



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MÔNICA CANÊDO SILVA MAIA

**USO DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE RECOMBINANTE EM
CICLOS DE FERTILIZAÇÃO ASSISTIDA**

**Goiânia
2015**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Mônica Canêdo Silva Maia		
E-mail:	monicalabrep@bol.com.br		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor:	Hospital das Clínicas – UFG		
Agência de fomento:	Nenhuma	Sigla:	
País:	Brasil	UF:	GO
		CNPJ:	
Título:	Uso do hormônio luteinizante recombinante em ciclos de fertilização assistida		
Palavras-chave:	estimulação ovariana, fertilização <i>in vitro</i> , hormônio luteinizante recombinante, suplementação com LH		
Título em outra língua:	Use of recombinant luteinizing hormone in assisted reproduction cycles		
Palavras-chave em outra língua:	ovarian stimulation, <i>in vitro</i> fertilization, recombinant luteinizing hormone, supplementation LH		
Área de concentração:	Dinâmica do Processo Saúde-Doença		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	03/12/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Ciências da Saúde – Faculdade de Medicina		
Orientador (a):	Dr. Mário Silva Approbato		
E-mail:	approbato.m@gmail.com		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 03 / 12 / 2015

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

MÔNICA CANÊDO SILVA MAIA

**USO DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE RECOMBINANTE EM
CICLOS DE FERTILIZAÇÃO ASSISTIDA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Mário Silva Approbato

**Goiânia
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Maia, Mônica Canêdo Silva
Uso do hormônio luteinizante recombinante em ciclos de fertilização
assistida [manuscrito] / Mônica Canêdo Silva Maia. - 2015.
XV, 101 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Mário Silva Approbato.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de
Medicina (FM) , Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Cidade de Goiás, 2015.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas.

1. Estimulação ovariana. 2. Fertilização in vitro. 3. Hormônio luteinizante recombinante. 4. Suplementação com LH. I. Approbato, Mário Silva , orient. II. Título.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: Mônica Canêdo Silva Maia

Orientador: Prof. Dr. Mário Silva Approbato

Membros:

1. Dr. Mário Silva Approbato - Presidente

2. Dra. Eliane Gouveia de Moraes Sanchez - Membro

3. Dra. Liliane da Rocha Siriano - Membro

4. Dr. Maria Alves Barbosa - Membro

5. Dra. Valeriana de Castro Guimarães - Membro

OU

6. Dra. Patrícia Leão da Silva Agostinho - Suplente

7. Dr. Hugo Machado Sanchez - Suplente

Data: 03/12/2015

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais Anísio e Maria da Penha,
pelos ensinamentos e, principalmente,
pelo exemplo de vida.*

*Aos meus tesouros Laura e Weber,
que são o sentido da minha vida. Amo
vocês com toda a força do mais puro
sentimento que existe em mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades. Agradeço por me dar o dom da vida e por colocar em meu caminho as provas necessárias ao meu amadurecimento intelectual, moral e espiritual.

Ao Professor Dr. Mário Silva Approbato pela atenção, disposição, leitura atenta e criteriosa na orientação deste trabalho.

À minha filha, Laura, que tem me transformado a cada instante, me estimulando a ser uma pessoa melhor e mais humana... Uma criança compreensível, inteligente, companheira. Obrigada filhinha, cada gesto, cada suspiro seu foi motivação para superar os obstáculos.

Ao meu sobrinho, afilhado e filho do coração Weber. Meu companheiro e amigo. Desejo tanto que você seja feliz, que realize seus sonhos. Saiba que estarei sempre ao seu lado!

Ao meu amor, João Paulo, obrigada por fazer parte da minha vida e, especialmente, por me proporcionar a experiência da maternidade.

À minha irmã, Ana Paula, que é parte do meu corpo e minha alma e a quem amo indefinidamente.

Aos meus pais, Anísio e Maria da Penha, pelos ensinamentos que formaram o meu caráter e minha vontade de lutar para tentar sempre ser alguém melhor, e por serem sempre os anjos que Deus me deu para superar as minhas dificuldades nesta vida! Mãe agradeço pelas orações, por entender meus desabafos, meus medos, minhas angústias, por sempre querer minha felicidade, por ser para mim um exemplo de garra, força, um exemplo de mulher. Essa vitória é nossa!

Aos meus sobrinhos: Maria Clara e Matheus. São pequenos no tamanho, mas grandes espíritos de luz que vieram reforçar a certeza de que estamos no caminho certo.

Ao meu sogro Zanone e meus cunhados Vanessa, Hostílio e Érica, meu muito obrigada pela amizade.

Meu cunhado preferido, Henrique, obrigada por fazer minha irmã tão feliz e ser um pai para o Weber.

À minha caçulinha Liliquinha que me fez companhia nas noites afora, demonstrando fidelidade e disponibilidade, através de seu silêncio que me dizia tudo o que eu precisava saber na hora certa.

À minha avó Esperança (in memorian), tenho certeza que aonde quer que esteja deve estar muito feliz por eu ter chegado até aqui. À todos aqueles que partiram e deixaram saudades. Acredito que o reencontro é apenas uma questão de tempo...

À equipe do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFG: Marisa, Coracy, Zélia, Elisete, Vanúzia, Rodopiano, Iulla, Antônia e em especial minha companheira de longa jornada, Tatiana, obrigada por tudo!

À minha grande amiga Liliane da Rocha Siriano, amizade essa que começou antes de nos conhecermos. Te admiro muito como mulher, mãe e profissional.

À fonoaudióloga Valeriana de Castro Guimarães, agradeço pela troca de experiências e pela amizade

Às amigas que fiz ao longo do doutorado: Eliamar de Barros Fleury, Eliane Sanchez, Christiane Giviziez. Adoro vocês!

Às pacientes do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFG que jamais desistam de seu sonho: o de ser mãe!

**"Se tiver que amar, ame hoje.
Se tiver que sorrir, sorria hoje.
Se tiver que chorar, chore hoje.
Pois o importante é viver hoje.
O ontem já foi e o amanhã talvez não venha."**

(Chico Xavier)

FIGURAS E TABELAS	xi
SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 HISTÓRICO	19
2.2 FISIOLOGIA DO CICLO OVULATÓRIO	20
2.2.1 Hipotálamo	21
2.2.2 Hipófise	22
2.2.3 Ciclo ovariano	23
2.3 INDUÇÃO DA OVULAÇÃO	25
2.3.1 Contraceptivos orais combinados no ciclo prévio à indução	26
2.3.2 Citrato de clomifeno e letrozol	27
2.3.3 FSH recombinante	28
2.3.4 Corifolitrofina alfa	29
2.3.5 Hormônio coriônico gonadotrópico recombinante versus urinário	30
2.3.6 Agonistas do GnRH	31
2.3.7 Antagonistas do GnRH	33
2.3.8 LH recombinante	33
3. OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35

4. METODOLOGIA	36
4.1 CASUÍSTICA	36
4.2 GRUPO DE ESTUDO	36
4.3 PROCEDIMENTOS	36
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	41
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	41
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4.7 ASPECTOS ÉTICOS	42
5. RESULTADOS	43
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICES E ANEXOS	61
Apêndice A. ARTIGO 1 – Use of recombinant luteinizing hormone for controlled ovarian hyperstimulation in infertile patients	62
Apêndice B. ARTIGO 2 – Efeitos da suplementação com hormônio luteinizante recombinante na estimulação ovariana controlada em um protocolo com antagonista de GnRH	72
Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	87
Anexo 2. Normas para Publicação do JBRA Assisted Reproduction	91
Anexo 3. Normas para Publicação da Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB)	97

FIGURAS E TABELAS

Figura 1	O hipotálamo e a hipófise	22
Figura 2	Ciclo ovariano	24
Figura 3	Ovócito com pronúcleos	40
Figura 4	Desenvolvimento embrionário	40
Figura 5	Distribuição das pacientes segundo a taxa de fertilização	44
Figura 6	Distribuição das pacientes segundo a taxa de clivagem embrionária	45
Figura 7	Distribuição das pacientes segundo a taxa de gravidez química	46
Figura 8	Distribuição das pacientes segundo a taxa de gravidez clínica	46
Tabela 1	Distribuição das pacientes segundo características gerais	43
Tabela 2	Distribuição das pacientes segundo características ovocitárias	44

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
BCF	Batimentos cardíacos fetais
DP	Desvio-padrão
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
FSH	Hormônio folículo estimulante altamente purificado
FSHu	Hormônio folículo estimulante urinário
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HC/UFG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás
hMG	Gonadotrofina menopausada humana
HHO	Hipotálamo Hipófise Ovário
IC 95%	Intervalo de confiança a 95%
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóides
IMC	Índice de massa corporal
LABREP	Laboratório de Reprodução Humana
LH	Hormônio luteinizante
LHr	Hormônio luteinizante recombinante
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
n	Número de casos

ns	Não significativa
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OR	<i>Odds Ratio</i>
p	Valor-p
PRL	Prolactina
RR	Risco relativo
SOP	Síndrome de ovários policísticos
SSM	Single Step Medium
TRAs	Técnicas de Reprodução Assistida
TSH	Hormônio tireoestimulante
ZP	Zona pelúcida
χ^2	Qui-quadrado

Introdução: A estimulação ovariana controlada tornou-se parte integrante no tratamento da infertilidade. As opções de tratamento com gonadotrofinas recombinantes adicionaram mais conhecimento da foliculogênese e esteroidogênese ovariana. O uso do hormônio luteinizante recombinante é controverso em pacientes que passam por estimulação ovariana e tem sido amplamente debatido. **Objetivo:** Comparar os efeitos da suplementação de LHr para a estimulação ovariana controlada com FSHr em um protocolo com antagonista de GnRH em ciclos de FIV/ICSI. **Métodos:** Estudo caso-controle com 113 pacientes atendidas em um centro universitário na cidade de Goiânia, idade entre 34 a 42 anos, as quais foram divididas em dois grupos de acordo com a estimulação ovariana: Grupo I (n= 60): FSHr (grupo controle) e Grupo II (n= 53): FSHr + LHr (grupo tratado). Estes grupos foram comparáveis para idade, IMC, duração da infertilidade, níveis séricos de FSH, LH e estradiol. Foram analisados número de ovócitos coletados e em metáfase II, taxa de fertilização, taxa de clivagem embrionária, taxas de gravidez química e clínica. A análise de dados foi realizada pelo programa estatístico Bioestat 5.3®. As diferenças de proporções foram avaliadas por teste de Qui-quadrado e as médias pelo teste Wilcoxon Mann-Whitney. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. **Resultados:** A média de idade das pacientes do Grupo I foi $37,3 \pm 2,1$ anos e do Grupo II de $37,9 \pm 2,4$ anos ($p > 0,05$). A comparabilidade das outras principais características (duração da infertilidade, índice de massa corporal, FSH, LH e estradiol basal) foram também observadas entre os Grupos I e II ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa entre os dois grupos em relação ao: número de ovócitos captados (Grupo I= $4,9 \pm 2,1$; Grupo II= $5,7 \pm 2,6$; $p= 0,061$), número de ovócitos em metáfase II (Grupo I= $3,4 \pm 1,6$; Grupo II= $4,0 \pm 1,9$; $p= 0,060$), taxa de fertilização (Grupo I= 65,3%; Grupo II= 69,4%; OR 1,20; IC 95% 0,85-1,70; $p= 0,282$), taxa de clivagem embrionária (Grupo I= 85,4%; Grupo II= 88,5%; OR 1,31; IC 95% 0,73-2,36; $p= 0,355$), taxa de gravidez química (Grupo I= 20,0%; Grupo II= 24,5%; OR 1,30; IC 95% 0,53-3,16; $p= 0,562$) e taxa de gravidez clínica (Grupo I= 20,0%; Grupo II= 22,6%, OR 1,17; IC 95% 0,47-2,89; $p= 0,731$). **Conclusão:** Neste estudo concluiu-se que a suplementação com LHr não demonstrou benefício em relação às variáveis analisadas durante a estimulação ovariana controlada com antagonistas de GnRH.

Palavras-chave: estimulação ovariana, fertilização *in vitro*, hormônio luteinizante recombinante, suplementação com LH

Background: Controlled ovarian stimulation has become an integral part of infertility treatment. Treatment options with recombinant gonadotrophins add more to knowledge on folliculogenesis and ovarian steroidogenesis. The role of recombinant luteinizing hormone is controversial undergoing ovarian stimulation and has been widely debated. **Objective:** To compare the effects of supplementation with recombinant luteinizing hormone (rLH) for controlled ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) in a protocol with GnRH-antagonist in cycles of IVF/ICSI. **Methods:** Case-control study with 113 patients attended at a university center in the city of Goiania, aged between 34-42 years, who were divided into two groups according to an ovarian stimulation scheme: Group I (n= 60): rFSH (control group) and Group II (n= 53): rFSH + rLH (treated group). These groups were comparable for age, BMI, duration of infertility, serum FSH, LH and estradiol. Numbers of oocytes collected and in metaphase II, fertilization rate, embryos rate and rates of chemical and clinical pregnancy were analyzed. Data analysis was conducted using the statistical software BioStat ® 5.3. Differences in proportions were assessed by chi-square test and means by Wilcoxon Mann-Whitney test. $P < 0,05$ was considered statistically significant. **Results:** The mean age of patients in Group I was 37.3 ± 2.1 years and Group II 37.9 ± 2.4 years ($P > 0.05$). The comparability of the other main characteristics (duration of infertility, BMI, FSH, LH and basal estradiol) were also observed between Groups I and II ($P > 0.05$). There was no significant difference between the two groups regarding: number of oocytes retrieved (Group I= 4.9 ± 2.1 , Group II= 5.7 ± 2.6 , $P = 0.061$), number of oocytes in metaphase II (Group I= 3.4 ± 1.6 , Group II= 4.0 ± 1.9 , $P = 0.060$), fertilization rate (Group I= 65.3%, Group II= 69.4 %, OR 1.20, 95% CI 0.85-1.70, $P = 0.282$), embryos rate (Group I= 85.4%, Group II= 88.5%, OR 1.31, 95% CI 0.73-2.36, $P = 0.355$), rate of chemical pregnancy (Group I= 20.0%, Group II= 24.5%; OR 1.30, 95% CI 0.53-3.16, $P = 0.562$) and clinical pregnancy rate (Group I= 20.0%, Group II= 22.6%, OR 1.17, 95% CI 0.47-2.89, $P = 0.731$). **Conclusion:** In this study it was concluded that supplementation with r-LH showed no benefit with respect to variables during controlled ovarian stimulation with GnRH antagonists.

Key-words: ovarian stimulation, *in vitro* fertilization, recombinant luteinizing hormone, supplementation LH

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define infertilidade como a ausência de gravidez após um ano de relações sexuais regulares sem uso de contracepção (GNOTH et al., 2005).

O tratamento reprodutivo para casais inférteis tem evoluído rapidamente desde o nascimento de Louise Brown, o primeiro bebê nascido de uma fertilização *in vitro* (FIV) (STEPTOE; EDWARDS, 1978). Novas técnicas de tratamento, novas tecnologias utilizadas em laboratório e novas medicações compõem um arsenal de opções que tem contribuído no tratamento desses casais (YOVICH, 2011).

Homens e mulheres inférteis buscam tratamentos que podem envolver desde procedimentos simples até os mais complexos, como as intervenções cirúrgicas e as técnicas de reprodução assistida (TRAs). A garantia de acesso das pessoas a esses tratamentos, segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), é uma das metas a serem atingidas até 2015 por diversos países, entre eles o Brasil (United Nations, 2000).

A estimulação ovariana é um dos passos fundamentais para o sucesso das TRAs que consiste em aumentar a exposição dos ovários às gonadotrofinas, promovendo o crescimento de múltiplos folículos ovarianos por ciclo. Além disto, o aumento da concentração das gonadotrofinas nas células da granulosa produz aumento da síntese de estradiol, fatores de crescimento e de receptores hormonais, cuja ação sinérgica torna o

ambiente folicular mais adequado para o desenvolvimento de ovócitos viáveis (MACKLON et al., 2006).

A escolha do esquema de estimulação ovariana que produza a melhor resposta folicular da maneira mais fisiológica possível é o objetivo dos especialistas que atuam em medicina reprodutiva. Os esquemas de estimulação ovariana têm sido aprimorados por meio da utilização de novas opções terapêuticas (MACKLON et al., 2006). São medicações que utilizam hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) para que o crescimento dos folículos seja completo.

Estudos indicam que a suplementação com LH recombinante (LHr) ao FSH recombinante (FSHr) é indicada durante a estimulação do desenvolvimento folicular em mulheres com hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) (HOWLES et al., 2011), mulheres que tiveram níveis séricos endógenos de LH $<1,2$ IU/l (LEHERT et al., 2014), má resposta ovariana anterior que se submeteram a monoterapia com FSHr e aquelas com idade >35 anos (ALVIGGI et al., 2006; BOSCH et al., 2011).

Apesar destes potenciais benefícios, o uso do LHr durante a estimulação ovariana é controverso e tem sido amplamente debatido (DAHAN et al., 2014; RAMACHANDRA et al., 2014).

Meta-análises anteriores sugeriram que não haveria qualquer melhoria nos resultados de gravidez com a suplementação de LHr (KOLIBIANAKIS et al., 2007; MOCHTAR et al., 2007). No entanto, um estudo com mulheres normogonadotróficas mostrou um aumento do número de ovócitos, taxa de implantação e taxa de nascidos vivos naquelas que utilizaram a suplementação com LHr (FRANCO et al., 2009).

O desenvolvimento deste estudo justifica-se pela necessidade da utilização do LHr associado ao FSHr durante a estimulação ovariana em procedimentos de reprodução assistida e sua contribuição em termos de qualidade ovocitária, clivagem embrionária e gravidez.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

O uso de gonadotrofinas humanas vem sendo feito com a finalidade de conseguir ovulação e gravidez. Gemzell et al. (1958) publicaram o primeiro caso de gravidez utilizando gonadotrofina hipofisária humana, obtida de extratos hipofisários humanos.

Lunenfeld et al. (1960) publicaram um estudo sobre a indução da ovulação e gestações em pacientes anovulatórias com gonadotrofinas humanas, obtidas da urina de mulheres menopausadas denominada gonadotrofina menopausada humana (hMG). As primeiras preparações tinham apenas 5% de pureza e continham FSH, LH e proteínas urinárias.

A partir dos anos 80, o surpreendente desenvolvimento da FIV introduziu novos conhecimentos dos mecanismos que controlam a hiperestimulação ovariana induzidas pelas gonadotrofinas (FAUSER, 1993).

Muitos protocolos de indução de ovulação foram criados, com suas vantagens e desvantagens, todos com o objetivo comum de um controle do desenvolvimento folicular através de ultrassonografias e dosagens seriadas de estradiol sérico (SCHOOT et al., 1992).

No final dos anos 80 os análogos do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) foram introduzidos nos protocolos de hiperestimulação ovariana controlada, em combinação com gonadotrofinas, depois de suas já consagradas aplicações clínicas, a partir do conhecimento dos fenômenos regulatórios do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (HHO) (BUSSO et al., 1999).

Em 1980, surgiu uma nova preparação de FSH urinário (FSHu), porém com atividade mínima de LH. Posteriormente, foi usada para a estimulação ovariana em pacientes com Síndrome de Ovários Policísticos (SOP) (FLAMIGNI, 1980), e nos programas de FIV para a produção de múltiplos folículos (SHAW et al., 1985).

Em 1993, com uma nova metodologia de extração do FSHu obteve-se o chamado FSH-HP (Metrodin HP), ou seja, o FSH altamente purificado (LUNENFELD, 2002).

A grande demanda mundial por gonadotrofinas acabou por dificultar a sua disponibilidade. Houve a necessidade de se produzi-las por outros métodos que não apenas a purificação da urina de mulheres menopausadas. Por volta de 1994 cerca de 30 milhões de litros de urina por ano eram necessários para cobrir a demanda mundial de gonadotrofinas (LUNENFELD, 2002).

Desse modo, surgiu a tecnologia de DNA recombinante, com capacidade de produzir gonadotrofinas de alta pureza, excelente eficácia, e custo relativamente igual ao das gonadotrofinas urinárias (LUNENFELD, 2002). Assim, foi possível produzir FSH, LH e hCG (gonadotrofina coriônica humana) para emprego terapêutico sem necessidade de extração de fluidos humanos (LOUMAYE et al., 1995).

2.2 FISIOLOGIA DO CICLO OVULATÓRIO

O bom funcionamento do ciclo reprodutivo depende fundamentalmente da ação de um complexo mecanismo, coordenado pelo

eixo HHO. Os sistemas nervoso e endócrino funcionam em sintonia de modo a permitir respostas de acordo com as necessidades do organismo (BECKMANN et al., 2006).

2.2.1 Hipotálamo

O hipotálamo encontra-se situado abaixo do tálamo, fazendo parte integrante do diencéfalo. É constituído fundamentalmente por substância cinzenta que se agrupa em núcleos. Entra na composição da base do terceiro ventrículo, envolvendo o quiasma óptico (ZUPAN et al., 2003).

Apesar das suas pequenas dimensões, este órgão recebe informações oriundas de todas as partes do corpo, tendo como função principal regular a ação da hipófise. Este processo ocorre pela liberação de GnRH, liberação esta que ocorre de forma pulsátil a intervalos de 70 a 90 minutos (BECKMANN et al., 2006).

A secreção hipotalâmica do GnRH pode atingir a hipófise através de duas vias: direta e indireta. A via direta é representada pelo trato hipotálamo-hipofisário que faz a comunicação entre o hipotálamo e a hipófise. A via indireta pode ocorrer de dois modos: 1) através do sistema porta-hipofisário, onde os axônios dos núcleos hipotalâmicos, que terminam nas paredes dos capilares deste sistema, liberam sua secreção que atinge então as células da adenohipófise; 2) através de alguns neurônios especiais denominados tanícitos, que seriam responsáveis pelo transporte da neurosecreção para outros neurônios ou, ainda, para o sistema porta-hipofisário (SCHWANZEL-FUKUDA & PFAFF, 1989).

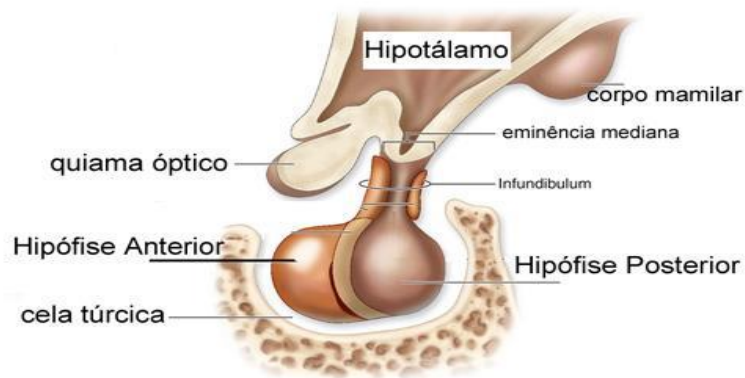


Figura 1. O hipotálamo e a hipófise (Fonte: SEELEY et al., 2003).

2.2.2 Hipófise

A hipófise corresponde à continuação do infundíbulo e, encontra-se situada na sela túrcica do osso esfenóide. Esta glândula apresenta-se dividida em duas partes com funções distintas: a neuro-hipófise ou hipófise posterior e a adeno-hipófise ou hipófise anterior. A neuro-hipófise encontra-se ligada ao hipotálamo por feixes nervosos, que provém do núcleo paraventricular e supraóptico do hipotálamo e a adeno-hipófise (ZUPAN et al., 2003).

A adeno-hipófise tem por função produzir diversos hormônios: o hormônio do crescimento (GH), a prolactina (PRL), que é essencial para o desenvolvimento da mama e para o fenômeno da lactação, o hormônio tireoestimulante (TSH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e gonadotrofinas (FSH e LH) que são fundamentais para o bom funcionamento do sistema reprodutor feminino. O FSH tem por função promover o desenvolvimento dos folículos nos ovários, a fim de um deles se transformar

num folículo de Graaf, maduro, contendo um ovócito maduro. O LH por sua vez estimula a formação do corpo amarelo nos ovários, no local de ruptura do folículo de Graaf, com a finalidade de produzir progesterona, tendo este hormônio como função proporcionar um meio adequado a implantação do ovócito fertilizado na parede do útero, devido ao aumento da circulação sanguínea do local e ao crescimento de células (HOWLES, 2000).

2.2.3 Ciclo ovariano

A partir da menarca, os ovários da mulher não grávida seguem um ciclo dividido em três fases: fase folicular, fase ovular e fase lútea. Estas fases são coordenadas por uma série de hormônios como o GnRH, FSH, LH, estrogênios e progesterona, variando as suas concentrações ao longo do ciclo ovariano (WINIKOFF; WYMELENBERG, 1997).

Observa-se na figura 2, a fase folicular é caracterizada pelo desenvolvimento dos folículos primários sob ação do FSH. Apesar de serem vários os folículos primários a iniciarem a maturação num ciclo, apenas um folículo ou dois entram em maturação, entrando os outros em processo degenerativo. Os folículos mais maduros vão libertar estrogênios e inibina, hormônios que tem por função inibir a ação do FSH sobre os outros folículos. Quando um folículo chega a sua maturidade total é denominado de folículo de Graaf. Isso ocorre graças a liberação de GnRH pelo hipotálamo no início de cada ciclo que, vai atuar sobre a hipófise para libertar o FSH que por sua vez, estimula as células granulosas a converter os androgênios em estrogênios. Quando a concentração de estrogênios atinge certa quantidade,

vai suprimir a liberação de FSH pela adeno-hipófise, mas por outro lado, vai promover o aumento da liberação de LH, já numa fase final da fase folicular, um a dois dias antes da ovulação (GANONG, 2007).

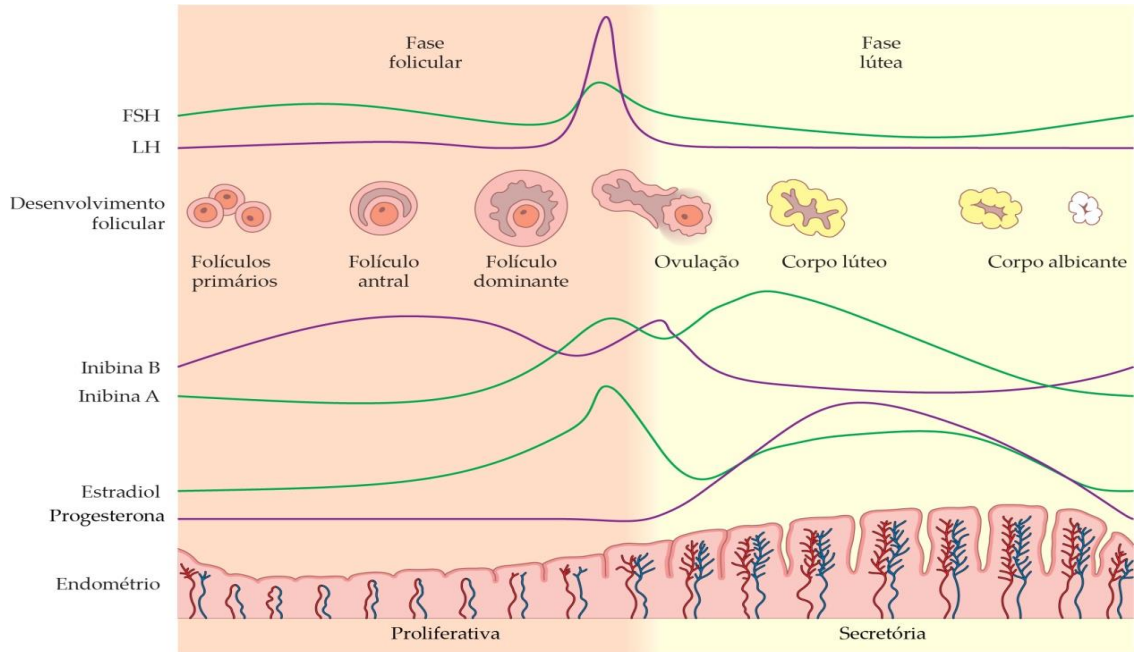


Figura 2. Ciclo Ovariano (Fonte: HALL, 2009).

Quando o folículo de Graaf atinge a sua maturação máxima ocorre a liberação do ovócito, iniciando assim a segunda fase do ciclo ovariano, a ovulação. Nessa parte do ciclo, o aumento de LH iniciado horas antes da ovulação é responsável pelo aumento da concentração de prostaglandinas e enzimas proteolíticas na parede folicular. Estas substâncias são responsáveis pela alteração da estrutura da parede folicular, facilitando a saída do ovócito por perfuração do folículo (OLIVE; PALTER, 2007).

Após a ovulação, a estrutura folicular restante é transformada no principal regulador da fase lútea que, tem como objetivo principal a produção do corpo lúteo ou corpo amarelo. Nesta última fase do ciclo ovariano os estrogênios produzidos pelo folículo decrescem e a produção de progesterona produzida pelas células do corpo amarelo aumenta, uma vez

que este hormônio vai contribuir para o fornecimento de nutrientes para a gestação. As concentrações de estrogênios e progesterona vão ter um efeito de *feedback* negativo sobre o GnRH e conseqüentemente diminuição de LH e FSH, diminuindo assim a estimulação para o recrutamento de outro folículo. Caso ocorra fecundação, a placenta irá produzir hCG que tem por função manter o corpo amarelo (SEELEY et al., 2001).

A manutenção do corpo lúteo depende da produção de LH que é mimetizado pelo hCG quando ocorre fecundação. No entanto, quando isso não ocorre o corpo lúteo degenera. Nesta fase os níveis de estrogênios e progesterona diminuem, fazendo com que os níveis de FSH e LH voltem a aumentar induzindo assim o desenvolvimento de um novo folículo (OLIVE; PALTER, 2007).

2.3 INDUÇÃO DA OVULAÇÃO

A estimulação ovariana é um dos passos fundamentais para o sucesso na aplicação das técnicas de reprodução assistida.

Vários hormônios são administrados com essa finalidade: contraceptivos orais combinados, utilizados no ciclo prévio à estimulação ovariana; citrato de clomifeno; agonistas do GnRH, utilizados para o bloqueio do HHO e também para a indução da maturação final dos folículos em ciclos de antagonistas de GnRH; antagonistas do GnRH, utilizados para o bloqueio do eixo HHO; hormônio estimulador de folículos (FSH), principal hormônio na indução da ovulação, que pode ser derivado da urina de mulheres menopausadas, recombinante e, mais atualmente, a forma recombinante de

liberação prolongada (corifolicotrofina alfa); hCG, utilizado na indução da maturação final dos oócitos, disponível na forma derivada da urina e na forma recombinante; LH, utilizado como coadjuvante na indução da ovulação, que pode ser derivado da urina de mulheres menopausadas ou recombinante; e letrozol, um modulador seletivo do receptor do estradiol, que pode também pode ser utilizado como coadjuvante na indução da ovulação (MARTINS et al., 2010).

Essas drogas podem ser utilizadas de forma isolada ou combinada, dependendo de várias características relacionadas às pacientes e aos próprios medicamentos (BUSSO et al., 2000).

2.3.1 Contraceptivos orais combinados no ciclo prévio à indução

A estimulação ovariana normalmente é iniciada nos primeiros dias do ciclo menstrual. Para facilitar o agendamento dos procedimentos, tanto para as mulheres submetidas ao tratamento quanto para os centros de reprodução assistida, contraceptivos orais combinados têm sido utilizados no ciclo prévio para programar a menstruação. Tal prática ganhou ainda mais adeptos após ter sido demonstrado que o seu uso estava relacionado a um menor número de cancelamentos do ciclo, por diminuição da presença de cistos ovarianos e supressão do eixo HHO obtendo-se menos dias de GnRH (BILJAN et al., 1998).

2.3.2 Citrato de clomifeno e letrozol

Apesar de não serem hormônios, o tamoxifeno e o letrozol são drogas utilizadas para indução da ovulação. O citrato de clomifeno é o medicamento mais comumente usado na indução da ovulação. O mecanismo de ação sobre a infertilidade ocorre através da ligação aos receptores de estrogênio no hipotálamo como agonista parcial, levando a uma inibição, o que é percebido pelo hipotálamo como uma queda dos níveis de estradiol circulantes. Em resposta, o hipotálamo estimula a hipófise a liberar gonadotrofinas, o que leva à estimulação ovariana, resultando em ovulação. Com estímulo maior há aumento do risco de gestação múltipla que pode raramente levar à síndrome de hiperestimulação ovariana. Têm sido relatados efeitos colaterais com o clomifeno, principalmente distúrbios gástricos e intestinais, fogachos, inchaço, cefaleia, tonturas, depressão e desconforto nas mamas (CASPER; MITWALLY, 2006).

Não há exame clínico ou laboratorial que possa prever com precisão, a dose necessária de citrato de clomifeno para provocar uma ovulação. A dose usual é de 50mg por dia durante cinco dias, mas na ausência de resposta deve-se acrescentar 50mg por ciclo até um máximo de 200 a 250mg por dia (FRANCO JR; SCHIMBERNI, 1985).

O letrozol faz parte da terceira geração de drogas inibidoras da aromatase, sendo bastante utilizada para o tratamento do câncer de mama devido à sua ação antiestrogênica. Sua administração durante a indução da ovulação faz diminuir a síntese ovariana de estrogênios e promove um discreto aumento dos níveis androgênicos intra-ovarianos. A hipófise, que

não é afetada pelo uso de letrozol, responde à queda nos níveis séricos de estrogênio com um aumento da liberação de FSH, estimulando o crescimento dos folículos ovarianos. Conforme os folículos vão crescendo e a produção de estrogênio aumentando, a hipófise, conforme seu mecanismo natural de *feedback*, diminui a secreção de FSH, provocando a atresia dos folículos menores e levando, geralmente, a uma ovulação única (CASPER; MITWALLY, 2006).

2.3.3 FSH recombinante

Apesar do primeiro nascimento de um humano por meio das técnicas de FIV, em 1978, ter sido obtido por meio da aspiração de um ovócito de um ciclo natural, em pouco tempo foi demonstrado que as taxas de sucesso poderiam ser significativamente melhoradas através de um estímulo multifolicular obtido com o uso de gonadotrofinas exógenas (HUGHES, 2002).

A primeira indução da ovulação com FSH foi realizada com gonadotrofinas derivadas de hipófises humanas obtidas de autópsia; entretanto, tal preparado foi retirado do mercado no final da década de 1990 (LE COTONNEC et al., 1994).

Posteriormente, o FSH utilizado para estimulação ovariana era obtido da urina de mulheres menopausadas (hMG). O principal problema encontrado no hMG é o fato de apresentar, além do FSH, também o LH, que pode ser deletério quando presente nas fases iniciais da estimulação ovariana (LE COTONNEC et al., 1994).

Para contornar tal problema, através da utilização de anticorpos monoclonais, tentou-se purificar o FSH contido na hMG, criando-se o FSH-HP, conseguindo uma pureza de 95%, muito mais elevada que o 1 a 2% encontrado no hMG. Tal pureza, reduzindo o total de proteínas, permitiu a administração por via subcutânea, apresentando farmacocinética semelhante e excelente biodisponibilidade, comparáveis com o uso do hMG intramuscular (LE COTONNEC et al., 1994).

A purificação completa só foi obtida através da tecnologia do DNA recombinante que também permitiu a produção de FSH em larga escala, sendo que, mais recentemente, foi desenvolvida até uma forma com meia-vida mais longa, capaz de levar a estimulação folicular sustentada por até uma semana, a corifolitrofina alfa, sendo necessária uma aplicação única para se obter o recrutamento folicular desejado (BAKER et al., 2009).

A dose inicial depende: da idade da paciente, do nível de FSH plasmático na fase folicular inicial, da presença ou não de anovulação crônica e da resposta prévia a estimulação (se houver). A variação da dose é feita então de acordo com as necessidades e particularidades de cada paciente (LUNENFELD et al., 2002).

2.3.4 Corifolitrofina alfa

A corifolitrofina alfa é uma molécula híbrida produzida pela tecnologia do DNA recombinante, resultante da fusão do composto protéico do FSH com o peptídeo carboxi-terminal da subunidade β do hCG. A diferença desse composto é que, devido à sua farmacocinética (dobro da meia-vida do

FSHr e o quádruplo do tempo para atingir o pico sérico), uma única dose desse composto é capaz de manter uma estimulação ovariana por sete dias (DEVROEY et al., 2009).

Um grande estudo multicêntrico, controlado com placebo e que avaliou 757 ciclos estimulados com folicitrofina alfa e 752 ciclos estimulados com FSHr, todos com bloqueio do eixo HHO feito com antagonista, demonstrou resultados muito similares para os dois grupos: a partir do oitavo dia, ambos precisaram de mais 400 UI de FSHr (média), e os ciclos tiveram uma duração mediana de nove dias. A taxa de gravidez, tanto por ciclo iniciado (39,9 *versus* 38,1% obtida com corifolitrofina alfa *versus* FSHr), quanto por transferência (43,8 *versus* 40,6%), também não foram diferentes entre os grupos (DEVROEY et al., 2009), sendo que os autores concluíram que ambos tratamentos são eficazes para induzir a estimulação ovariana e assim a corifolitrofina alfa pode ser uma opção terapêutica atrativa para a mulher que estiver se submetendo à reprodução assistida, uma vez que menos aplicações subcutâneas são necessárias.

2.3.5 Hormônio coriônico gonadotrópico recombinante versus urinário

Embora o hCG urinário seja tradicionalmente o composto utilizado como gatilho final para a maturação folicular, novas alternativas já foram propostas. O hCG recombinante (250 µg) foi comparado com o hCG urinário em dois estudos prospectivos, randomizados e duplo-cegos. Esses estudos não demonstraram diferenças entre os grupos em relação ao número de ovócitos aspirados, taxa de fertilização, clivagem, taxas de gravidez ou

síndrome de hiperestimulação ovariana. Os níveis séricos de hCG e progesterona foram mais elevados no grupo que utilizou o composto recombinante (DRISCOLL et al., 2000).

2.3.6 Agonistas do GnRH

Os primeiros análogos do GnRH surgiram a partir de substituição de aminoácidos na molécula original, descoberta em 1971 por Schally et al. (SCHALLY et al., 1971; SCHALLY, 1999). Inicialmente foi utilizado por sua capacidade anti-reprodutiva, bloqueando o eixo HHO e também em patologias ginecológicas como a endometriose e adenomiose, em miomas uterinos, SOP e mais recentemente, em patologias oncológicas (SCHALLY, 1999; MAGON, 2011). Em reprodução assistida, sua utilização em associação às gonadotrofinas exógenas trouxe a solução para um de seus problemas da indução ovariana controlada: o pico precoce de LH, que prejudicava a coleta de ovócitos em torno de 20% dos casos (ASHKENAZI et al., 1989).

Os agonistas atuam ocupando os receptores específicos de GnRH na hipófise, causando uma dessensibilização dos mesmos. Inicialmente essa medicação, ao ocupar esses receptores hipofisários, libera o FSH já produzido e armazena-os em grânulos. Em seguida, ocorre um bloqueio da produção e liberação dos hormônios hipofisários (FSH e LH). O efeito inicial de liberação do FSH acumulado é chamado de efeito “flare-up” e também pode ser usado como estímulo inicial já que esse hormônio é liberado na corrente sanguínea e pode ser aproveitado no início da indução. O bloqueio

hipofisário inicial ocorre entre 3 e 4 semanas após o início do uso da medicação e seu efeito é duradouro, podendo persistir por algumas semanas, após a interrupção do uso (MAGON, 2011).

Existem, basicamente, 2 protocolos para uso dos agonistas do GnRH em reprodução assistida: 1) protocolo longo, mais utilizado, consiste na aplicação do agonista desde a fase lútea do ciclo prévio ao ciclo de estimulação com gonadotrofinas; e 2) protocolo curto, em que o agonista é iniciado no 1º dia do ciclo de indução ovariana juntamente com as gonadotrofinas. O protocolo longo apresenta melhores resultados com maior número de folículos estimulados, ovócitos captados, embriões formados e melhores taxas de implantação e gestação (SALAT-BAROUX et al., 1988).

O protocolo curto apresenta vantagens quanto ao custo do procedimento, pois utiliza menor quantidade de gonadotrofinas e pode ser indicado àquelas mulheres más respondedoras, pois se aproveita o efeito flare-up para obtenção de maior recrutamento folicular. Além disso, os agonistas do GnRH também vêm sendo utilizados como “promovedores” de pico de LH pré-ovulatório no lugar do hCG (SALAT-BAROUX et al., 1988).

Fauser et al. (2002) observaram que o pico do LH após o uso do agonista (valor médio 118,5 UI/mL) ocorre após cerca de 4 h da sua administração, e com uso do hCG (valor médio de 240 UI/mL) é após 24 h da sua administração. Não houve diferenças na taxa de fertilização entre as duas drogas estudadas.

2.3.7 Antagonistas do GnRH

O advento dos antagonistas trouxe outra perspectiva de manuseio, pois seu uso passa a ser realizado no início da indução do ciclo. Essa medicação atua na hipófise através de um bloqueio competitivo dos receptores de GnRH e sua ação é dose dependente. Ele ocupa os receptores sem estimular a secreção de gonadotrofinas e o efeito final é a não liberação dos hormônios hipofisários, especialmente o LH. O início de ação é imediato e a duração do efeito dura em torno de 34 horas (AL-INANY et al., 2011; GILLIAM, 2011).

Os principais benefícios são: redução da dose total de gonadotrofinas e do número de dias necessários para a estimulação; redução no risco para a ocorrência da síndrome de hiperestimulação ovariana; e a possibilidade da indução da maturação final com agonistas de GnRH (TARLATZIS et al., 2006).

2.3.8 LH recombinante

O LH é essencial para a reprodução humana natural e em muitas pacientes com infertilidade tratadas com técnicas de reprodução assistida, suas concentrações são naturalmente suficientes para permitir a concepção bem sucedida. A necessidade de se adicionar LHr é um assunto de controvérsia médica (HILL et al., 2012).

A maioria das pacientes submetidas à estimulação ovariana podem com sucesso ser estimuladas com FSH exógeno isoladamente,

presumivelmente porque uma quantidade endógena suficiente de LH é produzida para se ligar com pelo menos 1% dos receptores de LH, apesar da diminuição da regulação da pituitária. Este "nível mínimo" de concentração de LH podem ser suficientes para manter normal a foliculogênese na maioria das pacientes. No entanto, ainda não está claro se a suplementação com LH fornece algum benefício em termos de melhores resultados de gravidez entre as mulheres submetidas à estimulação ovariana como parte do tratamento de reprodução assistida (CHAPPEL; HOWLES, 1991).

De acordo com os conceitos atuais da foliculogênese, o LH desempenha um papel essencial nas fases finais da maturação folicular. Uma vez que o estágio adequado do desenvolvimento folicular foi alcançado em resposta ao tratamento com FSH, as células da granulosa tornam-se receptivas ao estímulo de LH, e este torna-se capaz de exercer a sua ação sobre as células da teca e granulosa. Além disso, tem sido postulado que nesta fase, o folículo reduz a sua dependência de FSH através da aquisição de receptores de LH (HILLIER, 2001; ZELEZNIK, 2004). Assim, LH pode desempenhar um papel essencial na determinação de maturidade do ovócito e do potencial de desenvolvimento, em ciclos de FIV.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar os efeitos da suplementação de LHr para a estimulação ovariana controlada com FSHr em um protocolo com antagonista de GnRH em ciclos de FIV/ICSI.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar os seguintes parâmetros entre o grupo de pacientes que utilizaram protocolos de estimulação ovariana com e sem suplementação de LHr:

- Número de ovócitos captados;
- Taxa de maturação ovocitária (MII);
- Taxa de fertilização;
- Taxa de clivagem embrionária;
- Taxa de gravidez química;
- Taxa gravidez clínica.

4. METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

Estudo caso-controle cujos dados foram coletados a partir de procedimentos realizados no período novembro de 2013 a fevereiro de 2015.

4.2 GRUPO DE ESTUDO

A partir de registros em protocolos foram avaliadas 113 pacientes com faixa etária compreendida entre 34 a 42 anos atendidas no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (LABREP-HC/UFG). Estas pacientes foram divididas em dois grupos:

- Grupo I (n= 60): utilizaram somente FSHr (grupo controle)
- Grupo II (n= 53): utilizaram FSHr e LHr (grupo tratado)

4.3 PROCEDIMENTOS

A programação do período menstrual foi realizada com uso de contraceptivo oral (Gynera[®] - 0,075mg gestodeno e 0,03mg etinilestradiol, Bayer Schering Pharma) no ciclo prévio ao da indução da ovulação controlada.

Após avaliação basal realizada no início do ciclo menstrual, por ultrassonografia transvaginal, as pacientes foram instruídas sobre como utilizar os medicamentos prescritos.

Nas pacientes do Grupo I foi administrado FSHr (Gonal-f[®], Merk-Serono, SP, Brasil), via subcutânea, em doses de 37,5 a 225 UI. No 8^o dia de estimulação ovariana, o desenvolvimento folicular começou a ser monitorizado por ultrassonografia transvaginal, e doses de FSHr foram ajustadas de acordo com a resposta ovariana. Não foi utilizado LHr.

Nas pacientes do Grupo II foi administrado LHr (Luveris[®], Merk-Serono, SP, Brasil) 75 UI, via subcutânea, a partir do 7^o - 8^o dia do ciclo associado a 37,5 a 225 UI de FSHr. No 8^o dia de estimulação ovariana, o desenvolvimento folicular começou a ser monitorizado por ultrassonografia transvaginal, e doses FSHr foram ajustadas de acordo com a resposta ovariana.

Antagonistas (Cetrotide[®], Merk-Serono, SP, Brasil) foram utilizados na indução em ambos os grupos. Quando foram observados um ou mais folículos ≥ 18 mm, foi administrado hCG recombinante (Ovidrel[®], Merk-Serono, SP, Brasil) na dose de 250 ug promovendo a maturação final dos folículos nos ovários.

Durante toda a estimulação ovariana a paciente foi submetida a várias ultrassonografias para saber exatamente o melhor momento para marcar a aspiração dos ovócitos. A avaliação do desenvolvimento folicular foi feita pela medição do diâmetro médio dos folículos com ultrassonografia transvaginal.

Os ovócitos foram aspirados dos folículos após 36-38 h da administração de hCG recombinante e enviados ao laboratório para obtenção dos gametas. Foi realizada sedação anestésica em ambiente hospitalar.

O líquido folicular assim que recebido foi aliquotado em placas de Petri onde, sob visão microscópica os ovócitos foram identificados e classificados quanto a sua maturidade.

Foi utilizada a classificação dos ovócitos segundo o I Consenso Brasileiro de Embriologia em Medicina Reprodutiva (ESTEVES et al., 2004), baseada na descrita pela Clínica Bourn Hall (Cambridge) , como se segue:

- a. Vesícula Germinativa – Células do cúmulus e da corona aderidas ao ovócito e vesícula germinativa presente no citoplasma. O ovócito está em prófase.
- b. Ovócito Imaturo – Células da corona compactadas com células do cúmulus apresentando algum grau de dispersão. Ovócito em Metáfase I (MI).
- c. Ovócito Pré-Ovulatório – Células da corona ainda aderidas e as do cúmulus bem dispersas. O primeiro corpúsculo polar já liberado. Ovócito em metáfase II (MII).
- d. Ovócito Pós-Maduro – Corona ausente com intensa dispersão das células do cúmulus. O primeiro corpúsculo polar é ainda visível e o ovócito permanece em metáfase II.
- e. Ovócito Luteinizado – Ausência de corona e a arquitetura das células do cúmulus é representada como uma massa gelatinosa.

f. Ovócito Degenerado ou Atrésico – Cúmulus retraído com células escassas ao redor do ovócito. Podem ser identificados diferentes sinais de anormalidades como: citoplasma retraído e escurecido, vacúolos, zona pelúcida (ZP) fraturada ou rôta e ainda ZP vazia.

O sêmen passou por processo de lavagem com uma solução tampão (Dulbeco - Irvine Scientific®, USA) para que o líquido seminal fosse retirado e ocorresse a capacitação espermática pelo método swim-up (LOPATA et al., 1976). Esta técnica baseia-se na velocidade de progressão direcional dos espermatozóides. Elimina-se o plasma seminal, debris, material amorfo, células esfoliativas, espermatozóides mortos, imóveis e aqueles sem velocidade de progressão direcional.

Ao final, obtém-se uma amostra limpa contendo espermatozóides que exibem excelente motilidade. A técnica de "swim-up" recupera cerca de 20% dos espermatozóides móveis presentes no ejaculado inicial.

Caso a indicação do procedimento fosse a ICSI, os ovócitos recuperados foram retirados das células do cúmulus e da corona utilizando uma solução contendo 40 UI/ml de hialuronidase (Irvine Scientific®, USA) e os ovócitos desnudos foram classificados com base em critérios morfológicos citados anteriormente.

Os ovócitos foram então incubados até o momento da fertilização, em torno de 4 horas pós-coleta, para só então, ser realizada a inseminação, em caso de FIV ou injeção de espermatozóides, em caso, de ICSI.

Os ovócitos foram incubados em meio SSM (Irvine Scientific®, USA) com 10% de soro substituto sintético (Irvine Scientific®, USA) em

incubadoras a 37°C e 5% CO₂ por 48-120 horas para avaliação diária de sua evolução.

A taxa de fertilização corresponde ao número de ovócitos fecundados (com formação de 2 pronúcleos) em relação ao número de ovócitos inseminados, expresso em porcentagem. A fertilização foi confirmada 17 a 20 horas após a inseminação, assim que, os ovócitos quando fecundados pelos espermatozóides, apresentaram-se com 2 pronúcleos, um feminino e outro masculino.

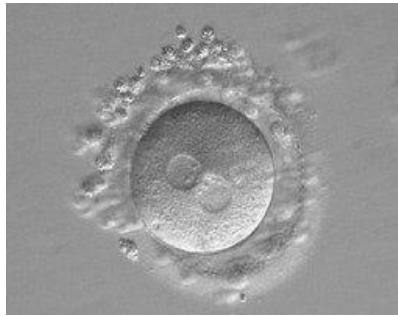


Figura 3. Ovócito com pronúcleos (Fonte: Arquivo - Laboratório de Reprodução Humana-HC/UFG).

A taxa de clivagem embrionária corresponde ao número de embriões clivados em relação ao número de ovócitos com 2 pronúcleos formados, expresso em porcentagem. Após a fertilização dos ovócitos ocorrerá a divisão/clivagem celular, dando origem aos embriões.



Figura 4. Desenvolvimento embrionário (Fonte: Arquivo - Laboratório de Reprodução Humana-HC/UFG).

Os embriões foram transferidos para o útero após 72 h de cultura com um cateter Sidney (Cook®, Indianapolis, EUA), guiada por ultrassonografia abdominal. Embriões excedentes foram criopreservados em nitrogênio líquido.

Todas as pacientes receberam suplementação da fase lútea com progesterona natural vaginal (Utrogestan®, Farmoquímica, RJ, Brasil).

Após 14 dias da transferência embrionária, foi realizada a dosagem sérica de β -HCG para avaliação de gravidez.

Algumas pacientes apresentaram β -HCG positivo (gravidez química) sem progressão. A gravidez química pode evoluir para microaborto (ou aborto bioquímico), aborto clínico ou gravidez a termo.

A taxa de gravidez clínica foi definida pela presença de saco gestacional com batimentos cardíacos fetais (BCF) presentes em ultrassonografia.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes com idade entre 34 a 42 anos;
- Pacientes com concentrações de FSH basal $\leq 9,9$ /l.

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes com ovários com diâmetro $< 3\text{cm}^3$;
- Índice de massa corporal [IMC = peso (kg) / altura (m²)] $<18,0$ e $>32,0$;
- Pacientes que realizaram mais de dois ciclos anteriormente sem sucesso de FIV ou ICSI;
- Pacientes com apenas um ovário;

- Pacientes com SOP e com oligomenorréia.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Estes grupos foram comparáveis para idade, duração da infertilidade, IMC, níveis séricos de FSH, LH e estradiol. Ficou a critério da paciente, a escolha do laboratório de análises clínicas para a realização das dosagens hormonais. Foram analisados número de ovócitos coletados, número de ovócitos em metáfase II, taxas de fertilização, taxas de clivagem embrionária e taxas de gravidez química e clínica.

A análise de dados foi realizada pelo programa estatístico Bioestat 5.3[®] (AYRES et al., 2007). Para avaliar a diferença observada entre as médias dos grupos analisados aplicou-se teste não paramétrico para comparar duas amostras independentes - Teste de Wilcoxon Mann-Whitney. Para avaliar diferenças entre proporções utilizou-se o teste Qui-quadrado. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.7 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo centro de Reprodução Humana – HC/UFG e pelo Comitê de Ética em Pesquisa – HC/UFG (Parecer nº 751.367 – Anexo 1) em 14/08/2014. Como se trata de uma pesquisa retrospectiva, não envolvendo a abordagem direta a pacientes, foi autorizado pelo Comitê de Ética a dispensa da aplicação do Termo Consentimento Livre e Esclarecido.

4. RESULTADOS

Foram analisadas 113 pacientes que procuraram tratamento para infertilidade com características que se enquadraram nos critérios de inclusão deste estudo. A idade das pacientes variou entre 34 a 42 anos sendo que, a média de idade no Grupo I foi $37,3 \pm 2,1$ anos e do Grupo II foi $37,9 \pm 2,4$ anos ($p= 0,111$). As variáveis confundidoras foram pareadas conforme tabela abaixo.

Tabela 1. Distribuição das pacientes segundo características gerais. Laboratório de Reprodução Humana /HC-UFG, Goiânia-GO, 2015.

Parâmetros	Grupo I (FSHr)	Grupo II (FSHr +LHr)	Valor de p
Idade	$37,3 \pm 2,1$	$37,9 \pm 2,4$	0,111
IMC (kg/m^2)	$23,2 \pm 2,9$	$23,1 \pm 3,0$	0,221
Duração da infertilidade (anos)	$8,2 \pm 4,9$	$8,4 \pm 4,1$	0,230
FSH basal (mUI/ml)	$6,4 \pm 2,0$	$6,6 \pm 1,9$	0,384
LH basal (mUI/ml)	$4,7 \pm 2,1$	$4,6 \pm 2,5$	0,190
Estradiol basal (pg/ml)	$45,0 \pm 22,7$	$42,3 \pm 29,4$	0,102

Valores expressos em média e Desvio padrão

Observa-se na tabela 1 que houve a comparabilidade da idade, IMC, duração da infertilidade e dos níveis basais de FSH, LH e estradiol entre os Grupos I e II (diferença estatística não significativa).

Em relação ao número de ovócitos captados, ovócitos em metáfase II, imaturos e inviáveis não se observou diferença estatística entre os dois grupos (tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das pacientes segundo características ovocitárias. Laboratório de Reprodução Humana /HC-UFG, Goiânia-GO, 2015.

	Grupo I (FSHr)	Grupo II (FSHr + LHr)	Valor de p
Ovócitos captados	4,9 ± 2,1	5,7 ± 2,6	0,061
Ovócitos metáfase II	3,4 ± 1,6	4,0 ± 1,9	0,060
Ovócitos imaturos	1,3 ± 0,8	1,6 ± 1,1	0,114
Ovócitos inviáveis	0,2 ± 0,5	0,1 ± 0,7	0,142

Valores expressos em média e Desvio padrão

Na figura 5, observou-se que dos 294 ovócitos viáveis do Grupo I, 192 (65,3%) foram fertilizados. Já no Grupo II, dos 301 ovócitos viáveis, 209 (69,4%) fertilizaram. Não houve diferença estatística entre àquelas pacientes que receberam suplementação de LHr ao FSHr e taxa de fertilização ($p=0,282$).

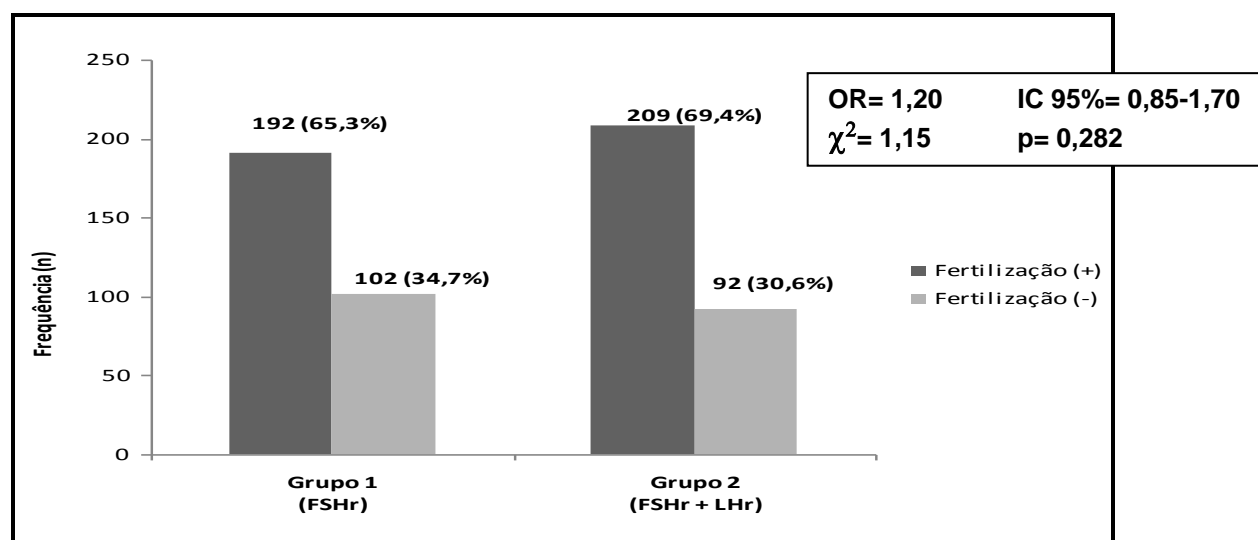


Figura 5. Distribuição das pacientes segundo a taxa de fertilização. Laboratório de Reprodução Humana /HC-UFG, Goiânia-GO, 2015.

Após a fertilização dos ovócitos ocorre a divisão/clivagem celular, que dará origem aos embriões. De acordo com a figura 6, dos 192 ovócitos fertilizados do Grupo I, 164 (85,4%) clivaram. No Grupo II, dos 209 ovócitos fertilizados, 185 (88,5%) clivaram. Não houve diferença estatística entre àquelas pacientes que receberam suplementação de LHr ao FSHr e taxa de clivagem embrionária ($p=0,355$).

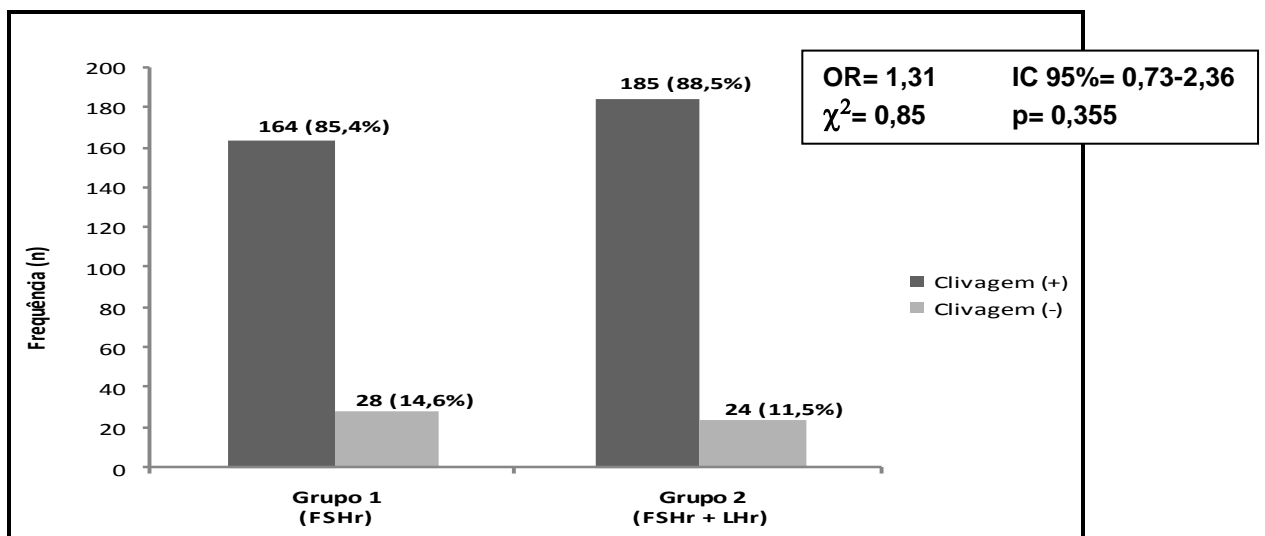


Figura 6. Distribuição das pacientes segundo a taxa de clivagem embrionária. Laboratório de Reprodução Humana /HC-UFG, Goiânia-GO, 2015.

De acordo com a figura 7, observou-se que após 14 dias de transferência embrionária foi dosado o β -HCG quantitativo e que das 60 pacientes do Grupo I, 12 (20,0%) apresentaram resultado positivo. Em relação às 53 pacientes do Grupo II, 13 (24,9%) apresentaram resultado positivo. Não houve diferença estatística entre àquelas pacientes que receberam suplementação de LHr ao FSHr e taxa de gravidez química ($p=0,562$).

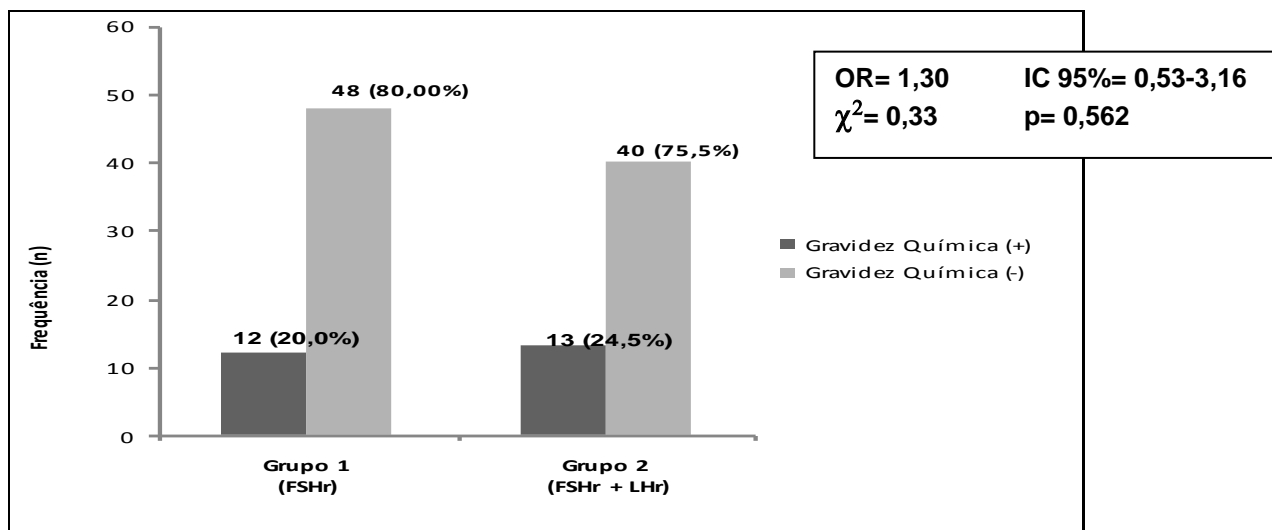


Figura 7. Distribuição das pacientes segundo a taxa de gravidez química. Laboratório de Reprodução Humana /HC-UFG, Goiânia-GO, 2015.

De acordo com a figura 8, observamos que após 7 semanas de transferência embrionária foi observada a presença de saco gestacional e BCF presentes à ultrassonografia transvaginal (gravidez clínica). Das 60 pacientes do Grupo I, 12 (20,0%) apresentaram saco gestacional com BCF presentes. Em relação às 53 pacientes do Grupo II, 12 (22,6%) apresentaram BCF presentes. Não houve diferença estatística entre àquelas pacientes que receberam suplementação de LHr ao FSHr e taxa de gravidez clínica ($p= 0,731$).

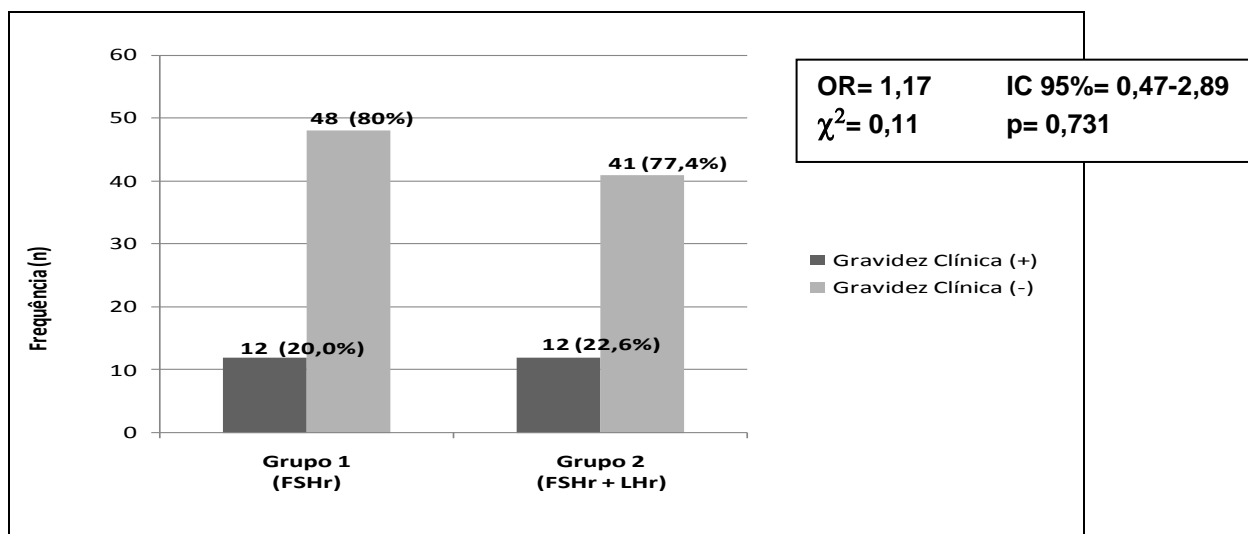


Figura 8. Distribuição das pacientes segundo a taxa de gravidez clínica. Laboratório de Reprodução Humana /HC-UFG, Goiânia-GO, 2015.

6. DISCUSSÃO

Nesse estudo observou-se uma discreta melhora em todos os parâmetros estudados, entretanto, sem diferença estatisticamente significativa.

O uso da suplementação com LHr é controverso em pacientes submetidas à estimulação ovariana e tem sido amplamente debatido. Poucos estudos avaliaram a suplementação com LHr em protocolos com antagonistas de GnRH e os resultados destes estudos obtidos com mulheres em idade avançada (>35 anos) são conflitantes. A adição de LH é muitas vezes baseada mais na experiência dos médicos ou opiniões de evidências publicadas (MOCHTAR et al., 2007).

Há três opiniões diferentes na literatura a respeito da suplementação com LHr. O primeiro parecer sustenta a hipótese que o LH não oferece nenhum benefício (KELLY et al., 1999; LLOYD et al., 2003) ou pode até ter um impacto negativo (PERIN et al., 2003). Porém, recentemente é defendido que algumas pacientes podem não ter uma resposta ovariana adequada ao FSH isoladamente (SHOHAM et al., 2002). Além disso, tem sido demonstrado que, a administração de 75-150 UI de LH não induz fenômenos indesejáveis, tais como o início de luteinização (LEVY et al., 2000; FILICORI et al., 2002a).

A segunda hipótese é que o LH deve ser utilizado em todas as mulheres, porque aumenta a resposta do ovário ao FSH, reduz a dose e a duração da estimulação e, conseqüentemente, os custos totais, mantendo

semelhante (COMMENGES-DUCOS et al., 2002; FILICORI et al., 2002b) ou mesmo superior (GORDON et al., 2001) eficácia em comparação ao uso somente do FSH.

A terceira hipótese sugere que o LH poderia ser útil em algumas situações clínicas (LEVY et al., 2000) como pacientes com idade reprodutiva avançada (BOSCH et al., 2011) e más respondedoras (MOCHTAR et al., 2007).

Uma meta-análise com quatro estudos (OLIVEIRA et al., 2007) indicaram que a suplementação com LHr não aumentou a taxa de gravidez clínica, taxa de implantação ou diminuiu a taxa de aborto espontâneo. No entanto, esta meta-análise indicou que a suplementação com LHr além de aumentar o estradiol sérico no dia da administração do hCG, pode diminuir os dias de estimulação com FSHr e reduzir o número de unidades de FSHr em cerca de 50 UI. Neste estudo não avaliamos a dosagem de estradiol no dia em que o hCG foi administrado em resposta à suplementação de LHr.

Uma variável a considerar é a dose de LHr. Neste estudo utilizamos a dose de 75 UI/dia. Na indução da ovulação de pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico, Burgues (2001) concluiu que a maioria destas pacientes obtém uma boa resposta ovariana, aumento do estradiol e da taxa de gravidez com uma dose de 75 UI / dia de LHr, e apenas poucas pacientes necessitam de 150 UI / dia.

König et al. (2013) em um estudo prospectivo, randomizado e controlado avaliaram 253 pacientes (≥ 35 anos) através de um protocolo de estimulação ovariana: FSHr 225 UI/dia a partir do 3º dia do ciclo, antagonista de GnRH e a partir do dia 6 ocorreu a randomização com o LHr. Os objetivos

foram analisar: taxas de gravidez clínica, implantação, cancelamento, número de folículos > 15 mm no dia da administração do hCG e número de ovócitos captados. Não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das variáveis analisadas. Assim como em nosso estudo, este autor também concluiu que a suplementação com LHr não ofereceu algum benefício sobre as taxas de gravidez química e clínica em mulheres com 35 anos ou mais.

Não foi encontrado nenhum relato na literatura acerca do valor de corte a respeito da concentração de LH utilizada como um marcador para identificar pacientes que poderiam ser beneficiadas com a adição de LHr aos protocolos de estimulação ovariana.

Outra variável a ser avaliada é o início da suplementação. Neste estudo o LH foi iniciado na segunda metade da fase folicular, semelhante ao estudo de Fabregues et al. (2006), que não observaram nenhum efeito da suplementação de LHr sobre os resultados de gravidez em mulheres com idade reprodutiva avançada.

Há relatos que a suplementação com LHr a partir do dia 6 da estimulação não parece ser benéfica. No entanto, poderia haver um potencial efeito benéfico a partir do 1º dia da estimulação em um ciclo com antagonista, especialmente com o pré-tratamento de contraceptivos orais em mulheres com idade avançada (KÖNIG et al., 2013).

No estudo de Bosch et al. (2011), as pacientes foram randomizadas para receber tanto FSHr e LHr ou somente FSHr a partir do 1º dia do ciclo utilizando-se antagonistas de GnRH. Entre as pacientes <35 anos, não foram observadas diferenças na taxa de implantação ou gravidez. No

entanto, entre as pacientes ≥ 35 anos, a combinação de FSHr e LHr resultou em maiores taxas de implantação (OR 1,56, IC 95% 1,14-2,33) e uma maior taxa de gravidez em curso (OR 1,49, IC 95% 0,93-2,38).

Younis et al. (2014) analisaram através de um estudo prospectivo 63 pacientes inférteis ≥ 35 anos que foram randomizadas para receber tanto FSHr e LHr ou somente FSHr em ciclos com antagonistas de GnRH. As características das pacientes incluindo reserva ovariana basal foram semelhantes em ambos os grupos de estudo. O número de folículos ≥ 14 mm, ovócitos, grau de maturação, taxas de fertilização e clivagem não alteraram entre os dois grupos. Espessura endometrial, implantação e taxa de gravidez também foram semelhantes entre os grupos. Assim como no presente estudo, este também não revelou uma melhora ao se adicionar LHr ao FSHr em protocolos com antagonista de GnRH naquelas pacientes com idade reprodutiva avançada.

O mesmo foi observado por Vuong et al. (2015) em um estudo randomizado com 240 mulheres com idade ≥ 35 anos que utilizaram um protocolo com antagonista de GnRH. As variáveis analisadas foram: número de ovócitos captados, número de embriões bons e criopreservados, taxas de implantação e gravidez clínica. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma das variáveis citadas acima.

A diminuição do número de receptores de LH funcionais, com o aumento da idade (VIHKO et al., 1996) foi sugerido como um possível mecanismo dos efeitos benéficos da suplementação com LHr em mulheres com idade avançada (HUMAIDAN et al., 2004).

Em contraposição, quatro estudos randomizados observaram especificamente que o LHr pode ser benéfico em pacientes ≥ 35 anos por aumentarem as taxas de implantação (HUMAIDAN et al., 2004; MARRS et al., 2004; MATORRAS et al., 2009; BOSCH et al., 2011).

Outro estudo que demonstrou benefícios ao utilizar LHr em um protocolo com antagonista de GnRH foi o de Nazzaro et al. (2012). 422 mulheres foram randomizadas em dois grupos de acordo com o esquema de estimulação ovariana: Grupo I (n = 211): FSHr e Grupo II (n = 211): FSHr + LHr. O número de ovócitos coletados, ovócitos em metáfase II, taxa de fertilização, número de embriões produzidos e congelados, taxas de implantação e gravidez clínica foram significativamente menores no Grupo I do que no Grupo II. A suplementação com LHr foi iniciada no 6º dia do ciclo e foi utilizada a dose de 150 UI/dia. No presente estudo, o LHr foi iniciado no 7º ou 8º dia do ciclo e foi utilizada a dose de 75 UI/dia, lançando dúvidas se esses fatores teriam influência sobre os resultados.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que a suplementação de LHr ao FSHr durante a estimulação ovariana controlada nesta faixa etária de pacientes (34 a 42 anos) e na dose utilizada (75 UI) não demonstrou melhora significativa em nenhum dos parâmetros analisados:

- Número de ovócitos captados;
- Taxa de maturação ovocitária (MII);
- Taxa de fertilização;
- Taxa de clivagem embrionária;
- Taxa de gravidez química;
- Taxa gravidez clínica.

Acredita-se que essa pesquisa possa contribuir no esclarecimento do tema que é bastante controverso na literatura. Futuras investigações são necessárias para estabelecer o preciso estágio do desenvolvimento folicular em que deverá ser iniciado a suplementação com LHr; qual grupo de pacientes que poderiam ser beneficiadas e qual dose efetiva de LH se obteria uma boa resposta ovariana e melhores taxas de gravidez.

AL-INANY, H.G. et al. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 11, n. 5, 2011.

ALVIGGI, C.; MOLLO, A.; CLARIZIA, R.; DE PLACIDO, G. Exploiting LH in ovarian stimulation. **Reprod Biomed Online**, v. 12, p. 221-233, 2006.

ASHKENAZI, J.; DICKER, D.; FELDBERG, D.; GOLDMAN, G.A.; YESHAYA, A.; GOLDMAN, J.A. The value of GnRH analogue therapy in IVF in women with unexplained infertility. **Hum Reprod**, v. 4, n. 6, p. 667-669, 1989.

AYRES, M.; AYRES, JR.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. BioEstat: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Manaus: Sociedade Civil Marimauá; 2007.

BAKER, V.L. et al. Clinical efficacy of highly purified urinary FSH versus recombinant FSH in volunteers undergoing controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization: a randomized, multicenter, investigator-blind trial. **Fertil Steril**, v. 91, n. 4, p. 1005-1011, 2009.

BECKMANN, C.R.B., et al. Reproductive Cycle. In: Beckmann, C.R.B., et al. (eds.) *Obstet gynecol.* 5ª ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, p. 342, 2006.

BILJAN, M.M. et al. Effects of pretreatment with an oral contraceptive on the time required to achieve pituitary suppression with GnRH analogues and on subsequent implantation and pregnancy rates. **Fertil Steril**, v. 70, n. 6, p. 1063-1069, 1998.

BOSCH, E.; LABARTA, E.; CRESPO, J.; SIMÓN, C.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. Impact of luteinizing hormone administration on gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles: an age-adjusted analysis. **Fertil Steril**, v. 95, n. 3, p. 1031-1026, 2011.

BURGUES, S. The effectiveness and safety of recombinant human LH to support follicular development induced by recombinant human FSH in WHO group I anovulation: evidence from a multicentre study in Spain. **Hum Reprod**, v. 16, p. 2525-2532, 2001.

BUSSO, N.E.; ACOSTA, A.A.; REMOHI, J. *Indução da Ovulação*. São Paulo: Atheneu, 1999.

BUSSO, N.E.; ACOSTA, A.A.; REMOHI, J. *Indução da ovulação*. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

CASPER, R.F.; MITWALLY, M.F.M. Aromatase inhibitors for ovulation induction. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 3, p. 760-771, 2006.

CHAPPEL, S.C.; HOWLES, C. Reevaluation of the roles of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process. **Hum Reprod**, v. 6, p. 1206-1212, 1991.

COMMENGES-DUCOS, M.; PIAULT, S.; PAPAXANTHOS, A.; RIBES, C.; DALLAY, D.; COMMENGES, D. Recombinant follicle-stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin in the late follicular phase during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 78, p. 1049-1054, 2002.

DAHAN, M.H.; AGDI, M.; SHEHATA, F.; SON, WY.; TAN, S.L. A comparison of outcomes from in vitro fertilization cycles stimulated with either recombinant luteinizing hormone (LH) or human chorionic gonadotropin acting as an LH analogue delivered as human menopausal gonadotropins, in subjects with good or poor ovarian reserve: A retrospective analysis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.172, p. 70–73, 2014.

DEVROEY, P.; BOOSTANFAR, R.; KOPER, N.P.; MANNAERTS, B.M.; IJZERMAN-BOON, P.C.; FAUSER, B.C. A double-blind, non-inferiority RCT comparing corifollitropin alfa and recombinant FSH during the first seven days of ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol. **Hum Reprod**, v. 24, n. 12, p. 3063-3072, 2009.

DRISCOLL, G.L.; TYLER, J.P.; HANGAN, J.T.; FISHER, P.R.; BIRDSALL, M.A.; KNIGHT, D.C. A prospective, randomized, controlled, doubleblind, double-dummy comparison of recombinant and urinary HCG for inducing oocyte maturation and follicular luteinization in ovarian stimulation. **Hum Reprod**, v. 15, n. 6, p. 1305-1310, 2000.

ESTEVEVES, S.C.; CATAFESTA, E.; MACIEL, M.C.A. In: I Consenso Brasileiro de Embriologia em Medicina Reprodutiva; São Paulo; Brasil; 2004.

FÁBREGUES, F.; CREUS, M.; PEÑARRUBIA, J.; MANAU, D.; VANRELL, J.A.; BALASCH, J. Effects of recombinant human luteinizing hormone supplementation on ovarian stimulation and the implantation rate in down-regulated women of advanced reproductive age. **Fertil Steril**, v. 85, n. 4, p. 925-931, 2006.

FAUSER, B.C.J.M. Clinical use of gonadotropins in women. In : GnRH, GnRH analogs, gonadotropins and gonadal peptides; Bouchards P. et al. (Eds.), Parthenon Publishing, Carnforth, UK, p 467-480, 1993.

FAUSER, B.C. et al. Endocrine profiles after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after cotreatment with the GnRH antagonist

ganirelix during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 2, p. 709-715, 2002.

FILICORI, M. et al. Stimulation and growth of antral ovarian follicles by selective LH activity administration in women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, p. 1156-1161, 2002a.

FILICORI, M. et al. Modulation of folliculogenesis and steroidogenesis in women by graded menotrophin administration. **Hum Reprod**, v. 17, p. 2009-2015, 2002b.

FLAMIGNI, C.; VENTUROLI, S.; PARASIDI, R. Induction of ovulation with human urinary FSH. 10 th Congress Mundial de Fertilidad et Esterilidad, Madrid, Spain, Abstr 358, 1980.

FRANCO JR, J.G.; SCHIMBERNI, M. Indução da ovulação. **Femina**, v. 13, p. 707-710, 1985.

FRANCO, J.G. et al. Effects of recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-agonist protocol: a matched case-control study. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 4, n. 7, p. 58, 2009.

GANONG, W. F. As gônadas: desenvolvimento e função do sistema reprodutor. In: Ganong, W.F. (ed.) Fisiologia médica. 22^a ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, p. 388-390, 2007.

GEMZELL, C.A.; DICZFALUSY, E.; TILLINGER, G. Clinical effect of human pituitary follicle stimulating hormone. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 18, p. 138-148, 1958.

GILLIAM, M.L. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. **Obstet Gynecol**, v. 118, p. 706-707, 2011.

GNOTH, C.; GODEHARDT, E.; FRANK-HERRMANN, P.; FRIOL, K.; TIGGES, J.; FREUNDL, G. Definition and prevalence of subfertility and infertility 2005. **Human Reprod**, v. 20, n. 5, p. 1144-1147, 2005.

GORDON, U.; HARRISON, R.F.; FAWZY, M.; HENNELLY, B.; GORDON, A.C. A randomized prospective assessor-blind evaluation of luteinizing hormone dosage and in vitro fertilization outcome. **Fertil Steril**, v. 75, n. 2, p. 324-331, 2001.

GRIESINGER, G.; FELBERBAUM, R.; DIEDRICH, K. GnRH antagonists in reproductive medicine. **Arch Gynecol Obstet**, v. 1, p. 1-8, 2005.

HALL, J.E. Normal and abnormal menstruation. ACP Medicine. p.1-14, 2009.

HILL, M.J. et al. The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive

age: a systematic review and meta-analysis. **Fertil Steril**, v. 97, n. 5, p. 1108-1115, 2012.

HILLIER, S.G. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. **Mol Cell Endocrinol**, v. 179, n. 1-2, p. 39-46, 2001.

HOWLES, C.M. Role of LH and FSH in ovarian function. **Mol Cell Endocrinol**, v. 161, p. 25-30, 2000.

HOWLES, C.M. Luteinizing hormone supplementation in ART. *In* How to Improve Your ART Success Rates. Edited by Kovacs G. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p. 99-104, 2011.

HUGUES, J.N. Ovarian Stimulation for assisted reproductive technologies. *In*: World Health Organization (2002), "Current Practices and controversies in Assisted Reproduction", (coord. Effy Vayena, Patrick Rowe e David Griffin) 2002.

HUM Aidan, P.; BUNGUM, M.; BUNGUM, L.; ANDERSENCY, C. 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**, v. 8, n. 6, p. 635-643, 2004.

KELLY, E.E.; NEBIOLO, L. Recombinant FSH therapy alone versus combination therapy with recombinant LH therapy in patients down-regulated with a low dose luteal GnRH agonist protocol: preliminary results. *In*: Jansen R, Mortimer D, Coote K (Eds.) Towards reproductive certainty: fertility and genetics beyond. Parthenon Publishing Group, Carnforth; p. 200-204, 1999.

KÖNIG, T.E. et al. Recombinant LH supplementation to a standard GnRH antagonist protocol in women of 35 years or older undergoing IVF/ICSI: a randomized controlled multicentre study. **Hum Reprod**, v. 28, p. 2804-2812, 2013.

KOLIBIANAKIS, E.M. et al. Among patients treated with FSH and GnRH analogues for in vitro fertilization, is the addition of recombinant LH associated with the probability of live birth? A systematic review and meta-analysis. **Hum Reprod Update**, v. 13, n. 5, p. 445-452, 2007.

LE COTONNEC, J.Y.; PORCHET, H.C.; BELTRAMI, V.; KHAN, A.; TOON, S.; ROWLAND, M. Clinical pharmacology of recombinant human follicle-stimulating hormone. II. Single doses and steady state pharmacokinetics. **Fertil Steril**, v. 61, n. 4, p. 679-686, 1994.

LEHERT, P. et al. Recombinant human follicle-stimulating hormone (r-hFSH) plus recombinant luteinizing hormone versus r-hFSH alone for ovarian stimulation during assisted reproductive technology: systematic review and meta-analysis. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 17, 2014.

LEVY, D.P.; NAVARRO, J.M.; SCHATTMAN, G.L.; DAVIS, O.K.; ROSENWAKS, Z. The role of LH in ovarian stimulation: exogenous LH: let's design the future. **Hum Reprod**, v. 15, p. 2258-2265, 2000.

LLOYD, A.; PHIL, M.; KENNEDY, R.; HUTCHINSON, J.; SAWYER, W. Economic evaluation of highly purified menotropin compared with recombinant follicle-stimulating hormone in assisted reproduction. **Fertil Steril**, v. 80, p. 1108-1113, 2003.

LOPATA, J. et al. A method for collection motile spermatozoa from human semen. **Fertil Steril**, v. 27, p. 677, 1976.

LOUMAYE, E. et al. Ovulation induction with recombinant human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. En Filicori Marco y Flamigni Carlo (eds), Ovulation Induction. Basic Science and Clinical Advances. Elsevier Science, The Netherlands, p. 227-236, 1995.

LUNENFELD, B.; MENZI, A.; VOLET, B. Clinical effects of human post menopausal gonadotropins. **Acta Endocrinol**, v. 51, p. 587, 1960.

LUNENFELD, B.; LUNENFELD, E.; INSLER, V. Human Gonadotropins. Manual on Assisted Reproduction, p. 79-132, 2000.

LUNENFELD, B. Development of gonadotropins for clinical use. **Reprod Biomed Online**, v. 4 (Suppl 1), p. 11-17, 2002.

MACKLON, N.S.; STOUFFER, R.L.; GIUDICE, L.C.; FAUSER, B.C. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. **Endocr Rev**, v. 27, n. 2. p. 170-207, 2006.

MAGON, N. Gonadotropin releasing hormone agonists: Expanding vistas. **Indian J Endocrinol Metab**, v. 15, n. 4, p. 261-167, 2011.

MARRS, R.; MELDRUM, D.; MUASHER, S.; SCHOOLCRAFT, W.; WERLIN, L.; KELLY, E. Randomized trial to compare the effect of recombinant human FSH (follitropin alfa) with or without recombinant human LH in women undergoing assisted reproduction treatment. **Reprod Biomed Online**, v. 8, n. 2, p. 175-182, 2004.

MARTINS, W.P.; NASTRI, C.O.; NAVARRO, P.A.A.S.; FERRIANI, R.A. Hormônios utilizados na estimulação ovariana. **Femina**, v. 38, n. 2, p. 105-110, 2010.

MATORRAS. R. et al. Mid-follicular LH supplementation in women aged 35-39 years undergoing ICSI cycles: a randomized controlled study. **Reprod Biomed Online**, v. 19, n. 6, p. 879-887, 2009.

MOCHTAR, M.H.; VAN, DER. VEEN. F.; ZIECH, M. VAN. WELY. M. Recombinant luteinizing hormone (rLH) for controlled ovarian

hyperstimulation in assisted reproductive cycles. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, CD005070, 2007.

NAZZARO, A.; SALERNO, A. Recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH antagonist protocol improves implantation and pregnancy rates. **Fertil Steril**, v. 98, n. 3, p. S280, 2012.

OLIVE, D. L. E.; PALTER, S. F. Reproductive physiology. In: Berek, J.S. (ed.) *Gynecology*. 14^a ed. Filadélfia, Lippincott Williams & Wilkins, p. 172-173, 2007.

OLIVEIRA, J.B. et al. Recombinant luteinizing hormone supplementation to recombinant follicle-stimulating hormone during induced ovarian stimulation in the GnRH-agonist protocol: a meta-analysis. **J Assist Reprod Genet**, v. 24, p. 67-75, 2007.

PERIN, P.M.; MALUF, M.; CZERESNIA, C.E.; SOUSA, P.D. The effect of recombinant human luteinizing hormone on oocyte/embryo quality and treatment outcome in down-regulated women undergoing in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 80, p. 76-77, 2003.

RAMACHANDRA, A.; JAMDADDE, K.; KUMAR, P.; ADIGA, S.K.; BHAT, R.; FERRAO, S.R. Is there a need for luteinizing hormone (LH) estimation in patients undergoing ovarian stimulation with gonadotropin releasing hormone (GnRH) antagonists and recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH)? **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 1, p. 90-92, 2014.

SALAT-BAROUX, J.; ALVAREZ, S.; ANTOINE, J.M. et al. Comparison between long and short protocols of LHRH agonist in the treatment of polycystic ovary disease by in-vitro fertilization. **Human Reprod**, v. 3, p. 535-539, 1988.

SCHOOT, D.C.; PACHE, T.D.; HOP W,C.; JONG, F.H.; FAUSER, B.C.J.M. Growth patterns of ovarian follicles during induction of ovulation with decreasing doses of human menopausal gonadotropin following presumed selection in polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**, v. 57, p. 1117-1120, 1992.

SCHWANZEL-FUKUDA, M., PFAFF, D.W. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. **Nature**, v. 338, p.161-4, 1989.

SEELEY, R.R.; STEPHENS, T.D.E.; TATE, P. Reprodução e desenvolvimento. In: Seeley, R.R.; Stephens, T.D.; Tate, P. (eds.) *Anatomia & Fisiologia*. 3^a ed. Lisboa, Lusodidacta, p. 991, 2001.

SEELEY, R.R.; STEPHENS, T.D.; TATE, P. Glândulas endócrinas. In: Seeley, R.R., Stephens, T.D, Tate, P. (eds.) *Anatomia & Fisiologia*. 6^a ed. Loures, Lusociência, p. 611, 2003.

SCHALLY, A.V. et al. Gonadotropin-releasing hormone:one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. **Science**, v. 173 (4001), p. 1036-1038, 1971.

SCHALLY, A.V. LHRH Analogues: I. Their impact on the control of tumorigenesis. **Peptides**, v. 20, n. 10, p. 1247-1262, 1999.

SHAPIRO, D.B. GnRH antagonists. **Fertil Steril**, v. 80 (Suppl 1), p. 1-7, 2003.

SHAW, R.W.; NDUKWE, G.; IMOEDEMHE, D.A.G.; BERNARD, A.G.; BURFORD, G. Twin pregnancy after pituitary desensitization with LHRH agonist and pure FSH. **Lancet**, v. 2, p. 506, 1985.

SHETTIG, J. Avaliação do sistema reprodutor e sexualidade. In: Phipps, W. J.; Sands, J.K.; Marek, J.F. (eds.) *Enfermagem médico-cirúrgica*. 6ª ed. Loures, Lusociência, p. 1721, 2003.

SHOHAM, Z. The clinical therapeutic window for luteinizing hormone in controlled ovarian stimulation. **Fertil Steril**, v. 77, p. 1170-1177, 2002.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. Birth after the reimplatation of a human embryo. **Lancet**, v. 12, n. 2, p. 366, 1978.

TARLATZIS, B.C.; FAUSER, B.C.; KOLIBIANAKIS, E.M.; DIEDRICH, K.; ROMBAUTS, L.; DEVROEY, P. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. **Hum Reprod Update**, v. 12, n. 4, p. 333-340, 2006.

UNITED NATIONS. The Millennium Development Goals. New York: United Nations; 2000.

VIHKO, K.K.; KUJANSUU, E.; MÖRSKY, P.; HUHTANIEMI, I.; PUNNONEN, R. Gonadotropins and gonadotropin receptors during the perimenopause. **European Journal of Endocrinology**, v. 134, n. 3, p. 357-361, 1996.

VUONG, T.N.; PHUNG, H.T.; HO, M.T. Recombinant follicle-stimulating hormone and recombinant luteinizing hormone versus recombinant follicle-stimulating hormone alone during GnRH antagonist ovarian stimulation in patients aged ≥ 35 years: a randomized controlled trial. **Hum Reprod**, v. 30, n. 5, p. 1188-1195, 2015.

WINIKOFF, B.E ; WYMELENBERG, S. *Contraception - A guide to safe and effective choices*, Washington, D.C., Joseph Henry Press, 1997.

YOUNIS, J.S.; IZHAKI, I.; BEN-AMI, M. The effect of LH supplementation following GnRH antagonist administration in advanced reproductive ageing women undergoing IVT-ET: a prospective randomized controlled study. **Fertil Steril**, v. 102, n. 3, p. S23, 2014.

YOVICH J.L. A clinician's personal view of assisted reproductive technology over 35 years. **Reprod Biol**, v. 11, n. 3, p. 31-42, 2011.

ZELEZNIK, A.J. The physiology of follicle selection. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 2, p. 31-37, 2004.

ZIKOPOULOS, K. et al. A prospective randomized study comparing gonadotropin-releasing hormone agonists or gonadotropin-releasing hormone antagonists in couples with unexplained infertility and/or mild oligozoospermia. **Fertil Steril**, v. 83, p. 1354-1362, 2005.

ZUPAN, K.M. et al. Avaliação do sistema endócrino. In: Phipps, W.J.; Sands, J.K.; Marek, J.F. (eds.) *Enfermagem-médico-cirúrgica*. 6ª ed. Loures, Lusociência, 2003.

Apêndice A. Artigo 1

Use of recombinant luteinizing hormone for controlled ovarian hyperstimulation in infertile patients

Autores: Mônica Canêdo Silva Maia, Mário Silva Approbato, Tatiana Moreira da Silva, Eliamar Aparecida de Barros Fleury, Eliane Gouveia de Moraes Sanhez, Reinaldo Satoru Azevedo Sazaki

JBRA Assisted Reproduction (Submetido em 19/10/2015)

Apêndice B. Artigo 2

Efeitos da suplementação com hormônio luteinizante recombinante na estimulação ovariana controlada em um protocolo com antagonista de GnRH

Autores: Mônica Canêdo Silva Maia, Mário Silva Approbato, Tatiana Moreira da Silva, Eliamar Aparecida de Barros Fleury, Eliane Gouveia de Moraes Sanhez, Reinaldo Satoru Azevedo Sazaki, Christiane Ricaldoni Giviziez

Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB) (Submetido em 20/11/2015)

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética (HC/UFG)

Anexo 2 – Normas de publicação *JBRA Assisted Reproduction*

Anexo 3 – Normas de publicação da *Revista da Associação Médica Brasileira*

APÊNDICE A. ARTIGO 1

Use of recombinant luteinizing hormone for controlled ovarian hyperstimulation in infertile patients

Mônica Canêdo Silva Maia¹, Mário Silva Approbato¹, Tatiana Moreira da Silva¹, Eliamar Aparecida de Barros Fleury¹, Eliane Gouveia de Moraes Sanchez¹, Reinaldo Satoru Azevedo Sasaki¹

1. Laboratory of Human Reproduction of Hospital das Clínicas – Federal University of the State of Goiás (UFG) – Goiânia (GO) - Brazil

Corresponding author:

Mônica Canêdo Silva Maia

Laboratory of Human Reproduction of Hospital Federal University of the State of Goiás (UFG)

1^a Avenida, s/n Setor Leste Universitário. Zip Code: 74605-020. Goiânia – GO, Brasil

Telephone: (0xx62) 3269-8278

E-mail: monicalabrep@bol.com.br

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

ABSTRACT

Controlled ovarian stimulation has become an integral part of infertility treatment high complexity. Treatment options with recombinant gonadotrophins add more to knowledge on folliculogenesis and ovarian steroidogenesis. Therefore, a literature search was conducted in the following data bases: Medline, Scielo and PubMed. The descriptors/key words used were ovarian stimulation, *in vitro* fertilization, recombinant luteinizing hormone, supplementation LH. The aim of this study was to review the available literature and to assess the benefits of using recombinant luteinizing hormone associated with recombinant follicle stimulating hormone in different populations who have undergone assisted reproduction procedures.

Keywords: ovarian stimulation, *in vitro* fertilization, supplementation LH

INTRODUCTION

The reproductive treatment for infertile couples has evolved rapidly since the birth of Louise Brown, the first baby born from *in vitro* fertilization (IVF) (Steptoe & Edwards, 1978).

To choose the ovarian stimulation scheme that produces the best follicular response in the most physiological way possible is a very important step in this process. The ovarian stimulation regimens have been enhanced through the use of new therapeutic options (Macklon *et al.*, 2006).

The recombinant luteinizing hormone (rLH) has become available by recombinant DNA technology and is now a new option for protocols of ovarian stimulation. The availability allows us to develop new strategies of ovulation induction, in order to achieve a better control of folliculogenesis. The use of rLH supplementation in IVF is controversial in patients undergoing ovarian stimulation and has been widely debated (Ramachandra *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2012).

Since 1993, rLH has been available for clinical trials and more recently (2001) has been registered for therapeutic use. Pharmacokinetic studies with rhLH were undertaken to compare its actions to pituitary and urinary LH. The mean concentration time curve, clearance, and volume distribution at steady state were similar for the three sources of human LH. The distribution half-lives were approximately 0.7 hours, and the terminal half-lives were approximately 10 hours (Porchet *et al.*, 1995).

Specific populations that have been suggested to benefit include patients greater than 35 years of age (Bosch *et al.*, 2011), suboptimal responders to ovarian stimulation (Mochtar *et al.*, 2007) and those undergoing specifically a GnRH antagonist cycle (Baruffi *et al.*, 2007) or GnRH agonist cycles (Franco *et al.*, 2009).

The aim of this study was to review the available literature and to assess the benefits of using rLH associated with recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) in different populations who have undergone assisted reproduction procedures, and the results in number of oocytes retrieved, implantation rate, live birth rate and pregnancy rate.

METHODS

The articles researched were those published in data bases Medline, Scielo and PubMed between the years of 1978 and 2015. The descriptors/ key words used were ovarian stimulation, *in vitro* fertilization and supplementation LH. The terms were searched both in Portuguese and English.

The criteria of inclusion were: articles published in Portuguese or English between the years of 1978 and 2015; articles with key words pre-established in the titles and/or abstract; researches conducted with human beings. The criteria of exclusion were: articles that do not have the pre-established key words in the title and/or abstract. The articles were preselected after the reading of the titles and abstracts. After the articles that fit the criteria were identified, the articles were read throughout.

RESULTS

Recombinant LH administration in patients with poor ovarian response

The definition of poor ovarian response (POR) in a simple and reproducible manner. POR to ovarian stimulation usually indicates a reduction in follicular response, resulting in a reduced number of retrieved oocytes (Ferraretti *et al.*, 2011).

After the introduction of ovarian hyperstimulation in IVF, it soon became evident that ovarian response differs between women. Already in 1983, the first study that described women with poor response was published (Garcia *et al.*, 1983). Poor response is often related to women with advanced age, in whom the low response to gonadotrophins reflects a physiologic decline in ovarian reserve of primordial follicles (Lawson *et al.*, 2003).

A pathologic decline in number and quality of primordial follicles may also occur in young women. Poor reserve is a common clinical problem, with up to 26% of IVF cycles resulting in poor response (Keay *et al.*, 1997). In the future this percentage is likely to increase as women continue to postpone childbearing. The diagnosis of poor ovarian reserve is based upon the ovarian response in an IVF treatment cycle and/or patient characteristics such as age, basal FSH, anti-Müllerian hormone (AMH) and/or basal antral follicle count (Sallam *et al.*, 2005).

In women with poor ovarian reserve, the number of mature follicles that develop during stimulation is frequently considered to be insufficient for a successful treatment, leading to cancellation of the cycle. A Cochrane review suggested that the addition of rLH to controlled ovarian hyperstimulation (COH) with rFSH increases ongoing pregnancy rates in women with poor ovarian reserve [odd ratio (OR) 1.85, 95% confidence interval (CI) 1.10–3.11] (Mochtar *et al.*, 2007).

Before considering the addition of rLH to IVF stimulation for women with poor ovarian reserve, its costs should be balanced against its potential benefits it will result in terms of pregnancy (Musters *et al.*, 2012).

Three databases (Medline, Embase and Central) were searched (from 1990 to 2011) and included 6433 patients aged 18-45 years. The co-primary endpoints were number of oocytes retrieved and clinical pregnancy rate. Analyses were conducted for the overall population and patients with poor ovarian response. No significant difference in the number of oocytes retrieved was found between the rFSH plus rLH and rFSH alone groups. However, in poor responders, significantly more oocytes were retrieved with rFSH plus rLH. These data suggest that there is a relative increase in the clinical pregnancy rates of 9% in the overall population and 30% in poor responders (Lehert *et al.*, 2014).

Recombinant LH administration in hypogonadotrophic hypogonadism

Hypogonadotrophic hypogonadism (HH) is a neuroendocrine dysfunction presenting with arrested folliculogenesis due to reduced hypothalamic or pituitary activity. In women with HH, successful induction of ovulation can be achieved with pulsatile GnRH therapy, which supplies pulsatile release of gonadotrophins from the pituitary (Filicori *et al.*, 1994).

The exclusive use of FSH in these patients results in fewer developed follicles and lower estradiol levels. In such cases, the addition of LH increase estradiol levels,

follicular recruitment and pregnancy rates (European Recombinant LH Study Group, 1998).

Even though there is no doubt that the rLH administration is necessary in patients with HH, and that its use could allow follicular growth during ovarian stimulation there is still controversy. Although both gonadotropins are necessary for normal follicular development and steroidogenesis appropriate, it is documented that FSH plays an important role in ovarian stimulation protocols; small amounts of LH are needed to promote the secretion of estradiol and suitable also allow the follicle perform the final maturation when exposed to hCG (human chorionic gonadotropin). On the other hand, it is known that elevated concentrations of LH in the follicular phase may affect the folliculogenesis, resulting in the ovulation of pos-mature oocytes (Balasch *et al.*, 1995).

The first randomized clinical study using rLH in HH patients (28 with primary and 10 with secondary HH) was conducted with 38 patients by administering different doses of rLH (placebo, 25, 75 and 225 IU/day) in combination with a fixed dose of rFSH (150 IU/day) (European Recombinant LH Study Group, 1998). Serum oestradiol concentrations increased proportionally with increasing rLH and a similar correlation was found in endometrial thickness in rLH up to 75 IU/day dose. Follicular growth was observed in 79% of patients receiving 75 or 225 IU/day rLH, while this rate was 27% in the placebo or 25 IU/day rLH receiving group.

This prospective controlled nonrandomized pilot study was conducted to investigate whether split daily doses of rLH is more efficacious than the single daily dose in supporting follicular development and ovulation in primary HH. Twenty-seven women with HH received a 150 IU fixed daily subcutaneous dose of rFSH, supplemented by 75 IU daily dose of rLH given either as a single dose (n=9; single-dose group) or four equally divided doses (n=18; split-dose group). Women in the split-dose group achieved higher serum oestradiol concentrations per follicle, endometrial thickness measurements and numbers of follicles than in the single-dose group (not statistically significant). The OR for ovulation rate was 2.08 (not statistically significant). This study concluded that administering rLH in split daily doses could provide superior results compared to the traditional single daily dose (Awwad *et al.*, 2013).

Recombinant LH administration in older assisted reproduction patients

A possible mechanism behind the beneficial effect of exogenous LH supplementation for women with less sensitive ovaries relates to the decreasing numbers of functional LH receptors with increasing age. In addition, ovarian androgen secretion, i.e. estrogen precursor secretion capacity, starts to decline as early as before the age of 30 years, again suggesting a diminished capacity of the ovary to respond to LH stimulus with age (Piltonen *et al.*, 2003).

A randomized controlled multicentre study compared the rLH supplementation to rFSH in 253 patients aged between 35 and 43 years in a protocol with GnRH antagonist. Of 253 subjects randomized, 125 received both rFSH and rLH and 128 received rFSH only. The objectives were to analyze: clinical pregnancy rates, implantation, cancellation, number of follicles > 15 mm on the day of hCG administration and number of oocytes obtained. There were no demographic or clinical

differences between the groups. It was concluded that LH supplementation has no benefit on ongoing pregnancy rates in women of 35 years or older (König *et al.*, 2013).

Vuong *et al.* (2015) through a study randomized controlled trial evaluated a total of 240 women aged ≥ 35 anos undergoing IVF received ovarian stimulation a GnRH antagonist protocol. Of the 240 patients randomized to treatment, 120 received rFSH/rLH and 120 received rFSH. Live birth rate, number of oocytes retrieved, implantation rate, miscarriage rate and clinical pregnancy rate did not differ significantly ($P > 0.05$) between rFSH + rLH and rFSH.

Bosch *et al.* (2011) analysed the impact of LH administration on cycle outcome in ovarian stimulation with GnRH antagonists. Patients were evaluated with up to 35 years old ($n = 380$) and aged 36 to 39 years ($n = 340$). rFSH versus rFSH + rLH administration was compared. Recombinant LH administration significantly increased the implantation rate in patients aged 36 to 39 years. A clinically relevant better ongoing rate per started cycle was observed, although the difference was not statistically significant. Patients younger than 36 years do not obtain any benefit from rLH administration.

Recombinant LH administration in normogonadotrophic patients

The issue of both LH supplementation and endogenous LH concentrations in GnRH antagonist as well as GnRH agonist stimulation protocols in normogonadotrophic women remains controversial, although a large number of studies on this issue are available. Kol (2005) suggests that the need for exogenous LH could possibly be predicted by the dynamics of endogenous LH levels during stimulation. Rigorous studies in GnRH agonist long protocol patients and GnRH antagonist multiple dose protocol patients respectively failed to find an association between endogenous LH and ongoing pregnancy likelihood (Kolibianakis *et al.*, 2006).

A study evaluated the use of rLH supplementation in an unselected group of IVF patients undergoing follicular stimulation with rFSH after pituitary down-regulation. Group A comprised 122 cycles administered rFSH and rLH while group B included 331 cycles using rFSH only during the same period of treatment. There was no significant difference in any of the endocrine, embryological and outcome parameters measured. The implantation rate of 14.2% for group A compared with 9.8% for group B showed a positive trend ($P = 0.055$) (Lisi, 2002).

A total of 244 patients without ovulatory dysfunction, aged < 40 years and at the first ICSI cycle were divided into two groups matched by age according to an ovarian stimulation scheme: Group I ($n = 122$): Down-regulation with GnRH agonist + rFSH and Group II ($n = 122$): Down-regulation with GnRH agonist + rFSH and rLH (beginning simultaneously). The number of oocytes collected, the number of oocytes in metaphase II, fertilization rate, the mean number of embryos produced per cycle, the mean number of frozen embryos per cycle and cumulative implantation rate were significantly lower in the Group I than in Group II. This study demonstrated the potential benefits with the use of rLH (Franco *et al.*, 2009).

Thus, no consensus has been reached regarding the benefit of adding rLH this group of patients.

CONCLUSIONS

There are controversies about the rLH supplementation to FSH during controlled ovarian stimulation. Further investigations are needed to establish the precise stage of follicular development that should start supplementing with rLH; the group of patients who could benefit and what effective dose would be obtained a good ovarian response and better pregnancy rates.

It is possible that rLH find their place in the ovarian stimulation when nominations are clearly defined and success rates offset the cost of treatment.

REFERENCES

- Awwad JT, Farra C, Mitri F, Abdallah MA, Jaoudeh MA, Ghazeeri G. Split daily recombinant human LH dose in hypogonadotrophic hypogonadism: a nonrandomized controlled pilot study. *Reprod Biomed Online*. 2013;26:88-92.
- Balasz J, Miró F, Burzaco I, Casamitjana R, Civico S, Ballescá JL, Puerto B, Vanrell JA. The role of luteinizing hormone in human follicle development and oocyte fertility: evidence from in-vitro fertilization in a woman with long-standing hypogonadotrophic hypogonadism and using recombinant human follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*. 1995;10:1678-83.
- Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Felipe V, Martins AMC, Cornicelli J, Cavagna M, Oliveira JB, Franco JG Jr. Recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-antagonist protocol: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:14-25.
- Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Impact of luteinizing hormone administration on gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles: an age-adjusted analysis. *Fertil Steril*. 2011;95:1031-6.
- European Recombinant LH Study Group. Recombinant human luteinizing hormone (LH) to support recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH)-induced follicular development in LH- and FSH-deficient anovulatory women: A dose- finding study. The European Recombinant LH Study Group. *J Clin Endocrinol Metabol*. 1998;83:1507-14.
- Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod*. 2011;26(7):1616-24.
- Filicori M, Flamigni C, Dellai P, Coqqniqni G, Michelacci L, Arnone R. Treatment of anovulation with pulsatile gonadotropin-releasing hormone: prognostic factors and clinical results in 600 cycles. *J Clin Endocrinol Metabol*. 1994;79:1215-20.
- Franco JG, Baruffi RL, Oliveira JB, Mauri AL, Petersen CG, Contart P, Felipe V. Effects of recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-agonist protocol: a matched case-control study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:58.
- Garcia JE, Jones GS, Acosta AA, Wright G Jr. Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: phase II. *Fertil Steril*. 1983;39:174-9.
- Hill MJ, Levens ED, Levy G, Ryan ME, Csokmay JM, DeCherney AH, Whitcomb BW. The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012;97:1108-14.

Keay SD, Liversedge NH, Mathur RS, Jenkins JM. Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997;104:521-7.

Kol S. To add or not to add LH: consideration of LH concentration changes in individual patients. *Reprod Biomed Online.* 2005;11:664-6.

Kolibianakis EM, Collins J, Tarlatzis B, 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.* 2006;12:3-12.

König TE, van der Houwen LE, Overbeek A, Hendriks ML, Beutler-Beemsterboer SN, Kuchenbecker WK, Renckens CN, Bernardus RE, Schats R, Homburg R, Hompes PG, Lambalk CB. Recombinant LH supplementation to a standard GnRH antagonist protocol in women of 35 years or older undergoing IVF/ICSI: a randomized controlled multicentre study. *Hum Reprod.* 2013;28:2804-12.

Lawson R, El Toukhy, Kassab A, Taylor A, Braude P, Parsons J, Seed P. Poor response to ovulation induction is a stronger predictor of early menopause than elevated basal FSH: a life table analysis. *Hum Reprod.* 2003;18:527-33.

Lehert P, Kolibianakis EM, Venetis CA, Schertz J, Saunders H, Arriagada P, Copt S, Tarlatzis B. Recombinant human follicle-stimulating hormone (r-hFSH) plus recombinant luteinizing hormone versus r-hFSH alone for ovarian stimulation during assisted reproductive technology: systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol and Endocrinol.* 2014;12:17.

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.* 2002;5:104-8.

Macklon NS, Stouffer RL, Giudice LC, Fauser BC. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocr Rev.* 2006;27:170-207.

Mochtar MH, Van der Veen F, Ziech M, van Wely M. Recombinant luteinizing hormone (rLH) for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;18:CD005070.

Musters AM, van Wely M, Mastenbroek S, Kaaijk EM, Repping S, van der Veen F, Mochtar MH. The effect of recombinant LH on embryo quality: a randomized controlled trial in women with poor ovarian reserve. *Hum Reprod.* 2012;27:244-50.

Piltonen T, Koivunen R, Ruukonen A, Tapanainen JS. Ovarian age-related responsiveness to human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2003;88:3327-32.

Porchet HC, Le Cottonnec JY, Neuteboom B, Canali S, Zanolio G. Pharmacokinetics of recombinant human luteinizing hormone after intravenous, intramuscular, and

subcutaneous administration in monkeys and comparison with intravenous administration of pituitary human luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:667–73.

Ramachandra A, Jamdade K, Kumar P, Adiga SK, Bhat R, Ferrao SR. Is there a need for luteinizing hormone (LH) estimation in patients undergoing ovarian stimulation with gonadotropin releasing hormone (GnRH) antagonists and recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH)? *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2014;8:90-2.

Sallam HN, Ezzeldin F, Agameya AF, Rahman AF, El-Garem Y. Defining poor responders in assisted reproduction. *Int J Fertil Womens Med.* 2005;50:115-20.

Stephoe PC & Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. *The Lancet.* 1978;12(2):366.

Vuong TN, Phung HT, Ho MT. Recombinant follicle-stimulating hormone and recombinant luteinizing hormone versus recombinant follicle-stimulating hormone alone during GnRH antagonist ovarian stimulation in patients aged ≥ 35 years: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2015;30:1188-95.

APÊNDICE B. ARTIGO 2

Efeitos da suplementação com hormônio luteinizante recombinante na estimulação ovariana controlada em um protocolo com antagonista de GnRH

Effects of recombinant luteinizing hormone supplementation for controlled ovarian stimulation in a protocol with GnRH antagonist

Mônica Canêdo Silva Maia^{1*}; Mario Silva Approbato²; Tatiana Moreira da Silva³; Eliamar Aparecida de Barros Fleury⁴; Eliane Gouveia de Moraes Sanchez⁵, Reinaldo Satoru Azevedo Sasaki⁶, Christiane Ricaldoni Giviziez⁷

1. Doutoranda em Ciências da Saúde na Universidade Federal de Goiás (UFG); biomédica do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas - Goiânia (GO) - Brasil.
2. Professor Titular do Departamento de Gineco-Obstetrícia da Faculdade de Medicina e da Pós-Graduação em Ciências da Saúde; Diretor do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás - Goiânia (GO) - Brasil.
3. Mestre em Ciências da Saúde na Universidade Federal de Goiás (UFG); biomédica do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas - UFG - Goiânia (GO) – Brasil.
4. Doutoranda em Ciências da Saúde na Universidade Federal de Goiás (UFG); musicoterapeuta. Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas - Goiânia (GO) - Brasil.
5. Doutora em Ciências da Saúde na Universidade Federal de Goiás (UFG); fisioterapeuta. Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas - Goiânia (GO) - Brasil.
6. Doutorando em Ciências da Saúde na Universidade Federal de Goiás (UFG); médico. Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas - Goiânia (GO) - Brasil.
7. Doutoranda em Ciências da Saúde na Universidade Federal de Goiás (UFG); nutricionista. Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas - Goiânia (GO) - Brasil.

Trabalho realizado no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) - Goiânia (GO) - Brasil.

1ª Avenida, s/nº - Setor Universitário CEP: 74605-020 - Goiânia-GO

*Correspondência: 1ª Avenida, s/n Setor Leste Universitário - Goiânia – GO
CEP 74605-020 e-mail: monicalabrep@bol.com.br

Conflito de autores: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (parecer nº 751.367) em 14/08/2015.

RESUMO

Objetivo: Comparar os efeitos da suplementação de LHr na estimulação ovariana controlada em um protocolo com antagonista de GnRH em ciclos de FIV/ICSI.

Métodos: Estudo caso-controle com 113 pacientes, idade entre 34 a 42 anos, as quais foram divididas em dois grupos de acordo com a estimulação ovariana: Grupo I (n= 60): FSHr (grupo controle) e Grupo II (n= 53): FSHr + LHr (grupo tratado). Estes grupos foram comparáveis para idade, IMC, duração da infertilidade, níveis séricos de FSH, LH e estradiol. Foram analisados número de ovócitos coletados e em metáfase II, taxa de fertilização, taxa de clivagem embrionária, taxas de gravidez química e clínica. A análise de dados foi realizada pelo programa estatístico Bioestat 5.3®. As diferenças de proporções foram avaliadas por teste de Qui-quadrado e as médias pelo teste Wilcoxon Mann-Whitney. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados: A média de idade das pacientes do Grupo I foi $37,3 \pm 2,1$ anos e do Grupo II de $37,9 \pm 2,4$ anos ($p > 0,05$). A comparabilidade das outras principais características (duração da infertilidade, IMC, FSH, LH e estradiol basal) foram também observadas entre os Grupos I e II ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa entre os dois grupos em relação ao: número de ovócitos captados, número de ovócitos em metáfase II, taxa de fertilização, taxa de clivagem embrionária, taxas de gravidez química e clínica ($p > 0,05$).

Conclusão: A suplementação com LHr não mostrou benefícios em relação às variáveis analisadas durante a estimulação ovariana controlada com antagonistas de GnRH.

Palavras-chave: estimulação ovariana, fertilização *in vitro*, hormônio luteinizante recombinante, suplementação com LH.

SUMMARY

Objective: To compare the effects of supplementation with rLH for controlled ovarian stimulation in a protocol with GnRH antagonist in cycles of IVF/ICSI.

Methods: Case-control study was performed of 113 patients, aged between 34-42 years, who were divided into two groups according to an ovarian stimulation scheme: Group I (n= 60): rFSH (control group) and Group II (n= 53): rFSH + rLH (treated group). These groups were comparable for age, BMI, duration of infertility, serum FSH, LH and estradiol. Numbers of oocytes collected and in metaphase II, fertilization rate, implantation rate and rates of chemical and clinical pregnancy were analyzed. Data analysis was conducted using the statistical software BioStat 5.3 ®. Differences in proportions were assessed by chi-square test and means by Wilcoxon Mann-Whitney test. $p < 0,05$ was considered statistically significant.

Results: The mean age of patients in Group I was 37.3 ± 2.1 years and Group II 37.9 ± 2.4 years ($P > 0.05$). The comparability of the other main characteristics (duration of infertility, BMI, FSH, LH and basal estradiol) were also observed between Groups I and II ($P > 0.05$). There was no significant difference between the two groups regarding: number of oocytes retrieved, number of oocytes in metaphase II, fertilization rate, chemical and clinical pregnancy rate ($P > 0.05$).

Conclusion: The supplementation with rLH showed no benefit with respect to variables during controlled ovarian stimulation with GnRH antagonists.

Keywords: ovarian stimulation, *in vitro* fertilization, recombinant luteinizing hormone, supplementation LH

INTRODUÇÃO

O hormônio luteinizante (LH) é essencial para a reprodução humana natural e em muitas pacientes com infertilidade tratadas com técnicas de reprodução assistida, suas concentrações são naturalmente suficientes para permitir a concepção bem sucedida. A necessidade de se adicionar LH recombinante (LHr) é um assunto de controvérsia ¹.

LHr tem sido avaliado em ensaios clínicos desde 1993 e foi o primeiro a ser utilizado em adição ao hormônio folículo estimulante recombinante (FSHr) na indução da ovulação em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico ².

Populações específicas que poderiam se beneficiar com o uso do LHr durante a estimulação ovariana incluem pacientes com idade superior a 35 anos de idade ³, pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico ⁴, mulheres que tiveram níveis séricos endógenos de LH <1,2 IU/l ⁵, más respondedoras a estimulação ovariana ⁶ e aquelas submetidas a um ciclo anterior com antagonista ⁷ ou agonista de GnRH sem sucesso ⁸.

Alguns estudos têm sugerido um efeito benéfico do LH, enquanto outros relatam que não há diferenças nos resultados quando o LH é adicionado no esquema de tratamento. Discrepâncias entre os resultados destes estudos podem ser devido a heterogeneidade de desenho, tamanho da amostra, critérios de inclusão, diferentes protocolos com análogo de GnRH, início do tratamento, duração e procedimentos de Fertilização *in vitro* (FIV) ou Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI).

O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos da suplementação de LHr para a estimulação ovariana controlada com FSHr em ciclos de FIV/ICSI.

MÉTODOS

Estudo caso-controle com 113 pacientes atendidas no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (LABREP-HC/UFG), sendo a faixa etária compreendida entre 34 a 42 anos de idade. Os dados foram coletados a partir de procedimentos realizados no período de novembro de 2013 a fevereiro de 2015.

Estas pacientes foram divididas em dois grupos:

- Grupo I (n= 60): FSHr foi administrado em doses de 37,5 a 225 UI (via subcutânea). No 8º dia de estimulação ovariana, o desenvolvimento folicular começou a ser monitorizado por ultrassonografia vaginal, e doses de FSHr foram ajustadas de acordo com a resposta ovariana. Não foi utilizado LHr (grupo controle) .
- Grupo II (n= 53): LHr foi administrado a 75 UI (via subcutânea) a partir do 7º - 8º dia do ciclo associado a 37,5 a 225 UI de FSHr. No 8º dia de estimulação ovariana, o desenvolvimento folicular começou a ser monitorizado por ultrassonografia vaginal, e doses de FSHr foram ajustadas de acordo com a resposta ovariana (grupo tratado).

Antagonistas de GnRH foram utilizados em ambos os grupos, os quais foram comparáveis para idade, duração da infertilidade, IMC, níveis séricos de FSH, LH e estradiol. Foram analisados número de ovócitos coletados, número de ovócitos em metáfase II, taxa de fertilização, taxa de clivagem embrionária e taxas de gravidez química e clínica.

Os critérios de exclusão foram os seguintes: ovários com diâmetro $< 3\text{cm}^3$, IMC = peso (kg) / altura (m²) $< 18,0$ e $> 32,0$, dois ciclos anteriormente sem sucesso de FIV ou ICSI, presença de apenas um ovário, pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e com oligomenorreia.

A análise de dados foi realizada pelo programa estatístico Bioestat 5.3®⁹ e pela planilha Excel®. As diferenças de proporções foram avaliadas por teste de Qui-quadrado e as médias pelo teste Wilcoxon Mann-Whitney. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)– HC/UFG sob o registro 751367. Como se tratou de uma pesquisa retrospectiva, não envolvendo a abordagem direta a pacientes, foi autorizado pelo CEP a dispensa da aplicação do termo consentimento livre e esclarecido.

RESULTADOS

A idade das pacientes variou entre 34 a 42 anos sendo que, a média de idade no Grupo I foi $37,3 \pm 2,1$ anos e do Grupo II foi $37,9 \pm 2,4$ anos ($p = 0,111$). As variáveis confundidoras foram pareadas conforme tabela 1.

Em relação ao número de ovócitos captados, ovócitos em metáfase II, imaturos e inviáveis não se observou diferença estatística entre os dois grupos. Dos 294 ovócitos viáveis do Grupo I, 192 (65,3%) foram fertilizados. Já no Grupo II, dos 301 ovócitos viáveis, 209 (69,4%) fertilizaram ($p= 0,282$). Dos 192 ovócitos fertilizados do Grupo I, 164 (85,4%) clivaram. No Grupo II, dos 209 ovócitos fertilizados, 185 (88,5%) clivaram ($p=0,355$) (tabela 2).

Em relação ao resultado de β -hCG (gravidez química), das 60 pacientes do Grupo I, 12 (20,0%) apresentaram resultado positivo. No Grupo II, das 53 pacientes, 13 (24,9%) apresentaram resultado positivo ($p= 0,562$). Quando foi avaliada a presença de gravidez clínica, observou-se que das 60 pacientes do Grupo I, 12 (20,0%) apresentaram saco gestacional com batimentos cardíacos fetais (BCF) presentes. Em relação às 53 pacientes do Grupo II, 12 (22,6%) apresentaram BCF presentes ($p= 0,731$) (tabela 2).

DISCUSSÃO

Nesse trabalho observou-se uma discreta melhora em todos os parâmetros estudados, entretanto, sem diferença estatisticamente significativa.

O uso da suplementação com LHr é controverso em pacientes submetidas à estimulação ovariana e tem sido amplamente debatido ¹⁰. Poucos estudos avaliaram a suplementação com LHr em protocolos com antagonistas de GnRH e os resultados destes estudos obtidos com mulheres em idade avançada (>35 anos) são conflitantes.

Há três opiniões diferentes na literatura a respeito da suplementação com LHr. O primeiro parecer sustenta que o LH não oferece nenhum benefício ^{11,12} ou pode até ter um impacto negativo ¹³. Porém, recentemente é defendido que algumas pacientes podem não ter uma resposta ovariana adequada ao FSH isoladamente ¹⁴. Além disso, tem sido demonstrado que, a administração de 75-150 UI de LH não induz fenômenos indesejáveis, tais como o início de luteinização ^{15,16}.

A segunda hipótese é que o LH deve ser utilizado em todas as mulheres, porque aumenta a resposta do ovário ao FSH, reduz a dose e a duração da estimulação e, conseqüentemente, os custos totais, mantendo semelhante ¹⁷ ou mesmo superior ¹⁸ eficácia em comparação ao uso somente do FSH.

A terceira hipótese sugere que o LH poderia ser útil em algumas situações clínicas como pacientes com idade reprodutiva avançada ¹⁹ e más respondedoras ¹⁰.

Uma meta-análise com quatro estudos ²⁰ indicaram que a suplementação com LHR não aumentou a taxa de gravidez clínica, taxa de implantação ou diminuiu a taxa de aborto espontâneo. No entanto, esta meta-análise indicou que a suplementação com LHR além de aumentar o estradiol sérico no dia da administração do hCG, pode diminuir os dias de estimulação com FSHr e reduzir o número de unidades de FSHr em cerca de 50 UI. Neste estudo não se avaliou a dosagem de estradiol no dia em que o hCG foi administrado em resposta à suplementação de LHR.

Uma variável a considerar é a dose de LHR. Neste estudo utilizamos a dose de 75 UI/dia. Na indução da ovulação de pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico, um estudo concluiu que a maioria destas pacientes obtém uma boa resposta ovariana, aumento do estradiol e da taxa de gravidez com uma dose de 75 UI / dia de LHR, e apenas poucas pacientes necessitam de 150 UI / dia ²¹.

Um estudo prospectivo, randomizado e controlado avaliaram 253 pacientes (≥ 35 anos) através de um protocolo de estimulação ovariana: FSHr 225 UI/dia a partir do 3º dia do ciclo, antagonista de GnRH e a partir do dia 6 ocorreu a randomização com o LHR. Os objetivos foram analisar: taxas de gravidez clínica, implantação, cancelamento, número de folículos > 15 mm no dia da administração do hCG e número de ovócitos captados. Não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das variáveis analisadas. Assim como no presente estudo, este autor também concluiu que a suplementação com LHR não ofereceu algum benefício sobre as taxas de gravidez química e clínica em mulheres com 35 anos ou mais ²².

Não foi encontrado nenhum relato na literatura acerca do valor de corte a respeito da concentração de LH utilizada como um marcador para identificar pacientes que poderiam ser beneficiadas com a adição de LHR aos protocolos de estimulação ovariana. Outra variável a ser avaliada é o início da suplementação. Há relatos que a suplementação com LHR a partir do dia 6 da estimulação não parece ser benéfica. No entanto, poderia haver um potencial efeito benéfico a partir do dia 1 da estimulação em um ciclo com antagonista, especialmente com o pré-tratamento de contraceptivos orais em mulheres com idade avançada ²². Em outro estudo as pacientes foram randomizadas para receber tanto FSHr e LHR ou somente FSHr a partir do 1º dia do ciclo utilizando-se

antagonistas de GnRH. Entre as pacientes <35 anos, não foram observadas diferenças na taxa de implantação ou gravidez. No entanto, entre as pacientes ≥ 35 anos, a combinação de FSHr e LHr resultou em maiores taxas de implantação (OR 1,56, 95% CI 1,14-2,33) e uma maior taxa de gravidez em curso (OR 1,49, 95% CI 0,93-2,38) ⁽¹⁹⁾. Observou-se que a suplementação com LHr foi iniciada a partir do 1º dia de estimulação, ao passo que no presente estudo a suplementação foi iniciada a partir do 7º ou 8º dia do ciclo.

Através de um estudo prospectivo, 63 pacientes inférteis ≥ 35 anos foram randomizadas para receber tanto FSHr e LHr ou somente FSHr em ciclos com antagonistas de GnRH. As características das pacientes incluindo reserva ovariana basal foram semelhantes em ambos os grupos de estudo. O número de folículos ≥ 14 mm, ovócitos, grau de maturação, taxas de fertilização e clivagem não alteraram entre os dois grupos. Espessura endometrial, implantação e taxa de gravidez também foram semelhantes entre os grupos ²³. Assim como no presente estudo, este também não revelou uma melhora ao se adicionar LHr ao FSHr em protocolos com antagonista de GnRH naquelas pacientes com idade reprodutiva avançada.

A diminuição do número de receptores de LH funcionais, com o aumento da idade ²⁴ foi sugerido como um possível mecanismo dos efeitos benéficos da suplementação com LHr em mulheres com idade avançada ²⁵.

Em contraposição, quatro estudos randomizados observaram especificamente que o LHr pode ser benéfico em pacientes ≥ 35 anos por aumentarem as taxas de implantação ^{3,19,25,26}. No entanto, estes resultados não foram confirmados com outros estudos randomizados ²⁷.

Outro estudo que demonstrou benefícios ao utilizar LHr em um protocolo com antagonista de GnRH foi o de Nazzaro et al. (2012). 422 mulheres foram randomizadas em dois grupos de acordo com o esquema de estimulação ovariana: Grupo I (n = 211): FSHr e Grupo II (n = 211): FSHr + LHr. O número de ovócitos coletados, ovócitos em metáfase II, taxa de fertilização, número de embriões produzidos e congelados, taxas de implantação e gravidez clínica foram significativamente menores no Grupo I do que no Grupo II. A suplementação com LHr foi iniciada no 6º dia do ciclo e foi utilizada a dose de 150 UI/dia. No presente estudo, o LHr foi iniciado no 7º ou 8º dia do ciclo e foi utilizada a dose de 75 UI/dia, lançando dúvidas se esses fatores teriam influência sobre os resultados.

CONCLUSÃO

A suplementação de LHr ao FSHr em ciclos de FIV/ICSI na faixa etária de 34 a 42 anos não demonstrou benefícios em relação às variáveis analisadas durante a estimulação ovariana. Essa pesquisa poderá contribuir no esclarecimento do tema que é bastante controverso na literatura. Futuras investigações são necessárias para estabelecer o preciso estágio do desenvolvimento folicular em que deverá ser iniciado a suplementação com LHr, o perfil de pacientes que poderiam ser beneficiadas e qual dose efetiva de LHr se obteria uma boa resposta ovariana e melhores taxas de gravidez.

REFERÊNCIAS

1. Hill MJ, Levens ED, Levy G, Ryan ME, Csokmay JM, DeCherney AH, et al. The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012; 97(5): 1108-15.
2. Agrawal R, West C, Conway GS, Page ML, Jacobs HS. Pregnancy after treatment with three recombinant gonadotropins. *Lancet* 1997; 349: 29-30.
3. Matorras R, Prieto B, Exposito A, Mendoza R, Crisol L, Herranz P, et al. Mid-follicular LH supplementation in women aged 35-39 years undergoing ICSI cycles: a randomized controlled study. *Reprod Biomed Online*. 2009; 19(6): 879-87.
4. Howles CM: Luteinizing hormone supplementation in ART. In *How to Improve Your ART Success Rates*. Edited by Kovacs G. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 2011; 99-104.
5. Lehert P, Kolibianakis EM, Venetis CA, Schertz J, Saunders H, Arriagada P, et al. Recombinant human follicle-stimulating hormone (r-hFSH) plus recombinant luteinizing hormone versus r-hFSH alone for ovarian stimulation during assisted reproductive technology: systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014; 12: 17.
6. De Placido G, Alviggi C, Perino A, Strina I, Lisi F, Fasolino A, et al. Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (rFSH) step-up protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women initial inadequate ovarian response to rFSH. A multicentre, prospective, randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2005; 20(2): 390-6.
7. Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Felipe V, Martins AM, Cornicelli J, et al. Recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian

stimulation in the GnRH-antagonist protocol: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2007; 14(1): 12-23.

8. Franco JG, Baruffi RL, Oliveira JB, Mauri AL, Petersen CG, Contart P, et al. Effects of recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-agonist protocol: a matched case-control study.” *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 4(7): 58.

9. Ayres M, Ayres JR, Ayres DL, Santos AS. *BioEstat: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Manaus: Sociedade Civil Marimauá; 2007.

10. Mochtar MH, Van der Veen F, Ziech M, van Wely M. Recombinant luteinizing hormone (rLH) for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 2: CD005070.

11. Kelly EE, Nebiolo L. Recombinant FSH therapy alone versus combination therapy with recombinant LH therapy in patients down-regulated with a low dose luteal GnRH agonist protocol: preliminary results. In: Jansen R, Mortimer D, Coote K (Eds.) *Towards reproductive certainty: fertility and genetics beyond*. Parthenon Publishing Group, Carnforth; 1999: 200–204.

12. Lloyd A, Phil M, Kennedy R, Hutchinson J, Sawyer W. Economic evaluation of highly purified menotropin compared with recombinant follicle-stimulating hormone in assisted reproduction. *Fertil Steril*. 2003; 80: 1108–13.

13. Perin PM, Maluf M, Czeresnia CE, Sousa PD. The effect of recombinant human luteinizing hormone on oocyte/embryo quality and treatment outcome in down-regulated women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2003; 80: S76–7.

14. Shoham Z. The clinical therapeutic window for luteinizing hormone in controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril*. 2002; 77: 1170–7.

15. Levy DP, Navarro JM, Schattman GL, Davis OK, Rosenwaks Z. The role of LH in ovarian stimulation: exogenous LH: let's design the future. *Hum Reprod.* 2000; 15: 2258–65.
16. Filicori M, Cognigni GE, Tabarelli C, Pocognoli P, Taraborrelli S, Spettoli D et al. Stimulation and growth of antral ovarian follicles by selective LH activity administration in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87: 1156–61.
17. Commenges-Ducos M, Piault S, Papaxanthos A, Ribes C, Dallay D, Commenges D. Recombinant follicle-stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin in the late follicular phase during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2002; 78: 1049–54.
18. Gordon U, Harrison RF, Fawzy M, Hennelly B, Gordon AC. A randomized prospective assessor-blind evaluation of luteinizing hormone dosage and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril.* 2001; 75: 324–31.
19. Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Impact of luteinizing hormone administration on gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles: an age-adjusted analysis. *Fertil Steril.* 2011; 95(3): 1031-6.
20. Oliveira JB, Mauri AL, Petersen CG, Martins AM, Cornicelli J, Cavanha M, Pontes A, Baruffi RL, Franco JG. Recombinant luteinizing hormone supplementation to recombinant follicle-stimulating hormone during induced ovarian stimulation in the GnRH-agonist protocol: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2007; 24:67–75.
21. Burgues S. The effectiveness and safety of recombinant human LH to support follicular development induced by recombinant human FSH in WHO group I anovulation: evidence from a multicentre study in Spain. *Hum Reprod.* 2001; 16: 2525-32.

22. König TE, van der Houwen LE, Overbeek A, Hendriks ML, Beutler-Beemsterboer SN, Kuchenbecker WK, et al. Recombinant LH supplementation to a standard GnRH antagonist protocol in women of 35 years or older undergoing IVF/ICSI: a randomized controlled multicentre study. *Hum Reprod.* 2013; 28: 2804–12.
23. Younis JS, Izhaki I, Ben-Ami M. The effect of LH supplementation following GnRH antagonist administration in advanced reproductive ageing women undergoing IVT-ET: a prospective randomized controlled study. *Fertil Steril.* 2014; 102(3), S23.
24. Vihko KK, Kujansuu E, Mörsky P, Huhtaniemi I, Punnonen R. Gonadotropins and gonadotropin receptors during the perimenopause. *Eur J Endocrinol.* 1996; 134(3): 357-61.
25. Humaidan P, Bungum M, Bungum L, Andersency C. 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.* 2004; 8(6): 635-43.
26. Marrs R, Meldrum D, Muasher S, Schoolcraft W, Werlin L, Kelly E. Randomized trial to compare the effect of recombinant human FSH (follitropin alfa) with or without recombinant human LH in women undergoing assisted reproduction treatment. *Reprod Biomed Online.* 2004; 8(2): 175-82.
27. Fábregues F, Creus M, Peñarrubia J, Manau D, Vanrell J.A, Balasch J. Effects of recombinant human luteinizing hormone supplementation on ovarian stimulation and the implantation rate in down-regulated women of advanced reproductive age. *Fertil Steril.* 2006; 85(4): 925-31.
28. Nazzaro A, Salerno, A. Recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH antagonist protocol improves implantation and pregnancy rates. *Fert Steril.* 2012; 98(3): S280.

Tabela 1 Distribuição das pacientes segundo a comparabilidade dos grupos.

Parâmetros	Grupo I (FSHr)	Grupo II (FSHr + LHr)	valor de p
Idade	37,3 ± 2,1	37,9 ± 2,4	0,111
IMC (kg/m ²)	23,2 ± 2,9	23,1 ± 3,0	0,221
Duração da infertilidade (anos)	8,2 ± 4,9	8,4 ± 4,1	0,230
FSH basal (mUI/ml)	6,4 ± 2,0	6,6 ± 1,9	0,384
LH basal (mUI/ml)	4,7 ± 2,1	4,6 ± 2,5	0,190
Estradiol basal (pg/ml)	45,0 ± 22,7	42,3 ± 29,4	0,102

As médias são expressas com o respectivo desvio padrão

Tabela 2 Resultados laboratoriais e clínicos dos grupos.

	Grupo I (FSHr)	Grupo II (FSHr + LHr)	valor de p
Ovócitos captados**	4,9 ± 2,1	5,7 ± 2,6	0,061
Ovócitos metáfase II**	3,4 ± 1,6	4,0 ± 1,9	0,060
Ovócitos imaturos**	1,3 ± 0,8	1,6 ± 1,1	0,114
Ovócitos inviáveis**	0,2 ± 0,5	0,1 ± 0,7	0,142
Taxa de fertilização %	192 (65,3)	209 (69,4)	0,282
Taxa de clivagem embrionária %	164 (85,4)	185 (88,5)	0,355
Taxa de gravidez química %	12 (20,0)	13 (24,5)	0,562
Taxa de gravidez clínica %	12 (20,0)	12 (22,6)	0,731

** As médias são expressas com o respectivo desvio padrão
Valores absolutos são expressos da percentagem (%)

ANEXO 1- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFG

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da suplementação com hormônio luteinizante recombinante na maturação ovocitária e qualidade embrionária em ciclos de fertilização assistida

Pesquisador: MÔNICA CANÊDO SILVA MAIA

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):

(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 33009214.6.0000.5078

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 751.367

Data da Relatoria: 14/08/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto para o programa de pós-graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde. É um estudo caso-controle, retrospectivo sobre a adição de LHr em protocolos de estimulação ovariana em pacientes submetidas a ciclos de FIV e ICSI. A população alvo será composta por pacientes atendidas no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (LABREP-HC/UFG). Serão incluídas pacientes com idade entre 18 a 40 anos; com concentrações FSH basal 9,9/l. Serão excluídas aquelas que apresentarem ovários com diâmetro menor que 3cm3; Índice de massa corporal [IMC = peso (kg) / altura (m2)] menor que 18,0 e maior que 32,0; Mais de dois ciclos anteriormente sem sucesso; presença de apenas um ovário; pacientes com síndrome dos ovários policísticos com oligo-amenorréia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Comparar os efeitos da suplementação de LHr para a estimulação ovariana controlada com FSHr

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitario

CEP: 74.605-020

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cephcfg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 751.367

em ciclos de FIV e ICSI na qualidade oocitária e de pré embriões.

Objetivo Secundário:

Comparar os seguintes parâmetros entre o grupo de pacientes que utilizaram protocolos de estimulação ovariana com e sem suplementação de LHR: Número de oócitos captados; Taxas de maturação ovocitária; Taxa de fertilização; Taxas de clivagem; Taxas de gravidez química; Taxas gravidez clínica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram informados apenas no formulário da PB.

Riscos: Em decorrência do desenho do estudo ser caso-controle, retrospectivo, não é possível determinar riscos. previsíveis.

Benefícios: Pacientes submetidas à técnicas de fertilização assistida serão beneficiadas com o uso de hormônio luteinizante em termos de resultados, gerando uma gravidez a termo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os dados serão coletados de planilhas pertencentes ao LABREP-HC/UFG de 80 pacientes atendidas por motivo

de infertilidade no período de janeiro a dezembro de 2013. As pacientes serão divididas em dois grupos: grupo A (pacientes com idade igual ou menor a 35 anos e grupo B pacientes com idade entre 36 a 40 anos.

Os grupos A e B serão subdivididos em: - Grupo I: quando o FSHr tiver sido administrado em doses de 37,5 a 225 UI até folículos maduros,

ajustada de acordo com a resposta da paciente ao ultrassom.

- Grupo II: quando o LHR tiver sido administrado por via subcutânea na dose de 75 IU / dia, a partir do 6º - 7º dia do ciclo associado a 37,5 a 225 UI de FSHr ajustado até os folículos se tornarem maduros de acordo com a resposta ovariana da paciente ao ultrassom.

As seguintes variáveis serão pareadas entre os grupos I e II:- idade;- porcentagem de agonistas e antagonistas em cada grupo;- valores basais de FSH, LH e estradiol;- IMC (índice de massa corporea);- técnica utilizada (FIV ou ICSI);-pacientes com síndrome de ovários policísticos (SOP);- meios de cultura;- suplementação com estradiol na 2ª fase do ciclo;-duração de infertilidade;-número de óocitos. A taxa de implantação será definida pelo número de sacos gestacionais observados pela ultrassonografia, 4 semanas após

transferência de embriões.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 751.367

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos: informações básicas sobre o projeto de pesquisa (Formulário PB); projeto detalhado; currículo dos pesquisadores envolvidos; justificativa para dispensa do TCLE; Declarações do pesquisador e orientador; autorização do núcleo de pesquisa e do LABREP e carta de encaminhamento do projeto.

Recomendações:

Verificar a redação dos critérios de inclusão e exclusão no documento informações básicas sobre o projeto de pesquisa. Eles estão diferentes dos apresentados no projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto não apresenta óbice ético.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas/UFG - CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Após início, o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, via Plataforma Brasil, relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações. O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.

Situação: Protocolo aprovado.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020

UF: GO **Município:** GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcfg@yahoo.com.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 751.367

GOIANIA, 14 de Agosto de 2014

Jose Mario Coelho Moraes

Assinado por:
JOSE MARIO COELHO MORAES
(Coordenador)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cephcufg@yahoo.com.br

Página 04 de 04

Anexo 2 – Normas para publicação JBRA Assisted Reproduction

Instructions for Authors

GENERAL

INFORMATION

1. JBRA Assisted Reproduction (JBRA Assist Reprod) is the official publication by both the Brazilian Society of Assisted Reproduction (SBRA – www.sbra.com.br), the Latin America Network of Assisted Reproduction (www.redlara.com) and Pronúcleo – Brazilian Association of Embryologists destined to scientific-based and quarterly issued papers. It is designated to specialists and researchers in the health area, in particular to gynecologists, andrologists, biologists, urologists and embryologists. Basic and clinical studies in the areas of assisted reproduction, infertility, reproductive genetics, reproductive immunology, andrology, reproductive microbiology, laboratory in assisted reproduction and gynecological endocrinology will be accepted for evaluation in the form of original articles, reviews, update articles and case reports (as detailed below). Articles must be submitted in English.
2. Papers submitted to JBRA Assisted Reproduction must be original, that is, they cannot have been either published or submitted for analysis by other journals, partially or in the whole. In cases where the illustrations have been published previously, an authorization must be granted and the source cited.
3. The Instructions for Authors by JBRA Assisted Reproduction is comprised of the recommendations given by the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. The complete version of the text is available at www.icmje.org. Manuscripts not in accordance with the instructions presented herein will be returned for modifications to be made before the Editorial Board has evaluated them.
4. Every article published in JBRA Assisted Reproduction undergoes a review process by specialists (peer review). Submitted articles are primarily sent to editors for an initial evaluation as to the scope of the work and the editorial demands of the journal. In case of a positive evaluation, the article is then sent to two reviewers specialized in the appropriate area. Every process is anonymous, that is, reviewers are not aware of author's identity and place of origin and vice versa. After the articles are evaluated by reviewers, they can be accepted without alterations, refused or returned to authors along with suggestions for modifications. Each article may return to its author several

times for clarification and alteration, without necessarily meaning a future acceptance of the article.

5. The co-authorship concept connotes substantial contribution in the creation and planning of the paper, analysis and interpretation of data not to mention the writing and critical revision of the text. Significant contributions given to the study which do not fit these criteria must be cited in the acknowledgements section.
6. Clinical trials articles should be registered in the Clinical Trials Registry validated by the criteria established by the World Health Organization and by the International Committee of Medical Journal Editors (for instance, www.actr.org.au, www.clinicaltrials.gov, www.ISRCTN.org, www.umin.ac.jp/ctr/index/htm and www.trialregister.nl). The study identification number shall be presented at the end of the abstract.
7. For texts accepted for publication, a statement signed by all authors shall be sent to the journal, including the following information: a) the manuscript is original; b) the manuscript has not been previously published nor submitted to any other journal, and will not be published in case it is accepted by JBRA Assisted Reproduction; c) all authors have actively taken part in the preparation of the study and have approved of the final version of the text; d) situations on potential conflict of interests (either financial or of any other nature) are being informed; e) an approval of the study by the Ethics Committee of the institution to which the paper is linked was obtained (for articles reporting experimental research data); f) an informed consent by the patients included in the study was obtained (when applicable). All information on the approval of the study by the Ethics Committee and the possession of an informed consent should also be mentioned in the Methods section of the article.
8. Before the publication of accepted articles, the corresponding authors will receive the published article via e-mail attachment in a PDF archive for approval. At this point, corrections should be limited to typographic mistakes, without altering the content of the study. Authors should return approved papers by e-mail or fax 48 hours after receiving the message.

TYPES OF PUBLISHED ARTICLES

Original articles. Pieces of work resulting from scientific research presenting original data about experimental or observational aspects of medical, biological, biochemical and psychosocial character and including descriptive statistical analysis and/or inferences of own data. These articles have priority for publication. They must be composed of: title page, abstract and keywords, text (divided in Introduction,

Material and Methods, Results, Discussion or equivalent, Conclusion), acknowledgments (if applicable), references, tables (if available), figure legends (if available) and figures (if available).

Reviews. Papers whose aim is to summarize, analyze, evaluate or synthesize investigative papers already published in scientific journals. They must include a synthesis and critical analysis of the researched literature and cannot be confused with update articles. They must be composed of: title page, abstract and keywords, text, references, tables (if available), figure legends (if available) and figures (if available).

Update or opinion articles. Papers reporting usually current information on themes of interest to certain specialties (such as a new technique or method). They have different characteristics from reviews, since they do not display critical analysis of the literature. They must be composed of: title page, abstract and keywords, text, references, tables (if available), figure legends (if available) and figures (if available).

Case reports. Articles representing descriptive data of one or more cases, exploiting a method or problem through example(s). The selected cases should be of great interest, with unusual disease or evolution or submitted to unexpected or alternative treatments. They must involve humans or animals and should present the studied individual's characteristics (gender, age, etc.). They must be composed of: title page, abstract and keywords, text (divided in: Introduction, Case Description and Discussion or equivalent), references, figure legends (if available) and figures (if available).

Letters to the reader. Letters to the editor commenting, discussing or criticizing articles published in JBRA Assisted Reproduction will be welcome and published as long as they are accepted by the Editorial Board. They must be composed of: title, name of author, identification of the publication being commented on and references (if available). It is recommended to include 500 words at the most, references inclusive. Whenever possible, a reply by the authors will be published alongside with the letter.

COVER LETTER

You have to prepared a cover letter for your submission, explaining why we should publish your manuscript and elaborating on any issues relating to our editorial policies detailed in the instructions for authors, and declaring any potential competing interests. This should be provided using the 'cover letter' section of the submission process.

The cover letter have to carry the following information:

- Title
- Authors' names
- Authors' institutional affiliation, showing department/unit, institution and geographic region

- Name of the institution where the work was carried
- Name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding author

PREPARATION OF ORIGINAL PAPERS

Preferably use Microsoft Word® processor. Papers should be typed in Times New Roman font sized 12, single-spaced and aligned to the left. Every section should be started on a new page in the following order: title page, abstract and keywords, text, acknowledgements, references, tables, figure legends and figures. All of the pages should be numbered consecutively.

Abbreviations should be spelled out in the first mention in the text; and after the first appearance, only the abbreviation should be used. In the abstract, the use of abbreviations should be avoided.

Chemicals should be presented by their generic name. If relevant, commercial name of the substance and the manufacturer's name must be informed in parentheses.

The presentation of units of measurements should follow the International System (IS).

Genes of animals should be presented in italics with capital letter initials (example: Sox2); genes of human beings should also be presented in italics; however, with all capital letters (example: SOX2). Proteins should follow the same pattern: capital/small, without italics, though.

Title Page

The title page should carry the following information:

- Concise and comprehensive title, representing the content of the article
- Short running head (no more than 40 characters including letters and spaces)
- Information about support given in the form of loan, equipment or drugs
- Congresses where the study was presented

Abstract

The content of the texts should not exceed 250 words.

For original articles, the abstract should be structured as follows: Objective, Methods, Results and Conclusion. For case reports, reviews and update articles, the abstract should not be structured. The use of abbreviations should be avoided in the abstract, and references should not be cited. Right after the abstract, three to six keywords should be presented.

Acknowledgements

This part is dedicated to acknowledging the work of those who have helped intellectually, but whose contribution does not justify co-authorship or those people or institutions who have given material support.

References

In the text, the citations will be identified by the author's last name in parentheses followed by the publication year. Examples: one author (Steptoe, 1978), two authors (Edwards & Steptoe, 1980), and more than two authors (Van Steirteghem et al., 1988).

The references should be presented in alphabetical order (each author's surname followed by his/her first two initials), and should not be numbered. Papers by the same author should be chronologically organized; papers by the same author in the same year should be identified with letters after each year (2000a, 2000b, etc.). The presentation of references will follow the format proposed in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (see examples below). All references cited in the list should be mentioned in the text and vice-versa.

1. Journal Article

Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol.* 1980;87:737-56.

2. Book

Wolf DP, Quigley MM, eds. *Human in vitro fertilization and embryo transfer.* New York: Plenum Press; 1984.

3. Book Chapter

Simpson JL. Gonadal dysgenesis and sex abnormalities: phenotypic-karyotypic correlations. In: Vallet HL, Porter IH, eds. *Genetic mechanisms of sexual development.* New York: Academic Press; 1979. p. 365-77.

4. Electronic Journal Article

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs [electronic journal].* 2002 June [cited 2002 aug 12];102(6):[approximately 3 p.]. Available at: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>.

5. Article published in the Internet

Wantland DJ, Portillo CJ, Holzemer WL, Slaughter R, McGhee EM. The

effectiveness of web-based vs. non-webbased interventions: a meta-analysis of behavioral change outcomes. *J Med Internet Res.* 2004;6(4):e40. Available at: <http://www.jmir.org/2004/4/e40/>. Accessed: 29/11/2004.

6. Site

OncoLink [site in the Internet]. Philadelphia: University of Pennsylvania; c1994–2006. [updated 2004 Sept 24; cited 2006 March 14]. Available at: <http://cancer.med.upenn.edu/>.

7. Software

Smallwaters Corporation. Analysis of moment structures: AMOS [software]. Version 5.0.1. Chicago: Smallwaters; 2003.

Tables And Figures

Tables and figures (graphs, photographs, etc.) should be numbered in Arabic numerals according to the order in which they appear in the text and should have individual legends, presented at the end of the paper.

In the tables, use horizontal lines only, and each piece of information should be in an independent cell. Explanations about items in the tables should be presented in footnotes identified by the following symbols, in this sequence: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡.

Figures must be submitted in electronic formats such as .jpg, .gif or .tif, with a minimum resolution of 300 dpi.

Photographs of patients should not allow their identification.

Figures previously published and included in submitted articles should include the original source in the legend and should be accompanied by a permission letter from the copyright's holder (publisher or journal).

SUBMISSION OF ARTICLES

To facilitate the articles publication, JBRA Assisted Reproduction prefers online submission. Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of the same research institution. Suggested reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the Editor and/or Editorial Board members.

Anexo 3 – Normas para publicação da Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB)

Normas para Publicação

Objetivo e Política Editorial

A Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB), editada pela Associação Médica Brasileira, tem por objetivo publicar artigos que contribuam para o conhecimento médico. A RAMB é indexada nas bases de dados SciELO, Science Citation Index Expanded (SCIE), Scopus, Web of Science, Institute for Scientific Information (ISI), Index Copernicus, LILACS, MEDLINE e CAPES - QUALIS B2. Atualmente, a revista é produzida em seis edições por ano em versão on-line, de livre acesso na internet (www.ramb.org.br). Os artigos serão publicados na língua original em que foram submetidos (são aceitos manuscritos em português, inglês ou espanhol). O conteúdo integral da revista em língua inglesa é publicado simultaneamente à versão em português.

A RAMB aceita para publicação artigos nas seguintes categorias: Artigos Originais, Artigos de Revisão, Correspondências, Ponto de Vista, Panorama Internacional, À Beira do Leito e Imagem em Medicina. O Conselho Editorial recomenda fortemente que os autores leiam a versão on-line da RAMB e analisem os artigos já publicados como modelo para a elaboração de seus trabalhos.

Informações gerais

Como submeter artigos

Os artigos e correspondências deverão ser enviados somente via internet pelo seguinte endereço eletrônico: www.ramb.org.br. Basta a realização de um cadastro, seguido do envio do manuscrito, obedecendo as normas aqui descritas. Só serão aceitos artigos que, dentre seus autores, contenha, no mínimo, um médico.

Os artigos poderão ser escritos em português, espanhol ou na língua inglesa. Cada artigo, acompanhado de correspondência ao editor, deverá conter título, nome completo do(s) autor(es), instituição na qual o trabalho foi realizado e seção da revista à qual se destina.

O conteúdo do material enviado para publicação na RAMB não pode estar em processo de avaliação, já ter sido publicado, nem ser submetido posteriormente para publicação em outros periódicos. A critério do editor chefe, todos os artigos recebidos são revisados por membros do Conselho Editorial.

Ao preparar o manuscrito, os autores deverão indicar qual ou quais áreas editoriais estão relacionadas ao artigo, para que este possa ser encaminhado para análise editorial específica.

O Conselho Editorial recomenda que os autores façam uma busca por artigos relacionados ao tema e publicados anteriormente na RAMB ou em outros periódicos indexados no SciELO, utilizando as mesmas palavras-chaves do artigo proposto. Estes artigos devem ser considerados pelos autores na elaboração do manuscrito com o objetivo de estimular o intercâmbio científico entre os periódicos SciELO.

O que acontece depois que o artigo foi submetido?

Em virtude do grande número de artigos enviados, o Conselho Editorial adotou critérios de seleção para o processo de revisão por pares. A exemplo do que acontece com outros periódicos, a maior parte dos artigos submetidos não passa para a fase detalhada de avaliação que é a revisão por pares. Os critérios que o Conselho Editorial adotou para essa seleção inicial incluem o perfil editorial da revista e de seus leitores, área de interesse do tema principal do trabalho, título e resumo adequados, redação bem elaborada, metodologia bem definida e correta (incluindo, no caso de estudos clínicos, tamanho amostral, metodologia estatística e aprovação por Comitê de Ética), resultados apresentados de maneira clara e conclusões baseadas nos dados. Esse procedimento tem por objetivo reduzir o tempo de resposta e não prejudicar os autores. A resposta detalhada, elaborada pelos revisores, só ocorre quando o artigo passa dessa primeira fase.

No caso de rejeição, a decisão sobre a primeira fase de avaliação é comunicada aos autores em média duas a três semanas depois do início do processo (que começa logo após a aprovação do formato pelo revisor de forma). O resultado da revisão por pares contendo a aceitação ou a rejeição do artigo para publicação ocorrerá no menor prazo possível.

Embora existam rigorosos limites de tempo para a revisão por pares, a maioria dos periódicos científicos conta com o notável esforço e a colaboração da comunidade científica que, por ter muitas outras atribuições, nem sempre consegue cumprir os prazos. Ao receber o parecer dos revisores, os autores deverão encaminhar, em comunicado à parte, todos os pontos alterados do artigo que foram solicitados pelos revisores. Além disso, o texto contendo as alterações solicitadas pelos revisores deverá ser reencaminhado à RAMB na cor vermelha, devendo ser mantido e sublinhado o texto anterior.

A ordem de publicação dos artigos será cronológica, podendo, no entanto, haver exceções definidas pelo Conselho Editorial. Os trabalhos aceitos para publicação serão enviados aos autores e deverão ser revisados e devolvidos no prazo de dois dias, caso contrário o artigo será publicado em sua forma original. Após a aprovação final pelos autores NÃO será possível modificar o texto.

Corpo editorial

O Corpo Editorial da RAMB é composto pelo Editor Geral, Editores Associados, Editores Colaboradores e Conselho Editorial nas seguintes áreas: Clínica Médica, Clínica Cirúrgica, Saúde Pública, Pediatria, Ginecologia e Obstetrícia, Bioética, Cancerologia, Emergência e Medicina Intensiva, Medicina Farmacêutica e Medicina Baseada em Evidências. O Corpo Editorial será responsável pela revisão e aceitação ou não dos artigos enviados à revista para publicação. O editor chefe tem as prerrogativas

que o cargo lhe confere para aceitar ou não qualquer artigo, independentemente da revisão por pares, assim como definir a edição de sua publicação.

Estilo e preparação de originais

O trabalho deverá ser redigido em corpo 12, no máximo em 15 laudas de 30 linhas cada, espaço 1,5 linha, com margem de 3 cm de cada lado, no topo e no pé de cada página. Todas as páginas, excluída a do título, devem ser numeradas.

Página título

Deverá conter:

- a) O título do trabalho, também na versão em inglês, deverá ser conciso e não exceder 75 toques ou uma linha.
- b) Nome, sobrenome do autor e instituição a qual pertence o autor.
- c) Nome e endereço da instituição onde o trabalho foi realizado.
- d) Carta de apresentação, contendo assinatura de todos os autores, responsabilizando-se pelo conteúdo do trabalho, porém apenas um deve ser indicado como responsável pela troca de correspondência. Deve conter telefone, fax, e-mail e endereço para contato.
- e) Aspectos éticos: carta dos autores revelando eventuais conflitos de interesse (profissionais, financeiros e benefícios diretos ou indiretos) que possam influenciar ou ter influenciado os resultados da pesquisa ou o conteúdo do trabalho. Na carta deve constar ainda, quando cabível, a data da aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição à qual estão vinculados os autores. É absolutamente obrigatório o envio, juntamente com o artigo, do termo de copyright, disponível no site da Ramb, devidamente assinado pelos autores, sem o qual o artigo não seguirá o seu fluxo normal de avaliação.

Tópicos dos artigos

Os artigos originais deverão conter, obrigatoriamente, Introdução, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

Notas de rodapé

Apenas quando estritamente necessárias; devem ser assinaladas no texto e apresentadas em folha separada após a do resumo, com o subtítulo "Nota de rodapé".

Agradecimentos

Apenas a quem colabore de modo significativo na realização do trabalho. Deve vir antes das referências bibliográficas.

Resumo/Summary

O resumo, com no máximo 250 palavras, deverá conter objetivo, métodos, resultados e conclusões. Após o resumo deverão ser indicados, no máximo, seis Unitermos (recomenda-se o vocabulário controlado do DeCS – Descritores em Ciências da Saúde, publicação da BIREME – Centro Latino Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde). Para os termos em inglês recomenda-se o MeSH da base Medline. O Summary visa permitir a perfeita compreensão do artigo. Apresentar em folha separada e seguir o mesmo modelo do resumo: background, methods, results, conclusions. Deve ser seguido de keywords.

Artigos escritos em português devem conter, na segunda página, dois resumos: um em português e outro em inglês (Summary). Artigos escritos em espanhol devem apresentar resumos em inglês (Summary) e português. Os escritos em inglês devem conter resumo também em português.

Referências bibliográficas

As referências bibliográficas devem ser dispostas por ordem de entrada no texto e numeradas consecutivamente, sendo obrigatória sua citação. Devem ser citados todos os autores, totalizando seis; acima deste número, citam-se os seis primeiros seguidos de et al. O periódico deverá ter seu nome abreviado de acordo com a LIST OF JOURNALS INDEXED IN INDEX MEDICUS do ano corrente, disponível também on-line nos sites: www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html ou www.nlm.nih.gov/citingmedicine ou, se não for possível, a Associação de Normas Técnicas (ABNT). Exemplos:

1. *Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. Br J Cancer 1996;73:1006-12.*
2. Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med 1996;124:980-3.*
3. The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust 1996; 164-282-4.*
4. Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J 1994;84:15.*
5. Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995.p.465-78.
6. Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis [serial on line] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]*. Available from: URL: www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm.

7. Leite DP. Padrão de prescrição para pacientes pediátricos hospitalizados: uma abordagem farmacoepidemiológica [dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

Referências de “resultados não publicados” e “comunicação pessoal” devem aparecer, entre parênteses, seguindo o(s) nome(s) individual (is) no texto. Exemplo: Oliveira AC, Silva PA e Garden LC (resultados não publicados). O autor deve obter permissão para usar “comunicação pessoal”.

Citações bibliográficas

As citações bibliográficas no texto devem ser numeradas com algarismos arábicos sobrescritos, na ordem em que aparecem no texto. Exemplo: Até em situações de normoglicemia ⁶.

Figuras, tabelas, gráficos, anexos

No original deverão estar inseridos tabelas, fotografias, gráficos, figuras ou anexos. Devem ser apresentados apenas quando necessários, para a efetiva compreensão do texto e dos dados, totalizando no MÁXIMO TRÊS.

- a) As figuras, sempre em preto e branco, devem ser originais e de boa qualidade. As letras e símbolos devem estar na legenda.
- b) As legendas das figuras e tabelas devem permitir sua perfeita compreensão, independente do texto.
- c) As tabelas, com título e legenda, deverão estar em arquivos individuais.
- d) É preciso indicar, em cada figura, o nome do primeiro autor e o número da figura. Figuras e tabelas deverão ser numeradas separadamente, usando algarismo arábico, na ordem em que aparecem no texto.

Abreviações / Nomenclatura

O uso de abreviações deve ser mínimo. Quando expressões extensas precisam ser repetidas, recomenda-se que suas iniciais maiúsculas as substituam após a primeira menção. Esta deve ser seguida das iniciais entre parênteses. Todas as abreviações em tabelas e figuras devem ser definidas nas respectivas legendas. Apenas o nome genérico do medicamento utilizado deve ser citado no trabalho.

Terminologia

Visando o emprego de termos oficiais dos trabalhos publicados, a RAMB adota a Terminologia Anatômica Oficial Universal, aprovada pela Federação Internacional de Associações de Anatomistas (FIAA). As indicações bibliográficas para consulta são as seguintes: FCAT – IFAA (1998) – International Anatomical Terminology – Stuttgart – Alemanha – Georg Thieme Verlag, Editora Manole.