

Comparação entre Diferentes Durações do Efeito dos Análogos do GnRH na Fase Lútea em Ciclos de Reprodução Assistida

Selmo Geber ^{1,2}

Ana Carolina Moreira ²

Maria Fernanda Rezende ²

Marcos Sampaio ¹

¹ ORIGEM – Centro de Medicina Reprodutiva – Belo Horizonte.

² Faculdade de Medicina da UFMG.

Abstract

Objectives: *The aim of this study was to evaluate whether the prolonged effect of GnRH-a on the luteal phase, in Assisted Reproduction cycles, might influence the pregnancy rates.*

Study design: *This is a retrospective study of 367 patients who had been submitted to ovulation induction for IVF/ICSI procedures between January 1998 and December 2000, and used Depot GnRHa for pituitary suppression. Patients were stratified according to the period of action of the agonists in the luteal phase: first group ≤ 6 days; second group: 7 to 12 days (inclusive) and third group: > 12 days. The following variables were analyzed: ovarian response, age, infertility causes and pregnancy rates.*

Results: *In the first group ($n = 53$), the mean age was 33,8 (23-44) and the pregnancy rate was 45,2%. In the second one ($n = 118$) the mean age was 33,5 (24-44) and the pregnancy rate was 38,9%. At last, in the third one ($n = 196$), the mean age was 33,8 (23-43) and the pregnancy rate was 47,4%.*

Conclusion: *No significant association of prolonged effect of depot GnRH-a and pregnancy rates were found ($p > 0,05$).*

Discussion: *Despite this conclusion, our findings suggest an increase in the pregnancy rates when GnRH-a effect lasts more than 12 days, which could represent an improvement in assisted reproduction procedures.*

Introdução

O uso dos análogos dos hormônios liberadores das gonadotrofinas (GnRHa) representou um importante marco para as técnicas de reprodução assistida, pois ao inibir o pico do hormônio luteinizante (LH), diminuiu as punções de urgência devido à rotura folicular precoce. No fim dos anos oitenta, a maioria dos centros já os empregava associados com menotrofinas (hMG) nos protocolos de estimulação ovariana (Rutherford *et al.*, 1988; Meldrum *et al.*, 1989; Lejeune *et al.*, 1990). Os protocolos mais utilizados são o curto ou longo. No curto, inicia-se o uso do GnRHa no início do ciclo menstrual, para se estimular o efeito de *flare up* (descarga inicial de gonadotrofinas endógenas) que irá potencializar o efeito das gonadotrofinas administradas por via exógena (FSH recombinante, hMG). Com isso, acredita-se obter uma superovulação mais potente e com menor dose de gonadotrofinas. Para esse protocolo, os análogos são utilizados diariamente, e seu uso é interrompido no dia da administração do hormônio da gonadotrofina coriônica (hCG) para indução da maturação oocitária.

No protocolo longo, o uso dos análogos pode ser iniciado tanto na fase folicular precoce ($\pm 2^{\circ}$ dia do ciclo) quanto na fase lútea

Correspondência para:

Av. Contorno 7747 – Lourdes – Belo Horizonte MG – 0010020

Tel.: 031- 32926363 – origem@origem.com.br

tardia ($\pm 21^{\circ}$ dia o ciclo). Nesse protocolo, é fundamental que ocorra a dessensibilização hipofisária antes de se iniciar a indução da foliculogênese. As vias de administração podem ser tanto intranasal e subcutânea diária quanto através de preparações de liberação lenta ou de depósito (Leyendecker *et al*, 1983; Fleming *et al*, 1988; Dodson *et al*, 1987; Geber *et al*, 2002). Inúmeras vantagens estão associadas ao uso de GnRHa nos protocolos de reprodução assistida. A principal delas é a supressão do pico de LH, tanto a sua fração imunológica quanto a biologicamente ativa (Meldrum *et al*, 1984; Mortola *et al*, 1989), prevenindo, assim, a rotura folicular antes do momento da aspiração e os efeitos indesejáveis de uma luteinização excessiva sobre a qualidade do ovócito (Stanger *et al*, 1985; Dodson *et al*, 1987). Uma vantagem adicional de seu uso combinado com gonadotrofinas exógenas seria um maior número de folículos recrutados, que de acordo com alguns autores pode ser obtido usando-se protocolos longos (Tan *et al*, 1992; Filicori *et al*, 1996). Uma possível explicação para esse efeito é a redução da produção de andrógenos pelo ovário salvando um número maior de folículos da atresia. É descrito também um aumento no número e na viabilidade de embriões (Chetkowski *et al*, 1991; Tummon *et al*, 1992), e também nas taxas de gravidez (Chetkowski *et al*, 1989; Abdalla *et al*, 1990; Polson *et al*, 1991; Hughes *et al*, 1992). Não está descrito um aumento no risco de anormalidades cromossômicas (Tejada *et al*, 1991) e a taxa de aborto é aparentemente menor (Abdalla *et al*, 1990) ou igual (Homburg *et al*, 1990) ao observado em ciclos sem uso dos análogos.

Um dos pontos que ainda continua pouco estudado é o efeito dos análogos durante a fase lútea. Smitz *et al*. (1988) demonstraram que pacientes submetidas a tratamento com fertilização *in vitro* (FIV), com GnRHa e HMG, e sem suporte de fase lútea, apresentavam fase lútea inadequada. Os mesmos autores (Smitz *et al*, 1992) posteriormente demonstraram que o efeito do GnRHa persiste até a fase lútea, conforme demonstrado pela avaliação dos níveis séricos de LH e FSH. A partir de ambos estudos, pôde-se demonstrar a necessidade de se suplementar a fase lútea com progesterona ou gonadotrofina coriônica humana (hCG). O que ainda persiste sem resposta é se esse efeito dos análogos do GnRH sobre a fase lútea teria alguma interferência sobre os resultados de gestação.

O intervalo de tempo decorrido entre o início da dessensibilização hipofisária e a indução da maturação oocitária pelo hCG, varia de acordo com cada paciente. No caso do uso de análogos do GnRH de depósito (ação prolongada) o tempo em que o mesmo permanece ativo na fase lútea também será variável. Conseqüentemente, esta diferença no tempo de ação, na fase lútea, poderia ser um fator a interferir nas

taxas de gestação. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se o efeito prolongado da ação dos análogos do GnRH de depósito, na fase lútea, em ciclos de reprodução assistida, apresentaria interferência sobre as taxas de gestação.

Materiais e Métodos

Foram analisados retrospectivamente 367 ciclos de reprodução assistida para tratamento de infertilidade conjugal realizados na Clínica ORIGEN (Belo Horizonte – MG), no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2000. Foram incluídos no estudo somente os casos em que foram utilizados análogos de depósito (Goserelin 3,6 mg – Zoladex – Zeneca – Brasil), para supressão da função hipofisária pelo protocolo longo. Todas as pacientes foram submetidas à propedêutica completa para infertilidade e, apenas aquelas que apresentaram níveis séricos do hormônio folículo-estimulante (FSH) < 15 mUI/ml, no terceiro dia do ciclo menstrual, foram incluídas no estudo. Para os casais que apresentaram contagem de espermatozoides $< 2,5 \times 10^6$ no dia da inseminação, foi realizada a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Indução da Ovulação

O tratamento era iniciado com a administração subcutânea de 3,6 mg de análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa – Goserelin – Zoladex – Zeneca – Brasil) para supressão da função hipofisária (protocolo longo), tanto no 2º quanto no 21º dia do ciclo menstrual (Geber *et al*, 2002). O bloqueio da função hipofisária era confirmado quando a paciente apresentava níveis séricos de estradiol (E_2) < 30 pg/ml e espessura endometrial < 3 mm à ultra-sonografia endovaginal. Todas as pacientes realizavam ambos exames a partir de 10 dias após a aplicação do GnRHa. Uma vez confirmada a supressão hipofisária, as pacientes eram consideradas aptas para iniciar a indução da foliculogênese. Se elas ainda não estivessem prontas, a dosagem do E_2 sérico e o ultra-som eram repetidos a cada 2 dias até que a supressão fosse alcançada.

A indução da superovulação era feita com doses diárias de gonadotrofinas humanas (hMG – Pergonal – Serono – Brasil) durante 4 dias, seguido por FSH recombinante (rFSH – Puregon – Organon – Brasil). A dose inicial de hMG era definida de acordo com a idade da paciente e ajustada de acordo com a resposta ovariana, monitorizado através de ultra-sonografia endovaginal (Tosbee – Toshiba – Japão) e dosagem do E_2 sérico. Para todas as pacientes foram utilizados os mesmos critérios. A indução da maturação oocitária era provocada utilizando-se o 10.000 UI de hCG (Profasi – Serono – Brasil) quando no mínimo dois folículos atingiam pelo menos 17mm de diâmetro com níveis concordantes de E_2 .

Fertilização in vitro, ICSI e Transferência de Embriões

A captação oocitária era realizada aproximadamente 34 horas após a administração do hCG, por aspiração guiada por ultrassom vaginal. Os oócitos eram inseminados aproximadamente 5 horas depois (Dia 0), tanto pela técnica clássica de FIV com aproximadamente 30.000 espermatozoides móveis/oócito, quanto por ICSI. O preparo do sêmen era feito pela técnica de *Swim up*. A micromanipulação era realizada sobre uma placa aquecedora colocada em um microscópio invertido com aumento de 400 vezes (Nikon Diaphot – Japão), adaptado com um par de micromanipuladores hidráulicos e controle elétrico (Narishige – Japão). Um único espermatozoide era aspirado pela pipeta de injeção, a partir de uma gota de meio de cultura tamponado (HEPES-buffered Earle's balanced salt solution – Sigma – USA), contendo 10% de polyvinylpirolidone (PVP – Irvine – USA). Os oócitos eram mantidos em uma pipeta de sustentação, enquanto a pipeta de injeção era empurrada através da zona pelúcida para dentro do citoplasma, e um único espermatozoide era então injetado.

No dia seguinte, 17 – 19 horas após a inseminação (Dia 1), os oócitos eram checados para se confirmar a fertilização, através da presença de dois pró-núcleos. Os embriões foram cultivados em gotas de 20 ml de solução balanceada de Earle (EBSS – Sigma) acrescida de 10% de soro sintético a 37°C em placa de Petri (Falcon – BD – USA), coberto com óleo mineral (Sigma), em mistura gasosa contendo 5% de CO₂ (Geber & Sampaio, 1999). No dia 2 ou 3 após a captação oocitária, os embriões eram examinados e, no máximo, 4 eram selecionados para a transferência, dependendo da idade da paciente. No caso da transferência ser realizada em estágio de blastocisto, os embriões eram transferidos para o meio S2 (Scandinavian IVF – Sweeden) até o 5º dia, quando um máximo de 3 blastocistos eram transferidos (Sampaio & Geber, 2001).

O suporte de fase lútea era feito com progesterona vaginal (Utrogestan – França – 600mg/dia) por 12 dias. O nível sérico de hCG era dosado 12 dias após a transferência dos embriões. A confirmação da gravidez era feita através de ultrassonografia endovaginal duas e quatro semanas depois. Todas as gestações foram seguidas por, pelo menos, 20 semanas.

Efeito dos Análogos do GnRH na Fase Lútea

Para fins de cálculo da duração do efeito dos análogos do GnRH na fase lútea, contamos o número de dias desde a sua administração até 2 dias depois do uso do hCG (momento que iniciou-se o suporte de fase lútea). O número de dias encontrado foi subtraído de 40, partindo-se do princípio de que esta é a duração máxima do análogo (Perry & Brogden, 1996).

Este valor obtido correspondeu ao número de dias em que o GnRHa permaneceu ativo na fase lútea. Assim, para fins de comparação, as pacientes foram separadas em 3 Grupos, de acordo com o tempo de ação dos análogos na fase lútea: Grupo 1: ≤ 6 dias; Grupo 2: 7 a 12 dias e Grupo 3: > 12 dias. Os dados analisados e comparados foram: idade, causa da infertilidade, número de ampolas utilizadas, número de folículos, número de oócitos obtidos, número de embriões transferidos e taxa de gravidez.

Análise Estatística

Para a análise estatística, foram utilizados o teste t de student para as variáveis contínuas e o qui quadrado para as variáveis dicotômicas (gravidez). Os resultados são apresentados por média ± desvio-padrão. Todos os resultados foram considerados significativos para uma probabilidade de significância inferior a 5% (p < 0,05), tendo, portanto, pelo menos 95% de confiança nas conclusões apresentadas.

Resultados

O número total de pacientes analisadas foi de 367, sendo que 53 estavam no Grupo 1, 118 no Grupo 2 e 196 no Grupo 3. A idade média das pacientes foi de: Grupo 1 – 33,8 ± 4,55 anos (23-44 anos); Grupo 2 – 33,7 ± 4,5 anos (24-44 anos) e Grupo 3 – 33,7 ± 4,4 anos (23-43 anos), (diferença não significativa). Dentre as causas de infertilidade apresentadas pelas pacientes, o fator masculino foi o mais prevalente em todos os grupos, e não identificamos diferença significativa entre os grupos quando analisamos as diferentes causas de infertilidade.

O número médio de ampolas utilizadas para indução da foliculogênese também não foi diferente estatisticamente (p > 0,05), sendo de 47,8 ± 14,2 (variação de 24 a 86) no Grupo 1; 44,2 ± 10,4 (variação de 23 a 80) no Grupo 2; e 42,5 ± 10,1 (variação de 16 a 66) no Grupo 3. O tempo de indução da foliculogênese, em dias, também foi semelhante nos três grupos, isto é, no grupo 1 foi de 12,08 ± 1,45 (variação de 8 a 15); no grupo 2 de 11,9 ± 1,34 (variação de 8 a 16) e no grupo 3 de 11,7 ± 1,48 (variação de 8 a 16). O número médio de folículos observados ao ultrassom no dia da administração do hCG foi de: Grupo 1: 9,3 ± 5,6 (variação de 1 a 31); Grupo 2: 11,1 ± 6,15 (variação de 3 a 32) e Grupo 3: 11,2 ± 5,2 (variação de 2 a 20) (não significativa). Com relação ao número de oócitos aspirados, também não identificamos diferença estatisticamente significativa. No Grupo 1 foram encontrados 11,1 ± 6,5 (variação de 2 a 33) oócitos; no Grupo 2, 12,7 ± 7,8 (variação de 2 a 35) e no Grupo 3, 13,8 ± 7,4 (variação de 3 a 35).

A média de embriões transferidos foi a única variável que apresentou diferença significativa entre os Grupos. No Grupo 1 tivemos uma média de $3,05 \pm 1,3$ embriões (variação de 1 a 4); no Grupo 2, $3,2 \pm 1,3$ embriões (variação de 1 a 4); e no Grupo 3, $3,41 \pm 1,3$ embriões (variação de 1 a 4). A diferença foi significativa, entretanto, quando comparados os Grupos 1 e 3, sendo o Grupo 2 semelhante aos demais. Não houve diferença entre os 3 grupos com relação ao dia da transferência embrionária, isto é, a proporção foi semelhante nos 3 grupos de embriões transferidos nos dias 2, 3 ou 5.

Com relação à taxa de gravidez, novamente não observamos diferença significativa entre os três Grupos. As taxas de gestação foram de 45,2%, 38,9% e 47,4%, respectivamente, para os Grupos 1, 2 e 3.

Discussão

Entendemos que este é o primeiro estudo que avalia clinicamente os efeitos dos análogos do GnRH de ação prolongada sobre a fase lútea de ciclos de FIV, com suporte de progesterona e suas conseqüências nas taxas de gestação. Mais ainda, comparamos se diferentes períodos de tempo de ação, poderiam ter ações diferentes nestas taxas.

A introdução do uso dos análogos do GnRH em ciclos de Reprodução Assistida trouxe diversos benefícios para o tratamento da infertilidade, culminando com o aumento nas taxas de gestação. Seu uso, entretanto, criou uma inadequação da fase lútea descrita por Smitz *et al.* (1987) e Smitz *et al.* (1988). Assim, diversos protocolos para se avaliar a necessidade de se suplementar a fase lútea, foram propostos. Ficou demonstrado, em todos os casos, que este suporte era benéfico para o tratamento, quando associado a indução com análogos do GnRH e gonadotrofinas (Soliman *et al.*, 1994).

O motivo mais provável para explicar essa inadequação da fase lútea seria a ausência de estímulo do LH para as células luteinizadas derivadas das células da teca, que produzem estrogênio e progesterona. Essa ausência seria responsável pela diminuição nas concentrações séricas desses hormônios observadas 8 dias após a injeção de hCG.

Outro fator importante seria o efeito direto dos análogos sobre a função do corpo lúteo sugerida por Pellicer & Miro (1990) e Brus *et al.* (1997). Esse efeito seria mediado por receptores presentes nas células da granulosa e da teca (Peng *et al.*, 1994). Até o momento, não existe consenso na literatura se haveria ou não, algum efeito inibitório na esteroidogênese. Pellicer & Miro (1990) e Brus *et al.* (1997), descreveram uma diminuição na produção dos esteróides ovarianos pelas células da granulosa e da teca, em ensaios realizados *in vitro*. Por outro lado, em estudos também realizados *in vitro*, Casper *et al.*

(1982) e Dodson *et al.* (1988) não confirmaram estes achados. A alteração na fase lútea após o uso dos análogos, por sua vez, pode interferir negativamente e de forma crucial no preparo endometrial para a implantação embrionária. Assim, alterações nas secreções de estrogênio e progesterona produzem um desequilíbrio, atrasando a maturação endometrial. Esse atraso, entretanto, não foi observado em pacientes que utilizaram suplementação de fase lútea (Bourgain *et al.*, 1994). De forma semelhante ao observado nos ovários, o efeito dos análogos do GnRH pode ser responsável por ações diretas nas células endometriais, uma vez que a expressão do RNA mensageiro do GnRH foi encontrada no tecido endometrial, principalmente na fase lútea (Dong *et al.*, 1998; Raga *et al.*, 1998).

O uso dos análogos do GnRH também não interfere na qualidade dos embriões (Benshushan, 1993) ou na evolução de gestações mesmo se usado em suas primeiras semanas de evolução (Wilshire, 1993; Taskin, 1999). Também foi demonstrado que o desenvolvimento físico, neurológico e mental de crianças nascidas após métodos de fertilização *in vitro* usando análogos de GnRH não difere do de crianças nascidas de gestações espontâneas (Ron-El, 1994).

Nosso estudo demonstrou que o tempo de exposição aos análogos do GnRH não interfere com os resultados clínicos de gravidez em ciclos de Reprodução Assistida, com suplementação de fase lútea com progesterona. Estes achados, inéditos na literatura, sugerem uma ausência de efeitos negativos diretos, desta medicação, sobre implantação.

Além disso, observamos uma tendência a um aumento nas taxas de gestação quando o efeito dos análogos do GnRH se mantinha por mais de 12 dias durante a fase lútea, suplementada com progesterona. Este achado sugere um possível benefício do efeito prolongado dos análogos em ciclos de Reprodução Assistida. Este aumento, entretanto, não foi significativo, sendo necessários estudos com maior número de pacientes para se comprovar esses resultados.

Resumo

Introdução: O uso dos análogos do GnRH em ciclos de reprodução assistida foi um importante marco para facilitar a técnica e melhorar os resultados. Diversos tipos de análogos têm sido utilizados, desde os de aplicação diária até os de efeito prolongado. Neste caso, a possibilidade de haver uma ação sobre a fase lútea pode ser aventada.

Objetivos: Avaliar se o efeito prolongado dos análogos do GnRH de depósito, utilizados em ciclos de reprodução assistida, apresenta algum efeito sobre as taxas de gestação pela sua ação durante a fase lútea.

Material e Métodos: Foram analisadas retrospectivamente 367 pacientes submetidas a ciclos de reprodução assistida para tratamento de infertilidade, no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2000, e que estavam em uso de 3,6 mg de Goserelin (Zoladex – Zeneca – Brasil) para supressão da função hipofisária. As pacientes foram separadas em 3 grupos de acordo com o tempo de ação dos análogos sobre a fase lútea: Grupo 1, ≤ 6 dias; Grupo 2, 7 a 12 dias e Grupo 3, > 12 dias. Foram analisados também, a resposta ovariana, a idade, número de embriões transferidos e taxa de gravidez de cada grupo.

Resultados: O grupo 1 apresentou 53 pacientes com idade média de 33,8 anos (variação de 23-44 anos); uma média de 3,05 embriões transferidos, e uma taxa de gestação de 45,2%; O grupo 2 apresentou 118 pacientes com idade média de 33,5 anos (variação de 24 a 44a); uma média de 3,2 embriões transferidos, e uma taxa de gestação de 38,9%; O grupo 3 apresentou 196 pacientes com idade média de 33,8 anos (variação de 23 a 43a); uma média de 3,41 embriões transferidos, e uma taxa de gestação de 47,4% ($p=0,89$)

Conclusões: Nosso estudo demonstrou uma tendência a se ter um aumento nas taxas de gestação quando o efeito dos análogos do GnRH se mantêm por mais de 6 dias durante a fase lútea. Este achado demonstra um possível benefício em se utilizar os análogos de depósito durante tratamento com técnicas de fertilização in vitro. Esse aumento, entretanto, não foi significativo, sendo necessários estudos com maior número de pacientes para se comprovar esses resultados.

Palavras-chave: *análogos do GnRH/fertilização in vitro/gravidez/fase lútea.*

Referências Bibliográficas

1. Abdalla HI, Ahuja KK, Leonard T, Morris NN, Honour JW, Jacobs HS: Comparative trial of luteinizing hormone-releasing hormone analog/human menopausal gonadotropin and clomiphene citrate/human menopausal gonadotropin in an assisted conception program. *Fertil Steril*, 53(3):473-8, 1990.
2. Benshushan A, Ezra Y, Simon A, Mordel N, Lewin A, Laufer N: The effect of gonadotropin-releasing hormone agonist on embryo quality and pregnancy rate following cryopreservation. *Fertil Steril*, 59(5):1065-9, 1993.
3. Bourgain C, Smitz J, Camus M: Human endometrial maturation is markedly improved after luteal supplementation of gonadotrophin-releasing hormone analogue/human menopausal. *Gonadotrophin stimulated cycles. Hum Reprod*, 9:32, 1994.
4. Brus L, Lambalk CB, Koning J: Specific gonadotropin-releasing hormone analogue binding predominantly in human luteinized follicular aspirates and not in human pre-ovulatory follicles. *Hum Reprod* 12:769, 1997.
5. Casper RF, Erickson G, Rebar R: The effect of luteinizing hormone-releasing factor and its antagonist on cultured human granulosa cells. *Fertil Steril*, 37:406, 1982.
6. Chetkowski RJ, Kruse LR, Nass TE: Improved pregnancy outcome with the addition of leuprolide acetate to gonadotropins for in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 52(2):250-5, 1989.
7. Chetkowski RJ, Rode RA, Burrue V, Nass TE: The effect of pituitary suppression and the women's age on embryo viability and uterine receptivity. *Fertil Steril*, 56(6):1095-103, 1991.
8. Dodson WC, Hughes CL, Whitesides DB, Haney AF: The effect of leuprolide acetate on ovulation induction with human menopausal gonadotropins in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 65(1):95-100, 1987.
9. Dodson WC, Myers T, Morton PC: Leuprolide Acetate: Serum and follicular fluid concentration and effects on human fertilization, embryo growth, and granulosa-luteal cell progesterone accumulation in vitro. *Fertil Steril*, 50:612, 1988.
10. Dong KW, Marcelin K, Hsu MI: Expression of gonadotropin-releasing hormone gene in human uterine endometrial tissue. *Mol Hum Reprod*, 4:893, 1998.
11. Filicori M, Flamigni C, Cognigni GE, Falbo A, Arnone R, Capelli M, Pavani A, Mandini M, Calderoni P, Brondelli L: Different gonadotropin and leuprolide ovulation induction regimens markedly affect follicular fluid hormone levels and folliculogenesis. *Fertil Steril*, 65(2):387-93, 1996.
12. Fleming R, Coutts JR: LHRH analogues for ovulation induction, with particular reference to polycystic ovary syndrome. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol. Sep*;2(3):677-87, 1988.
13. Geber S, Sales L, Sampaio MAC: Comparison between a single dose of goserelin (depot) and multiple daily doses of leuprolide acetate for pituitary suppression in IVF treatment: A clinical endocrinological study of the ovarian response. *J. Assist.Reprod. Genet.* 19:293-298, 2002.
14. Geber S, Sampaio M: Blastomere development after embryo biopsy: A new model to predict embryo development and to select for transfer. *Hum. Reprod.* 14: 782-6, 1999.
15. Homburg R, Eshel A, Kilborn J, Adams J, Jacobs HS: Combined luteinizing hormone releasing hormone analogue and exogenous gonadotrophins for the treatment of infertility associated with polycystic ovaries. *Hum Reprod*, 5(1):32-5, 1990.
16. Hughes EG, Fedorkow DM, Daya S, Sagle MA, Van de Koppel P, Collins JA: The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril*, 58(5):888-96, 1992.
17. Lejeune B, Barlow P, Puissant F, Delvigne A, Vanrysselberge M, Leroy F: Use of buserelin acetate in an in vitro fertilization program: a comparison with classical clomiphene citrate-human menopausal gonadotropin treatment. *Fertil Steril*, 54(3):475-81, 1990.
18. Leyendecker G, Wildt L: Induction of ovulation with chronic intermittent (pulsatile) administration of Gn-RH in women with hypothalamic amenorrhoea. *J Reprod Fertil*, 69(1):397-409, 1983.
19. Meldrum D: GnRH agonists as adjuncts for in vitro fertilization. *Obstet Gynecol Surv*, 44(5):314-6, 1989.
20. Meldrum DR, Tsao Z, Monroe SE, Braunstein GD, Sladek J, Lu JK, Vale W, Rivier J, Judd HL, Chang RJ: Stimulation of LH fragments with reduced bioactivity following GnRH agonist administration in women. *J Clin Endocrinol Metab*, 58(4):755-7, 1984.
21. Mortola JF, Sathanandan M, Pavlou S, Dahl KD, Hsueh AJ, Rivier J, Vale W, Yen SS: Suppression of bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone levels by a potent gonadotropin-releasing hormone antagonist: pharmacodynamic studies. *Fertil Steril*, 51(6):957-63, 1989.
22. Pellicer A, Miro F: Steroidogenesis in vitro of human granulosa-luteal cells pretreated in vivo with gonadotropin-releasing hormone analogs. *Fertil Steril* 54:590, 1990.
23. Peng C, Fan NC, Ligier M: Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 135:1740, 1994.
24. Perry CM, Brogden RN: Goserelin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in benign gynaecological disorders. *Drugs*, 51:2, 319-46, 1996.
25. Polson DW, MacLachlan V, Krapez JA, Wood C, Healy DL: A controlled

- study of gonadotropin-releasing hormone agonist (buserelin acetate) for folliculogenesis in routine in vitro fertilization patients. *Fertil Steril*, 56(3):509-14, 1991.
26. Raga F, Casan EM, Kruessel JS. Quantitative gonadotropin-releasing hormone gene expression and immunohistochemical localization in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biol Reprod*. 59:661, 1998.
 27. Ron-El R, Lahat E, Golan A, Lerman M, Bukovsky I, Herman A: Development of children born after ovarian superovulation induced by long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist and menotropins, and by in vitro fertilization. *Pediatr*, 125(5 Pt 1):734-7, 1994.
 28. Rutherford AJ, Subak-Sharpe RJ, Dawson KJ, Margara RA, Franks S, Winston RM: Improvement of in vitro fertilisation after treatment with buserelin, an agonist of luteinising hormone releasing hormone. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 25: 296(6639):1765-8, 1988.
 29. Sampaio M, Geber S. Births after transfer of zona free blastocysts in oocyte donation cycles. *J. Assist. Reprod. Genet*. 18: 156-9, 2001.
 30. Smits J, Devroey P, Braeckmans P. Management of failed cycles in an IVF/ GIFT programme with the combination of a GnRH analogue and hMG. *Hum Reprod*, 2:309, 1987.
 31. Smits J, Erard P, Devroey P, Camus M, Tournaye H, Wisanto A, Van Steirteghem AC. Pituitary gonadotrophin secretory capacity during the luteal phase in superovulation using GnRH-agonists and HMG in a desensitization or flare-up protocol. *Hum Reprod*, 7:1225-1229, 1992.
 32. Soliman S, Daya S, Collins J. The role of luteal phase support in infertility treatment: A meta-analysis of randomized trials. *Fertil Steril*, 61:1068, 1994.
 33. Stanger JD, Yovich JL: Reduced in-vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. *Br J Obstet Gynaecol*, 92(4):385-93, 1985.
 34. Tan SL, Kingsland C, Campbell S, Mills C, Bradfield J, Alexander NI, Yovich J, Jacobs HS: The long protocol of administration of gonadotropin-releasing hormone agonist is superior to the short protocol for ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 57(4):810-4, 1992.
 35. Taskin O, Gokdeniz R, Atmaca R, Burak F: Normal pregnancy outcome after inadvertent exposure to long-acting gonadotrophin-releasing hormone agonist in early pregnancy. *Hum Reprod*, 14(5):1368-71, 1999.
 36. Tejada MI, Mendoza R, Corcostegui B, Benito JA: Chromosome studies in human unfertilized oocytes and uncleaved zygotes after treatment with gonadotropin-releasing hormone analogs. *Fertil Steril*, 56(5):874-80, 1991.
 37. Tummon IS, Daniel SA, Kaplan BR, Nisker JA, Yuzpe AA: Randomized, prospective comparison of luteal leuprolide acetate and gonadotropins versus clomiphene citrate and gonadotropins in 408 first cycles of in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 58(3):563-8, 1992.
 38. Wilshire GB, Emmi AM, Gagliardi CC, Weiss G: Gonadotropin-releasing hormone agonist administration in early human pregnancy is associated with normal outcomes. *Fertil Steril*, 60(6):980-3, 1993.