocols? *Hum. Reprod.* 14: 2959-2962, 1999.
- D'Amato G, Caroppo E, Pasquabisceglie A, Carone D, Vitti A, Vizziello GM. - A novel protocol of ovulation induction with delayed gonadotrophin-releasing hormone antagonist administration combined with high-dose recombinant follicle-stimulating hormone and clomiphene citrate for poor responders and women over 35 years. *Fertil. Steril.* 81: 1572-1577, 2004.
- Garcia JE, Jones GS, Acosta AA, Wright G. - HMG/HCG follicular maturation for oocytes aspiration: phase II, 1981. *Fertil. Steril.* 39: 174-179, 1983.
- Garcia-Velasco JA, Isaza V, Vidal C, Landazábal A, Remohi J, Simón C, Pellicer A. - Human ovarian steroid secretion in vivo: effects of GnRH agonist versus antagonist (cetorelix). *Hum. Reprod.* 16: 2533-2539, 2001.
- Janssens RMJ, Brus L, Cahill DJ, Huirne JAF, Schoemaker J, Lambalk CB. - Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists. *Hum. Reprod. Update* 6: 505-518, 2000.
- Kailasam C, Keay SD, Wilson P, Ford WCL, Jenkins JM. -Defining poor ovarian response during IVF cycles, in women aged <40 years, and its relationship with treatment outcome. *Hum. Reprod.* 19: 1544-1547, 2004.
- Keay SD, Liversedge NH, Mathur RS, Jenkins JM. - Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 104: 521-527, 1997.
- Lindheim SR, Morales AJ. - GnRH antagonists followed by a decline in serum estradiol results in adverse outcomes in donor oocyte cycles. *Hum. Reprod.* 18: 2023-2031, 2003.
- Marci R, Caserta D, Dolo V, Tatone C, Pavan A, Moscarini. M - GnRH antagonist in IVF poor-responder patients: results of a randomized trial. *Reprod. Biomed. Online* 11: 189-193, 2005.
- Malmusi S, La Marca A, Giulini S, Xella S, Tagliasacchi D, Marsella T, Volpe A. - Comparison of a gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) antagonist and GnRH agonist flare-up regimen in poor responders undergoing ovarian stimulation. *Fertil. Steril.* 84: 402-406, 2005.
- Matikainen T, Ding YQ, Vergara M, Huhtaniemi I, Couzinet B, Schaison G. - Differing responses of plasma bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone to gonadotrophin-releasing hormone antagonist and agonist treatments in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 820-825, 1992.
- Mulrow CD, Oxman AD (eds) - *Cochrane Collaboration Handbook*, Oxford: Cochrane Collaboration, 1996.
- 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.* 10: 1974-1981, 1995.
- Scott RT, Navot D. - Enhancement of ovarian responsiveness with microdose of gonadotrophin-releasing hormone agonist during ovulation induction for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 61: 880-885, 1994.
- Schmidt DW, Bremner T, Orris JJ, Maier DB, Benadiva CA, Nulsen JC. - A randomized prospective study of microdose leuprolide versus ganirelix in in vitro fertilization cycles for poor responders. *Fertil. Steril.* 83: 1568-1571, 2005.
- Surrey ES, Bower J, Hill DM, Ramsey J, Surrey MW. - Clinical and endocrine effects of a microdose GnRH agonist flare regimen administered to poor responders who are undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 69: 419-424, 1998.
- Surrey ES, Schoolcraft WB. - Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques. *Fertil. Steril.* 73: 667-676, 2000.
- Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. - Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* 9: 61-76, 2003.

Uso da Suplementação de LH Recombinante na Estimulação Ovariana com Protocolos de FSH Recombinante e Agonistas do GnRH: Uma Revisão da Literatura.

Recombinant Luteinizing Hormone Supplementation to Recombinant Follicle-stimulation Hormone During Induced Ovarian Stimulation in the GnRH-agonist Protocol: A Literature Review.

**JBA Oliveira¹, AL Mauri^{1,2},
CG Petersen^{1,2}, AMC Martins²,
J Cornicelli¹, M Cavagna³, A Pontes⁴,
RLR Baruffi¹, JG Franco Jr^{1,4,5}**

¹Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Junior, Ribeirão Preto, SP.

²Pós-graduando, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, Botucatu, SP.

³ Faculdade de Medicina da Universidade de Santo Amaro, São Paulo, SP.

⁴ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, Botucatu, SP.

⁵ Correspondência para:

Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Junior
Av. Prof. João Fiusa, 689 - CEP 14025-310
Ribeirão Preto, SP - Brasil
E-mail: crh@crh.com.br

ABSTRACT

The purpose of this review was to assess the efficacy of recombinant LH (r-LH) supplementation for controlled ovarian stimulation in recombinant FSH (r-FSH) and GnRH-agonist (GnRH-a) protocol for IVF/ICSI cycles. Search strategies included on-line surveys of databases from 1990 to 2006. Four trials fulfilled the inclusion criteria (Lisi et al. 2002, Humaidan et al. 2004, Marrs et al. 2004, Tarlatzis et al. 2006). When the review was carried out advantages were observed for the r-LH supplementation protocol with respect to a fewer days of stimulation, a fewer total amount of r-FSH administered and a higher serum estradiol levels on the day of hCG administration. However, these differences were not observed in number of oocyte retrieved, number of mature oocytes, clinical pregnancy per oocyte retrieval, implantation and miscarriage rates. Nevertheless, more randomized controlled trials are necessary before evidence-based recommendations regarding exogenous r-LH supplementation in ovarian stimulation protocols with r-FSH and GnRH-a for assisted reproduction treatment can be provided.

Key words: ovarian stimulation, recombinant FSH (r-FSH), recombinant LH (r-LH), GnRH agonist.

Recebido em 20/07/2006
Avalidado e aceito em 14/11/2006

RESUMO

O objetivo desta revisão foi o de determinar a eficácia da suplementação com LH recombinante (r-LH) na estimulação ovariana para ciclos de FIV/ICSI com FSH recombinante (r-FSH) e agonista do GnRH (GnRH-a). Foram pesquisados estudos entre 1990 e 2006, sendo que quatro investigações preencheram os critérios de inclusão na revisão (Lisi et al. 2002, Humaidan et al. 2004, Marrs et al. 2004, Tarlatzis et al. 2006). As vantagens observadas com a suplementação com r-LH foram um menor número de dias de estimulação, menor quantidade de r-FSH administrada e maiores concentrações de estradiol sérico no dia da administração do hCG. Entretanto, tais diferenças não foram observadas quanto ao número de oócitos maduros coletados, taxa de gravidez clínica por punção folicular, e taxas de implantação e abortamento. Conclui-se que são necessários ulteriores estudos randomizados antes que se possa recomendar, com base em evidências, a suplementação com r-LH em ciclos de reprodução assistida estimulados com r-FSH e agonistas do GnRH.

Unitermos: estimulação ovariana, FSH recombinante (r-FSH), LH recombinante (r-LH), agonista do GnRH.

INTRODUCTION

The pharmacology of ovarian stimulation has been strongly influenced by the two-cell, two gonadotrophin theory, and follicular stimulation protocols historically have included both

luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) in an attempt to mimic normal physiology (Sills et al., 1999). During recent years, the effect of LH on follicular maturation and pregnancy outcome during the course of ovarian stimulation in relation to assisted reproduction has received increasing attention. This interest reflects the fact that modern stimulation protocols have resulted in LH concentrations substantially lower than those observed in the natural cycle and in previously used protocols. The introduction of gonadotrophin-releasing hormone agonists (GnRH-a) in the mid-1980s successfully circumvented the problems of a premature LH surge. During the same period of time, there has been a gradual shift from human gonadotrophin (HMG) with equal amounts of FSH and LH like activity over pure urinary derived FSH preparations to recombinant human FSH (r-FSH), without LH activity (Humaidan et al., 2004).

Some studies have suggested that the suppression of the endogenous LH secretion does not seem to affect the majority of IVF patients treated with supplementation in women undergoing assisted reproduction and stimulation with r-FSH. Other studies have indicated that a group of normogonadotrophic women, down regulated and stimulated with pure FSH preparations may experience low LH concentrations that compromise the parameters of the IVF treatment (Humaidan et al., 2004).

According to current concepts in the folliculogenesis, LH plays an essential role in the final stages of follicular maturation (Hillier, 2001; Zeleznik, 2001). Once an appropriate stage of follicular development has been achieved in response to treatment with FSH, granulosa cells became receptive to LH stimulation and LH becomes capable of exerting its actions on both theca cells and granulosa cells. In fact, at non-saturating concentrations of FSH and LH, the response are additive. Moreover, it has been postulated that the maturing follicle reduces its dependence on FSH by acquiring LH receptors (Hillier, 2001; Zeleznik, 2001). Thus, LH may play an essential role in determining oocyte maturity and development potential in IVF cycles. However, exposure of the developing follicle to inappropriately high concentrations of LH may interfere with follicular and oocyte maturation and thus adversely affect the reproductive process (Hillier, 1994; Shoham, 2002).

The objective of this review is to compare the efficacy and safety of recombinant LH (r-LH) supplementation in women undergoing assisted reproduction and stimulation with r-FSH in the GnRH-a protocol of ovarian stimulation in IVF/ICSI cycles.

MATERIALS AND METHODS

Criteria for considering studies for this review

All published and ongoing randomized controlled trials (RCT) comparing the effect of r-LH supplementation in women undergoing assisted reproduction and stimulation with r-FSH in the GnRH-a protocol were analyzed.

Types of outcome measures

The primary outcome measures used for this review were the number of days of stimulation, the total amount of r-FSH administered, serum estradiol levels on the day of hCG administration, the number of retrieved and mature (MII) oocytes. The secondary outcomes were clinical pregnancy rate (CPR) per oocyte retrieval, implantation rate and miscarriage rate.

Identification of studies

Search strategies included on-line surveys of databases (MEDLINE, EMBASE, Science Citation Index, Cochrane Controlled Trials Register and OVID) from 1990 to 2006. There was no language restriction. The following Medical Subject Headings

and text words were used: "ovarian stimulation", "recombinant FSH", "recombinant LH", "GnRH agonist" and "randomized controlled trial". The principal inclusion criterion was randomized controlled trial.

Validity assessment and data extraction

Each trial was assessed independently by two reviewers and ranked for its methodology rigor and its potential to introduce bias. Missing data were obtained from the authors when possible.

Statistical analysis

Data management and analysis were conducted using the StatsDirect statistical software (Cheshire, UK). Effectiveness was evaluated using the Mantel-Haenszel method. A confidence interval for the Mantel-Haenszel odds ratio in StatsDirect was calculated using the Robins, Breslow and Greenland variance formula. A chi-square test statistic was used with its associated probability that the pooled odds ratio (OR) was equal to one. The StatsDirect also gives the option to base effect size calculations on weighted mean difference (WMD) as described in the Cochrane Collaboration Handbook (Mulrow and Oxman, 1996). The measure of heterogeneity (non-combinability) was evaluated by Cochran's Q and the Breslow-Day test. A non-significant result (i.e. lack of heterogeneity) indicates that no trial has either an OR or a WMD that is statistically significantly worse or better than the overall common OR or WMD obtained by pooling the data. The fixed effects model was used for odds ratio (OR) and effect size (WMD). Since a fixed effects model has been employed it is important to acknowledge that inferences refer only to the particular studies included in the analysis. In the alternative random effect model, the individual studies are regarded as a random sample from the (infinite) population of studies. Global inferences would be permissible, but the random errors used would need to reflect inter-study variation. Since each of our analyses contained only four studies, we decided to derive our inferences from a fixed effects model.

RESULTS

Search results

Four trials fulfilled the inclusion criteria (Lisi et al. 2002, Marrs et al. 2003, Humaidan et al. 2004, Tarlatzis et al. 2006). In 3 trials, the pituitary down-regulation with GnRH-a started in the mid-luteal phase of the preceding cycle and in 1 trial in the beginning of the menstrual cycle. All trials compared ovarian stimulation with r-FSH alone (control group) versus ovarian stimulation with r-FSH + r-LH (study group).

Description of the studies included:

Lisi et al. (2002) All patients (n=453) began treatment during a set period (treatment run) in which patients were allocated r-FSH only or r-FSH and r-LH on the basis of randomization by allocation of treatment to every third patient. Exclusion criteria were a body mass index <18 or >35, an abnormal karyotype or any endocrinopathy/illness. Patients were included if there was evidence of tubal damage and endometriosis, but their frequency was not significantly different among all groups studied. Patients had no evidence of abnormal menstrual cycles and evaluation of basal hormone concentrations occurred on day 3 of the spontaneous cycle. The down-regulation was induced with triptoreline 0.1 mg (Ipsen, France) subcutaneously from the mid-luteal phase of previous cycle (day 21) for 3 weeks before start gonadotrophin stimulation. All patients commenced on a daily dose of 150IU r-FSH; group A patients (n= 122) were supplemented daily with 75IU r-LH (Luveris; Sero, Geneva, Switzerland) from day 7 of stimulation and group B

patients (n=331) were maintained on r-FSH only.

Marrs et al. (2003) The study included (n=431) normo-ovulatory women aged 18-40 with serum/plasma FSH \leq 11.2mIU/ml; presence of both ovaries; male partner with a diagnosis of male factor infertility; and a requirement for ICSI. Exclusion criteria included: clinically significant systemic disease; smoking more than 10 cigarettes per day; any contraindication to pregnancy; serum/plasma LH:FSH ratio $>$ 2; and more than two previous ICSI cycles in which gonadotrophin stimulation was used. This was a randomized, open-label, multi-centre study carried out in 44 centers in the USA. Patients were randomized 1:1 to undergo stimulation with r-FSH (Gonal-F; Serono Laboratories, Geneva, Switzerland) alone (n= 219) or r-FSH+r-LH (Luveris; Serono Laboratories) (n=212). Pituitary down-regulation was carried out using leuprolide acetate (Lupron; TAP Pharmaceuticals, Inc., IL, USA), 0.5 mg/day starting 7-8 days after estimated ovulation. Treatment with r-FSH (225 IU/day) was started when serum estradiol was $<$ 75pg/ml. After 5 days, the r-FSH could be increased about 75-150IU/day every 2-3 days if necessary. The combination group began treatment with r-LH (150 IU/day) on stimulation day 6. The dose of r-LH remained constant throughout the treatment period.

Humaidan et al. (2004) A total of 231 women undergoing IVF or ICSI treatment from November 2001 to October 2002 were included in this prospective randomized non-assessor-blind study. Patients fulfilling the following inclusion criteria were prospectively enrolled in a consecutive manner: (i) female age $<$ 40 years; (ii) baseline FSH $<$ 10 IU/L; (iii) menstrual cycles between 25 and 34 days; (iv) standard hormonal treatment as follows: pituitary down-regulation with GnRH-a (Suprefact; Hoechst, Horsholm, Denmark) 0.5 mg s.c. daily from the mid-luteal phase for 14 days after which the dose of GnRH-a was reduced to 0.2 mg s.c. and ovarian stimulation was initiated with r-FSH (Gonal F; Serono Nordic, Copenhagen, Denmark or Puregon; Organon, Skovlunde, Denmark) using individualized doses according to baseline FSH, BMI, age and ovarian volume. Patients $<$ 35 years of age were stimulated with 150IU of r-FSH and patients $>$ 35 years were stimulated with 225 IU of r-FSH. An additional 75IU of r-FSH was administered in patients with baseline FSH between 8 and 10IU/L, BMI above 30 and ovarian volume below 3 ml. The ovarian response was starting on day 8 of stimulation and the dose of FSH was adjusted if necessary. On this same day of stimulation (day 8), patients were randomized by the study nurse, using computer generated random numbers in sealed, unlabelled envelopes, each containing a unique study number, to receive either r-FSH plus supplementation of r-LH (Luveris; Serono Nordic, Copenhagen, Denmark) (n=116) or r-FSH alone (n=115). Doses of r-FSH and r-LH were given in a ratio of 2:1.

Tarlatzis et al. (2006) The trial was a double-blind, randomized, placebo-controlled, prospective study performed at six centres in four countries. Women were eligible for inclusion in the study if they aged between 18 and 37 years, had a normal uterus and two ovaries, and were scheduled to undergo controlled ovarian stimulation prior to IVF with ICSI. All women had normal ovulatory cycles of 24-35 days, with maximum FSH and prolactin concentrations of 12 IU/l and 1040 IU/l, respectively, during the early follicular phase (days 2-6). No evidence of other gynaecological pathology (except tubal) was present. Women in whom a previous IVF cycle had been unsuccessful due to a poor response (\leq 2 oocytes recovered) were not eligible for the study. Patients underwent pituitary down-regulation with busserelin (Suprefact, Hoechst, Frankfurt, Germany), using a fixed daily dose of 200 mg s.c. according to the long agonist protocol, starting on day 2 of the normal menstrual cycle. Treatment with r-FSH (Gonal-F, Laboratories Serono S.A, Aubonne, Switzerland) was then started in women with serum E₂ concentrations $<$ 200pmol/l and no follicles $>$ 15 mm in diameter or ovarian cysts on ultrasonographic exa-

mination. The initial r-FSH dose was 150 IU s.c. daily for 5 days, after which the dose was adjusted to a maximum of 450 IU per day according to the ovarian response. Once the leading follicle had reached a diameter of 14mm, patients were randomized to receive r-LH (Luveris, Laboratories Serono S.A), 75IU s.c. (n=55), or placebo (n=57) for a maximum of 10 days.

PRIMARY OUTCOME

-Days of stimulation (Table 1): All studies were included. The mean days of stimulation was significantly lower in the 505 women using r-LH than in the 722 women not using (p $<$ 0.0001; WMD: -0.198 95% CI: -0.24, -0.16). There was no heterogeneity in this comparison (Cohran Q: 1.16, df: 3, p= 0.76).

-Total amount of r-FSH administered (Table 2): All studies were included. A significantly fewer amount of r-FSH was administered for the 505 women using r-LH than in the 722 women not using (p $<$ 0.0001; WMD: -192, 95% CI: -220,-164). There was heterogeneity in this comparison (Cohran Q: 9.79, df:3, p= 0.02).

-Serum estradiol levels on the day of hCG administration (Table 3): Three trials reported this data. Significant higher serum estradiol level was found in 389 women using r-LH than in 607 women not using (p $<$ 0.0001; WMD: 49.4, 95% CI: 38.4, 60.4). There was no heterogeneity in this comparison (Cohran Q: 4.41, df:2, p= 0.11).

-Number of oocytes retrieved (Table 4): All studies were included. The mean number of oocytes retrieved was not significantly different in the 505 women using r-LH than in 722 women not using (p=0.37; WMD: 0.03, 95% CI: -0.03, 0.09). There was no heterogeneity in this comparison (Cohran Q: 1.84, df:3, p=0.61)

-The number of mature oocytes (MII) (Table 5): All studies were included. The mean number of mature oocytes retrieved was not significantly different in the 497 women using r-LH than in 717 women not using (p=0.94; WMD: 0.016, 95% CI: -0.46, 0.50). There was no heterogeneity in this comparison (Cohran Q: 2.57, df:3 p=0.46)

SECONDARY OUTCOME

-Clinical pregnancy rate oocyte retrieval (CPR) (Table 6): All studies were included. The CPR per oocyte retrieval procedure was not significantly different transfer in cycles using r-LH (171/497, 34.4%) than in cycles not using (202/705, 28.6%) (p=0.52; OR:1.1, 95% CI: 0.85, 1.42). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day: 3.42, df:3, p=0.33; Cochran Q:3.39, df:3, p= 0.34)

-Implantation rate (Table 7): Two studies were included. The implantation rate was not significantly different in the cycles using r-LH (97/464, 20.9%) than in cycles not using (127/940, 13.5%) (p=0.06; OR:1.35 95% CI: 0.99, 1.83). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day:0.68, df:1, p=0.41; Cochran Q:0.68, df:1, p= 0.41)

-Miscarriage rate (Table 8): Two trials were included. The miscarriage rates were not significantly different in the pregnancies after the use of r-LH (10/51, 19.6%) than in those in which it was not used (16/49, 32.6%) (p=0.23; OR:0.52, 95% CI: 0.21, 1.3). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day:1.24, df:1, p=0.26; Cochran Q:1.22, df:1, p= 0.27)

DISCUSSION

The validity of the two-cell, two-gonadotrophin hypothesis, which suggests that both LH and FSH are required for ovarian steroidogenesis in a gonadotrophin-deficient population (World Health Organization I classification), is clear. However, there is still a considerable controversy on the need of additional LH supple-

mentation in cycles of assisted reproduction techniques using a GnRH-a (Tarlatzis et al., 2006). It has been proposed that "resting" concentrations of LH are sufficient to maintain steroidogenesis and normal folliculogenesis (Chappel and Howles, 1991).

It has been widely demonstrated that, during ovarian stimulation with FSH and concomitant administration of a GnRH-a, endogenous levels of LH decrease reaching lowest values during the late stimulation phase. Thus, it would seem logical that if LH supplementation is to have any benefit, then the late follicular phase would be appropriate time for its administration especially if, as has been reported, $\pm 50\%$ of agonist/FSH treated women are LH deficient (plasma LH concentration $<0.5\text{IU/l}$) (Westergaard et al., 2000). The proportion of positive pregnancy tests was similar in the two groups (30% versus 34% per started cycle), but the final clinical treatment outcome was significantly different, with a five-fold higher risk of early pregnancy loss (45% versus 9%; $p<0.05$) in the low LH group and consequently a significant poorer chance of delivery than in the normal LH group (Westergaard et al., 2000).

On the other hand, the rationale for using a dose 150IU/day was on the concentrations of LH measured in women down-regulated with GnRH-a. This dose of r-LH achieved a C-max of 1.2IU/L, a concentration found to be important in hypogonadotropic women stimulated with r-FSH alone (O'Dea and The U.S. Recombinant Human LH Study Group, 2000). Concentrations of LH $<1.2\text{IU/L}$ were associated with insufficient estradiol concentrations and a failure to become pregnant. It seems to be a therapeutic "window" of LH concentrations, because high concentrations of LH have been associated with atresia of developing follicles in women with hypogonadotropic hypogonadism or polycystic ovary disease (O'Dea and The U.S. Recombinant Human LH Study Group, 2000; Marrs et al., 2003).

It has recently been suggested that, in a subset of patients, a suboptimal ovarian response to the GnRH-a protocol associated with the use FSH-only gonadotrophin preparations may be due to low LH activity caused by low serum concentrations of LH and/or LH bioactivity (De Placido et al., 2001). The following facts support this possibility. The ovarian response to stimulation with gonadotrophins is often reduced in patients receiving long-term down-regulation (Fábregues et al., 1998) or in those who required prolonged GnRH-a treatment to achieve down-regulation, with a subsequent profound suppression of endogenous gonadotrophins (Fleming et al., 1998).

When this review was carried out advantages for the LH supplementation protocol with respect to a higher serum estradiol levels on the day of hCG administration ($p<0.0001$; WMD: 49.4 95% CI 38.4, 60.2) were observed. How estradiol might influence or reflect human oocyte health has not been fully elucidated, although preliminary research has suggested a potential role as a growth factor. Diminished serum estradiol concentrations most probably represent impaired ovarian steroidogenesis after GnRH-a down-regulation, and assessment of estradiol response patterns have been considered important markers for IVF cycle success (Davis and Rosenwaks, 1992). Multiple novel roles of LH have been recently proposed and it has been postulated that LH may affect IVF results both determining oocyte quality and by influencing uterine receptivity via ovarian estradiol secretion or through direct effects on endometrium, myometrium, and uterine artery and vein (Rao, 2001; Shemesh, 2001; Tesarik and Mendoza, 2002). In essence, LH should no longer be viewed only as a gonadal regulating hormone. LH has a number of other target organs in the body, and what it does in them could be important for better understanding of biology as well as a benefit to patients. As we learn more about the non-classical LH action our thinking may yet again have to be revised (Rao, 2001).

In addition, this review also showed advantages for the LH supplementation protocol with respect to a fewer total amount of r-FSH

administered ($p<0.0001$; WMD: -192 95% CI -220, -164) and a fewer days of stimulation ($p<0.0001$; WMD: -0.20 95% CI -0.24, -0.16). The reduction of total amount of the r-FSH in the group with r-LH supplementation confirms that FSH and LH act synergistically in the last part of the cycle (Humaidan et al., 2004). However, the variable total amount of r-FSH had a significant heterogeneity (Cohran Q: 9.79, df:3 $p=0.02$). De Placido et al. (2004) observed that the administration of a daily r-LH resulted in a significant decrease in that cumulative r-FSH amount and in a trend toward a reduction of the stimulation length. Balasch et al. (2003) reported that with a fixed regimen of 150IU r-FSH or HMG during the first 14 days of treatment, the duration of ovarian stimulation and the per cycle gonadotrophin amount dose were lower in group HMG.

On the other hand, in this review no differences were observed in the number of oocytes retrieval, mature oocytes, CPR per oocyte retrieval, implantation rate and miscarriage rate.

Some authors think that the mid-follicular LH levels have a significant impact on ovarian response and pregnancy outcome. Concerning the group of patients with high LH levels after down-regulation, we have to await the results of future trials to draw firm conclusions. The dynamic changes of the endogenous LH levels during down-regulation outcome as well as the bioactivity of the LH molecule in individual patients, however, should receive more attention, as they seem to be of importance for the reproductive outcome of the down-regulated cycle (Humaidan, 2006).

Kolibianakis et al. (2006) in a systematic review concluded that, the available evidence suggests, among women with normal ovulation or WHO II oligo-anovulation, low endogenous LH levels during ovarian stimulation for IVF using GnRH analogues are not associated with a decreased probability of ongoing pregnancy beyond 12 weeks. On the contrary, there is evidence to suggest that the opposite may be true. Unless further prospective studies modify the direction of the current evidence, LH supplementation in ovarian stimulation for IVF using GnRH analogues cannot be based on the rationale that low endogenous LH levels have an adverse effect on the probability of ongoing pregnancy beyond 12 weeks of gestation.

On the contrary, Balasch and Fabregues (2006) concluded that the LH plays an essential physiological role in follicle steroidogenesis and development and oocyte maturation. Thus, exogenous LH is an essential tool in ovulation induction. Current concepts of gonadotrophic control of ovarian function have established that both a 'threshold' and a 'ceiling' for LH concentrations exist during the follicular phase of menstrual and induced cycles. Therefore, concentrations of LH should be neither too high nor too low during ovulation induction, in order to not compromise reproductive performance.

Although there may be specific subgroups of endocrinologically healthy assisted reproduction treatment patients needing LH supplementation, it is well accepted that the best and only true model to investigate any LH hypothesis correctly is the hypogonadotropic woman who may be totally LH deficient. It seems clear that normally ovulating women with pituitary down-regulation are not comparable to WHO group I anovulatory patients, as in most cases an absolute deficiency does not really exist, as demonstrated by a very different steroidogenic response to FSH alone. In addition, the use of GnRH analogues represents a major effect modifier. Therefore, to establish the threshold value of LH that should be used to discriminate between LH concentrations considered sufficient and those considered too low or too high in assisted reproduction treatment patients is not an easy task. Thus, more data (randomized controlled trials) are necessary before evidence-based recommendations regarding exogenous r-LH supplementation in ovarian stimulation protocols with r-FSH and GnRH-a for assisted reproduction treatment can be provided.

Artigo Revisão

Table 1 - Cycles with and without LH supplementation: days of stimulation

Trail	rec FSH +rec LH		rec FSH		WMD	95%CI fixed
	n	mean±sd	n	mean±sd		
Tarlatzis 2006	55	9.7±2.3	57	9.9±3.2	-0.2	-1.24,0.84
Humaidan 2004	116	11.1±1.4	115	11.1±1.4	0	-0.36,0.36
Marrs 2004	212	9.3±1.6	219	9.5±2.0	-0.2	-0.54,0.14
Lisi 2002	122	12.57±0.15	331	12.77±0.27	-0.2	-0.25,-0.15
Total	505		722			
Pooled effect size Fixed effects (Mulrow-Oxman)					-0.198	-0.24,-0.16

Z (test WMD + differs from 0)= -9.96 p<0.0001

Non-combinability:

-Cohran Q= 1.16 (df = 3) p= 0.76

Table 2 - Cycles with and without LH supplementation: total amount of r-FSH administered

Trail	rec FSH +rec LH		rec FSH		WMD	95%CI fixed
	n	mean±sd (UI)	n	mean±sd(UI)		
Tarlatzis 2006	55	1837.5±802.5	57	1755±682.5	82.5	-193, 358
Humaidan 2004	116	2008±776	115	1997±749	11	-185.7, 207.7
Marrs 2004	212	2161.4±716.55	219	2266.4±826.21	-105	-251.2, 41.2
Lisi 2002	122	2998±112	331	3201±198	-203	-240.2,-165.8
Total	505		722			
Pooled effect size Fixed effects (Mulrow-Oxman)					-192	-220,-164

Z (test WMD + differs from 0)= -13.4 p<0.0001

Non-combinability:

-Cohran Q= 9.79 (df = 3) p= 0.02

Table 3 – Cycles with and without LH supplementation: serum estradiol levels on the day of hCG administration

Trail	rec FSH +rec LH		rec FSH		WMD	95%CI fixed
	n	mean±sd (pmol/l)	n	mean±sd (pmol/l)		
Tarlatzis 2006	55	1901±1073	57	1539±723	362	24.2, 670
Marrs 2004	212	9004±5162	219	8435±4853	569	-376, 1514
Lisi 2002	122	1221±58	331	1072±36	49	40.1, 57.9
Total	389		607			
Pooled effect size Fixed effects (Mulrow-Oxman)					49.4	38.4, 60.4

Z (test WMD + differs from 0)= 8.8 p<0.0001

Non-combinability:

-Cohran Q = 4.41 (df=2) p=0.11

Table 4 - Cycles with and without LH supplementation: number of retrieved oocytes.

Trail	rec FSH +rec LH		rec FSH		WMD	95%CI fixed
	n	mean±sd	n	mean±sd		
Tarlatzis 2006	55	10.1±5.4	57	9.8±7.0	0.3	-2.02,2.62
Humaidan 2004	116	9.3±5.4	115	10.0±4.7	-0.7	-2.00,0.60
Marrs 2004	212	13.6±6.8	219	14.1±7.5	-0.5	-1.85,0.85
Lisi 2002	122	7.0±0.32	331	6.97±0.20	0.03	-0.02,0.08
Total	505		722			
Pooled effect size Fixed effects (Mulrow-Oxman)					0.03	-0.03, 0.09

Z (test WMD + differs from 0)=0.89 p=0.37

Non-combinability:

-Cohran Q= 1.84 (df=3) p=0.61

Table 5 – Cycles with and without LH supplementation: number of mature oocytes (MII)

Trail	rec FSH +rec LH		rec FSH		WMD	95%CI fixed
	n	mean±sd	n	mean±sd		
Tarlatzis 2006	47	6.9±4.9	52	6.2±4.8	0.7	-1.21, 2.61
Humaidan 2004	116	8.3±4.9	115	9.1±4.5	-0.8	-2.01, 0.41
Marrs 2004	212	10.3±5.9	219	10.4±6.3	-0.1	-1.25, 1.05
Lisi 2002	122	5.71±2.96	331	5,52±3.04	0.19	-0.44, 0.82
Total	497		717			
Pooled effect size Fixed effects (Mulrow-Oxman)					0.016	-0.46, 0.50

Z (test WMD + differs from 0)= 0.64 p:0.95

Non-combinability:

-Cohran Q= 2.57 (df=3) p=0.46

Table 6 - Cycles with and without LH supplementation: clinical pregnancy rate per oocyte retrieval

Trail	rec FSH +rec LH	rec FSH	%Weights	Odds ratio	95%CI fixed
Tarlatzis 2006	9/55	14/57	10.4	0.60	0.21, 1.68
Humaidan 2004	42/116	35/115	20.3	1.3	0.72, 2.33
Marrs 2004	90/204	91/202	46.4	0.96	0.64, 1.45
Lisi 2004	30/122	62/331	58.9	1.41	0.83, 2.38
Total	171/497	202/705			
Pooled odds ratio Fixed effects (Mantel-Haenszel, Robins-Breslow-Greenland)				1.1	0.85, 1.42

Chi² (test odds ratio differs from 1) = 0.41 p = 0.52

Non-combinability of studies

-Breslow-Day= 3.42 (df= 3) p= 0.33

-Cochran Q= 3.39 (df= 3) p= 0.34

Artigo Revisão

Table 7 - Cycles and without LH supplementation: implantation rate

Trail	rec FSH +rec LH	rec FSH	%Weights	Odds ratio	95%CI fixed
Humaidan 2004	56/176	53/187	49.9	1.2	0.73, 1.9
Lisi 2002	41/288	74/753	50.1	1.52	0.98, 2.3
Total	97/464	127/940			
Pooled odds ratio Fixed effects (Mantel-Haenszel, Robins-Breslow-Greenland)				1.35	0.99, 1.83

Chi² (test odds ratio differs from 1) = 3.54 p = 0.06

Non-combinability of studies

-Breslow-Day= 0.68 (df= 1) p= 0.41

-Cochran Q= 0.68 (df= 1) p= 0.41

Table 8 - Cycles with and without LH supplementation: miscarriage rate

Trail	rec FSH +rec LH	rec FSH	%Weights	Odds ratio	95%CI fixed
Tarlatziz 2006	3/9	4/14	16.1	1.25	0.13, 10.5
Humaidan 2004	7/42	12/35	83.9	0.38	0.11, 1.26
Total	10/51	16/49			
Pooled odds ratio Fixed effects (Mantel-Haenszel, Robins-Breslow-Greenland)				0.52	0.21, 1.3

Chi² (test odds ratio differs from 1) = 1.41 p = 0.23

Non-combinability of studies

-Breslow-Day= 1.24 (df=1) p= 0.26

-Cochran Q= 1.22 (df=1) p= 0.27

REFERENCES

- Balasz J, Peñarrubia J, Fábregues F et al. - Ovarian responses to recombinant FSH or HMG in normogonadotrophic women following pituitary desensitization by a depot GnRH agonist for assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online* 7: 35-42, 2003.
- Balasz J, Fábregues F. - LH in the follicular phase: neither too high nor too low. *Reprod. Biomed. Online* 12: 406-415, 2006.
- Chappel SC, Howles C. - Reevaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process. *Hum. Reprod.* 6: 1206-1212, 1991.
- Davis OK, Rosenwaks Z. - Currents status of in vitro fertilization and new reproductive technologies. *Curr. Op. Obstet. Gynecol.* 4: 354-358, 1992.
- De Placido G, Alviggi C, Mollo A et al. - Rescue of IVF cycles by HMG in pituitary down-regulated normogonadotrophic young women characterized by a poor initial response to recombinant FSH. *Hum. Reprod.* 16: 1875-1879, 2001.
- De Placido G, Alviggi C, Mollo A et al. - Effects of recombinant LH (6LH) supplementation during controlled ovarian hyperstimulation (COH) in normogonadotrophic women with an inadequate response to recombinant FSH (rFSH) after pituitary downregulation. *Clin. Endocrinol.* 60: 637-643, 2004.
- Fábregues F, Balasz J, Creus M, Civico S, Carmona F, et al. - Long-term down-regulation does not improve pregnancy rates in an in vitro fertilization program. *Fertil. Steril.* 70: 46-51, 1998.
- Fleming R, Lloyd F, Herbert M et al. - Effects of profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation on follicular activity, oocyte and embryos function in cycles stimulated with purified follicle stimulating hormone. *Hum. Reprod.* 13: 1788-1792, 1998.
- Hillier SG. - Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum. Reprod.* 9: 188-191, 1994.
- Hillier SG. - Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179: 39-46, 2001.
- Humaidan P, Bungum M, Bungum L, Andersen YC. - Effects of recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and stimulation with recombinant FSH: an opening study. *Reprod. Biomed. Online* 8: 635-643, 2004.
- Humaidan P. - Are endogenous LH levels during ovarian stimulation for IVF using GnRH analogues associated with the probability of ongoing pregnancy? A systematic review. Letter to editor: *Hum. Reprod. Update* 12: 325-326, 2006.
- Kolibanakis EM, J Collins J, Tarlatzis JB, Papanikolaou E, Devroey P. - Are endogenous LH levels during ovarian stimulation for IVF using GnRH analogues associated with the probability of ongoing pregnancy? A systematic review. *Hum. Reprod. Update* 12: 3-12, 2006.
- Lisi F, Rinaldi L, Fishel S, Lisi R, Pepe GP, Picconeri MG, Campbell A. - Use of recombinant LH in a group of unselected IVF patients. *Reprod. Biomed. Online* 5: 104-108, 2002.
- Marrs R, Meldrum D, Muasher S, Schoolcraft W, Werlin L, Kelly E. - Randomized trial to compare the effect of recombinant human FSH (folitropin alfa) with or without recombinant human LH in women undergoing assisted reproduction treatment. *Reprod. Biomed. Online* 8: 175-182, 2003.
- Mulrow CD, Oxman AD (eds). - *Cochrane Collaboration Handbook*, Oxford: Cochrane Collaboration, 1996.
- O'Dea L StL and The US Recombinant Study Group - Recombinant LH in support of recombinant FSH in female hypogonadotropic hypogonadism - Evidence of threshold effects *Fertil. Steril.* 74 (suppl.3): S36, 2000.
- Rao CV. - Multiple novel roles of luteinizing hormone. *Fertil. Steril.* 76: 1097-1100, 2001.
- Shemesh M. - Actions of gonadotrophins on the uterus. *Reproduction* 121: 835-842, 2001.
- Sills EA, Levy DP, Moomjy M, McGee M, Rosenwaks Z. - A prospective, randomized comparison of ovulation induction using highly purified follicle-stimulating hormone alone and with recombinant human luteinizing hormone in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 14: 2230-2235, 1999.
- Shoham Z. - The clinical therapeutic window for luteinizing hormone in controlled ovarian stimulation. *Fertil. Steril.* 77: 1170-1177, 2002.
- Tarlatzis B, Tavmergen E, Szamatowicz M, Amit A, Levitas E, Shoham Z. - The use of recombinant human LH (lutropin alfa) in the late stimulation phase of assisted reproduction cycles: a double-blind, randomized, prospective study. *Hum. Reprod.* 21: 90-94, 2006.
- Tesarik J, Mendoza C. - Effects of exogenous LH administration during ovarian stimulation of pituitary down-regulated young oocyte donors on oocyte yield and developmental competence *Hum. Reprod.* 17: 3129-3137, 2002.
- Westergaard LG, Laursen SB, Andersen CY. - Increased risk of early pregnancy loss by profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation in normogonadotrophic women undergoing assisted reproduction. *Hum. Reprod.* 15: 1003-1008, 2000.
- Zeleznik AJ. - Follicle selection in primates: "Many are called but few are chosen". *Biol. Reprod.* 65: 655-659, 2001.

Associação de ICSI e Doação Temporária de Útero como Estratégia no Tratamento de Pacientes com Síndrome de Mayer-rokitansky-Kuster-Hauser: Relato de Caso e Revisão da Literatura.

ICSI-gestational Carrier Association as a Strategy for Treatment of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome Patients: Case Report and Literature Review.

Patrícia Diniz^{1*}, Marcelo A. Costa Lima^{2,3}, Flávia Areas¹, Simone Nogueira¹, Sérgio L. Simões¹, Luis Fernando Dale¹.

¹ Centro de Medicina da Reprodução (CEMERJ)

² Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

³ Laboratório de Malformações Congênitas, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

* Autor para correspondência

P. Diniz

Centro de Medicina da Reprodução (CEMERJ)

Rua Lauro Muller 116, Torre Rio Sul, 12º andar – grupo 1202

Botafogo, Rio de Janeiro, Brasil

CEP 22290-160

Telefone: 21-2543-1355

Fax: 21-2542-1996

email: diniz-patricia@uol.com.br

email:selmogeb@origen.com.br

RESUMO

O desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida tem permitido a mulheres que apresentam severas anomalias urogenitais a evitar a falta de progênie e a utilizar seus próprios gametas para gerar um filho através do uso de doação temporária de útero. Neste trabalho descrevemos a utilização da metodologia em uma paciente com síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser. A indução da ovulação após sincronização de ciclos menstruais foi realizada a partir da utilização de protocolo longo com bloqueio hipofisário. Após o tratamento, os folículos foram aspirados por via transvaginal sob monitorização ecográfica e os ovócitos em estágio metafase II submetidos à Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI). Após avaliação, os pré-embriões que apresentavam desenvolvimento embrionário compatível com o período da transferência embrionária foram transferidos para o útero da receptora sob monitorização ultra-sonográfica. A gestação culminou com o nascimento de uma criança saudável e fenotipicamente normal.

A associação entre técnicas de reprodução assistida e a utilização de doação temporária de útero constitui uma estratégia eficiente para que pacientes com alterações urogenitais severas alcancem a gravidez e constituam uma família.

Unitermos: síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser, ICSI, infertilidade, anomalias urogenitais

ABSTRACT

The development of assisted reproduction techniques has allowed women who present severe urogenital anomalies to avoid childlessness and to use their own gametes to generate a child through the use of temporary donation of uterus. In this work we describe the use of the methodology in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. Ovulation was induced after synchronization of menstrual cycles by using a long protocol with hypophysary blockade. After the treatment, the follicles were aspirated under ecographic monitoring and the metaphase II oocytes were submitted to Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). After evaluation, the preembryos with compatible embryonic development were transferred to the uterus of the receptor under ultrasonographic monitoring. The gestation culminates with the birth of a healthy and phenotypically normal child.

Recebido em 15/05/2006
Avaliado e aceito em 03/11/2006

Relato de Caso

pically normal child. The association between techniques of attended reproduction and the use of temporary donation of uterus constitute an efficient strategy to allow patients with severe urogenital alterations to reach pregnancy and constitute a family.

Keywords: Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome, ICSI, infertility, urogenital anomalies

INTRODUÇÃO

A determinação sexual ocorre no momento da fertilização, entretanto a diferenciação fenotípica das gônadas somente é alcançada entre a 6ª e 7ª semanas de desenvolvimento (Sadler, 1990) e envolve uma série de genes e estímulos (MacLaughlin e Donahoe, 2004). Nas mulheres, o desenvolvimento dos dutos mesonéfricos (Wolfianos) origina o duto de Gartner, ao passo que o desenvolvimento dos dutos paramesonéfricos (Müllerianos) forma diversas estruturas, incluindo o óstio abdominal da tuba uterina, o útero, a cervix e as porções superiores da vagina.

Anormalidade Müllerianas, incluindo útero bicorno e didelfo, atresia de cervix e agenesia vaginal apresentam uma prevalência de 2-3% (Sanfillippo et al., 1986). Se anomalias uterinas de menor porte forem incluídas, a ocorrência passa a faixa entre 7 e 10% das mulheres (Acien et al., 2004). Entretanto, se apenas a ausência congênita da vagina é considerada, a frequência de ocorrência estimada é de cerca de 1 para 5.000 nascimentos do sexo feminino (Caparo et al., 1987).

A Síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) é uma anomalia congênita incomum que afeta 1 para 4.000 a 10.000 meninas (Capraro e Gallego, 1976; Rock e Azziz, 1987). A doença é a segunda maior causa de amenorréia primária, sendo responsável por cerca de 10% dos casos registrados, e é caracterizada pela atresia vaginal ou ausência dos 2/3 superiores da vagina, associada a um útero rudimentar ou agenesia uterina e genitália externa normal. As pacientes com síndrome podem, ainda, apresentar malformações renais ou esqueléticas (Willemsem, 1982). Como ovários são originados de forma independente do mesonefro, as trompas e os ovários estão presentes, a ovulação ocorre normalmente e as características sexuais são normais (Ludwig, 1998; Lin et al., 2004), o que representa que as mulheres com esta síndrome possuem um potencial reprodutivo normal (Esfandiari et al., 2004). Além disso, concentrações cíclicas de gonadotrofina hipofisária e funções endócrinas normais estão documentadas em pacientes portadoras desta síndrome (Coyotupa et al., 1973).

No passado, o interesse primário nas pacientes de MRKH estava concentrado na reconstrução cirúrgica da vagina (Cooper et al., 1996). Diversas técnicas para criação de uma neovagina encontram-se disponíveis e as mais recentes metodologias combinam o uso de derma artificial com aplicação local de fator de crescimento de fibroblastos recombinantes (Noguchi et al., 2004). Entretanto, o desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida (TRA) alcançado nas últimas décadas vem capacitando mulheres com anomalias Müllerianas severas a utilizar seus próprios óvulos para gerar uma progênie biológica, com herança genética. A associação de TRA ao uso de doação temporária de útero é uma estratégia viável para estas pacientes e que vem sendo utilizada com sucesso nos últimos anos (Beski et al., 2000; Esfandiari et al., 2004).

Assim como em outras anomalias do trato genital feminino, a etiologia da síndrome Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser é complexa, e envolve tanto fatores genéticos como fatores ambientais. A maioria dos casos é esporádica e a análise citogenéticas tem revelado constituições cariotípicas normais

(Simpson, 1999). Entretanto, algumas pacientes apresentam anomalias cromossômicas estruturais (Van Lingem et al., 1997) ou agregação familiar, o que sugere a presença de um componente genético principal no desencadeamento da doença. Em um estudo retrospectivo conduzido nos EUA foi observado que a ausência de vagina e de útero não é transmitida com um caráter dominante (Petrozza et al., 1997).

O componente genético da síndrome vem sendo estudado e mutações nos genes *AMHR-II* e *GALT* foram associadas à doença, entretanto, o polimorfismo p.N314D do produto codificado pelo gene *GALT* não está associado a ausência congênita de útero e vagina (Klipstein et al., 2003), assim como outros polimorfismos nos genes *AMR* e *AMRH-II* (Zenteno et al., 2004; Oppelt et al., 2005) e *HOXA7* a *HOXA13* e *PBX1* (Burel et al 2006). Recentemente, uma mutação em um resíduo altamente conservado do produto codificado pelo gene *WNT4*, uma glicoproteína rica em cisteína que age como sinalizador extracelular, foi associada à síndrome (Biason-Lauber et al., 2004). Em um estudo realizado na Grécia com seis casos consecutivos de MRKH, a presença do gene que codifica a proteína específica do testículo 1Y (*TSPY*) foi observada em duas pacientes, sugerindo que a síndrome possa estar associada a outros elementos genéticos (Plevraki et al., 2004). Entretanto, a participação de seqüências codificadoras do cromossomo Y na etiologia da síndrome Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser ainda é bastante controversa.

Aqui apresentamos um caso clássico de síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser no qual a estratégia de tratamento associado de ICSI com útero doado temporariamente foi utilizada com pleno sucesso. Não houve intercorrências ao longo da gestação, que culminou com o nascimento de uma criança saudável fenotipicamente normal.

RELATO DO CASO

Paciente com 32 anos, portadora da síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser, apresentando agenesia uterina e terços superiores vaginais reconstruídos por cirurgia plástica utilizando enxertos de pele extraídos dos grandes lábios pulvares. A avaliação hormonal e citogenética apresentou padrões de normalidade, com cariótipo 46,XX. A realização de ultra-sonografia revelou ausência de imagem uterina na projeção da cúpula vaginal, compatível com o diagnóstico prévio, com projeção vaginal centrada e de pequena extensão, bem definida à observação com a introdução do transdutor endocavitário promovendo sua distensão. Em topografias anexais, ovários aparentemente normais com diâmetros de 2,3cm e 2,5cm, para os ovários direito e esquerdo, respectivamente, foram observados, assim como ausência de líquido livre e anormalidades urológicas.

A avaliação masculina, com realização de espermograma, revelou uma concentração de 27 milhões de espermatozoides/mL, com motilidade de 37% (categoria B) e morfologia de 6%, de acordo com critério de Kruger. Para doação temporária de útero (receptora) utilizou-se parente de 1º grau (irmã), 38 anos, também portadora de anomalia genital, útero unicorno, cuja histeroscopia evidenciou cavidade uterina cilíndrica e apenas um óstio tubário visível. A receptora possuía gestação anterior com parto normal sem intercorrências. A técnica indicada para o caso foi Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) com doação temporária do útero.

Estimulação Ovariana e Transferência Embrionária

A paciente realizou ultra-sonografia transvaginal seriada da ovulação visando à datação do ciclo. Quinze dias após a

ovulação, iniciou pílula anticoncepcional oral para facilitar sincronização dos ciclos menstruais. Foi utilizado protocolo longo para indução da ovulação para Fertilização In Vitro (FIV). O bloqueio hipofisário foi realizado com uso de Acetato de Nafarelina (Synarel®). No estímulo ovariano foi administrado 300 UI de HMG (Gonadotrofina Menopáusica Humana, Merional® por dia, durante quatro dias. Seguiu-se a administração de 300UI diária de FSHr Hormônio Folículo Estimulante recombinante, Gonal® por 6 dias, com controle ultra-sonográfico e dosagens de estradiol sérico diários. Após este período foi realizada aplicação de 10.000UI de HCG gonadotrofina coriônica humana, Profasi 10.000 UI®.

A aspiração folicular ocorreu 37 horas após a aplicação da gonadotrofina coriônica humana, sob analgesia por via transvaginal sob monitorização ecográfica. Foram obtidos treze óvulos, dos quais oito encontravam-se em Metáfase II (MII) e foram submetidos à Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI Palermo et al., 1992). A fertilização foi obtida em seis ovócitos e, após a avaliação embrionária, foram selecionados 3 pré-embriões com desenvolvimento compatível com o período da transferência embrionária (estágio D3). Os pré-embriões foram transferidos para o útero da receptora com utilização de cateter de Sidney®, sob monitorização ultra-sonográfica.

A receptora fez uso de Acetato de Leuprolida (Lupron Depot 3,75 UI®) no 24º dia do ciclo e iniciou 4mg/dia de Valerato de Estradiol quatro dias antes do estímulo da doadora ser iniciado.

Após 16 dias da transferência foi realizado um teste de dosagem de β -HCG no sangue, apresentando resultado positivo. Cerca de seis semanas após a transferência foi realizada ultra-sonografia pélvica, com visualização de saco gestacional duplo, com batimentos cardio-fetais em apenas um dos embriões. O segundo saco gestacional, adjacente à parede posterior do saco evolutivo, não apresentou vitalidade sendo observada posterior regressão.

A gestação do feto único evoluiu normalmente, sem intercorrências, e a avaliação de translucência nucal e morfológica não revelaram alterações. A gestação foi conduzida a termo, as 39ª semanas, culminando com o nascimento de uma criança fenotipicamente normal.

DISCUSSÃO

Até o desenvolvimento das Técnicas de Reprodução *in vitro*, mulheres que apresentassem anomalias congênitas do trato reprodutivo não eram capazes de gerar uma prole biológica. Com o progresso das técnicas de fecundação *in vitro* e transferência de embriões, estas pacientes têm sido beneficiadas. A síndrome de agenesia Mülleriana inclui vagina ausente ou hipoplásica. O útero pode ser normal, mas frequentemente observa-se agenesia uterina ou uma estrutura rudimentar. Apesar da criação de uma neovagina facilitar o intercursos sexual, a infertilidade é regra, exceto nos raros casos com útero normal.

No caso da MRKH, o funcionamento ovário é normal e as paciente são candidatas potenciais para a fecundação *in vitro* associada ao uso de doação temporária de útero (Esfandiari et al., 2004). Estas pacientes devem ser informadas que são capazes de gerar famílias utilizando seu próprios gametas (Beski et al., 2000) e o aconselhamento genético deve ser oferecido, já que uma base genética foi recentemente proposta para a doença (Biason-Lauber et al., 2004). Isto representa que a paciente deve decidir se deseja gerar uma prole biológica com herança genética enquanto ainda se encontra em idade reprodutiva (Beski et al., 2000).

MRKH é considerada uma anomalia congênita rara, entretanto, um número crescente de pacientes com esta doença está recorrendo às técnicas de reprodução assistida, permitindo que certas conclusões sobre esta população estejam disponíveis. Comparações entre pacientes utilizando doadoras de útero para diferentes indicações fornecem dados sobre a função ovariana de pacientes com agenesia vaginal e aquelas pacientes com ausência cirúrgica do útero. Trabalhos que avaliam os principais parâmetros associados ao sucesso nos processos de reprodução assistida revelam que não há diferenças significativas na resposta entre as portadoras MRKH e as pacientes com ausência uterina por diversas causas, incluindo ausência cirúrgica e anormalidade uterina por exposição a dietilestilbestrol (DES) (Corson et al., 1998; Wood et al 1999). A partir destes estudos fica claro que um dos fatores que influencia mais diretamente o sucesso do procedimento é a idade da mãe biológica (genética), em função da importância da qualidade ovocitária. Mulheres com menos de 39 anos apresentam maior probabilidade de sucesso do que as mulheres acima desta faixa etária (Serafini et al., 1994). Desta forma, a associação de FIV com a doação temporária de útero para tratamento de pacientes com a síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser constitui uma solução concreta e efetiva para se alcançar a gestação almejada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acien P., Acien M., Sanchez-Ferrer M. - Complex malformations of the female genital tract. New types and revision of classification. Hum. Rep., 19:2377-84, 2004.
2. Basile C., De Michelle V. - Renal abnormalities in Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. J. Nephrol., 14:316-8, 2001.
3. Beski S., Gorgy A., Venkat G., Craft I.A., Edmonds K. - Gestational surrogacy: a feasible option for patients with Rokitansky syndrome. Hum. Rep., 15:2326-8, 2000.
4. Biason-Lauber A., Konrad D., Navratil F., Schoenle E.J. - A *WNT-4* mutation associated with mullerian-duct regression and virilization in a 46, XX woman. N. Engl. J. Med., 351:792-8, 2004.
5. Beski S., Gorgy A., Venkat G., Craft I.L., Edmonds K. - Gestational surrogacy: a feasible option for patients with Rokitansky syndrome. Hum. Reprod., 15:2326-8, 2000.
6. Brinsden P.R. - Gestational surrogacy. Hum. Rep. Update, 9:483-91, 2003.
7. Capraro V.J., Gallego M.B. - Vaginal agenesis. Am. J. Obstet. Gynecol., 124:98-107, 2000.
8. Burel A., Mouchel T., Odent S., Tiker F., Knebelmann B., Pellerin I., Guerrier D. - Role of *HOXA7* to *HOXA13* and *PBX1* genes in various forms of MRKH syndrome (congenital absence of uterus and vagina). J. Negat. Results Biomed., 23:5:4, 2006.
9. Corson S.L., Kelly M., Braverman A.M., English M.E. - Gestational carrier pregnancy. Fertil. Steril., 69:670-4, 1998.
10. Coyotupa J., Buster J., Parlow A.F., Dignam W.J. - Normal cyclical patterns of serum gonadotropins and ovarian steroids despite congenital absence of the uterus. J. Clin. Endocrinol. Metab., 36(2):395-6, 1973.
11. Esfandiari N., Claessens E.A., O'Brien A., Gottlieb L., Casper R.F. - Gestational carrier is an optimal method for pregnancy in patients with vaginal agenesis (Rokitansky syndrome). Int. J. Womens Med., 49:79-82, 2004.
12. Klipstein S., Bhagavath B., Topipat C., Sasur L., Reindollar R.H., Gray M.R. - The N314D polymorphism of the *GALT* gene is not associated with congenital absence of the uterus and vagina. Mol. Hum. Reprod., 9:171-4, 2003.
13. MacLaughlin D.T., Donahoe P.K. - Sex determination and differentiation. N. Engl. J. Med., 350:367-78, 2004.
14. Noguchi S., Nakatsuka M., Sugiyama Y., Chekir C., Kamada Y., Hiramatsu Y. - Use of artificial dermis and recombinant basic fibroblast growth factor for creating a neovagina in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. Hum. Rep., 19:1629-32, 2004.
15. Oppelt P., Strissel P.L., Kellermann A., Seeber S., Humeny A., Beckman M.W., Strick R. - DNA sequence variations of the entire anti-Mullerian hormone (*AMH*) gene promoter and AMH protein expression in patients with the Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. Hum. Rep., 20:149-57, 2005.
16. Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C. - Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet, 340:17-8, 1992.

Relato de Caso

17. Petrozza J.C., Gray M.R., Davis A.J., Reindollar R.H. - Congenital absence of the uterus and vagina is not commonly transmitted as a dominant genetic trait: Outcomes of surrogate pregnancies. *Fertil. Steril.* 67:387-9, 1997.
18. Plevraki E., Kita M., Goulis D.G., Hatzisevastou-Loukidou H., Lambropoulos A.F., Avramides A. - Bilateral ovarian agenesis and the presence of the testis-specific protein 1-Y-linked gene: two new features of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Fertil. Steril.*, 81:689-92, 2004.
19. Rock J.A., Aziz R. - Genital anomalies in childhood. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 30:682-96, 1987.
20. Serafini P. - Outcome and follow-up of children born after IVF-surrogacy. *Hum. Reprod. Update*, 7:23-7, 2001.
21. Serafini P., Tran C., Richardson A. - *In vitro* fertilization surrogacy. *Assist. Reprod. Rev.*, 4:155-61, 1994.
22. Simpson J.L. - Genetics of female reproductive ducts. *Am. J. Med. Genet.*, 89:224-39, 1989.
23. Van Lingen B.L., Gray M.R., Davis A.J., Cowan J.M., Reindollar R.H. - Physical mapping of 3p23, a region that includes a translocation breakpoint in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 61, suppl:A246, 2001.
24. Willemsen W.N.P. - Renal-skeletal-ear and facial anomalies in combination with the Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Europ. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 14:121-30, 1982.
25. Wood E.G., Batzer F.R., Corson S.L. - Ovarian response to gonadotrophins, optimal method for oocyte retrieval and pregnancy outcome in patients with vaginal agenesis. *Hum. Rep.*, 14:1178-81, 1999.
26. Zenteno J.C., Carranza-Lira S., Kofman-Alfaro S. - Molecular analysis of the anti-Mullerian hormone, the anti-Mullerian hormone receptor and galactose-1-phosphate uridylyl transferase genes in patients with the Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 269:270-3, 2004.

“Não recebo a revista.”

**Você é sócio?
Seu pagamento está em dia?
Seu endereço mudou?**

**Se há dúvidas, consulte o seu
cadastro e fale conosco**

www.sbra.com.br

2007

JANEIRO

33rd Annual Conference
International Embryo Transfer Society
January 7-9
Kyoto, Japan

The Management of the Infertile Couple and Assisted Conception'
Joint RCOG/BFS Meeting
January 8-12
London, UK

ESHRE Campus 2007
Follicle culture, in vitro maturation and cryopreservation - from basic research to clinical application
January 12-14
Luebeck, Germany

8th Winter Obstetrics & Gynecology Congress
January 17-21
Uludag-Bursa
Turkey

FEVEREIRO

4th Annual International Egg Donation Conference
February 4-5
Philadelphia, PA
USA

ISAR 2007 - 12TH National Congress on Assisted Reproduction Technology and Advances in Infertility Management
February 8-11
Chandigarh, India

International Fertility Treatment Conference for individuals, couples and patients
February 10-11
Geneva, Switzerland

JUNHO

5th Annual Meeting
International Society for Stem Cell Research
June 17-20
Cairns, Queensland
Australia

JULHO

23rd Annual Meeting of the ESHRE
July 1-4
Lyon, France

British International Congress of Obstetrics and Gynaecology
July 4-6
ExCeL, London

AGOSTO

XXII Congresso Brasileiro de Reprodução Humana - SBRA
23 a 25 de Agosto de 2007
Centro de Convenções de Brasília

SETEMBRO

5th World Congress on Ovulation Induction
September 13-15
Rome, Italy

OUTUBRO

17th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology
October 7-11
Florence, Italy

63rd Annual Meeting of the ASRM
October 13-17
Washington, DC
USA

MENOPUR® - Menotropina altamente purificada - (75 UI de FSH + 75 UI de LH) - USO ADULTO - **FORMA FARMACÊUTICA:** Caixas com 1 ou 5 ampolas de diluente de 1 ml e 1 ou 5 frasco-ampolas com 75 UI de menotropina altamente purificada (FSH + 75 UI de LH) para injeção SC ou IM após preparo de solução. **INDICAÇÃO:** Esterilidade em mulheres com insuficiência hipo ou normogonadotrófica, para estimulação do crescimento folicular. Esterilidade em homens com hipogonadismo hipogonadotrófico, em combinação com hCG (gonadotrofina coriônica humana) para estimular a espermatogênese. **CONTRA-INDICAÇÕES:** Não deve ser utilizado em caso de hipersensibilidade às gonadotrofinas ou à lactose, e nos seguintes quadros: Em mulheres: Gravidez, mal formação de órgãos sexuais incompatíveis com uma gravidez; aumento dos ovários ou cistos que não tenham sido causados por síndrome de ovários policísticos; sangramento ginecológico com causa desconhecida; tumores do útero, ovários e mama. Em homens: Câncer de próstata ou testículos. As seguintes condições devem ser tratadas apropriadamente antes do início de aplicação de MENOPUR®: disfunções da glândula tireóide e do córtex da glândula supra-renal; aumento do nível sérico da prolactina com diferentes causas (hiperprolactinemia); tumores na glândula pituitária ou no diencéfalo (hipotálamo). **POSOLOGIA:** Na mulher: A dosagem de MENOPUR® para a indução do crescimento folicular em mulheres normo ou hipogonadotróficas depende da reação ovariana, e deve ser verificada através de exames ultra-sonográficos dos ovários e mensuração dos níveis de estradiol. Para induzir a ovulação, 5.000 ou 10.000 U.I. de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) são injetados intramuscularmente, 1 a 2 dias após a última administração de MENOPUR®. **Observação:** Após a administração de uma dose muito alta de MENOPUR®, a administração subsequente de hCG pode causar uma hiperestimulação involuntária dos ovários. No homem: Inicialmente, 1.000 - 3.000 U.I. de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) são administrados 3 vezes por semana. Até atingir-se um nível sérico de testosterona normal. Então, 75-150 U.I. de MENOPUR® são administrados 3 vezes por semana, por alguns meses. **PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS:** O hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) não deve ser administrado para induzir a ovulação em mulheres cujos ovários foram involuntariamente hiperestimulados. **INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS:** A interação com outros medicamentos é desconhecida. **REAÇÕES ADVERSAS:** As seguintes reações podem ocorrer com a aplicação de gonadotrofinas recombinantes ou menotropinas em casos de síndrome de hiperestimulação ovariana grave: ascite, hidrotórax, oligúria, hipotensão e fenômenos tromboembólicos. Ocasionalmente, o tratamento é acompanhado por náusea e vômito. Em casos isolados, reações de hipersensibilidade e febre podem ocorrer. **EFEITOS COLATERAIS:** Os tratamentos com gonadotrofinas recombinantes ou menotropinas podem levar a uma hiperestimulação ovariana. Isto, contudo, torna-se geralmente clinicamente relevante apenas após a administração de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) para induzir a ovulação. Levando à formação de grandes cistos ovarianos, que tendem a romper-se podendo também causar sangramento intra-abdominal. O tratamento deve ser imediatamente descontinuado quando os primeiros sinais de hiperestimulação forem detectados ultrasonograficamente e através de dores e distensão palpável no baixo abdômen. Com a gravidez, estes efeitos colaterais podem intensificar-se e continuar por um longo período de tempo, podendo tornar-se um risco de vida. A gravidez múltipla involuntária ocorre com maior frequência durante os tratamentos de reprodução assistida. **CONDUTA NA SUPERDOSAGEM:** a) Nenhuma terapia é necessária quando uma hiperestimulação leve está presente (Nível I), acompanhada por um ligeiro aumento dos ovários (tamanho dos ovários 5 - 7 cm), secreção de esteróides excessiva, e dor abdominal. Contudo, o paciente deve ser informado, e cuidadosamente observada; b) A supervisão clínica e o tratamento sintomático, e talvez uma reposição de volume intravenoso em caso de alta concentração de hemoglobina, são necessários caso haja a ocorrência de hiperestimulação moderada (Nível II) com presença de cistos ovarianos (tamanho do ovário 8 - 10 cm), acompanhada de sintomas abdominais, náusea e vômito; c) A hospitalização é imperativa quando ocorre a hiperestimulação séria (Nível III) com presença de grandes cistos ovarianos (tamanho do ovário maior que 10 cm), acompanhada de ascite, hidrotórax, abdômen distendido, dor abdominal, dispnéia, retenção de sais, aumento da concentração de hemoglobina e da viscosidade do sangue, agregação plaquetária com risco de tromboembolismos. **CUIDADOS DE ARMAZENAGEM:** Manter o medicamento até 25°C. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA** - Laboratórios Ferring Ltda - SAC 0800 772 4656

UTROGESTAN® - progesterona natural micronizada
USO ADULTO

Composição: cada cápsula contém progesterona 100 mg ou 200 mg; excipientes qsp. **Indicações:** UTROGESTAN® é indicado para os distúrbios relacionados à deficiência de progesterona, como alterações do ciclo menstrual e amenorréia secundária; na insuficiência lútea; na pré-menopausa e na reposição hormonal da menopausa (como complemento à terapia estrogênica). UTROGESTAN® via vaginal é indicado também na implantação do embrião e manutenção da gravidez durante o primeiro trimestre e como suporte da fase lútea durante os ciclos de reprodução assistida. **Contra-indicações:** este medicamento é contra-indicado em doenças graves do fígado. Hipersensibilidade do princípio ativo ou a qualquer outro componente da fórmula. **Precauções:** alterações leves ou moderadas da função hepática, pacientes com disfunção renal. **Advertências:** Este medicamento não trata todas as causas de aborto espontâneo precoce e, particularmente, ele não tem ação sobre abortos provenientes de defeitos genéticos (o que corresponde a mais da metade das causas de aborto). **Pacientes idosos:** Não há dados que indiquem a necessidade do ajuste de dose para a paciente idosa. **Gravidez** - Amamentação: Nenhuma relação entre o progesterona e malformações fetais foi observada durante diversos estudos epidemiológicos em mais de mil pacientes. **Interações medicamentosas:** o uso crônico de barbitúricos, carbamazepinas, hidantoinas ou rifampicina pode diminuir a eficácia de UTROGESTAN®. Por outro lado, UTROGESTAN® pode potencializar os efeitos farmacológicos da ciclosporina, teofilina ou beta-bloqueadores. **Posologia:** Via Oral: Na insuficiência de progesterona, na insuficiência lútea o regime de tratamento usual é de 200mg por dia: → 10 dias por ciclo, habitualmente do 17º dia ao 26º dia, inclusive. Em terapia de reposição hormonal para menopausa, a terapia estrogênica isolada não é recomendada (risco de hiperplasia endometrial). Conseqüentemente, a progesterona é combinada em dose de 200 mg por dia, da seguinte forma: → dose única de 200 mg à noite antes de dormir, de 12 a 14 dias por mês. Na dose de 200 mg é comum observar-se um sangramento de privação após o uso da progesterona. Via vaginal: Cada cápsula gelatinosa deve ser introduzida profundamente na vagina. Suplementação da fase lútea (segunda fase do ciclo menstrual) durante ciclos de FIV: A dosagem recomendada é de 400 a 600 mg por dia, divididos em duas a três doses, do dia da injeção HCG até a 12ª semana de gravidez. Suplementação da fase lútea durante ciclos espontâneos ou induzidos: a dosagem recomendada é de 200 a 400 mg por dia, divididos em duas doses, a partir do 17º dia do ciclo, durante 10 dias. O tratamento será rapidamente reiniciado se a menstruação não ocorrer novamente e, sendo diagnosticada uma gravidez, até a 12ª semana desta. Ameaça de aborto precoce ou prevenção de aborto comum devido à insuficiência lútea: a dosagem recomendada é de 200 a 400 mg por dia divididos em duas doses até a 12ª semana de gravidez. **Forma farmacêutica e apresentação:** UTROGESTAN® 200 mg é apresentado em caixas contendo blister com 14 cápsulas gelatinosas. UTROGESTAN® 100 mg é apresentado em caixas contendo blister com 30 cápsulas gelatinosas. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.** Registro no M.S.: 1.0390.0167. Farm. Resp.: Dr. Wessel de Oliveira Cunha CRF-RJ: 2184. Fabricado por: CAPSUGEL PLOERMEZ. Zone Industrielle Carnagnon, B. P.320 - 56803 Poermezel Cedex - Embalado por: Laboratórios Besins International Bélgica. Distribuído por: Farmoquímica S/A, Rua Yvúva Cláudio, 300 - Rio de Janeiro - RJ - Indústria Brasileira - CNPJ: 33.349.473/0003-10 - SAC 0800 25 0110 - Para ver o texto de bula na íntegra, acesse o site www.fqm.com.br