UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Beatrice Nuto Nóbrega

Avaliação da eficácia de uma estimulação ovariana controlada simplificada e de custo reduzido – um estudo piloto.

Ribeirão Preto

2018

BEATRICE NUTO NÓBREGA

Avaliação da eficácia de uma estimulação ovariana controlada simplificada e de custo reduzido – um estudo piloto.

Versão original

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Dr. Wellington de Paula Martins

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Nóbrega, Beatrice Nuto

Avaliação da eficácia de uma estimulação ovariana controlada simplificada e de custo reduzido – um estudo piloto.

62 p. Il; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Área de concentração: Tocoginecologia.

Orientador: Martins, Wellington de Paula

1. Indução de ovulação 2. Técnicas de Reprodução Assistida , 3. Acesso aos Serviços de Saúde, 4. Clomifeno, 5. Letrozol.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Beatrice Nuto Nóbrega

Avaliação da eficácia de uma estimulação ovariana controlada simplificada e de custo reduzido – um estudo piloto.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Esse é ápice de um ciclo que começou com minha mudança para Ribeirão Preto, em 2012. É impossível não agradecer:

A Deus.

Aos meus pais, Gláucio e Silvania, que sempre foram meu porto seguro e maiores incentivadores. Sem a ajuda deles esse plano não estaria pronto ou sequer haveria iniciado. Ao Gabriel que, além de ser meu querido irmão, é meu exemplo de pesquisador dedicado. Amo vocês.

Ao meu amor, Fernando. Obrigada por todo o apoio na vida real, por tudo que construímos juntos e por sua compreensão em tantos altos e baixos nesse caminho.

Ao meu orientador, Wellington de Paula Martins, que me ensinou tantas coisas durante a residência e durante esse projeto do mestrado. E que além de ser uma inspiração na área acadêmica, se tornou um amigo. Agradeço também à sua esposa Carol Nastri, por toda a ajuda com o trabalho e pela receptividade em sua casa.

Aos meus familiares queridos (avós, tios, cunhadas e primos) e amigos de Fortaleza, que mesmo à distância se fazem presente e que me fazem sempre me sentir em casa aí, onde quer que eu esteja morando.

Aos amigos de Ribeirão Preto, que fizeram esses quatro anos de residência inesquecíveis. Vocês foram fundamentais e com certeza foram as melhores companhias durante o trabalho e a diversão.

À melhor turma de residentes de reprodução do HC: Lívia, Marina, Paulinha e Vinícius. Obrigada pela amizade e pela ajuda com a pesquisa.

A toda a Equipe do laboratório de GO. Obrigada por todos os ensinamentos, pela convivência e pela paciência.

A toda a Equipe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HC. Fazer parte deste serviço foi essencial na minha carreira profissional e sempre será motivo de orgulho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo suporte financeiro com a bolsa (Processo 2015/12996-9).

À minha nova família Cearoca, que me tanto me ajudou a seguir em frente diante de tantas mudanças.

Às participantes do estudo, obrigada pela confiança depositada.

RESUMO

NOBREGA, B. N **Avaliação da eficácia de uma estimulação ovariana controlada simplificada e de custo reduzido – um estudo piloto.** [dissertação de mestrado] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2018. 62 p.

Introdução: As técnicas de reprodução assistida (TRA) são o principal tratamento para a infertilidade, que afeta 9-15% dos casais em idade reprodutiva. No entanto, o alto custo do tratamento, que se deve principalmente aos medicamentos utilizados para a estimulação ovariana (EO), muitas vezes é um fator limitante ao acesso e à continuação. O objetivo deste estudo é avaliar a viabilidade de um novo protocolo de OS simplificado e de custo reduzido, que inclui o uso de medicamentos orais e um menor número de injeções, a fim de idealizar um estudo clínico randomizado. **Métodos:** Foram convidadas a participar todas as mulheres que seriam submetidas a EO para TRA em um serviço de reprodução universitário no Brasil entre abril de 2015 e fevereiro de 2016 com ≤ 90 Kg, 18-40 anos e com uma contagem de folículos antrais (CFA) ≥ 9 . 40 pacientes que preenchiam aos critérios de inclusão concordaram em participar e iniciaram a EO no segundo ou terceiro dia da menstruação. O protocolo incluía letrozol 7,5mg/dia por 5 dias e citrato de clomifeno 100mg/dia até o dia da maturação folicular por via oral e uma injeção subcutânea única de corifolitropina alfa 100 mcg no terceiro dia de estimulação. O monitoramento com ultrassonografia foi feito no primeiro de estímulo, no oitavo dia e em seguida a cada dois dias. O desencadeamento da maturação final foi realizado com agonista do GnRH, leuprolida 1mg ou triptorelina 0,2mg, por via subcutânea. A captação de oócitos foi realizada 35-36 horas depois. Nenhum antagonista do GnRH foi usado na prevenção do pico precoce de LH. A maioria dos oócitos foi injetada e todos os embriões foram criopreservados para posterior transferência. Os resultados foram comparados com outras 40 pacientes submetidas à EO convencional no mesmo serviço e período de tempo, selecionadas aleatoriamente de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Ambos os grupos foram divididos em subgrupos de acordo com a CFA: 9-19 ou >19 . **Resultados:** Não houve diferença entre o grupo controle e o da pesquisa quanto à idade, peso, índice de massa corporal e CFA. Os resultados para o novo protocolo foram: mediana de oócitos totais recuperados de 12 e de oócitos MII de 9. No subgrupo com CFA 9-19, as medianas foram de 9 e 7,5 e no subgrupo > 19 foram de 16 e 13. As taxas de fertilização e clivagem foram 72% e 93%, respectivamente. Não houve diferença estatística

entre estes resultados e o grupo controle. A duração média da EO foi de 11 dias, 2 dias a mais em relação ao controle. Houve dois casos de síndrome de hiperestimulação ovariana, um moderado e um grave de acordo com os critérios de Golan. Ambos foram tratados clinicamente com hidratação, medicação sintomática e trombopprofilaxia, com melhora satisfatória em poucos dias. **Conclusão:** Apesar da duração mais longa da EO com o novo protocolo, o número de oócitos totais e MII recuperados e as taxas de fertilização e clivagem foram satisfatórios. Assim, este novo é viável para posterior avaliação em um estudo controlado randomizado.

Palavras-chave: Indução de ovulação. Técnicas de Reprodução Assistida. Acesso aos Serviços de Saúde. Clomifeno. Letrozol.

ABSTRACT

NOBREGA, B. N. **A feasibility study of a new friendly and low-cost ovarian stimulation protocol for assisted reproduction.** [masters dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2018. 62 p.

Introduction: Assisted reproduction techniques are the main treatment for infertility, that affects 9-15% of couples at reproductive age. However, the high cost of the treatment, which is often a limiting factor to access and continuation, is mainly due to medications used for controlled ovarian stimulation (OS). The objective of this study is to evaluate the feasibility of a new friendly and low-cost OS protocol, including the use of oral and low-cost medications and reducing the number of injections, in order to enable the design of a large randomized controlled trial. **Methods:** All women undergoing ART with OS in a university fertility center in Brazil within abril-2015 to Feb-2016 with ≤ 90 Kg, 18-40 years, and with an antral follicle count (AFC) ≥ 9 were invited to participate. 40 patients which matched inclusion criteria agreed to participate and started OS on menstruation days 2 or 3. They received oral letrozole 7.5mg/day for 5 days and oral clomiphene citrate 100mg daily until the triggering. On stimulation day-3 they received a single dose of corifollitropin alfa 100mcg subcutaneously. Ultrasound monitoring started on day-8 and proceeded every other day. The final triggering was performed as usual with GnRH agonist, leuprolide 1mg or triptorelin 0.2mg, subcutaneously. The oocyte retrieval was performed 35-36 hours afterwards. No GnRH antagonist was used for prevention of LH surge. Most oocytes were injected and all embryos were cryopreserved for later transfer. Some patients decided for oocytes cryopreservation. The results were compared to other 40 patients who underwent conventional OS at the same service and period of time, randomly selected according to inclusion and exclusion criteria. Both groups were divided in two subgroups according AFC: 9-19 and >19 . The primary outcome was the number of mature (MII) oocytes retrieved. **Results:** There was no difference in control and research group regarding age, weight, body mass index and AFC. The results for the new protocol were: the median number of total oocytes retrieved was 12 and of MII oocytes 9. In AFC 9-19 subgroup the median was 9 and 7.5 and in >19 AFC subgroup was 16 and 13. The fertilization and cleavage rates were respectively 72% and 93%. No statistical difference was found between this results and the control group. The median length of OS was 11 days, with a 2 days increase comparing to

control. There were two cases of ovarian hyperstimulation syndrome, one moderate and one severe according to the Golan criteria. Both were clinically treated with hyperhydration, symptomatic medication and thromboprophylaxis with satisfactory improvement within few days. **Conclusions:** Besides a longer duration in the OS, the number of total and MII oocytes, fertilization and cleavage rates were satisfactory. Thus this new friendly and low cost OS protocol is feasible for further evaluation in a randomized controlled trial.

Keywords: Ovulation Induction. Assisted Reproductive Techniques. Health Services Accessibility. Clomiphene. Letrozole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Medicações análogas do GnRh, agonistas e antagonistas.	16
Figura 2. Comportamento das concentrações periféricas de FSH, LH e estradiol (E2) após aplicação dos análogos do GnRH.....	17
Figura 3. Molécula do citrato de clomifeno	21
Figura 4. Regime de tratamento com citrato de clomifeno.	22
Figura 5. Molécula do letrozol.....	24
Figura 6. Comparação entre as moléculas de FSH e corifolitropina alfa	25
Figura 7. Comparação do tratamento diário com FSH (A) ou uma injeção de corifolitropina alfa (B). O limiar de FSH representa a concentração acima da qual o desenvolvimento folicular é estimulado.....	26
Figura 8. Esquema das medicações do protocolo da pesquisa durante os dias da estimulação ovariana	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. Diferença entre mecanismos de ação dos análogos do GnRH	17
Tabela 3. Esquema das medicações da EO proposta e custo médio aproximado	33
Tabela 4. Características e resultados das participantes do estudo	37
Tabela 5. Comparação dos oócitos captados e submetidos à ICSI, taxas de fertilização e clivagem e percentual de embriões de ótima qualidade	38
Tabela 6. Características, resultados e comparações no subgrupo de pacientes com reserva ovariana normal (CFA entre 9 e 19)	39
Tabela 7. Características, resultados e comparações no subgrupo de pacientes com reserva ovariana elevada (CFA maior ou igual a 20)	40
Tabela 8. Características e resultados das pacientes excluídas do estudo	41
Tabela 9. Pacientes com síndrome de hiperestimulação ovariana	41

LISTA DE SIGLAS

TRA: técnicas de reprodução assistida

FIV: fertilização *in vitro*

ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozoide

EO: estimulação ovariana

RA: reprodução assistida

FSH: hormônio folículo-estimulante, do inglês *follicle-stimulating hormone*

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas, do inglês *gonadotropin-releasing hormone*

Eixo HHO: eixo hormonal hipotálamo-hipófise-ovariano

LH: hormônio luteinizante, do inglês *luteinizing hormone*

hCG: gonadotrofina coriônica humana, do inglês *human chorionic gonadotropin*

CC: citrato de clomifeno

LTZ: letrozol

IIU: inseminação intrauterina

OR: razão de chance, do inglês *odds ratio*

IC: intervalo de confiança

SHO: síndrome de hiperestimulação ovariana

hMG: gonadotrofina menopáusica humana, do inglês *human menopausal gonadotropin*

SOP: síndrome dos ovários policísticos

DNA: ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

FSHr: hormônio folículo-estimulante de origem recombinante

IMC: índice de massa corpórea

Oócitos MII: oócitos maduros, na metáfase II

D2: segundo dia pós-fertilização

HC-FMRP-USP: Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

DP: desvio padrão

IIQ: intervalo interquartil

E2: estradiol

P4: progesterona

Observação: Pela similaridade com as abreviaturas em português e pelo fato de muitas das abreviaturas em inglês serem amplamente utilizadas na prática clínica, optamos por manter algumas utilizadas na literatura internacional, para facilitar o entendimento do leitor.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONVENCIONAL.....	15
1.2. CRÍTICAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONVENCIONAL	18
1.3. CITRATO DE CLOMIFENO	20
1.4. LETROZOL	24
1.5. CORIFOLITROPINA ALFA	25
1.6. POLÍTICA DE CONGELAMENTO TOTAL	26
1.7. NOVO PROTOCOLO PROPOSTO	27
2. OBJETIVOS.....	29
3. MÉTODOS	30
3.1. DESENHO DO ESTUDO.....	30
3.2. CENÁRIO	30
3.3. PARTICIPANTES:.....	30
3.4. VARIÁVEIS	31
3.5. ESTIMULAÇÃO OVARIANA.....	31
3.6. PUNÇÃO FOLICULAR E CAPTAÇÃO DE OÓCITOS	33
3.7. FERTILIZAÇÃO	34
3.8. CÁLCULO AMOSTRAL	34
3.9. MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	34
3.10. ASPECTOS ÉTICOS	35
4. RESULTADOS	36
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida (TRA), que incluem a fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), são o principal tratamento para a infertilidade, o que pode afetar de 9-15% dos casais em idade reprodutiva (Boivin, Bunting et al. 2007, Thoma, McLain et al. 2013). Durante um ciclo de tratamento, o número de oócitos captados, isto é, recuperados com a punção folicular e disponíveis para serem fertilizados, é comumente um fator limitante para o desenvolvimento de embriões e, por consequência, para os resultados clínicos, tais como gravidez clínica e nascimento de feto vivo (Ferraretti, La Marca et al. 2011, Sunkara, Rittenberg et al. 2011, Coelho Neto, Martins et al. 2015).

1.1. ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONVENCIONAL

A fase inicial de um ciclo de reprodução assistida (RA), conhecida como estimulação ovariana (EO), consiste no uso de medicações a fim de provocar o desenvolvimento de múltiplos folículos e, consequentemente, aumentar o número de oócitos disponíveis. O objetivo dessa etapa do tratamento é compensar as ineficiências inerentes à reprodução humana e às TRA, na tentativa de desenvolver um ou mais embriões para transferência, na tentativa de aumentar as taxas de gestação a fresco e cumulativa, seja pela seleção dos melhores embriões, seja pela possibilidade de múltiplas transferências (Sunkara, Rittenberg et al. 2011, Vaughan, Leung et al. 2017).

Para tanto, utilizam-se drogas que induzem o desenvolvimento multifolicular, que podem ser desde injeções do próprio hormônio folículo-estimulante (FSH), de origem natural, sintética ou mais recentemente em forma de molécula quimérica, até medicações que estimulem a secreção hipotalâmica endógena dessa gonadotrofina, como o citrato de clomifeno e o letrozol (Trousnon, Leeton et al. 1981, Lopata 1983, Vargyas, Morente et al. 1984, Quigley, Schmidt et al. 1985).

A partir do final da década de 1980 com o surgimento das drogas análogas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Figura 1), além da estimulação dos ovários, o bloqueio do eixo hormonal hipotálamo-hipófise-ovariano (HHO) tornou-se parte fundamental dessa fase. A supressão do eixo endógeno tem como finalidade evitar a liberação hipofisária de hormônio luteinizante (LH) que poderia culminar com ovulação ou

luteinização precoce, o que poderia causar cancelamento do ciclo e prejuízo à quantidade de óvulos captados ou às taxas de gravidez com transferência de embriões a fresco, por elevação da progesterona e interferência na janela de implantação (Zorn, Boyer et al. 1987, Abdalla, Baber et al. 1989).

Figura 1. Medicamentos análogos do GnRh, agonistas e antagonistas.

Glu: glutamina; His: histidina; Trp: triptofano; Ser: serina; Tyr: tirosina; Gly: glicina; Leu: leucina; Arg: arginina; Pro: prolina.

Dentre os análogos do GnRH, os que primeiro tiveram uso comercial dentro das TRA foram os do tipo agonistas. Essa medicação age através da ligação de suas moléculas com os receptores de GnRH nos gonadotrofos da hipófise. Por serem moléculas muito semelhantes com esse hormônio decapeptídeo natural, sua alta afinidade pelos receptores desencadeia um estímulo na hipófise, conhecido como “*flare up*”, que culmina com a liberação inicial das reservas de FSH e LH. No entanto, como a droga não é facilmente degradada ou liberada do receptor, a ocupação contínua leva a uma dessensibilização da hipófise, conhecido como “*down regulation*”, o que suprime a liberação de gonadotrofinas (Hughes, Fedorkow et al. 1992).

Cerca de dez anos depois surgiram as drogas antagonistas do GnRH. Essas medicações possuem a mesma finalidade de prevenção do pico precoce de LH durante a EO,

mas agem de forma diferente dos agonistas. As moléculas dos antagonistas são mais distintas do GnRH natural e competem diretamente no seu receptor, mas sem desencadear a ativação do mesmo. Dessa forma, são capazes de uma supressão da liberação endógena de gonadotrofinas de maneira rápida e reversível, podendo ser iniciado a partir do meio do ciclo de EO (Figura 2 e Tabela 1) (Al-Inany, Youssef et al. 2016).

Figura 2. Comportamento das concentrações periféricas de FSH, LH e estradiol (E2) após aplicação dos análogos do GnRH

Adaptado de Tratado de Reprodução Assistida - 3ª edição - 2014 (Dzik 2014)

Tabela 1. Diferença entre mecanismos de ação dos análogos do GnRH

Análogos do GnRH	
Agonistas	Antagonistas
Descarga inicial “flare up”	Supressão imediata
“Down regulation” do receptor	Inibição do receptor
Dessensibilização da hipófise	Inibição competitiva
Reversão lenta	Reversão rápida

O bloqueio hormonal, além de melhorar a organização logística dos centros de reprodução, com melhor controle do ciclo e programação de procedimentos, possibilitou o uso de gonadotrofinas exógenas em altas doses, buscando aumentar ainda mais o número de folículos e consequentemente de oócitos recuperados, a fim de melhorar as taxas de gestação e evitar cancelamento de ciclos por crescimento inadequado.

1.2. CRÍTICAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONVENCIONAL

O esforço constante para melhorar os resultados dos tratamentos de RA levou à utilização em larga escala do que chamamos hoje de protocolo de EO convencional ou padrão, que consistem na prescrição de injeções de gonadotrofinas exógenas em altas doses, combinado com uso de drogas análogas ao GnRH (agonistas ou antagonistas). Esse esquema padrão foi e continua sendo bastante utilizado, mas já é alvo de algumas críticas no tocante a custos, complexidade, acessibilidade e desgaste físico e emocional do casal (Paulson, Fauser et al.).

Por exemplo, o protocolo com análogos do GnRH e altas doses de gonadotrofinas tem um custo elevado. Em um estudo realizado na Holanda em 2006, considerando as técnicas laboratoriais vigentes e uma estimulação padrão com FSH recombinante ou altamente purificado, agonistas e gonadotrofina coriônica humana (hCG) para desencadear a maturação final dos oócitos, observou-se que a fase inicial, isto é, a EO é responsável pela maior parte das despesas por ciclo, em média 68% para os casos de FIV e 61% para ICSI. Esse valor é constituído por despesas com medicamentos, visitas a centros de fertilidade e exames de ultrassonografia, mas, devido ao custo elevado das medicações, as drogas utilizadas são exclusivamente responsáveis por, em média, 61% e 55% de todos os custos por ciclo, para FIV e ICSI respectivamente (Bouwman, Lintsen et al. 2008).

É importante ressaltar que o custo dos procedimentos de reprodução assistida é frequentemente uma barreira ao tratamento da infertilidade. Em países onde os seguros de saúde não cobrem tratamentos de alta complexidade, esse obstáculo é ainda mais evidente (Paulson, Fauser et al. , Domar, Gordon et al. 2012).

No Brasil, os planos de saúde não abrangem esse tipo de tratamento e, no ambiente público, existem apenas alguns hospitais de referência que disponibilizam esse serviço, aquém da demanda populacional, e que geralmente exigem coparticipação do casal

nos custos. É o que acontece no cenário deste projeto de pesquisa, o Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), onde o tratamento somente é viável com a coparticipação dos pacientes exatamente na aquisição das medicações durante o ciclo de RA.

Além de ser um obstáculo para o acesso ao tratamento, os custos dos casais que submetem às TRA podem ter consequências catastróficas, especialmente nos países em desenvolvimento. Definindo-se como catastrófica a despesa capaz de causar ou aprofundar empobrecimento, em geral quando superam 40% das despesas anuais não alimentares da família, um estudo realizado na África do Sul demonstrou que um quinto (22%) dos casais que procuram o tratamento estão sujeitos a esse impacto financeiro. No tercil mais humilde, esse número chega à metade (51%) das famílias, que buscam estratégias como diminuição de gastos com roupas e comida, utilização de economias guardadas, empréstimos ou trabalhos extras para conseguir arcar com os gastos (Dyer, Sherwood et al. 2013).

Diante do exposto, a redução dos custos com medicação da fase de EO torna-se um objetivo prioritário, especialmente considerando o cenário em que este trabalho está incluído.

Além das barreiras econômicas, o impacto psicológico também é um importante motivo para que as pacientes adiem ou desistam do tratamento de infertilidade. Mesmo em locais em que o tratamento é oferecido pelo governo ou coberto pelos planos de saúde, em geral limitado a três tentativas, muitos casais acabam desistindo antes de completar suas chances por motivos não financeiros, principalmente o estresse (Olivius, Friden et al. 2004, Domar, Smith et al. 2010, Domar, Gordon et al. 2012).

Além de muitas vezes causar a descontinuação precoce, o desgaste emocional é visto também como a principal barreira que as mulheres encontram antes de buscar o tratamento, e deve-se a fatores como o medo do insucesso, interferência no relacionamento e a ansiedade relacionada às injeções das medicações. Em um estudo multicêntrico envolvendo quatro países europeus, aproximadamente um terço das 445 mulheres entrevistadas sentem que um regime com menos injeções poderia trazer experiências mais positivas, por facilitar o cumprimento das programações de tratamento e diminuir os níveis de estresse ao verificar se essa tarefa foi executada corretamente (Domar, Gordon et al. 2012).

A relação entre estresse emocional e desfechos reprodutivos é controversa. Uma meta-análise publicada em 2011 sugere que angústia emocional causada pela própria infertilidade ou outros eventos não aumenta a chance de falha em mulheres submetidas a um ciclo de RA (Boivin, Griffiths et al. 2011), enquanto outra revisão sistemática e meta-análise publicada no mesmo ano sugere que o estresse pode influenciar negativamente as chances de gestação após tratamento de alta complexidade, mas que esse efeito é pequeno, limitado (Matthiesen, Frederiksen et al. 2011).

No entanto, sabe-se que o fardo psicológico, que pode ser influenciado pelo regime estrito de injeções, é considerado uma razão de interrupção precoce do tratamento e que assim poderia, juntamente com os custos inacessíveis, afetar os resultados em longo prazo, como a taxa de gravidez cumulativa, por abandono ao tratamento. Por esse motivo, o grande número de injeções é outra importante crítica ao esquema padrão atual.

Visando a redução dos custos e da quantidade de injeções aplicadas durante a fase de EO para ciclos de RA, uma alternativa ao protocolo padrão usado atualmente, com uso de FSH em altas doses e análogos do GnRH, seria o uso de agentes de indução de ovulação orais, como o citrato de clomifeno (CC) e o letrozol (LTZ).

1.3. CITRATO DE CLOMIFENO

O CC, uma das primeiras drogas utilizada com finalidade de induzir a ovulação, foi desenvolvida para uso clínico desde 1956 e ainda hoje é considerada primeira linha de tratamento para muitos casos de anovulação (Fitz 2012, Legro, Brzyski et al. 2014). Trata-se de um agonista parcial dos receptores de estrogênio, com efeitos estrogênicos e antiestrogênicos, mas com ação predominantemente antiestrogênica, agindo como um antagonista que compete com esse hormônio na ligação com os receptores no sistema reprodutivo (Figura 3).

Figura 3. Molécula do citrato de clomifeno

Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

A nível hipotalâmico, a ocupação dos receptores causada por essa medicação leva à interpretação errônea de que os níveis de estrogênio circulantes estão abaixo do real, o que reduz o feedback negativo exercido pelo estradiol no sistema nervoso central. Dessa forma, com o objetivo de aumentar os níveis de estrogênios, há um mecanismo compensatório que altera a secreção de GnRH e estimula a secreção endógena de gonadotrofinas pela hipófise, aumentando os níveis séricos de FSH em 50 a 60% (Macklon, Stouffer et al. 2006, Fitz 2012).

Essa medicação apresenta características positivas, como uso oral, baixo custo e segurança e é comumente usada por 5 dias no início da fase folicular do ciclo menstrual com o objetivo de promover o crescimento folicular (Figura 4). No entanto, seu uso isolado tem poder de estimulação ovariana limitado, pois depende da produção endógena do FSH pela hipófise.

Figura 4. Regime de tratamento com citrato de clomifeno.

Adaptado de Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility - 7ª edição – 2015 (Fitz 2012).

Após a introdução dos agonistas GnRH, o CC acabou sendo deixado de lado no âmbito dos tratamentos de RA de alta complexidade. Apesar de continuar sendo bastante utilizado em tratamentos de baixa complexidade, como coito programado ou inseminação intrauterina (IIU), ele não se encaixava no paradigma do protocolo de EO convencional, pois a consequente e duradoura dessensibilização da hipófise causada pelos agonistas não permitiam que as medicações orais, que dependiam da liberação hormonal endógena de gonadotrofinas, fossem utilizados em conjunto.

O CC acabou por um tempo sido usado apenas em protocolos de estimulação leve, conhecidos como “*mild stimulations*”, que podem ser feitos inclusive sem bloqueio do eixo (Kato, Takehara et al. 2012). No entanto, com o surgimento dos antagonistas do GnRH, os indutores orais puderam voltar a ser utilizados em conjunto com as gonadotrofinas exógenas, no início da fase folicular, auxiliando no crescimento multifolicular.

Uma meta-análise buscou avaliar se a combinação de CC e gonadotrofinas (com ou sem antagonista no meio do ciclo) é, no mínimo, igualmente eficaz a gonadotrofinas associadas a agonistas do GnRH para EO para FIV ou ICSI. Não houve evidência de diferença entre os protocolos em termos de nascidos vivos, com *Odds Ratio* (OR) de 0,93 e intervalo de confiança (IC) de 95% de 0,69 a 1,24, ou gravidez clínica (OR 1,07 e IC 95% de 0,85 a 1,33). Nesse caso, considerando uma taxa de nascidos vivos média de 23% utilizando um regime com agonista, o uso de protocolos com CC poderia gerar taxas entre 16 e 26%. Além de desprezar essa inferioridade, houve uma redução significativa na incidência de síndrome de hiperestimulação ovariana (SHO) (OR 0,23 e IC 95% de 0,10 a 0,52) (Gibreel, Maheshwari et al. 2012).

Outra meta-análise comparou a eficácia e segurança do uso do clomifeno combinado com gonadotrofina – FSH ou gonadotrofina menopáusica humana (hMG) - e antagonista versus gonadotrofina com análogos do GnRH (agonista ou antagonista) sem CC. Considerando os sete ensaios clínicos randomizados incluídos na análise, não foram observadas diferenças significativas em relação a nascidos vivos e gravidez clínica. Os protocolos com o clomifeno trouxeram uma redução do risco de SHO, além de com menor duração da indução e menor dose de gonadotrofinas (Figueiredo, Nastri et al. 2013). Esses últimos benefícios são relevantes na busca de EO mais amistosa ao paciente, com menos injeções, e mais barata (Noorashikin, Ong et al. 2008).

Em adição aos efeitos do CC de aumento no GnRH e consequente liberação de FSH na fase folicular precoce, têm-se estudado seu uso de forma contínua, durante todo a EO, a fim de evitar o aumento prematuro de LH. Alguns estudos utilizaram protocolos de CC contínuo combinado com doses limitadas de gonadotrofinas e obtiveram com taxas de gravidez aceitáveis (Teramoto and Kato 2007, Aleyamma, Kamath et al. 2011, Kato, Takehara et al. 2012). Essa nova posologia seria capaz de evitar as injeções diárias de análogos antagonistas, o que poderia possivelmente ajudar a reduzir ainda mais as despesas e a quantidade de injeções, diminuindo a ansiedade e dor associada.

Dessa forma, o CC, por seu uso oral e acessibilidade, é uma opção interessante e condizente com a atual busca por tratamentos mais simplificados e amistosos ao paciente, começando nos protocolos de EO.

1.4. LETROZOL

O LTZ é uma medicação oral, que atua como inibidor da enzima aromatase. Essa droga bloqueia a principal enzima envolvida na produção ovariana de estrogênios, a partir da conversão de androgênios, sendo capaz de estimular a secreção endógena de FSH por reduzir a retroalimentação negativa do estradiol sobre o hipotálamo e a hipófise na fase folicular inicial.

Essa medicação, que surgiu inicialmente para tratamento de condições oncológicas e depois passou a ser utilizada apenas como alternativa em mulheres resistentes ao CC, vem sendo atualmente largamente utilizada para induzir a ovulação, com resultados até discretamente melhores do que os observado pelo CC em mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP) ou infertilidade sem causa aparente (Franik, Kremer et al. 2014, Liu, Zheng et al. 2014).

Figura 5. Molécula do letrozol

Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Apesar de o seu custo ser superior ao do CC, esse ainda é substancialmente menor do que as injeções de gonadotrofinas exógenas, sendo bastante oportuno na busca de uma EO mais barata e mais amistosa para os pacientes. Uma nova aplicação ainda mais interessante seria a combinação das duas drogas orais CC e LTZ, que mostrou ter bons

resultados no desenvolvimento folicular de pacientes que tiveram falha no uso isolado das medicações para um ciclo de IIU e que poderia ser útil em EO para FIV (Hajishafiha, Dehghan et al. 2013).

1.5. CORIFOLITROPINA ALFA

Com o mesmo objetivo de melhorar o grau de ansiedade e satisfação das pacientes durante os ciclos de TRA, a corifolitropina alfa tem sido estudada. Trata-se de uma molécula híbrida fabricada a partir de técnicas de DNA recombinante e transferência gênica, com a ligação do peptídeo C-terminal da subunidade β do hCG à subunidade β do FSH. Dessa forma, essa droga atua com o mesmo perfil farmacodinâmico do hormônio folículoestimulante recombinante (FSHr), mas com meia vida mais longa, funcionando como um estimulante folicular sustentado (Fauser, Mannaerts et al. 2009).

Essa droga é capaz de iniciar e manter o crescimento folicular múltiplo durante uma semana, podendo substituir sete injeções diárias de uma dose média de FSHr. Alguns estudos mostraram que não houve diferença nos resultados clínicos em relação ao protocolo padrão (Mahmoud Youssef, van Wely et al. 2012) e que pode haver melhora da satisfação com o tratamento em mulheres que utilizam esse regime (Requena, Cruz et al. 2013).

Figura 6. Comparação entre as moléculas de FSH e corifolitropina alfa

Adaptado de <http://en.pharmacodia.com>

Figura 7. Comparação do tratamento diário com FSH (A) ou uma injeção de corifolitropina alfa (B). O limiar de FSH representa a concentração acima da qual o desenvolvimento folicular é estimulado.

Adaptado de *Human Reproduction Update*, Volume 15, 2009 (Fauser, Mannaerts et al. 2009)

1.6. POLÍTICA DE CONGELAMENTO TOTAL

Um questionamento importante a respeito do uso do CC com LTZ se dá em relação aos efeitos antiestrogênicos em outras partes do sistema reprodutor, inclusive no endométrio (Nakamura, Ono et al. 1997). Essa preocupação deve-se principalmente ao primeiro, já que esse seria usado de forma contínua durante toda a EO e que o LTZ tem demonstrado ser poupador de efeitos no endométrio (Wallace, Johnson et al. 2011). Entretanto, se todos os embriões de tal ciclo de indução forem criopreservados para transferência em ciclo subsequente, o efeito sobre o endométrio não seria relevante (Zhang, Chang et al. 2010).

Além disso, resta ainda a preocupação com a segurança dos protocolos de EO. A busca por aumentar a segurança das TRA tem se desenvolvido por diversas abordagens. Uma delas é o uso de agonistas do GnRH ao fim da estimulação, quando não utilizados como bloqueadores da hipófise ao longo da etapa, com a finalidade de induzir a maturação final oocitária ao desencadear a liberação endógena de LH através do efeito de “*flare up*”. Essa estratégia, em comparação com o uso de hCG, é capaz de diminuir a incidência de SHO.

Estudos sugerem que o uso do agonista na maturação final em ciclos com transferência a fresco é associado a uma menor taxa de nascidos vivos. No entanto, tal associação não foi observada em ciclos em que houve doação de oócitos, o torna essa estratégia útil para pacientes que não farão transferência de embriões a fresco, isto é, nas que planejam congelar todos os óvulos ou embriões (Erb, Vitek et al. 2010, Youssef, Van der Veen et al. 2014).

A opção de congelamento de todos os embriões para transferência em ciclos posteriores de preparo endometrial, conhecida com política de “*freeze-all*”, tem se mostrado de interesse inclusive para diversas outras situações de tratamento. A racionalidade por trás dessa tendência é que a EO, com seus níveis hormonais elevados acima do fisiológico, poderia diminuir a receptividade endometrial. Além disso, o preparo endometrial em um ciclo subsequente, seja com monitorização de um ciclo natural ou com uso de hormônios exógenos estradiol e progesterona, pode ser acompanhado de forma mais precisa sem que haja preocupação com os folículos antrais, o que poderia contribuir para um melhor ajuste da sincronia entre endométrio e embrião (Roque, Lattes et al. 2013, Roque, Valle et al. 2015).

Um crescente número de evidências aponta que congelar todos os embriões formados, não transferindo no mesmo ciclo da EO, parece melhorar os resultados reprodutivos das TRA e também os resultados perinatais, como parto pré-termo (Maheshwari and Bhattacharya 2013, Pinborg, Wennerholm et al. 2013, Roque, Lattes et al. 2013, Wong, Mastenbroek et al. 2014, Roque, Valle et al. 2015). Além disso, um estudo brasileiro avaliou a relação custo-efetividade da política de congelamento total, com resultado favorável à mesma. Isto é: apesar do congelamento representar um custo maior no tratamento geral, como a estratégia foi capaz de melhorar desfechos clínicos, houve um menor custo para cada gestação em curso alcançada com o tratamento (Roque, Valle et al. 2015).

1.7. NOVO PROTOCOLO PROPOSTO

Diante de todas essas considerações e com o desejo de uma EO e consequentemente um ciclo de TRA mais acessível, seguro e amigoso ao paciente, propomos este novo protocolo para estimulação ovariana com a combinação de citrato de

clomifeno e letrozol por via oral (COOL-COS – “*Clomiphene citrate and Oral Letrozole for Controlled Ovarian Stimulation*”) associada a apenas duas injeções no total, de corifolitropina alfa e agonista do GnRH, nesta ordem.

Trata-se de uma nova sugestão de combinação de medicações já comumente usadas para tal fim. O objetivo principal é avaliar a viabilidade deste novo protocolo a fim de prospectivamente projetar um estudo randomizado controlado.

2. **OBJETIVOS**

O objetivo principal do estudo foi avaliar a viabilidade de um novo protocolo de EO simplificada e de custo reduzido, com atenção à duração do tratamento, número de oócitos maduros obtidos e taxas de fertilização e clivagem, a fim de projetar um estudo randomizado controlado.

3. MÉTODOS

3.1. DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo clínico, não-randomizado para avaliar efeitos de intervenção (Sterne, Hernan et al. 2016), aberto, prospectivo, com controle histórico.

3.2. CENÁRIO

Setor de Reprodução Humana do HC-FMRP-USP, Ribeirão Preto, Brasil entre 2015 e 2016.

3.3. PARTICIPANTES:

Foram consideradas elegíveis mulheres com idade entre 18 e 40 anos, com peso inferior a 90 quilos, contagem de folículos antrais (CFA) maior ou igual a 9 e alfabetizadas, que aceitaram participar da pesquisa após leitura, explanação e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi registrado em ClinicalTrials.gov sob o número NCT02288143.

O recrutamento das participantes foi feito entre os casais previamente agendados para procedimentos de reprodução assistida (FIV ou IIU) no serviço. Foram considerados como critérios de exclusão: a realização do primeiro exame de ultrassonografia após o 3^o dia do ciclo menstrual, a presença de um ou mais folículos ≥ 10 mm no primeiro exame (pré-indução) e níveis de estradiol sérico ≥ 40 pg/L na data deste primeiro exame.

As participantes do grupo da pesquisa foram divididas em dois subgrupos, de acordo com a CFA realizada na primeira ultrassonografia do ciclo, na tentativa agrupar pacientes com reserva ovariana funcional e resposta esperada à indução semelhantes, desta forma: Pacientes com CFA entre 9 e 19 foram inseridas no subgrupo de reserva ovariana normal e pacientes com CFA ≥ 20 no subgrupo de reserva ovariana elevada.

De forma análoga, foram incluídas de forma aleatória como grupo controle a mesma quantidade de pacientes em cada subgrupo, que haviam sido submetidas à EO com

protocolo padrão do serviço com injeções de gonadotrofinas, sempre associada a antagonista do GnRH e sem medicações orais. Foi adotada a mesma divisão entre os subgrupos de acordo com a contagem de folículos antrais e foram respeitados todos os critérios de inclusão (idade, peso e CFA) e exclusão, à exceção da necessidade de termo de consentimento já que as informações foram coletadas a partir do banco de dados do Laboratório de Reprodução Humana do HCFMRP, de forma retrospectiva e sem identificação pessoal.

3.4. VARIÁVEIS

As pacientes foram caracterizadas quanto à idade, índice de massa corporal (IMC), volume ovariano e CFA. O desfecho principal analisado foi o número de oócitos maduros (MII) obtidos após punção folicular, o qual foi obtido no mesmo dia do procedimento. Os desfechos secundários foram número total de oócitos coletados, duração da EO, o número de folículos ≥ 14 mm no dia do desencadeamento, as taxas de fertilização e de clivagem e porcentagem de embriões de ótima qualidade, avaliados dois dias após a recuperação.

A taxa de fertilização foi definida como o número de zigotos fertilizados dividido pelo número de oócitos maduros injetados (ICSI). A taxa de clivagem foi definida como o número de embriões normais no 2º dia pós-fertilização por oócito fertilizado. A porcentagem de embriões de ótima qualidade foi calculada pelo número de embriões com 4 células e grau 1 pelo consenso de Istambul (fragmentação $< 10\%$, tamanho de células adequado para o estágio de divisão celular, sem evidência de multinucleação) sobre o número total de embriões obtidos no segundo dia pós-fertilização (D2) (ESHRE 2011).

Os dados foram coletados dos prontuários por um dos autores.

3.5. ESTIMULAÇÃO OVARIANA

A EO nos dois grupos foi iniciada no 2º ou 3º dia do ciclo menstrual.

As pacientes do grupo da pesquisa foram submetidas ao protocolo a seguir: CC (Indux®, EMS Sigma Pharma, São Bernardo do Campo, Brasil), por via oral, 100 mg ao dia (2 comprimidos por dia) contínuo desde o início da EO até o dia do desencadeamento da maturação final; LTZ (Letrozol, Eurofarma, São Paulo, Brazil) 7,5 mg ao dia (3 comprimidos

por dia) apenas nos primeiros 5 dias da EO e Corifolitropina alfa (Elonva, Laboratórios Schering-Plough Indústria Farmacêutica Ltda, São Paulo – SP), injeção subcutânea, 100 mcg em dose única no 3º dia da EO (Figura 8).

Figura 8. Esquema das medicações do protocolo da pesquisa durante os dias da estimulação ovariana

As pacientes incluídas como controle foram submetidas à EO com protocolo padrão do serviço com gonadotrofinas na forma de FSH recombinante (Gonal® ou Puregon®), FSH recombinante associado a LH recombinante (Pergoveris®), gonadotrofina urinária de mulher menopausada (Menopur®) e corifolitropina alfa (Elonva®), sempre associada ao bloqueio do eixo endógeno com antagonista do GnRH e sem o uso de nenhuma medicação oral.

A ultrassonografia transvaginal foi realizada no primeiro dia da indução. O segundo exame de ultrassonografia, isto é, o primeiro retorno da paciente deu-se no sexto dia de EO no grupo controle, a fim de iniciar a medicação antagonista conforme rotina pré-estabelecida do serviço e no oitavo ou décimo dia de EO no grupo da pesquisa, pois não havia necessidade de alteração da prescrição inicial. As ultrassonografias subsequentes foram realizadas a cada 2 a 3 dias, conforme necessidade.

O desencadeamento da maturação folicular final foi realizado no mesmo dia ou no dia seguinte da observação de três folículos ≥ 17 mm ou no mesmo dia da observação de um folículo ≥ 24 mm, com uma injeção subcutânea de 0,2ml (1mg) de acetato de leuprolida

(Lupron®-M, Laboratório ABBOTT, São Paulo-SP, Brasil) ou duas seringas (0,2mg) de acetato de triptorrelina (Gonapeptyl Daily, Gonapeptyl®, Ferring, Alemanha) entre 20 e 23 horas, de acordo com o horário agendado da punção folicular. Nesse dia, além da medicação acima, foi utilizada apenas o citrato de clomifeno no grupo da pesquisa.

Segue abaixo uma tabela ilustrativa demonstrando uma EO seguindo este protocolo e o custo relacionado às medicações, considerando uma duração de média de 11 dias (Tabela 2).

Tabela 2. Esquema das medicações da EO proposta e custo médio aproximado

Dia da EO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Custo
US	X							X		X		
CC (mg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	R\$ 50
LTZ (mg)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5							R\$ 100
Corifolitropina (mg)			100									R\$ 1200
Leuprolida ou Triptorrelina (mg)											1 ou 0,2	R\$ 50 ou R\$65
Total												R\$ 1400 ou R\$ 1415

EO: estimulação ovariana; US: Ultrassonografia; CC: Citrato de Clomifeno; LTZ :Letrozol.

As outras etapas do tratamento, como captação de oócitos, fertilização, suplementação da fase lútea e transferência de embriões foram realizados rotineiramente conforme o protocolo do serviço, descritos abaixo.

3.6. PUNÇÃO FOLICULAR E CAPTAÇÃO DE OÓCITOS

A captação foi realizada entre 35 a 36 horas após o desencadeamento da maturação folicular final com aspiração do líquido intrafolicular com bomba de vácuo através da punção com agulha guiada por ultrassonografia transvaginal. O procedimento foi

realizado com sedação, decidida pelo médico anestesista.

3.7. FERTILIZAÇÃO

Os oócitos foram submetidos à ICSI e transferidos para uma placa de 60 mm com gotas de 25 μ l de meio de cultura (HTF, LifeGlobal®, EUA) coberta com óleo mineral (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EUA) e colocados numa incubadora (Forma™ Series II 3110 Água-Jacketed CO2 Incubadoras, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). As placas foram removidas da incubadora 18-20 horas após ICSI para examinar a fertilização e novamente 40-44 horas após ICSI examinar clivagem e morfologia do embrião.

Todos os embriões foram criopreservados. Algumas pacientes optaram por não realizar fertilização sendo, nesses casos, criopreservados oócitos.

3.8. CÁLCULO AMOSTRAL

O tamanho do estudo foi calculado de acordo com o número esperado de oócitos, para garantir um intervalo de confiança de 95% com média esperada de $9,0 \pm$ desvio padrão de 2,2 e uma margem de erro de $\pm 1,0$ (Karimzadeh, Ahmadi et al. 2010). Foram incluídas 20 participantes por grupo, somando 40 participantes no total.

3.9. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

A análise estatística foi realizada através dos programas Minitab (Versão 16.1.0 para Windows, LEADTOOLS®, LEAD Technologies, EUA) e Excel (Microsoft Corp, Redmond, EUA) por dois dos autores. A distribuição normal dos parâmetros avaliados foi examinada pelo teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Foram aplicados o teste exato de Fisher para análise entre proporções e, para comparação entre as médias, o teste t não-pareado e o teste análogo de Mann-Whitney, pois nem todas as variáveis seguiam distribuição normal.

Os resultados foram relatados como média $\pm$ desvio padrão (DP), mediana e intervalo interquartil (IIQ). Foram comparadas as seguintes variáveis: idade, IMC, volume

ovariano, CFA, duração em dias da estimulação, número de folículos acima de 14mm no último dia da EO, quantidade total de oócitos coletados e de oócitos maduros. As taxas de fertilização e clivagem e o número de embriões de ótima qualidade no segundo dia foram calculados como uma proporção.

3.10. ASPECTOS ÉTICOS

Todas as mulheres do grupo da pesquisa foram convidadas a participar do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido após leitura e explicação por um dos pesquisadores envolvidos. Os dados das pacientes do grupo controle foram coletados de forma retrospectiva e anônima. O projeto foi previamente submetido ao comitê de ética em pesquisa do HC-FMRP-USP.

4. RESULTADOS

Todas as mulheres elegíveis que foram convidadas concordaram em participar do estudo. Quatro pacientes foram excluídas no total: três delas por inclusão errônea, pois duas possuíam mais do que 40 anos e uma pesava 93 quilogramas, valores acima dos previstos nos critérios de inclusão. Nesses casos, as pacientes receberam a medicação e fizeram o ciclo de tratamento com assistência e sem intercorrências, apenas os dados não foram utilizados nas análises estatísticas. A última paciente foi excluída por ter usado a última medicação do tratamento de forma incorreta. A paciente fez a última injeção, com agonista do receptor de GnRH (Lupron®) em um local inadequado, tendo desperdiçado parte da medicação que é fundamental para a indução da maturação final oocitária. A paciente foi encaminhada para punção folicular, sem recuperação de nenhum oócito, pois somente após o procedimento comunicou à equipe o ocorrido.

Após as exclusões, completaram o ciclo de tratamento o total de 40 pacientes, sendo 20 para cada subgrupo de pacientes com CFA normal e elevada. Não houve necessidade de cancelamento de nenhum ciclo devido má resposta.

As características das pacientes incluídas (idade, peso, estatura, IMC e CFA) e os resultados de duração da EO, quantidade de folículos acima de 14mm no dia do desencadeamento da maturação final, quantidade de oócitos recuperados total e maduros e taxas de fertilização, clivagem e porcentagem de embriões de ótima qualidade no segundo dia de evolução encontram-se resumidos nas tabelas a seguir, assim como as comparações com as pacientes do grupo controle.

Tabela 3. Características e resultados das participantes do estudo

PARTICIPANTES									
	COOL-COS (N=40)			CFA entre 9-19 (N=20)			CFA >19 (N=20)		
	Mediana	IIQ		Mediana	IIQ		Mediana	IIQ	
		1°Q	3°Q		1°Q	3°Q		1°Q	3°Q
Idade (anos)	32.7	30.2	36.1	35.6	31.0	38.1	32.2	29.1	33.7
IMC (Kg/m ²)	24.8	22.9	28.3	24.5	21.9	25.9	25.3	23.5	30.4
Volume ovariano (cm ³)	5.4	4.1	7.6	4.3	3.6	6.1	6.2	5.2	9.1
CFA	19.5	13.0	28.5	13.0	10.3	16.8	28.0	21.0	37.3
Duração EO (dias)	11	11.0	12.0	11.0	10.0	12.0	11.5	11.0	12.0
Folículos ≥14mm	11.0	8.0	18.5	8.0	4.3	11.0	16.0	9.8	22.5
Oócitos	12.0	7.3	17.0	9.0	4.3	13.8	16.0	9.3	19.8
Oócitos MII	9.0	5.3	14.8	7.5	4.0	11.3	13.0	8.3	16.8

CFA: contagem de folículos antrais; IIQ: intervalo interquartil; 1°Q: primeiro quartil; 3°Q: terceiro quartil; IMC: índice de massa corpórea; EO: estimulação ovariana; Fol≥14mm: folículos acima de 14mm; Oócitos MII: oócitos na metáfase II (maduros).

Tabela 4. Comparação dos oócitos captados e submetidos à ICSI, taxas de fertilização e clivagem e percentual de embriões de ótima qualidade

Subgrupo		Protocolo				p*
TOTAL		COOL-COS (N=40)		Padrão (N=40)		
Oócitos		487		472		
Oócitos Maduros		414	85%	375	79%	
Injetados (ICSI)*		224		268		
Fertilizados		162	72%	201	75%	
Clivados	Por injetado	151	67%	188	70%	
	Por fertilizado		93%		94%	
Embrião D2 de ótima qualidade	Por injetado	72	32%	76	28%	
	Por embrião D2		48%		40%	
CFA: 9-19		COOL-COS (N=20)		Padrão (N=20)		
Oócitos		186		163		
Oócitos Maduros		151	81%	125	77%	
Injetados (ICSI)*		100		113		
Fertilizados		66	66%	77	68%	0.77
Clivados	Por injetado	59	59%	71	63%	0.58
	Por fertilizado		89%		92%	
Embrião D2 de ótima qualidade	Por injetado	25	25%	31	27%	0.76
	Por embrião D2		42%		44%	
CFA: ≥ 20		COOL-COS (N=20)		Padrão (N=20)		
Oócitos		301		309		
Oócitos Maduros		263	87%	250	81%	
Injetados (ICSI)*		124		155		
Fertilizados		96	77%	124	80%	0.66
Clivados	Por injetado	92	74%	117	75%	0.89
	Por fertilizado		96%		94%	
Embrião D2 de ótima qualidade	Por injetado	47	38%	45	29%	0.13
	Por embrião D2		51%		38%	

CAF: contagem de folículos antrais; ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozoides; D2: segundo dia de desenvolvimento embrionário; p* = teste exato de Fisher.

*Os oócitos maduros que não foram injetados (submetidos à ICSI) foram vitrificados.

Tabela 5. Características, resultados e comparações no subgrupo de pacientes com reserva ovariana normal (CFA entre 9 e 19)

COOL-COS								Protocolo padrão com antagonista									
	Média	DP	Mediana	IIQ		Amplitude		Média	DP	Mediana	IIQ		Amplitude		p*	p**	
				Q1	Q3	Máximo	Mínimo				Q1	Q3	Máximo	Mínimo			
Idade (anos)	34.4	4.2	35.6	31.0	38.1	25.7	39.9	35.4	4.1	35.8	32.2	39.0	26.8	39.8	0.45	0.47	
Peso (Kg)	64.9	9.3	65.1	55.3	72.8	48.0	78.2	67.4	10.2	67.0	60.0	76.0	48.0	86.0	0.48	0.42	
Estatura (cm)	164.3	5.8	166.0	160.3	168.8	151.0	172.0	162.3	5.5	162.5	157.0	167.0	153.0	171.0	0.22	0.27	
IMC	24.0	3.0	24.5	21.9	25.9	18.7	29.4	25.6	4.0	24.6	22.5	29.2	20.0	32.8	0.29	0.16	
CFA	13.7	3.2	13.0	10.3	16.8	9.0	19.0	12.5	2.7	12.0	10.0	14.0	9.0	19.0	0.24	0.19	
Duração (dias)	11.1	2.0	11.0	10.0	12.0	6.0	14.0	9.0	1.3	9.0	8.0	10.0	7.0	11.0	<0.001	<0.001	
Fol ≥14mm	8.7	5.1	8.0	4.3	11.0	1.0	21.0	6.9	3.8	6.0	4.0	9.8	2.0	15.0	0.24	0.20	
Oócitos	9.3	5.1	9.0	4.3	13.8	2.0	18.0	8.2	3.2	8.0	5.0	10.8	3.0	14.0	0.58	0.40	
Oócitos MII	7.6	4.1	7.5	4.0	11.3	2.0	15.0	6.3	2.9	5.5	4.0	9.0	2.0	12.0	0.43	0.25	

DP: desvio padrão; IIQ: intervalo interquartil; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil; IMC: índice de massa corpórea; CFA: contagem de folículos antrais; Fol≥14mm: quantidade de folículos acima de 14mm; Oócitos MII: quantidade de oócitos na metáfase II (maduros); p*: teste de Mann-Whitney; p**: teste t não-pareado.

Tabela 6. Características, resultados e comparações no subgrupo de pacientes com reserva ovariana elevada (CFA maior ou igual a 20)

COOL-COS								Protocolo padrão com antagonista									
	Média	DP	Mediana	IIQ		Amplitude		Média	DP	Mediana	IIQ		Amplitude		p*	p**	
				Q1	Q3	Máximo	Mínimo				Q1	Q3	Máximo	Mínimo			
Idade (anos)	31.8	3.0	32.2	29.1	33.7	27.1	38.4	32.5	4.9	33.8	28.3	36.7	23.8	39.8	0.40	0.59	
Peso (Kg)	70.3	10.7	70.5	59.1	80.4	54.5	88.0	67.0	12.0	66.0	58.0	77.3	43.0	87.0	0.38	0.37	
Estatura (cm)	162.3	5.9	162.5	158.0	166.8	151.0	175.0	162.5	6.0	162.0	157.0	167.8	153.0	173.0	0.95	0.94	
IMC	26.7	4.0	25.3	23.5	30.4	19.5	32.9	25.6	5.3	24.3	21.5	30.9	15.8	34.5	0.34	0.45	
CFA	30.2	9.8	28.0	21.0	37.3	20.0	52.0	34.0	14.7	27.5	22.0	44.5	21.0	69.0	0.36	0.34	
Duração (dias)	11.8	1.1	11.5	11.0	12.0	10.0	15.0	9.8	2.3	9.5	8.0	11.0	7.0	17.0	<0.001	0.001	
Fol ≥14mm	16.3	6.8	16.0	9.8	22.5	5.0	28.0	10.0	4.6	9.5	6.0	12.8	4.0	20.0	0.003	0.002	
Oócitos	15.1	6.2	16.0	9.3	19.8	5.0	28.0	15.5	6.7	16.0	8.8	20.5	5.0	29.0	0.86	0.85	
Oócitos MII	13.2	5.9	13.0	8.3	16.8	4.0	26.0	12.5	7.1	11.5	6.0	17.0	4.0	29.0	0.68	0.76	

DP: desvio padrão; IIQ: intervalo interquartil; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil; IMC: índice de massa corpórea; CFA: contagem de folículos antrais; Fol≥14mm: quantidade de folículos acima de 14mm; Oócitos MII: quantidade de oócitos na metáfase II (maduros); p*: teste de Mann-Whitney; p**: teste t não-pareado.

Tabela 7. Características e resultados das pacientes excluídas do estudo

Iniciais	Idade (anos)	Peso (Kg)	Estatura (cm)	IMC	CFA	Duração (dias)	Fol $\geq$ 14	Oócitos	MII	ICSI	Fertilizados	Clivados	Morfologia D2	OBS:
EFSR	40,4	63	163	23,7	9	13	2	4	2	2	1	1	2G1	
MFFM	39,2	92	164	34,2	13	14	9	9	9	-	-	-	-	Vitrificados 9 oócitos
JCCBC	31,8	51	162	19,4	12	15	10	0	-	-	-	-		Desencadeamento da maturação final inadequado
GVOCJ	41,7	64	158	25,6	9	13	6	4	4	4	3	3	4G1;4G2;4G2	

IMC: índice de massa corpórea; CFA: contagem de folículos antrais; Fol $\geq$ 14mm: quantidade de folículos acima de 14mm; MII: quantidade de oócitos na metáfase II (maduros); ICSI: quantidade de oócitos submetidos à ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides)

Tabela 8. Pacientes com síndrome de hiperestimulação ovariana

Iniciais	Idade (anos)	CFA	Oócitos	Data da captação	Data da internação	Data da alta	Classificação	Hb inicial	Ht inicial	Hb alta	Ht alta	Medidas durante internação
CCMM	32,8	38	20	24/06/2015	26/05/2015	27/05/2015	Grau 5 (grave)	18,1	52	12,8	39	Antiemético, hidratação venosa, heparina profilática, dieta branda
SMFC	27,3	21	26	01/09/2015	03/08/2015	04/08/2015	Grau 3 (moderado)	14,3	42	12,7	36	Antiemético, analgésicos, hidratação venosa, heparina profilática, dieta branda/laxativa

Hb: hemoglobina (g/dL); Ht: hematócrito (% - porcentagem de volume ocupada pelas hemácias no volume total de sangue)

As características inerentes às pacientes - idade, peso, estatura, IMC e CFA - não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, em cada subgrupo, quando comparadas as pacientes da pesquisa e as do grupo controle.

A idade média das pacientes do grupo da pesquisa foi de 34,4 anos no subgrupo das pacientes com CFA normal e 31,8 anos no subgrupo com CFA elevada, e do grupo controle de 35,4 e 32,5 anos respectivamente. Seja no grupo controle ou no da pesquisa, as pacientes com reserva ovariana aumentada apresentam uma média de idade inferior àquelas com reserva normal.

Não houve diferença entre as médias das estaturas das pacientes ou entre as médias do IMC das pacientes entre os subgrupos, estando os valores desse último parâmetro próximos ao limite superior da normalidade (24,9 Kg/m²) ou já dentro do sobrepeso (entre 25 e 29,9 Kg/m²). Não houve diferença entre a média dos pesos entre os subgrupos do grupo controle, mas, entre as pacientes da pesquisa, as pacientes do subgrupo de reserva elevada apresentaram uma média de peso superior.

A quantidade média de folículos antrais das pacientes com CFA normal foi de 13,7 e 12,5, para as pacientes submetidas ao COOL-COS e ao protocolo padrão, respectivamente. Entre as pacientes com contagem folicular aumentada, os valores foram, nessa ordem, 30,2 e 34,0. Como já foi salientado, não houve diferença estatística entre os subgrupos enquadrados com a mesma reserva ovariana.

Quanto à estimulação ovariana, a duração média com o novo protocolo de indução proposto foi de 11,4 dias no geral, sendo a mediana de 11 dias. Na análise por subgrupos, a média foi de 11,1 dias entre as pacientes com contagem folicular normal e de 11,8 entre as com contagem aumentada submetidas ao novo protocolo. Esse valor encontrou diferença estatística nos dois subgrupos quando comparados aos respectivos controles, sendo, em geral, a estimulação com o COOL-COS dois dias mais longa.

Além da duração, foi observado uma diferença entre a quantidade de folículos com medida acima de 14mm no subgrupo das pacientes com reserva ovariana aumentada, entre o teste e o controle. Apesar do número de oócitos recuperados após a punção folicular ter sido semelhante na comparação entre os subgrupos, foram visualizados mais folículos maiores na ultrassonografia no dia do *triggering* das pacientes participantes da pesquisa.

Em relação aos desfechos principais, as pacientes submetidas à indução com COOL-COS obtiveram em média 12,175 oócitos captados, sendo 10,35 a média de oócitos maduros recuperados, com medianas de 12 e 9 respectivamente. No subgrupo com CFA entre 9 e 19, a média de oócitos recuperados no total e maduros foi de 9,3 e 7,6, com medianas de 9 e 7,5. As pacientes com CFA maior ou igual a 20 submetidas ao novo protocolo captaram em média 15,1 oócitos, sendo 13,2 a média de maduros e as respectivas medianas de 16 e 13. Não houve diferença significativa nessas variáveis entre o grupo da pesquisa e o controle, e entre seus subgrupos.

Na comparação entre os oócitos obtidos pelo protocolo proposto e o padrão, não houve diferença estatística entre as taxas de fertilização e clivagem, entre os subgrupos com mesma reserva ovariana. A taxa de fertilização total do grupo da pesquisa foi de 72%, sendo 66% no grupo com contagem folicular normal e 77% no com alta. Os mesmos resultados para o grupo controle foram de 75%, 68% e 80%, semelhantes.

Em relação à taxa de clivagem, os números também são semelhantes: de 93%, 89% e 96% respectivamente para o grupo teste e 94%, 92% e 94% para o grupo controle, sendo esses valores correspondentes ao percentual de embriões clivados no segundo dia de desenvolvimento embrionário, em relação ao total de zigotos fertilizados. Nesse mesmo momento, isto é, no D2, foi observada a fração de embriões de ótima qualidade entre o número total de embriões clivados, e os resultados não foram estatisticamente distintos. De uma forma geral, quase a metade (48%) dos embriões clivados formados a partir de oócitos obtidos com o protocolo da pesquisa foram considerados como tendo a melhor classificação morfológica possível para o D2.

Uma das complicações mais frequentes que podem ocorrer às mulheres submetidas à EO é a síndrome de hiperestimulação ovariana. Entre as pacientes participantes da pesquisa, foram diagnosticados dois casos. De acordo com os critérios de Golan (Nastri, Ferriani et al. 2010), um foi considerado moderado, pois a paciente apresentou distensão abdominal, vômitos e evidência de ascite à ultrassonografia, e o outro caso foi considerado como grave, pois além desses sintomas a paciente apresentou hemoconcentração, com hematócrito acima de 45%.

As duas pacientes pertenciam ao grupo de reserva ovariana aumentada e ambas foram internadas em ambiente hospitalar quando retornaram ao hospital para

reavaliação, que havia sido agendada previamente, dois dias após a punção folicular. Os casos foram tratados clinicamente com infusão venosa de fluidos, medicação sintomática analgésica e antiemética via endovenosa e profilaxia de tromboembolismo venoso com dose baixa de heparina de baixo peso molecular por via subcutânea. As pacientes evoluíram com melhora satisfatória e receberam alta hospitalar após 24 horas de internação. Houve recuperação completa dos sintomas em poucos dias, o que foi observado com reavaliações ambulatoriais.

5. DISCUSSÃO

O primeiro sucesso clínico com as técnicas de fertilização *in vitro*, o nascimento de Louise Brown em 1978, foi conseguido com a coleta de óvulo em ciclo natural, isto é, sem estimulação hormonal prévia. No entanto, nos quase 40 anos que se sucederam até hoje, a grande maioria de ciclos de RA são feitos com estimulação ovariana inicial, a fim de aumentar o número de óvulos conseguidos, numa tentativa de compensar as falhas seguintes no processo, como falhas de fertilização, falhas de desenvolvimento embrionário no laboratório e implantação. O objetivo final é aumentar o número de embriões possíveis de serem transferidos, permitindo uma melhor seleção de embriões e maior sucesso nos desfechos clínicos, como gravidez e nascimento vivo.

Muito se tem estudado a respeito dos protocolos de estimulação ovariana, inclusive na busca de protocolos alternativos, de preferência menos dispendiosos financeiramente e emocionalmente. Essa busca tem levado em consideração também as evoluções nas técnicas envolvidas no ciclo, em especial o congelamento de óvulos e embriões por vitrificação, com altas taxas de sobrevivência após o descongelamento, o que não exige mais a necessidade de transferência de embriões a fresco.

O presente estudo buscou incluir o uso de agentes orais, como o CC e o LTZ, que se encaixam perfeitamente na busca por protocolos alternativos, por serem medicações mais baratas, de fácil acesso e uso, evitando uso de medicações injetáveis.

Nos últimos anos essas medicações têm sido usadas, isoladamente, com o objetivo de reduzir dose total de gonadotrofinas e, assim, diminuir os custos em pacientes má-respondedoras e de reduzir a incidência de SHO nas pacientes com reserva ovariana normal. Todavia essas medicações podem ser usadas em associação e também com outras finalidades.

Uma meta-análise comparou o uso de CC e/ou LTZ sozinhos na EO ou associados a doses baixas de FSH exógeno *versus* estimulação padrão com FSH exógeno e bloqueio do eixo hormonal com agonistas ou antagonistas do GnRH, em mulheres com expectativa de baixa resposta ovariana ou não (Bechtejew, Nadai et al. 2017).

Os resultados encontrados na meta-análise foram que, em mulheres com expectativa de baixa resposta, o uso do CC não trouxe diferenças significativas em relação às taxas de gestação clínica e nascido vivo e o uso de letrozol não trouxe repercussão quanto ao número de oócitos recuperados, em relação à estimulação padrão. As duas medicações orais foram separadamente capazes de reduzir o consumo de FSH exógeno nas duas comparações, de forma significativa.

Na comparação entre mulheres sem expectativa de baixa resposta à EO, o uso do CC não trouxe diferenças significativas quanto às taxas de gestação clínica e nascimento vivo. Foi observada uma considerável redução do risco de SHO e no consumo de FSH exógeno, mas à custa de uma redução no número de oócitos obtidos com a punção folicular. Quanto ao uso de LTZ, foi observada uma redução na dose necessária de FSH exógeno, mas não foram possíveis outras conclusões devido à baixa qualidade de evidência ou à estimativa ser muito imprecisa.

No protocolo proposto, o uso do clomifeno e do letrozol no início do ciclo também busca aumentar a secreção de FSH endógeno na tentativa de reduzir a dose necessária de FSH exógeno, que tem um preço elevado. No entanto, não foram incluídas pacientes com expectativa de baixa resposta ovariana, onde os agentes orais já mostraram ter seu papel.

O objetivo do estudo foi justamente avaliar a viabilidade de se conseguir uma quantidade razoável de oócitos, comparável aos protocolos padrões, em pacientes com expectativa de boa resposta ovariana, usando um esquema de medicação mais simplificado. E, diferente da meta-análise citada, no presente estudo não foi encontrada diferença entre a quantidade de oócitos recuperados entre o protocolo com as medicações orais e o padrão. Nos dois subgrupos de reserva ovariana normal ou aumentada, o protocolo COOL-COS e o padrão levaram a quantidades semelhantes de oócitos totais e maduros recuperados.

Além disso, não foi visível a redução significativa na incidência de SHO observada tanto pelo CC quanto pelo LTZ isoladamente na meta-análise. Ao compararmos com os dados da revisão para pacientes sem expectativa de baixa reserva, a incidência encontrada nas pacientes do COOL-COS é diferente das taxas de estimulações leves com doses menores de FSH (*mild stimulations*), sendo mais compatível com os dados de estimulação padrão. De acordo com outra revisão sobre

SHO, a incidência de esperada é de 3 a 10% na população geral e até 10% entre as pacientes com alto risco (Nastri, Ferriani et al. 2010), o que foi condizente com a incidência encontrada no estudo de 5% e 10% respectivamente.

Dessa forma, pode-se imaginar que o poder de estimulação folicular do COOL-COS é semelhante ao de um protocolo padrão, e não ao de uma estimulação leve, seja na sua finalidade primária de aumentar o número de óvulos coletados, seja nos seus efeitos colaterais quando isso se dá de forma exagerada.

Essa observação pode ser atribuída a duas condições que diferem dos estudos incluídos na meta-análise: o uso combinado das duas medicações orais e o uso da corifolitropina alfa.

Não está disponível na literatura experiências do uso combinado das duas medicações orais presentes no protocolo proposto. Dessa forma, ainda não é possível afirmar se há um limite para a estimulação da secreção endógena do FSH pela hipófise ou se as duas drogas poderiam agir de forma sinérgica.

Em relação à corifolitropina, essa medicação foi incluída no protocolo do estudo por apresentar vantagens como menor custo e longa duração, já que sua posologia com longa duração reduz para uma injeção a necessidade de injeções diárias de FSH exógeno por 7 dias, o que a torna bastante atraente na busca de uma estimulação amigável.

No entanto, devemos ter cautela ao comparar o efeito dessa medicação com doses baixas de FSH. Um estudo duplo-cego randomizado comparou, em uma população com reserva ovariana normal (excluídos indicativos de baixa e excessiva resposta) e menos que 60kg, uma dose de 100µg de colifolitropina alfa a injeções diárias de 150 UI de FSH recombinante por 7 dias, seguidos por injeções diárias de FSH nos dois grupos. O resultado foi uma significativamente maior quantidade de oócitos obtidos no primeiro grupo, com maior incidência de cancelamento por resposta excessiva e risco de SHO (Corifollitropin alfa Ensure Study 2010).

Uma meta-análise conduzida com os dados individuais de pacientes de ensaios clínicos randomizados, incluindo a publicação acima e dois estudos comparando a dose de 150µg com doses diárias de 200UI e 300UI de FSH em pacientes com mais de 60Kg, conclui que uma dose única de corifolitropina alfa pelos primeiros 7 dias de estimulação é semelhante, em relação a eficácia e segurança, a sete injeções

diárias de FSH recombinante e que as diferenças entre as taxas de gestação e nascimento vivos foram pequenas e sem significância estatística (Griesinger, Boostanfar et al. 2016).

Apesar disso, devemos considerar o fato de que no presente estudo foi usada apenas a menor dose de 100µg, independente do peso, devido ao seu menor custo. Em todos os subgrupos a média de peso é superior a 60Kg, peso acima do qual estaria preconizada a dose maior, de 150µg, mas que foi julgada como não sendo necessária.

Tendo em vista que o resultado final do estímulo ovariano, isto é, a quantidade de óvulos disponível para a fertilização, não parece ser inferior com o protocolo proposto, assim como as taxas de fertilização e clivagem dos embriões originados desses óvulos, temos que avaliar então outras possíveis vantagens em relação ao estímulo tradicional, o que incluem a redução do custo, do número de injeções e de visitas ao centro de reprodução para realização de exames de ultrassonografia.

Uma importante mudança proposta no estudo em relação a uma estimulação padrão com esse objetivo foi em relação ao bloqueio do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, que normalmente é feito com análogos do GnRH, agonistas ou mais recentemente antagonistas. O CC, por exemplo, também pode ser utilizado de maneira estendida durante todo o estímulo hormonal com essa finalidade, a fim de evitar ainda mais injeções diárias, das medicações acima, e tornar o tratamento mais barato e simplificado.

Em um estudo de 1988, o CC já foi utilizado a fim de evitar o pico endógeno de LH em mulheres com ovulação normal. Neste trabalho, cinco mulheres com diagnóstico de infertilidade e com ciclos ovulatórios prévios documentados foram submetidas a dois tipos de tratamento com CC em meses distintos, um por cinco dias, do segundo ao sexto dia do ciclo menstrual, e outro por quinze dias, do segundo ao décimo sexto dia. Em ambos a dose diária foi de 100mg e as pacientes foram acompanhadas com exames de ultrassonografia e dosagens hormonais de FSH, LH, estradiol (E2) e progesterona (P4).

Neste estudo, durante o ciclo de tratamento por cinco dias, todas as pacientes apresentaram pico endógeno de LH, com luteinização dos folículos, aumento da progesterona, com ovulação de um ou dois folículos, evidenciado pelo colapso do

folículo ao exame de ultrassom. Em contraste, durante o ciclo de 15 dias nenhuma das pacientes apresentou o aumento súbito de LH durante o uso da medicação, apesar do aumento progressivo na P4 plasmática de maneira semelhante nos dois protocolos. Apenas uma paciente apresentou o pico de LH no tratamento estendido, mas somente após dois dias do fim da administração do CC (Messinis and Templeton 1988).

Esse estudo mostrou que o uso prolongado de CC em mulheres com ciclos ovulatórios normais pode bloquear o efeito de retroalimentação (*feedback*) positivo causado pelo aumento sustentado dos níveis de estradiol, que culminariam com o pico de LH no meio do ciclo. Além disso, o estudo sugere que o aumento subsequente do LH depende da queda nos níveis séricos da droga, isto é, da suspensão da medicação (Messinis and Templeton 1988).

Isso acontece porque, do início ao meio da fase folicular, o efeito predominante do estrogênio é de retroalimentação negativa sobre a hipófise e o hipotálamo. Em um ciclo não estimulado, o aumento do estrogênio leva a uma queda nos níveis de FSH no meio da primeira fase do ciclo menstrual, o que contribui para a seleção do folículo dominante que irá ovular, geralmente apenas um, e levando à atresia dos demais. O aumento nas concentrações séricas de FSH e LH com a administração do CC é explicado pelas propriedades anti-androgênicas, que bloqueiam o efeito de *feedback* negativo neste momento e contribuem para o desenvolvimento multifolicular, ao invés de monofolicular.

Ainda em um ciclo fisiológico, os níveis de E2 aumentam exponencialmente no fim da fase folicular. Por razões ainda não totalmente esclarecidas, uma exposição prolongada e a níveis elevados de E2, associada à secreção de progesterona, é capaz de alterar o efeito de retroalimentação do estradiol, que deixa de ter um papel inibidor e passa a ser estimulador no eixo hipotálamo-hipófise, sendo o responsável por gerar o pico de LH (Young and Jaffe 1976). Dessa forma, o uso prolongado do CC poderia também bloquear o efeito de *feedback* positivo no final da fase folicular, evitando assim o aumento do LH e a ovulação, enquanto houver concentração sérica adequada.

Por motivos externos, não foi possível o acompanhamento dos ciclos envolvidos no presente estudo com dosagens hormonais seriadas de estradiol, progesterona e LH, o que com certeza enriqueceria os dados aqui publicados e auxiliaria no entendimento da farmacodinâmica do protocolo COOL-COS.

Apesar dessa limitação, o seguimento dos ciclos com ultrassonografia a cada um ou dois dias a partir do meio da fase folicular não demonstrou ovulação de nenhuma das pacientes envolvidas.

Ademais, no grupo de pacientes da pesquisa com contagem folicular normal, observamos resultados compatíveis entre o número de folículos maiores que 14mm observados ao último exame de ultrassonografia, realizado na véspera ou no mesmo dia na indução da maturação final (*triggering*), e os números de oócitos totais e maduros obtidos com a punção folicular, cujas medianas foram respectivamente 8, 9 e 7,5. Esse resultado, nos leva a crer que não houve folículos perdidos por ovulação, considerando ainda as perdas que podem acontecer inerentes ao procedimento de punção folicular.

E, comparando esses resultados com o das pacientes levantadas como controle, que usaram antagonista do GnRH diariamente a partir de meados da fase folicular estimulada, com medianas de 6, 8 e 5,5 respectivamente, pode-se afirmar que eles foram semelhantes, com uma tendência de até mais oócitos recuperados nas pacientes submetidas ao novo protocolo, mas sem significância estatística.

No grupo das pacientes com contagem folicular aumentada, também observamos resultados condizentes com um bom aproveitamento entre os folículos observados no último exame e os oócitos totais e maduros recuperados, com medianas de 16, 16 e 13. Quando comparamos esse grupo com seu controle, observamos medianas semelhantes em relação aos oócitos obtidos com a punção, de 16 para totais e 11,5 para maduros.

No entanto, não houve diferença estatística entre a quantidade de oócitos total e maduros coletados entre as pacientes com reserva ovariana elevada. Esses achados corroboram a ideia de que o CC também é capaz de inibir o pico precoce de LH também em ciclos estimulados, servindo como uma alternativa aos análogos do GnRH.

É importante ressaltar que, como o bloqueio do eixo HOO se dá com uso contínuo do CC, não é necessária a realização do exame de ultrassonografia no quinto ou sexto dia de medicação para definir o início do antagonista, como é feito na maioria dos centros atualmente. Ainda, à medida que se ganha confiança no bloqueio por parte do CC, seria possível diminuir ainda mais as visitas da paciente ao centro de

reprodução para realização de tal exame, pois não há mudanças na prescrição, o que poderia contribuir ainda mais com redução nos custos da EO no total.

Uma das diferenças significativas encontradas ($p=0,003$) se deu entre a quantidade de folículos maiores que 14mm observados na ultrassonografia no dia do *triggering* entre o subgrupo da pesquisa, de 16, e o controle, de 9,5, apenas no grupo com reserva aumentada. Podemos especular alguns motivos para tal achado. Inicialmente, é plausível imaginar que o dia do desencadeamento para a maturação final oocitária pode influenciar neste achado.

Por exemplo, se no grupo controle a última injeção tivesse sido postergada para um ou dois dias além do dia do último exame de ultrassonografia, seria esperado que fossem vistos menos folículos maiores que 14 mm, em relação aos oócitos recuperados, mas isso não ocorreu. Nos dois grupos, a maioria das pacientes seguiu a regra do *triggering* no mesmo dia do exame. E, pelo contrário, dentre a minoria que fugiu à regra, mais pacientes no grupo da pesquisa tiveram sua última injeção, com agonista do GnRh, postergada por mais um, dois ou até mesmo três dias.

Talvez por esse motivo foi observada uma diferença na duração da EO. De fato, a quantidade de dias de medicação foi a única variável que encontrou diferença significativa entre o grupo teste e o controle nos dois subgrupos. A estimulação ovariana foi em geral dois dias mais longa nas pacientes submetidas ao novo esquema nas duas comparações: Medianas de 11 e 9 dias, entre as pacientes com reserva ovariana normal ($p<0,001$) e de 11,5 e 9,5 dias ($p<0,001$) entre as pacientes com reserva aumentada.

No entanto, é importante ressaltar que esse aumento na duração não é acompanhado de um incremento proporcional nos custos relacionado, pois a única medicação que a paciente segue usando após o quinto dia de indução é o citrato de clomifeno, contínuo e sem mudança na dose.

Podemos especular alguns motivos para tal defasagem. Como já foi falado, enquanto as pacientes do grupo controle seguiram o protocolo do serviço para a prescrição do *triggering* e o agendamento da punção folicular, que em geral era desencadeado quando os folículos maiores atingiam mais que 17 mm, nas pacientes do grupo da pesquisa o mesmo acabou sendo atrasado em alguns casos, à medida que se ganhou confiança no bloqueio da ovulação por parte do CC.

Algumas pacientes da pesquisa chegaram a ter folículos maiores que 20 mm, de até 24mm, pois a equipe optou por estender a indução na tentativa de manter o crescimento multifolicular e ter um maior número de oócitos, o que não se concretizou.

Além disso, podemos imaginar que, por estimular a secreção endógena de FSH, o estímulo com medicações orais pode demorar um pouco mais para elevar os níveis séricos desse hormônio do que quando a própria molécula do FSH recombinante é administrada, o que poderia resultar em um pequeno atraso no recrutamento folicular.

E, possivelmente o mais importante, no protocolo proposto a única medicação injetável para estimular o crescimento folicular, a corifolitropina alfa, foi utilizada apenas no terceiro dia da EO, dois dias além do que é preconizado na maioria dos protocolos em que é comumente utilizada, com análogos do GnRH. Essa medicação foi inclusive utilizada por algumas pacientes incluídas no grupo controle, associada ao padrão de bloqueio do eixo hormonal com antagonista do GnRH, tendo sido iniciada no primeiro dia da indução ovulatória e tendo sido complementada com FSH recombinante ou hMG a partir do oitavo dia.

De fato, quando se compara os dados atuais com publicações similares, destaca-se a duração aumentada da EO do COOL-COS.

Por exemplo, uma publicação de origem indiana mais recente, de 2016, quando esta pesquisa já estava sendo realizada, avaliou o uso estendido do CC para o bloqueio do pico de LH em ciclos de estimulação ovariana de 35 pacientes sabidamente férteis (com pelo menos um parto de feto vivo), com idade entre 21 e 35 anos e com CFA maior ou igual a 10, para doação de óvulos para FIV. Nesses casos, também não há preocupação com os possíveis efeitos deletérios do CC no endométrio, pois a transferência de embriões é feita em outra paciente, a receptora.

Foi usado 50mg de CC associado a 150 UI de FSHr diariamente, até o dia da maturação final, realizada também com acetato de leuprolida. Nesse estudo piloto, três casos foram cancelados por crescimento folicular assíncrono ou insuficiente e uma paciente não aderiu ao protocolo. Dentre os 31 casos analisados, três casos apresentaram pico de LH acima de 10mUI/ml, com progesterona sérica acima de 1.0ng/ml, mas mesmo nesses casos foi realizada a captação de oócitos. A média de

oócitos recuperadas foi de 15,4 por paciente, com a média de 76% de maduros e taxa de fertilização de 76%. A duração média da estimulação foi de 8,65 dias.

A comparação direta entre os resultados do estudo acima e os achados do COOL-COS é prejudicada pelo fato dos dois apresentarem tamanhos de amostra pequenos. Mas nota-se a menor duração da estimulação e a maior média de oócitos recuperados na publicação indiana, o que pode ser explicada pelo perfil diferente de suas pacientes, com menor média de idade (26,45 anos) e com fertilidade comprovada por 1 a 3 gestações espontâneas prévias (Shilpa Bhandar and Gupta 2016).

Mais tarde, em 2017, o mesmo grupo de pesquisadores publicou dados retrospectivos com uma população maior. O estudo comparativo incluiu 203 pacientes doadoras de óvulos, com as mesmas características descritas acima, que foram estimuladas com doses variáveis de FSH (150 a 275UI por dia), 103 delas usando CC e 100 usando ganirelix, um antagonista do GnRH, para bloqueio do eixo hormonal próprio. A média de idade foi de 27,6 e 28,5 anos e a duração média foi de 9,5 e 9,6 dias, respectivamente.

Seguindo a mesma ordem, as pacientes obtiveram em média 16,9 e 17,5 oócitos recuperados na punção, sendo 13,0 a média de maduros nos dois grupos. 10 pacientes do grupo do CC e 9 pacientes do grupo do antagonista desenvolveram OHSS, sem necessidade de internação hospitalar. Não houve diferença significativa entre esses achados, nem entre a dose inicial de FSH e a dose total de gonadotrofina utilizada.

A única diferença estatisticamente significativa encontrada entre os grupos foi na dosagem de estradiol final antes do desencadeamento da maturação final, que foi maior no grupo com a medicação oral (5452,76 *versus* 3622,26). As taxas de gravidez clínica e de nascimento vivo nas receptoras foram semelhantes, de 61,2% e 47,8% no primeiro grupo contra 57,0% e 39,6% no segundo (Singh, Bhandari et al. 2016).

Outros trabalhos já haviam utilizado o CC tanto na estimulação folicular quanto na prevenção da ovulação precoce, mas a maior parte deles em casos de reprodução com ciclo natural ou com estimulação mínima (Al-Inany, Azab et al. 2010, von Wolff, Nitzschke et al. 2014). Assim como o presente estudo, os indianos foram pioneiros na avaliação do uso estendido do CC em pacientes com boa reserva ovariana e com a proposta de estimulação plena.

É claro que o estudo apresenta limitações, como a amostra pequena, falta de acompanhamento com dosagens hormonais, o caráter retrospectivo do grupo controle e falta de dados quanto aos desfechos clínicos, e que o COOL-COS ainda necessita de validação com estudos maiores, de preferência prospectivos, randomizados e com algum grau de mascaramento por parte dos profissionais que estão envolvidos na realização dos exames de ultrassonografia e nos procedimentos.

Apesar de suas limitações, o estudo demonstra que é possível obter resultados razoáveis utilizando um protocolo que associa medicações orais, o letrozol e o citrato de clomifeno, este de forma contínua evitando uso de agonistas ou antagonistas do GnRH, a apenas duas injeções durante todo o tratamento. Apesar de não ter sido avaliado objetivamente, o protocolo parece ser uma boa opção quanto a custo-efetividade e conveniência, por seu baixo custo, por usar menos injeções, com menor dificuldade de armazenamento, e possivelmente menos visitas médicas e exames de ultrassonografia.

Dessa forma, novos estudos são necessários para confirmar os dados ou mesmo para propor ajustes no protocolo, como, por exemplo, avaliar a necessidade do letrozol e a possibilidade de utilizar a corifolitropina no primeiro dia da estimulação. Esses estudos idealmente devem incluir dose total de gonadotrofina utilizada, a fim de melhor dimensionar o custo, e informações a respeito do grau de estresse ou satisfação das pacientes durante o tratamento. Além disso, eles podem ser direcionados para as situações em que o COOL-COS aparenta ser mais oportuno: em condições de limitação de recursos financeiros, de estresse ligado às injeções ou em casos em que o congelamento total pode ser benéfico, como preservação de fertilidade, análise genética pré-implantacional, doação total de óvulos, planejamento terapêutico de adenomiose ou endometriose ou mesmo na dupla estimulação ovariana.

6. CONCLUSÃO

Este estudo piloto foi feito para avaliar a viabilidade de um novo protocolo de estimulação ovariana para ciclos de reprodução assistida de alta complexidade. O mesmo utiliza duas medicações por via oral, letrozol e citrato de clomifeno, associada a corifolitropina alfa.

As drogas por via oral são utilizadas para reduzir o feedback negativo do estrogênio na hipófise e hipotálamo no início do ciclo a fim de estimular a secreção endógena de hormônio folículo-estimulante. O clomifeno é ainda utilizado de forma estendida, além dos cinco dias em que é tradicionalmente usado, até o final da estimulação, a fim de evitar o feedback positivo do estrogênio sobre o pico de hormônio luteinizante. Já a corifolitropina é capaz de promover um estímulo sustentado com alta afinidade sobre os receptores de FSH nos ovários por sete dias.

Considerando duas populações diferentes, divididas de acordo com sua reserva ovariana e, portanto, com sua expectativa de resposta ovariana pós-estimulação para fertilização *in vitro*, temos que o protocolo proposto pelo estudo teve resultados comparáveis ao protocolo padrão que normalmente é utilizado para esse fim.

Isto é, dado que os grupos da pesquisa e controle, dentro de cada subgrupo, apresentam características semelhantes em relação à idade, peso, estatura, IMC e contagem de folículos antrais, observa-se que os resultados da estimulação em relação à quantidade de oócitos total e maduros, taxas de fertilização e clivagem e percentual de embriões de ótima qualidade também foram semelhantes.

Isso nos leva à ideia de que o protocolo de estimulação ovariana proposto não é inferior ao que normalmente se utiliza na fase inicial dos ciclos de reprodução assistida de alta complexidade atualmente. Além disso, a combinação de medicações do estudo pode oferecer algumas vantagens em relação ao tradicional, como menor custo e menor quantidade de injeções.

A replicação dos resultados terá que ser validada por estudos maiores, randomizados e prospectivos, em especial para grupos de pacientes que poderiam se beneficiar do congelamento total de óvulos ou embriões, já que o uso contínuo do clomifeno poderia causar efeitos deletérios na receptividade endometrial. E que

também sejam capazes de avaliar desfechos clínicos relevantes para a paciente, como taxas de gestação clínica, especialmente a cumulativa, e taxas de gravidez em curso, abortamento e nascimento vivo.

7. REFERÊNCIAS

Abdalla, H. I., R. J. Baber, T. Leonard, A. Kirkland, A. Mitchell, M. Power, E. Owen and J. W. Studd (1989). "Timed oocyte collection in an assisted conception programme using GnRH analogue." Hum Reprod **4**(8): 927-930.

Al-Inany, H., H. Azab, W. El-Khayat, A. Nada, E. El-Khattan and A. M. Abou-Setta (2010). "The effectiveness of clomiphene citrate in LH surge suppression in women undergoing IUI: a randomized controlled trial." Fertil Steril **94**(6): 2167-2171.

Al-Inany, H. G., M. A. Youssef, R. O. Ayeleke, J. Brown, W. S. Lam and F. J. Broekmans (2016). "Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology." Cochrane Database Syst Rev **4**: CD001750.

Aleyamma, T. K., M. S. Kamath, K. Muthukumar, A. M. Mangalaraj and K. George (2011). "Affordable ART: a different perspective." Human reproduction **26**(12): 3312-3318.

Bechtejew, T. N., M. N. Nadai, C. O. Nastri and W. P. Martins (2017). "Clomiphene citrate and letrozole to reduce follicle-stimulating hormone consumption during ovarian stimulation: systematic review and meta-analysis." Ultrasound Obstet Gynecol **50**(3): 315-323.

Bhandari, S., Ganguly, I., Chittawar, P. B., Agarwal, P., Singh, A., and N. Gupta (2016). "Use of clomiphene to prevent premature luteinizing hormone surge during controlled ovarian hyper stimulation " International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology **5**(6): 1944-1948.

Boivin, J., L. Bunting, J. A. Collins and K. G. Nygren (2007). "International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care." Hum Reprod **22**(6): 1506-1512.

Boivin, J., E. Griffiths and C. A. Venetis (2011). "Emotional distress in infertile women and failure of assisted reproductive technologies: meta-analysis of prospective psychosocial studies." BMJ **342**: d223.

Bouwman, C. A., B. M. Lintsen, M. J. Eijkemans, J. D. Habbema, D. D. Braat and L. Hakkaart (2008). "A detailed cost analysis of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection treatment." Fertil Steril **89**(2): 331-341.

Coelho Neto, M. A., W. P. Martins, M. L. Lima, M. A. Barbosa, C. O. Nastri, R. A. Ferriani and P. A. Navarro (2015). "Ovarian response is a better predictor of clinical pregnancy rate following embryo transfer than is thin endometrium or presence of an endometrioma." Ultrasound Obstet Gynecol **46**(4): 501-505.

Corifollitropin alfa Ensure Study, G. (2010). "Corifollitropin alfa for ovarian stimulation in IVF: a randomized trial in lower-body-weight women." Reprod Biomed Online **21**(1): 66-76.

Domar, A., K. Gordon, J. Garcia-Velasco, A. La Marca, P. Barriere and F. Beligotti (2012). "Understanding the perceptions of and emotional barriers to infertility treatment: a survey in four European countries." Hum Reprod **27**(4): 1073-1079.

Domar, A. D., K. Smith, L. Conboy, M. Iannone and M. Alper (2010). "A prospective investigation into the reasons why insured United States patients drop out of in vitro fertilization treatment." Fertil Steril **94**(4): 1457-1459.

Dyer, S. J., K. Sherwood, D. McIntyre and J. E. Ataguba (2013). "Catastrophic payment for assisted reproduction techniques with conventional ovarian stimulation in the public health sector of South Africa: frequency and coping strategies." Hum Reprod **28**(10): 2755-2764.

Dzik, A. P., Pereira, D. H. M.; Cavagna, M. and Amaral, W. N. "Tratado de Reprodução Assistida" 3. edição. SBRH, 2014

Erb, T. M., W. Vitek and A. N. Wakim (2010). "Gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for final oocyte maturation in an oocyte donor program." Fertil Steril **93**(2): 374-378.

ESHRE (2011). "The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting." Hum Reprod **26**(6): 1270-1283.

Fausser, B. C., B. M. Mannaerts, P. Devroey, A. Leader, I. Boime and D. T. Baird (2009). "Advances in recombinant DNA technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency." Hum Reprod Update **15**(3): 309-321.

Ferraretti, A. P., A. La Marca, B. C. Fauser, B. Tarlatzis, G. Nargund, L. Gianaroli and E. w. g. o. P. O. R. Definition (2011). "ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria." Hum Reprod **26**(7): 1616-1624.

Figueiredo, J. B., C. O. Nastri, A. D. Vieira and W. P. Martins (2013). "Clomiphene combined with gonadotropins and GnRH antagonist versus conventional controlled ovarian hyperstimulation without clomiphene in women undergoing assisted reproductive techniques: systematic review and meta-analysis." Arch Gynecol Obstet **287**(4): 779-790.

Fritz, M. A., Speroff L., "Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility". 8. edição. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

Franik, S., J. A. Kremer, W. L. Nelen and C. Farquhar (2014). "Aromatase inhibitors for subfertile women with polycystic ovary syndrome." Cochrane Database Syst Rev **2**: CD010287.

Gibreel, A., A. Maheshwari and S. Bhattacharya (2012). "Clomiphene citrate in combination with gonadotropins for controlled ovarian stimulation in women undergoing in vitro fertilization." Cochrane Database Syst Rev **11**: CD008528.

Griesinger, G., R. Boostanfar, K. Gordon, D. Gates, C. McCrary Sisk and B. J. Stegmann (2016). "Corifollitropin alfa versus recombinant follicle-stimulating hormone: an individual patient data meta-analysis." Reprod Biomed Online **33**(1): 56-60.

Hajishafiha, M., M. Dehghan, N. Kiarang, N. Sadegh-Asadi, S. N. Shayegh and M. Ghasemi-Rad (2013). "Combined letrozole and clomiphene versus letrozole and clomiphene alone in infertile patients with polycystic ovary syndrome." Drug Des Devel Ther **7**: 1427-1431.

Hughes, E. G., D. M. Fedorkow, S. Daya, M. A. Sagle, P. Van de Koppel and J. A. Collins (1992). "The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials." Fertil Steril **58**(5): 888-896.

Karimzadeh, M. A., S. Ahmadi, H. Oskouian and E. Rahmani (2010). "Comparison of mild stimulation and conventional stimulation in ART outcome." Arch Gynecol Obstet **281**(4): 741-746.

Kato, K., Y. Takehara, T. Segawa, S. Kawachiya, T. Okuno, T. Kobayashi, D. Bodri and O. Kato (2012). "Minimal ovarian stimulation combined with elective single embryo transfer policy: age-specific results of a large, single-centre, Japanese cohort." Reproductive biology and endocrinology : RB&E **10**(1): 35.

Legro, R. S., R. G. Brzyski, M. P. Diamond, C. Coutifaris, W. D. Schlaff, P. Casson, G. M. Christman, H. Huang, Q. Yan, R. Alvero, D. J. Haisenleder, K. T. Barnhart, G. W. Bates, R. Usadi, S. Lucidi, V. Baker, J. C. Trussell, S. A. Krawetz, P. Snyder, D. Ohi, N. Santoro, E. Eisenberg, H. Zhang and N. R. M. Network (2014). "Letrozole versus clomiphene for infertility in the polycystic ovary syndrome." N Engl J Med **371**(2): 119-129.

Liu, A., C. Zheng, J. Lang and W. Chen (2014). "Letrozole versus clomiphene citrate for unexplained infertility: a systematic review and meta-analysis." J Obstet Gynaecol Res **40**(5): 1205-1216.

Lopata, A. (1983). "Concepts in human in vitro fertilization and embryo transfer." Fertil Steril **40**(3): 289-301.

Macklon, N. S., R. L. Stouffer, L. C. Giudice and B. C. Fauser (2006). "The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization." Endocr Rev **27**(2): 170-207.

Maheshwari, A. and S. Bhattacharya (2013). "Elective frozen replacement cycles for all: ready for prime time?" Hum Reprod **28**(1): 6-9.

Mahmoud Youssef, M. A., M. van Wely, I. Aboufoutouh, W. El-Khyat, F. van der Veen and H. Al-Inany (2012). "Is there a place for corifollitropin alfa in IVF/ICSI cycles? A systematic review and meta-analysis." Fertil Steril **97**(4): 876-885.

Matthiesen, S. M., Y. Frederiksen, H. J. Ingerslev and R. Zachariae (2011). "Stress, distress and outcome of assisted reproductive technology (ART): a meta-analysis." Hum Reprod **26**(10): 2763-2776.

Messinis, I. E. and A. Templeton (1988). "Blockage of the positive feedback effect of oestradiol during prolonged administration of clomiphene citrate to normal women." Clin Endocrinol (Oxf) **29**(5): 509-516.

Nakamura, Y., M. Ono, Y. Yoshida, N. Sugino, K. Ueda and H. Kato (1997). "Effects of clomiphene citrate on the endometrial thickness and echogenic pattern of the endometrium." Fertil Steril **67**(2): 256-260.

Nastri, C. O., R. A. Ferriani, I. A. Rocha and W. P. Martins (2010). "Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology and prevention." J Assist Reprod Genet **27**(2-3): 121-128.

Nastri, C. O., R. A. Ferriani, I. A. Rocha and W. P. Martins (2010). "Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology and prevention." Journal of assisted reproduction and genetics **27**(2-3): 121-128.

Noorashikin, M., F. B. Ong, M. H. Omar, M. R. Zainul-Rashid, A. Z. Murad, A. Shamsir, M. A. Norsina, A. Nurshaireen, N. S. Sharifah-Teh and A. H. Fazilah (2008). "Affordable ART for developing countries: a cost benefit comparison of low dose stimulation versus high dose GnRH antagonist protocol." J Assist Reprod Genet **25**(7): 297-303.

Olivius, C., B. Friden, G. Borg and C. Bergh (2004). "Why do couples discontinue in vitro fertilization treatment? A cohort study." Fertil Steril **81**(2): 258-261.

Paulson, R. J., B. C. J. M. Fauser, L. T. N. Vuong and K. Doody "Can we modify assisted reproductive technology practice to broaden reproductive care access?" Fertility and Sterility **105**(5): 1138-1143.

Pinborg, A., U. B. Wennerholm, L. B. Romundstad, A. Loft, K. Aittomaki, V. Soderstrom-Anttila, K. G. Nygren, J. Hazekamp and C. Bergh (2013). "Why do

singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis." Hum Reprod Update **19**(2): 87-104.

Quigley, M. M., C. L. Schmidt, P. J. Beauchamp, N. F. Maklad, A. S. Berkowitz and D. P. Wolf (1985). "Preliminary experience with a combination of clomiphene and variable dosages of menopausal gonadotropins for enhanced follicular recruitment." J In Vitro Fert Embryo Transf **2**(1): 11-16.

Requena, A., M. Cruz, D. Collado, A. Izquierdo, A. Ballesteros, M. Munoz and J. A. Garcia-Velasco (2013). "Evaluation of the degree of satisfaction in oocyte donors using sustained-release FSH corifollitropin alpha." Reprod Biomed Online **26**(3): 253-259.

Roque, M., K. Lattes, S. Serra, I. Sola, S. Geber, R. Carreras and M. A. Checa (2013). "Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis." Fertil Steril **99**(1): 156-162.

Roque, M., M. Valle, F. Guimaraes, M. Sampaio and S. Geber (2015). "Cost-Effectiveness of the Freeze-All Policy." JBRA Assist Reprod **19**(3): 125-130.

Roque, M., M. Valle, F. Guimaraes, M. Sampaio and S. Geber (2015). "Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer." Fertil Steril **103**(5): 1190-1193.

Singh, A., S. Bhandari, P. Agrawal, N. Gupta and N. Munaganuru (2016). "Use of clomiphene-based stimulation protocol in oocyte donors: A comparative study." J Hum Reprod Sci **9**(3): 159-163.

Sterne, J. A., M. A. Hernan, B. C. Reeves, J. Savovic, N. D. Berkman, M. Viswanathan, D. Henry, D. G. Altman, M. T. Ansari, I. Boutron, J. R. Carpenter, A. W. Chan, R. Churchill, J. J. Deeks, A. Hrobjartsson, J. Kirkham, P. Juni, Y. K. Loke, T. D. Pigott, C. R. Ramsay, D. Regidor, H. R. Rothstein, L. Sandhu, P. L. Santaguida, H. J. Schunemann, B. Shea, I. Shrier, P. Tugwell, L. Turner, J. C. Valentine, H. Waddington, E. Waters, G. A. Wells, P. F. Whiting and J. P. Higgins (2016). "ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of interventions." BMJ **355**: i4919.

Sunkara, S. K., V. Rittenberg, N. Raine-Fenning, S. Bhattacharya, J. Zamora and A. Coomarasamy (2011). "Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles." Human Reproduction **26**(7): 1768-1774.

Teramoto, S. and O. Kato (2007). "Minimal ovarian stimulation with clomiphene citrate: a large-scale retrospective study." Reproductive biomedicine online **15**(2): 134-148.

Thoma, M. E., A. C. McLain, J. F. Louis, R. B. King, A. C. Trumble, R. Sundaram and G. M. Buck Louis (2013). "Prevalence of infertility in the United States as estimated

by the current duration approach and a traditional constructed approach." Fertil Steril **99**(5): 1324-1331 e1321.

Trounson, A. O., J. F. Leeton, C. Wood, J. Webb and J. Wood (1981). "Pregnancies in humans by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle." Science **212**(4495): 681-682.

Vargyas, J. M., C. Morente, G. Shangold and R. P. Marrs (1984). "The effect of different methods of ovarian stimulation for human in vitro fertilization and embryo replacement." Fertil Steril **42**(5): 745-749.

Vaughan, D. A., A. Leung, N. Resetkova, R. Ruthazer, A. S. Penzias, D. Sakkas and M. M. Alper (2017). "How many oocytes are optimal to achieve multiple live births with one stimulation cycle? The one-and-done approach." Fertil Steril **107**(2): 397-404 e393.

von Wolff, M., M. Nitzschke, P. Stute, N. Bitterlich and S. Rohner (2014). "Low-dosage clomiphene reduces premature ovulation rates and increases transfer rates in natural-cycle IVF." Reprod Biomed Online **29**(2): 209-215.

Wallace, K. L., V. Johnson, V. Sopelak and R. Hines (2011). "Clomiphene citrate versus letrozole: molecular analysis of the endometrium in women with polycystic ovary syndrome." Fertil Steril **96**(4): 1051-1056.

Wong, K. M., S. Mastenbroek and S. Repping (2014). "Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates." Fertil Steril: In press.

Young, J. R. and R. B. Jaffe (1976). "Strength-duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women. II. Effects of varying concentrations of estradiol." J Clin Endocrinol Metab **42**(3): 432-442.

Youssef, M. A., F. Van der Veen, H. G. Al-Inany, M. H. Mochtar, G. Griesinger, M. Nagi Mohesen, I. Aboulfoutouh and M. van Wely (2014). "Gonadotropin-releasing hormone agonist versus HCG for oocyte triggering in antagonist-assisted reproductive technology." Cochrane Database Syst Rev **10**: CD008046.

Zhang, J., L. Chang, Y. Sone and S. Silber (2010). "Minimal ovarian stimulation (mini-IVF) for IVF utilizing vitrification and cryopreserved embryo transfer." Reprod Biomed Online **21**(4): 485-495.

Zorn, J. R., P. Boyer and A. Guichard (1987). "Never on a Sunday: programming for IVF-ET and GIFT." Lancet **1**(8529): 385-386.