**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Nova dosagem de testosterona transdérmica em gel previamente à
estimulação ovariana controlada em pacientes potencialmente más
respondedoras: resultados preliminares.**

Paula Luiza Muzetti De Chico

**Ribeirão Preto
2020**

Paula Luiza Muzetti De Chico

Nova dosagem de testosterona transdérmica em gel previamente à estimulação ovariana controlada em pacientes potencialmente más respondedoras: resultados preliminares.

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Professora Doutora Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro.

Ribeirão Preto

2020

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

De Chico, Paula Luiza Muzetti

Nova dosagem de testosterona transdérmica em gel previamente à estimulação ovariana controlada em pacientes potencialmente más respondedoras: resultados preliminares. Ribeirão Preto, 2020

81 pg.

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Navarro, Paula Andrea de Albuquerque Salles.

1. Técnicas de reprodução assistida 2. Estimulação ovariana controlada 3. Estradiol 4. Testosterona. 5. Má resposta ovariana

FOLHA DE APROVAÇÃO

Paula Luiza Muzetti De Chico

Nova dosagem de testosterona transdérmica em gel previamente à estimulação ovariana controlada em pacientes potencialmente más respondedoras: resultados preliminares.

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.
Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Titulação/Nome:

Instituição:

Assinatura: _____

Titulação/Nome:

Instituição:

Assinatura: _____

Titulação/Nome:

Instituição:

Assinatura: _____

Titulação/Nome:

Instituição:

Assinatura: _____

Dedicatória

DEDICO aos meus pais, Adriana e Dorival,
pelo amor, educação, incentivo e apoio constante que
muito me auxiliaram dando-me força e
determinação para concluir esta e
outras etapas que estão por vir.
AMO MUITO VOCÊS!

Agradecimentos

Aos meus pais, meu irmão Murilo e meu namorado Pedro que sempre estiveram ao meu lado, incentivando, apoiando e encorajando. Obrigada por compreenderem minha ausência, acreditarem no meu sonho, apoiarem nos momentos difíceis e fazerem todo o esforço valer a pena.

A minha orientadora, Profa. Dra. Paula Navarro por ser sempre paciente e compreensiva, me proporcionado crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela oportunidade, pelo suporte, apoio e preocupação sempre a mim dedicados.

A grande colaboradora Vanessa Sig.o meu muito obrigada, pela amizade, pelas risadas, assim como pelas broncas, pelo auxílio na execução deste projeto, pelo apoio em todos os momentos e pela dedicação.

Agradeço a Michele Da Broi. Profa. Juliana Meola, Liliane Fábio e Thalita Berteli pelas sugestões e correções feitas durante o trabalho, as quais contribuíram para o meu crescimento profissional.

Aos colegas pós-graduandos pela amizade e pelo carinho, em especial ao Eduardo que dividiu comigo as conquistas e dificuldade da rotina de pesquisa, muito obrigada por todos os momentos de tensão e de alegria.

Às minhas amigas de vida, Milena, Manoella, Luísa, Marcela, Giovana e Pâmela por sempre estarem presentes e me incentivarem ao máximo para a conclusão deste trabalho.

Às funcionárias do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, Setor de Reprodução Humana, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, especialmente a Marilda, Cris e Roberta por todos os ensinamentos.

A grande amiga e “mãezona” Cidinha, por realizar as coletas de sangue e especialmente pelo carinho e tempo cedidos a mim e a pesquisa.

À CAPES- Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo de mestrado (2017-2019).

Aos componentes da banca avaliadora pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente a todas as pacientes que aceitaram participar do estudo.

MUITO OBRIGADA!

Epígrafe

*“Talvez não tenha conseguido fazer o
melhor, mas lutei para que o melhor fosse
feito. Não sou o que deveria ser, mas
Graças a Deus, não sou o que era antes”
(Martin Luther King)*

Lista de ilustrações

Figura 1 - Biossíntese de androgênios e seus mecanismos de ativação.....**24**

Figura 2 - Desenho experimental.....**34**

Figura 3 - Fluxograma representativo do recrutamento de pacientes para coleta de sangue no período de julho/2017 a setembro/2019.....**42**

Lista de tabelas

Tabela 1 - Dados descritivos das pacientes nos Ciclo Controle e Testosterona.....	43
--	-----------

Tabela 2 - Concentrações séricas de SHBG, testosterona total, testosterona livre, índice de androgênio livre e estradiol em diferentes momentos do tratamento.....	45
---	-----------

Tabela 3 - Resposta à EOC e resultados de ICSI de pacientes com risco de má resposta nos Ciclos Controle e Testosterona.....	47
---	-----------

Lista de siglas

EOC: Estimulação Ovariana Controlada

TRA: Técnicas de Reprodução Assistida

IAL: Índice de Androgênios Livre

ICSI: Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide

CC: Ciclo Controle

CT: Ciclo Testosterona

COC: Contraceptivo Oral Combinado

D1: Dosagem 1

D2: Dosagem 2

D3: Dosagem 3

D4: Dosagem 4

D5: Dosagem 5

SHBG: Globulina Ligadora de Hormônios Sexuais

OMS: Organização Mundial de Saúde

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças

ESHRE: Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia

CFA: Contagem de Folículos Antrais

AMH: Hormônio Antimulleriano

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

FIV: Fertilização *in vitro*

SHO: Síndrome de Hiperestimulação Ovariana

LH: Hormônio Luteinizante

hCG: Gonadotrofina Coriônica Humana

GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofina

AR: Receptor de Androgênio

DHT: di-hidrotestosterona

S-DHEA: Sulfato de deidroepiandrosterona

DHEA: Desidroepiandrosterona

A4: Androstenediona

E1: Estrona

E2: Estradiol

SOP: Síndrome dos Ovários Policísticos

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

IMC: Índice de Massa Corporal

UStv: Ultrassonografia Transvaginal

r-FSH: Hormônio Folículo Estimulante Recombinante

HMG: gonadotropina menopáusica humana

CCO: Complexos-Cumulus-Oócito

CV: Coeficiente de variabilidade

LC-MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem

TT: Testosterona Total

IC: Intervalo de Confiança

IUI: Inseminação Intrauterina

IQ: Intervalo interquartil

SUS: Sistema Único de Saúde

RCT: Estudo Clínico Randomizado e Controlado

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

RESUMO

De Chico, Paula Luiza Muzetti. **Nova dosagem de testosterona transdérmica em gel previamente à estimulação ovariana controlada em pacientes potencialmente más respondedoras: resultados preliminares.** 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A má resposta à estimulação ovariana controlada (EOC) está associada a reduzida chance de gravidez após o uso das técnicas de reprodução assistida (TRA). Alguns estudos sugerem um potencial efeito benéfico da testosterona transdérmica utilizada previamente à EOC, sobre as taxas de nascidos vivos em más respondedoras. Todavia, dúvidas persistem sobre a eficácia e segurança da intervenção, assim como a dose e tempo de uso mais adequados. O objetivo primário deste estudo foi avaliar os efeitos adversos e as concentrações séricas de testosterona (total e livre), SHBG, estradiol e o índice de androgênios livres (IAL) após a administração transdérmica em gel de uma nova dosagem de testosterona (25mg a cada 48 horas) por 60 dias antes da EOC para injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) em pacientes potencialmente más respondedoras. Inicialmente, as pacientes foram submetidas à EOC, iniciada no segundo ou terceiro dia do ciclo menstrual não programado, utilizando um dos dois protocolos padronizados no serviço (Ciclo Controle - CC). As pacientes que não engravidaram no CC utilizaram testosterona transdérmica (25 mg a cada 48 horas) associada a contraceptivo oral combinado (COC - Level®) por 60 dias antes da segunda EOC, realizada com o mesmo protocolo de EOC do CC (Ciclo Testosterona – CT). Dessa forma, cada paciente foi seu próprio caso-controle. As coletas de sangue foram realizadas antes do início da primeira EOC (D1), no dia da primeira recuperação dos oócitos (D2), no dia do início da testosterona (D3), 60 dias após o uso de testosterona + COC (D4) e no dia da segunda recuperação de oócitos (D5). As concentrações séricas de testosterona total foram avaliadas pelo método de cromatografia líquida de alta performance acoplado à espectrometria de massa em tandem e testosterona livre e o IAL foram calculados. O estradiol foi avaliado pelo método de imunoensaio competitivo por eletroquimioluminescência e a SHBG pelo método eletroquimioluminométrico. A comparação entre os dias de coleta de sangue e os grupos para cada variável foi realizada considerando os contrastes ortogonais usando o modelo de regressão linear de efeitos mistos, utilizando o programa SAS versão 9.4.

Seis pacientes participaram de ambos os ciclos e realizaram coleta de sangue para dosagens hormonais nos cinco momentos, sendo avaliadas. Os efeitos adversos relatados, representados por sangramento vaginal irregular (6 pacientes), sensibilidade mamária (2/6 pacientes) e pele oleosa e acne (1/6 pacientes), foram leves e não interferiram com o uso regular da medicação. Observamos concentrações significativamente maiores de testosterona total e livre em D4 do que em D1 (respectivamente, $p = 0,009$ e $p = 0,041$) e em D3 (respectivamente, $p = 0,010$ e $p = 0,031$). O IAL também foi significativamente maior em D4 do que em D1 ($p = 0,041$) e em D3 ($p = 0,031$). As concentrações de estradiol foram significativamente maiores em D2 do que em D1 ($p < 0,001$) e em D5 do que em D3 ($p = 0,001$) e D4 ($p = 0,002$). As concentrações de SHBG foram significativamente menores em D1 do que em D4 ($p = 0,028$). A nova dose de testosterona transdérmica em gel, utilizada por 60 dias antes da EOC, associada ao COC, em pacientes potencialmente más respondedoras se mostrou bem tolerada, promovendo efeitos adversos leves, principalmente representados por sangramento vaginal irregular. Apesar da administração da testosterona em gel ser associada ao uso de COC, promovendo aumento da SHBG, observamos concentrações significativamente maiores de testosterona total e livre após a sua administração do que as observadas em condições basais antes da primeira e da segunda EOC. Como esperado, as concentrações séricas de estradiol foram significativamente maiores após a EOC, tanto sem como após o uso da testosterona transdérmica. Estudos bem delineados são necessários para avaliar os desfechos reprodutivos associados a esta nova intervenção.

Palavras-chave: técnicas de reprodução assistida, estimulação ovariana controlada, estradiol, testosterona, má resposta ovariana

ABSTRACT

De Chico, Paula Luiza Muzetti. **New dosage of transdermal gel testosterone prior to controlled ovarian stimulation in potentially poor responders: preliminary results.** 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Poor response to controlled ovarian stimulation (COS) is associated with reduced chance of pregnancy after assisted reproduction technology (ART). Some studies suggest a potential beneficial effect of transdermal testosterone used prior to COS on live birth rates in poor responders. However, doubts remain about the efficacy and safety of the intervention, as well as the most appropriate dose and duration of use. The primary objective of this study was to evaluate the adverse effects and serum concentrations of total and free testosterone, SHBG, estradiol and free androgen index (FAI) following transdermal gel administration of a new testosterone dosage (25 mg every 48 hours) for 60 days before COS for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in potentially poor responders. Initially, the patients were submitted to COS, initiated on the second or third day of the unscheduled menstrual cycle, using one of two standardized protocols in the service (Control Cycle - CC). Patients who did not become pregnant in CC used transdermal testosterone (25 mg every 48 hours) combined with combined oral contraceptive (COC - Level®) for 60 days prior to the second EOC, performed with the same COS protocol used in CC (Testosterone – Cycle - TC). Thus, each patient was their own case-control. Blood samples were collected before the first COS (Dosage 1 – D1), on the day of the first oocyte retrieval (Dosage 2 - D2), on start day of transdermal testosterone (Dosage - D3), 60 days after use of transdermal testosterone + COC (Dosage 4 - D4) and on the day of the second oocyte retrieval (Dosage 5 - D5).

Serum levels of total testosterone were evaluated by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric method (LC-MS/MS) and FAI were calculated. Serum concentration of estradiol was evaluated by the competitive electrochemiluminescence immunoassay method and SHBG by the electrochemiluminometric method. Comparison between blood collection moments and groups for each variable was performed considering orthogonal contrasts using the mixed effects linear regression model on SAS version 9.4 software.

Six patients participated in both cycles. Blood samples were collected for hormonal dosages at five moments and then evaluated. Adverse effects reported as irregular vaginal bleeding (6 patients), breast tenderness (2/6 patients) and oily skin and acne (1/6 patients), were mild and did not interfere with regular medication use. We observed significantly higher total and free testosterone at D4 than D1 (respectively, $p = 0.009$ and $p = 0.041$) and D3 (respectively, $p = 0.010$ and $p = 0.031$). The FAI was also higher at D4 than D1 ($p = 0.041$) and D3 ($p = 0.031$). The concentration level of estradiol were significantly higher at D2 than D1 ($p < 0.001$) and at D5 than D3 ($p = 0.001$) and D4 ($p = 0.002$). The concentration level of SHBG was lower at D1 than D4 ($p = 0.028$). The new dosage of transdermal gel testosterone used for 60 days prior to COS associated with COC, in potentially poor responders patients, has been shown to be well tolerated, promoting mild adverse effects, mainly represented by irregular vaginal bleeding. Although gel testosterone administration is associated with COC use, promoting increased SHBG, we observed significantly higher total and free testosterone levels after its administration, compared with basal conditions before the first and second COS. As expected, concentration level of estradiol were higher after COS as well as after testosterone use. Well-designed studies are needed to assess the reproductive outcomes associated with this new intervention.

Keywords: assisted reproduction technology, controlled ovarian stimulation, estradiol, testosterone, poor ovarian response.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Marcadores de reserva ovariana	18
1.2. Estimulação ovariana controlada para más respondedoras.....	20
1.3. Biossíntese dos androgênios.....	21
1.4. Expressão do AR nos ovários.....	23
1.5. Papel dos androgênios na foliculogênese.....	24
1.6. Suplementação de androgênios e esperada resposta ovariana em más respondedoras	24
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo Primário	29
2.2. Objetivos Secundários.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Desenho do estudo, aspectos éticos e local de realização do estudo.....	31
3.2. Participantes, intervenção utilizada e ciclos estudados (Ciclo Controle e Ciclo Testosterona)	31
3.3. Protocolos de EOC, ICSI e transferência embrionária	35
3.4. Desfechos avaliados.....	36
3.5. Metodologias de avaliação dos desfechos primários	37
3.5.1. Dosagens hormonais séricas:.....	37
3.6. Vieses.....	38
3.7. Tamanho do estudo.....	38
3.8. Análises estatísticas	38
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Fluxograma do estudo	41
4.2. Caracterização das pacientes incluídas no estudo	43
4.3. Efeitos adversos relatados durante o uso da testosterona transdérmica em gel.....	43
4.4. Análise das dosagens hormonais realizadas em diferentes momentos do estudo .	43
4.5. Resposta à EOC e resultados da ICSI dos Ciclos controle e testosterona.....	46
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8. APÊNDICE	69
9. ANEXO.....	74

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade é considerada uma doença pela OMS (Organização Mundial de Saúde) (BERG, 2017), sendo clinicamente definida como a incapacidade de um casal atingir a gravidez após um ano de relações sexuais regulares sem qualquer tipo de contracepção. Estudos apontam que cerca de 15% dos casais vão vivenciar uma infertilidade primária ou secundária ao decorrer de suas vidas reprodutivas (EIMERS et al., 1994).

Nas últimas décadas, a utilização de Técnicas de Reprodução Assistida (TRA) têm se tornado cada vez mais frequentes, sendo a postergação da maternidade devido às mudanças sociais um dos principais motivos (The ESHRE Capri Workshop Group, 2009). As TRA consistem na manipulação de, ao menos, um dos gametas (oócito e/ou espermatozoide) em ambiente laboratorial e têm como objetivo o desenvolvimento folicular múltiplo em um mesmo ciclo, a fim de se obter um maior número de oócitos e, assim, aumentar a chance de sucesso gestacional (DE PLACIDO et al., 2005).

A estimulação ovariana controlada (EOC) é necessária para a indução do crescimento de folículos, a qual é realizada por meio do uso de gonadotrofinas, responsáveis pela produção de um número maior de oócitos em comparação ao ciclo fisiológico da paciente (JUNGHEIM; MEYER; BROUGHTON, 2015).

Ao longo dos últimos anos, as TRA atingiram uma progressiva modernização de conhecimento clínico e de desenvolvimento tecnológico (UBALDI et al., 2014). De acordo com o Centro Nacional de Prevenção de Doenças Crônicas e Promoção da Saúde (CDC), as TRA conseguem proporcionar 29,3% de gravidez clínica e 23,9% de nascidos vivos por ciclo iniciado (Assisted Reproductive Technology National Summary Report, 2015). Contudo, uma das limitações ainda existentes no cotidiano de clínicas de TRA está relacionada a casos de obtenção de um baixo número de oócitos após a EOC, levando a baixas taxas de gestação por transferência e menores taxas cumulativas de gravidez por ciclo iniciado em comparação àquelas mulheres com resposta normal (OUDENDIJK et al., 2012; UBALDI et al., 2014). Essa limitação atinge um grupo de mulheres denominadas de más respondedoras que correspondem de 9% a 24% das mulheres submetidas às TRA (UBALDI et al., 2005).

Durante anos, vários autores discutiram a respeito da ampla diversidade de definições empregadas para especificar mulheres que apresentam comprometimento

do crescimento folicular em resposta à EOC (KAILASAN et al., 2004; SALLAM et al., 2005; ARSLAN et al., 2005). Na revisão sistemática feita por Polyzos e Devroey (2011), a indignação e a busca por uma definição concreta do termo tornam-se claras ao mostrarem gigantesca variabilidade de definições de pacientes más respondedoras empregadas pela literatura. Entre 47 estudos randomizados, 41 definições diferentes foram feitas para caracterizar esse grupo. Apenas em 2011, um grupo de estudos da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) sugeriu uma homogeneização e consensualização desta definição com a elaboração do “Critério de Bolonha” (FERRARETTI et al., 2011).

Portanto, de acordo com o Critério de Bolonha, a paciente má respondedora é caracterizada pela presença de ao menos duas das seguintes características: I-) idade materna avançada (≥ 40 anos) ou qualquer outro fator de risco para baixa reserva ovariana, como por exemplo, endometrioma, ooforoplastia/ooforectomia e quimioterapia; II-) má resposta à EOC em ciclo prévio (ou seja, obtenção de 3 oócitos ou menos utilizando um protocolo de estimulação convencional); e III-) teste de reserva ovariana com resultado anormal (isto é, contagem de folículos antrais [CFA] $< 5 - 7$ folículos; ou hormônio antimulleriano [HAM] $< 0,5 - 1,1$ ng/mL).

1.1. Marcadores de reserva ovariana

Conhecer e entender a reserva ovariana da paciente que será submetida as TRA é extremamente importante para proporcionar melhor eficácia e segurança do tratamento (UBALDI et al., 2014). A reserva ovariana de uma paciente é considerada normal quando, após estimulação ovariana controlada, obtem-se mais de três oócitos no procedimento de punção folicular (FERRARETTI et al., 2011). Embora ainda não tenham sido identificados reais marcadores de qualidade oocitária, temos acesso a preditores indiretos de competência gamética, como idade, parâmetros bioquímicos (hormônio antimulleriano [AMH] e concentrações séricas de FSH no início da fase folicular) e características morfológicas ovarianas (contagem de folículos antrais [CFA] e volume ovariano) (BROEKMANS et al., 2006). Sabe-se que a idade leva à diminuição da fertilidade da mulher por meio da perda da função ovariana, a qual acarreta na depleção folicular e a incapacidade do ovário produzir oócitos aptos a serem fertilizados e a se desenvolverem (TATONE et al., 2008). A idade avançada da mulher também está associada a maiores taxas de oócitos aneuplóides (FRAGOULI

et al., 2013). Alguns estudos mostram relação entre a meiose e a regulação do ciclo celular e o aumento da idade da paciente (GRONDAHL et al., 2010). Entretanto a fertilidade é variável entre mulheres da mesma idade (FERRARIO et al., 2014).

O FSH foi considerado, por anos, um dos mais confiáveis preditores de resposta ovariana em ciclos de FIV/ICSI. A concentração basal desse hormônio se eleva aproximadamente 10 anos antes da menopausa. Esse aumento é causado pela redução do *feedback* negativo das proteínas moduladoras de FSH, inibina A e B (GROOME et al., 1996) e também pela redução dos folículos antrais, os quais estão em estágio inicial (BURGER et al., 1998; WELT et al., 1999). Entretanto, o FSH basal é considerado um bom marcador de resposta ovariana apenas em altas concentrações (superiores a 12mIU/mL), de modo que é um preditor tardio de baixa reserva ovariana (BROEKMANS et al., 2006).

O AMH é uma glicoproteína produzida pelas células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais pequenos com até 7 a 8mm, que possui importante função sobre a maturação e desenvolvimento folicular (LA MARCA et al., 2010). Sua concentração sérica sofre pequenas variações durante o ciclo menstrual, o que o torna um bom marcador de reserva ovariana (LA MARCA et al., 2006).

A CFA e a medida do volume ovariano são feitas por meio de ultrassonografia transvaginal realizada entre o 2º e o 5º dia do ciclo menstrual. Por meio desse exame é possível analisar o volume dos ovários e realizar a contagem dos folículos medindo entre 2 e 9 mm em ambos os ovários. Após a soma dos folículos, é feita a classificação da reserva ovariana da paciente e, dessa maneira, juntamente com outros preditores de resposta ovariana, como a dosagem do hormônio antimulleriano e o FSH basal da paciente, é possível fornecer informações sobre a resposta à EOC (BAKER et al., 2018). Além disso, é possível definir o melhor protocolo de estimulação a ser utilizado, com o intuito de evitar o cancelamento do ciclo ou a síndrome de hiperestimulação ovariana (SHO).

Alguns estudos evidenciam que a acurácia do AMH e da CFA para predição da resposta à EOC são similares (VAN ROOIJ et al., 2002; MUTTUKRISHNA et al., 2005; ELGINDY et al., 2007; LEKAMGE et al., 2007; JAYAPRAKASAN et al., 2008). Portanto, segundo o Critério de Bologna proposto por Ferraretti (2011), podemos classificar como teste de reserva ovariana anormal a CFA menor que 5 a 7 ou HAM menor que 0,5 – 1,1 ng/mL.

1.2. Estimulação ovariana controlada para más respondedoras

O objetivo da EOC é promover o crescimento multifolicular com o uso das gonadotrofinas, controlar o pico espontâneo de Hormônio Luteinizante (LH), a fim de impedir que a ovulação ocorra antes da captação oocitária, e induzir a maturação oocitária e ovulação, com o uso de gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou com o análogo do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (apenas em ciclos que utilizam GnRH antagonista) (ATA; SELI, 2015).

Quando a dose convencional de gonadotrofinas (200 a 225 UI ao dia) não proporciona um crescimento multifolicular adequado, uma das abordagens clínicas mais utilizadas é aumentar a dose de gonadotrofinas. A maioria dos autores utilizou, durante décadas, altas doses de gonadotrofinas em pacientes más respondedoras (UBALDI et al., 2014). Porém, alguns trabalhos defendem que uma dose máxima de 300 UI diárias de gonadotrofinas seria suficiente para essas pacientes, uma vez que doses mais altas não aumentam as taxas de gravidez e de nascidos vivos (BERKKANOGLU; OZGUR, 2010; BAKER et al., 2015). Segundo Ubaldi (2014), é sabido que a reserva ovariana desse tipo de paciente é reduzida; os folículos possivelmente recrutáveis são menores e as gonadotrofinas, independentemente da dosagem utilizada, permitem apenas suportar a coorte de folículos receptivos à estimulação ovariana controlada, sem a produção de folículos *de novo*.

Durante muitos anos, utilizou-se diversos protocolos de estimulação em mulheres más respondedoras com o propósito de encontrar algum que trouxesse benefícios. Uma revisão feita pela Cochrane demonstrou que o uso de antagonistas do GnRH em pacientes candidatas a má resposta aumentou o número de oócitos e diminuiu a dose de gonadotrofinas, comparado com protocolo longo utilizando agonista do GnRH (PANDIAN et al., 2010). Em uma meta-análise com 14 estudos clínicos randomizados, o uso de protocolos com antagonistas do GnRH, comparados com protocolos utilizando agonista do GnRH, resultou em redução significativa na duração da estimulação ovariana controlada (PU et al., 2011). Aliado a isto, não apresentou diferença no número de oócitos captados, nas taxas de nascidos vivos e de ciclos cancelados. Por essa razão, alguns autores indicam a utilização do antagonista de GnRH, em combinação com gonadotrofinas, ao invés do agonista de GnRH, como um protocolo vantajoso para pacientes potencialmente más respondedoras. Ademais, a diminuição da quantidade de injeções subcutâneas diárias

pode ajudar a combater as dificuldades físicas e psicológicas das pacientes (MAHMOUD YOUSSEF et al., 2012). Porém, ainda é preciso mais estudos para conseguirmos otimizar um protocolo ideal para esse grupo de pacientes.

Outro protocolo utilizado para pacientes potencialmente más respondedoras é o de mínima estimulação, o qual consiste na utilização de doses baixas de gonadotrofinas associadas ao citrato de clomifeno (LAZER et al., 2014). A principal vantagem deste protocolo consiste no menor custo, pelas menores doses de gonadotrofinas utilizadas, além de ser um protocolo mais amigável para a paciente (MOHSEN; EL DIN, 2013; OZCAN CENKSOY et al., 2014). Uma meta-análise, comparando protocolos de alta dose de gonadotrofinas com os de mínima estimulação em más respondedoras, concluiu que o protocolo de alta dose não apresentou superioridade ao protocolo de mínima estimulação em relação às taxas de nascidos vivos e de gravidez clínica (JAMALUDIN et al., 2019). Desta forma, ambos os protocolos têm sido utilizados para a EOC em pacientes potencialmente más respondedoras, sendo a escolha por um ou outro individualizada, na dependência de vários fatores, como a experiência do médico, a CFA antes do início do tratamento, a resposta e o tipo de protocolo utilizado em ciclos prévios, entre outros fatores.

1.3. Biossíntese dos androgênios

Os androgênios controlam sua ação, principalmente, por meio dos receptores de androgênio (AR), os quais estão localizados no citoplasma da célula em um complexo inativo ligado a proteínas de choque térmico, uma classe de proteínas chaperonas moleculares. Uma vez que a testosterona ou dihidrotestosterona (DHT) se ligam ao AR, a proteína de choque térmico é dissociada, estimulando a transcrição de genes (QUIGLEY et al., 1995).

Os principais esteroides circulantes, que promovem efeitos androgênicos nas mulheres são, em ordem decrescente de concentração, dehidroepiandrosterona sulfato (S-DHEA), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona (A4), testosterona e di-hidrotestosterona (DHT) (DAVISON, DAVIS, 2003). Entretanto, apenas os hormônios testosterona e DHT (androgênio puro e não aromatizável, 3 a 10 vezes mais potente que a testosterona) conseguem se ligar diretamente ao receptor de androgênio (AR); os demais androgênios são precursores

que necessitam conversão em testosterona ou DHT para modular efeitos androgênicos (BURGER, 2002).

Dentro do ovário, existem milhares de folículos ovarianos que são a sua unidade funcional básica. No interior desse folículo ovariano, temos um único oócito, envolto por uma camada de células epiteliais achatadas. Entre esta e o oócito, temos uma camada composta por glicoproteínas, chamada zona pelúcida. Ao redor do folículo surge outra camada, a teca, a qual está intimamente associada a membrana basal. A principal função da teca interna é a produção de esteroides (TANGHE et al., 2002).

A síntese de androgênios dentro do ovário está sob controle do LH. O LH possui receptores localizados nas células da teca interna que, quando ativados, estimulam a conversão do colesterol em pregnenolona através da enzima P450scc (CYP11A1). Em seguida, a pregnenolona é metabolizada em DHEA pela enzima P450c17 (CYP17A1) e depois em A4 pela 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β - HSD), que é a precursora direta da testosterona. Por meio da enzima 17 β - hidroxiesteroide desidrogenase (17 β - HSD) a A4 é convertida em testosterona, a qual pode ser aromatizada em estradiol (E2) pela P450arom (CYP19) ou reduzida a DHT pela 5 α -redutase 1 (SRD5A1) e 2 (SRD5A2). A DHT pode exercer sua função de forma direta, ao se ligar a receptores de androgênios, ou de forma indireta, após sua redução enzimática em 3 β -diol (Figura 1) (MAGOFFIN, 2005; MILLER, AUCHUS, 2011).

A esteroidogênese é um processo compartimentado, ou seja, a A4 e a testosterona são sintetizadas nas células da teca antes de se difundirem nas células da granulosa, onde elas são convertidas em estrona (E1) e estradiol (E2) respectivamente. (GHAYEE; AUCHUS, 2007).

1.4. Expressão do AR nos ovários

Figura 1 - Biossíntese de androgênios e seus mecanismos de ativação.

Fonte: Adaptado de (WALTERS, 2015).

O AR demonstra um papel crucial no desenvolvimento folicular ovariano. Os AR são expressos em quase todos os estágios foliculares, porém, distribuídos de forma e em quantidade distintas em cada etapa de desenvolvimento, implicando em mudanças na sua importância ao longo da foliculogênese. Em humanos, concentrações elevadas de AR são encontradas nas células da granulosa, a partir do estágio primário, com um pico no estágio antral (WEIL et al., 1998; SEM; HAMMES, 2010). Por meio do fenótipo do rato nocaute para AR nas células da granulosa, é possível demonstrar a importância desses receptores, uma vez que o rato se torna subfértil, diminui a progressão dos folículos, apresenta menos ovulações e o tamanho da sua ninhada é reduzido (SEN; HAMMES, 2010).

1.5. Papel dos androgênios na foliculogênese

Os folículos primordiais (formados durante a vida fetal) consistem em um oócito primário envolto por uma única camada de células foliculares achatadas, o qual representa o primeiro estágio na maturação folicular dos primatas. Os fatores que implicam na ativação dos folículos primordiais ainda são pouco compreendidos. Em um estudo que tratou macacos rhesus com suplementação de androgênios observou-se um aumento expressivo do fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1) em oócitos de folículos primordiais (VENDOLA et al., 1999). O tratamento com androgênios, o qual aumenta a sinalização de IGF-1 e de seu receptor em oócitos de macacos rhesus, podem desencadear a ativação dos oócitos, assim como a iniciação do crescimento folicular. (VENDOLA et al., 1998; VENDOLA et al., 1999).

Alguns estudos mostraram que o tratamento com testosterona, apesar de suprimir a produção de gonadotrofinas, resulta em um aumento do número de folículos em desenvolvimento. Portanto, sugere-se que os androgênios estimulam a ativação dos folículos primordiais, mesmo sem a estimulação de gonadotrofinas (SPINDER et al., 1989).

Na estimulação ovariana controlada, a suplementação com androgênios pode agir sinergicamente com FSH na proliferação de células da granulosa e também no recrutamento dos folículos, ao mesmo tempo em que a ação exógena do FSH promove a proteção desses folículos recrutados para que não entrem em atresia. Ademais, existem alguns estudos que mostram que os androgênios agem sobre a foliculogênese, promovendo um aumento do número de receptores de FSH expressos em células da granulosa (WEIL et al., 1999).

1.6. Suplementação de androgênios e esperada resposta ovariana em más respondedoras

Diversas estratégias foram propostas para aumentar o sucesso gestacional de mulheres más respondedoras, uma vez que a chance de gravidez nesse grupo de pacientes é reduzida, com a maioria dos estudos reportando menos de 10% de gravidez clínica por ciclo iniciado (MAMAN et al., 2012; SOMIGLIANA et al., 2013). Todavia, a maioria dos estudos investigando novas intervenções visando a melhora dos resultados reprodutivos deste grupo de mulheres mostra resultados desapontadores.

Uma das terapias auxiliares que vem se destacando é a suplementação de androgênios em mulheres más respondedoras. Ensaios *in vitro* mostram que a resposta ao Hormônio Folículo Estimulante (FSH) pelas células da granulosa é um processo modulado por androgênios (HILLIER, DE ZWART, 1981).

Recente estudo em primatas não humanos, utilizando o cultivo folicular tridimensional, mostrou que a adição de androgênios altera a sobrevivência e crescimento folicular, assim como a produção de esteroides e AMH de uma maneira dependente da dose de androgênio e do estágio de desenvolvimento folicular, com atuação desde o estágio de folículo secundário (RODRIGUES et al., 2015), sugerindo um importante papel dos androgênios ao longo da foliculogênese. Em primatas não humanos, o tratamento com androgênios aumentou a expressão de receptores de FSH nas células da granulosa (WEIL et al., 1998; WEIL et al., 1999), promoveu iniciação do crescimento de folículos primordiais (VENDOLA, ZHOU et al. 1999), assim como aumentou o número de folículos pré-antrais e antrais pequenos em crescimento (VENDOLA et al., 1998).

Estudos em mulheres saudáveis em idade fértil demonstram que a secreção de esteroides ovarianos e resposta à EOC começam a diminuir por volta dos 30 anos. Apesar do declínio de androgênios, os quais são precursores da biossíntese de estrogênio, os níveis séricos de estradiol permanecem inalterados até a idade fértil tardia (PILTONEN et al., 2004).

Um modelo clássico para estudar os efeitos dos androgênios no ovário humano é o representado por mulheres que tem a síndrome dos ovários policísticos (SOP), as quais são caracterizadas pela hiperprodução ovariana de androgênios, principalmente androstenediona e testosterona. Nas pacientes com esta síndrome, observa-se um exacerbado número de folículos antrais que têm capacidade de responder ao FSH e concentrações de androgênios circulantes relacionadas positivamente com a contagem de folículos antrais (PIGNY et al., 2003). Além disso, características morfológicas e funcionais semelhantes à de mulheres com SOP são reproduzidas em mulheres que são expostas à androgênios por um longo período, por decorrência de alguma patologia, como por exemplo, hiperplasia adrenal congênita ou por virilização exercida por tumores (LOBO, 1984).

O primeiro estudo avaliando a suplementação de androgênio em más respondedoras sobre a EOC foi publicado em 2000 por Casson e colaboradores (CASSON et al., 2000). Casson et al (2000) utilizaram a dehidroepiandrosterona

(DHEA), um androgênio não aromatizável, como pré tratamento à EOC com FSH recombinante e reportaram um aumento da concentração do pico de estradiol e um aumento do número médio de folículos maduros. Então, em 2006, Balasch e colaboradores utilizaram a testosterona como pré-tratamento à EOC com FSH recombinante e reportaram um aumento do número de folículos recrutados (BALASCH, et al., 2006).

A partir de então, o efeito da testosterona transdérmica sobre desfechos reprodutivos em mulheres com provável má resposta ovariana à EOC já foi avaliado por alguns ensaios clínicos randomizados (MASSIN, CEDRIN-DURNERIN et al. 2006; FÁBREGUES et al., 2009, SIPE et al., 2010; KIM; HOWLES; LEE, 2011; KIM et al., 2014; DOAN et al., 2017; SAHARKHIZ et al., 2018), com resultados animadores. Dados das últimas meta-análises sugeriram um potencial efeito benéfico da testosterona transdérmica, usada previamente à EOC, sobre as taxas de nascidos vivos (GONZÁLEZ-COMADRAN et al., 2012; NAGELS et al., 2015).

Em suma, alguns ensaios *in vitro* demonstraram que a resposta ao FSH pelas células da granulosa é um processo dependente de androgênios (HILLIER, DE ZWART, 1981), que os androgênios podem colaborar sinergicamente com o FSH no crescimento de folículos primordiais (WEIL et al., 1999) e que os androgênios desempenham um importante papel ao longo da foliculogênese de modo dose e tempo dependente (RODRIGUES, et al., 2015). Em mulheres submetidas a EOC para procedimentos de reprodução assistida, observa-se uma correlação positiva entre os níveis séricos de testosterona, o número de oócitos captados (BARBIERI, et al., 2005) e a taxa de gestação (FRATTARELLI, PETERSON, 2004). Portanto, por meio dessas informações, e do fato de que a concentração plasmática de androgênios diminui em mulheres depois dos 30 anos (PILTONEN et al., 2004), hipotetizou-se que a suplementação de androgênios previamente à EOC, em mulheres más respondedoras, pode aumentar o número e/ou a qualidade dos oócitos. Todavia, é importante ressaltar que há estudos sugerindo que o excesso de androgênios em roedores pode induzir atresia em folículos antrais (HILLIER; ROSS, 1979; BILLIG; FURUTA; HSUEH, 1993; FRANKS; HARDY, 2018). Desta forma, a partir de meados de 2016, passamos a oferecer às mulheres potencialmente más respondedoras, a possibilidade de usar a única testosterona transdérmica comercializada no Brasil (Androgel®), na dose de 1 sachê de 25 mg a cada 48 horas, nos 60 dias que antecedem a EOC, sendo uma dose nunca testada previamente e por um período de

exposição maior do que o utilizado em estudo prévios, como estratégia experimental visando melhorar os resultados das TRA. Dados preliminares avaliando todas as pacientes elegíveis recrutadas ao longo de dois anos de estudo, são aqui apresentados.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Primário

Avaliar os efeitos adversos, as concentrações séricas de testosterona (total e livre), SHBG e estradiol e o índice de androgênios livres após a administração transdérmica em gel de uma nova dosagem de testosterona (25mg a cada 48 horas) por 60 dias antes da EOC para injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) em pacientes potencialmente más respondedoras que preenchem os Critérios de Bolonha.

2.2. Objetivos Secundários

Comparar a duração da EOC (em dias), o total de gonadotrofinas utilizadas, o número de oócitos recuperados, oócitos maduros, oócitos fertilizados, embriões formados e de embriões transferidos entre os ciclos Controle (protocolos padrão de EOC) e Testosterona (administração transdérmica em gel de testosterona (25mg a cada 48 horas) por 60 dias, seguida de EOC utilizando o mesmo protocolo da ciclo Controle, em mulheres potencialmente más respondedoras que preenchem os Critérios de Bolonha.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo, aspectos éticos e local de realização do estudo

Foi realizado um estudo caso-controle de julho 2017 a setembro de 2019 no Laboratório de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP) - SP processo CAAE nº 62062216.1.0000.5440.

Foram incluídas no presente estudo todas as pacientes do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP submetidas à Estimulação Ovariana Controlada (EOC) para a realização de injeção intra-citoplasmática de espermatozoide (ICSI), que preencheram os critérios de elegibilidade abaixo descritos e manifestaram o desejo de participar do projeto, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A) (Anexo B).

3.2. Participantes, intervenção utilizada e ciclos estudados (Ciclo Controle e Ciclo Testosterona)

A população de estudo foi composta pelos casais submetidos à EOC para realização de ICSI no HC-FMRP (como protocolo clínico do serviço, a ICSI é realizada como método de fertilização *in vitro* para todos os casais, mesmo na ausência de fator masculino de infertilidade), cuja mulher cumpriu o Critérios de Bolonha para má resposta ovariana (FERRARETTI al., 2011), ou seja, pelo menos dois dos seguintes três critérios deviam estar presentes para considerar uma paciente como potencial má respondedora: I) idade materna avançada (≥ 40 anos) ou qualquer fator de risco para má resposta, como por exemplo, endometrioma, ooforoplastia ou quimioterapia prévia; II) má resposta ovariana prévia (≤ 3 oócitos obtidos após uma estimulação ovariana convencional); III-) teste de reserva ovariana com resultado anormal (contagem de folículos antrais (CFA) $< 5 - 7$ folículos ou Hormônio Antimulleriano (HAM) $< 0,5 - 1,1$ ng/mL).

Os critérios de exclusão adotados foram: perimenopausa em amenorréia ou ciclo irregular; FSH basal > 20 UI/l; anormalidades uterinas; qualquer anormalidade

endócrina atual não tratada; hidrossalpinge unilateral ou bilateral; contra-indicações para o uso de gonadotrofinas; doença grave requerendo tratamento regular; uso de androgênios durante os últimos 3 meses; azoospermia.

As pacientes tiveram seus prontuários avaliados de acordo com os critérios de elegibilidade e as consideradas elegíveis foram contatadas para a realização do convite e da entrevista inicial (Anexo C). Estas pacientes foram convidadas a participar do estudo, após leitura e explicação do TCLE, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP. As pacientes que aceitaram participar, após a assinatura do TCLE, foram incluídas no estudo.

Inicialmente as pacientes com risco de má resposta à EOC realizaram a EOC para ICSI, utilizando um dos dois protocolos clínicos do serviço, iniciada no segundo ou terceiro dia de um ciclo natural, ou seja, não utilizaram contraceptivo oral combinado (COC) para programação do início da estimulação ovariana (Ciclo Controle - CC). Às pacientes que não engravidaram ao participar do CC, foi oferecida a possibilidade de utilização da testosterona transdérmica (Androgel® - 25 mg, 1 sachê a cada 48 horas) associada ao uso de COC (Level®) por 60 dias, previamente ao novo ciclo de EOC para ICSI, utilizando o mesmo protocolo de EOC do CC. (Figura 2) As pacientes foram instruídas a utilizar a testosterona transdérmica nas coxas e na parte inferior do abdômen (VEGUNTA; KLING; KAPOOR, 2019). As pacientes que aceitaram utilizar esta intervenção e realizaram o novo ciclo de EOC realizaram o Ciclo Teste (CT). Dessa maneira, cada paciente foi seu próprio caso-controle.

A escolha pelo Androgel® foi decorrente do fato de ser a única apresentação de testosterona transdérmica comercializada no Brasil e aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mas para o uso por homens hipogonadotróficos. O Androgel® era disponibilizado em duas dosagens (25 e 50 mg), sendo optado pelo uso da menor dosagem, uma vez que concentrações séricas muito elevadas, estudadas em roedores, poderiam promover efeitos deletérios sobre a foliculogênese (HILLIER; ROSS, 1979; BILLIG; FURUTA; HSUEH, 1993; FRANKS; HARDY, 2018). Também com o intuito de não promover elevação excessiva das concentrações séricas de testosterona, optamos pelo uso de 25 mg a cada 48 horas (e não diariamente) associado a COC contendo como progestágeno o levonorgestrel (Level®), uma vez que os COC promovem elevação da SHBG, com consequente redução das concentrações livres dos esteroides sexuais (MORGANTE et al., 2017). A escolha pelo tempo de uso (60 dias previamente à EOC), mais prolongado do que

o utilizado nos estudos que investigaram a eficácia da testosterona transdérmica em más respondedoras (MASSIN et al., 2006; BALASCH et al., 2006; SIPE et al., 2010; FÁBREGUES et al., 2009; KIM; HOWLES; LEE, 2011; KIM et al., 2014; BOSDOU et al., 2016; DOAN et al., 2017; SAHARKHIZ et al., 2018; BERCAIRE et al., 2018), foi pelo fato de estudos em primatas não humanos evidenciarem potencial papel benéfico da testosterona desde o início da foliculogênese (RODRIGUES et. al., 2015).

Figura 2 – Desenho experimental

3.3. Protocolos de EOC, ICSI e transferência embrionária

A EOC no Ciclo Controle (CC) foi iniciada no 2º ou 3º dia do ciclo menstrual natural da paciente. No Ciclo Testosterona, a EOC foi iniciada quatro dias após a interrupção do COC e dois dias após a interrupção da aplicação da testosterona transdérmica. Todas as mulheres foram monitorizadas apenas por Ultrassonografia transvaginal (UStv) a cada dois dias, com início no 6º dia da EOC afim de monitorizar o crescimento dos folículos. As pacientes foram submetidas à EOC utilizando um dos dois protocolos clínicos do serviço:

- Protocolo de “alta dose”: uso diário de alta dose (300 UI) de gonadotrofina menopáusica humana (HMG - Menopur®, Ferring, Brasil) ou alfafolitropina e alfalutropina (Pergoveris®, Merck, Brasil).
- Protocolo de “mínima estimulação”: uso diário de citrato de clomifeno (100 mg) por cinco dias, iniciado quatro dias após a interrupção do COC. Uso de 150 UI de gonadotrofina menopáusica humana (HMG - Menopur®, Ferring, Brasil) em dias alternados (no segundo e quarto dia da EOC) e diariamente a partir do sexto dia da EOC, até um folículo atingir pelo menos 17 mm.

A escolha pelo protocolo de EOC dependeu das condições econômicas dos casais (o custeio das medicações era realizado pelos casais), assim como do número de folículos antrais no dia de início do tratamento, de respostas prévias a EOC (para pacientes submetidas a tratamentos prévios) e da experiência clínica do médico que assistiu a paciente.

O bloqueio hipofisário foi realizado com antagonista do GnRH (Cetrorelix 0,25 mg (Cetrotide®; Merck, Brasil) ou Ganirelix (Orgalutran®; Schering-Plow, Brasil), iniciado quando havia pelo menos um folículo com diâmetro médio maior ou igual a 14 mm e mantido até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Ovidrel®, Serono, Brasil). O desencadeamento da maturação folicular final foi realizado com a injeção subcutânea de uma ampola de hCG recombinante (Ovidrel®, Serono, Brasil) no dia da observação de um folículo ≥ 17 mm, cerca de 35 a 37 horas antes da aspiração folicular.

O cancelamento da EOC foi realizado quando não foram visualizados folículos com diâmetro médio ≥ 10 mm após 10 dias da EOC ou quando nenhum folículo atingiu o diâmetro de 17 mm.

A captação de oócitos foi realizada 35 a 37 horas após o desencadeamento da maturação folicular final com hCG, sob anestesia geral endovenosa, por meio de punção aspirativa dos folículos por via endovaginal guiada por ultrassonografia transvaginal. A aspiração dos folículos foi realizada com pressão aspirativa artificial constante de 100 mmHg, mantida por meio de bomba de sucção com controle eletrônico (*Craft® Suction Pump, Rocket Medical, Inglaterra*). Os folículos foram aspirados em *pool*, ou seja, foi realizada a aspiração do maior número possível de folículos em cada punção, observando-se o esvaziamento completo de cada folículo e puncionando-se o ovário o menor número de vezes possível. Para a identificação e o isolamento dos complexos cumulus-oócito (CCO), o material aspirado foi transferido para placas de Petri com 10 cm de diâmetro, previamente aquecidas em platina térmica a 37°C, não contendo meio de cultivo. Depois de identificados, os CCO foram isolados do fluido folicular (FF) e colocados em placa separada. Os CCO foram então lavados cuidadosamente em meio de cultura Human Tubal Fluid-HEPES (HTF, Irvine Scientific), para a remoção de sangue e debris e incubados por 2 a 5 horas até seu desnudamento e realização de ICSI nos oócitos maduros. A fertilização foi avaliada aproximadamente 16-18 horas após ICSI, caracterizada pela presença de dois pronúcleos e dois corpúsculos polares.

A transferência de embriões foi realizada dois ou três dias após a captação de oócitos (OATWAY; GUNBY; DAYA, 2004), sendo transferidos, no máximo, dois embriões por mulher (LAWLOR; Nelson, 2012). Caso houvesse mais de dois embriões no dia da transferência, os embriões com 4 células no segundo dia ou com 8 células no terceiro dia após a fertilização e com menor fragmentação seriam selecionados para a transferência (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Os embriões excedentes foram criopreservados para possível futura transferência.

3.4. Desfechos avaliados

Desfecho primário: concentrações séricas de testosterona (total e livre), SHBG e estradiol e o índice de androgênios livres após a administração transdérmica

de testosterona em gel por 60 dias antes da EOC em pacientes potencialmente más respondedoras.

Desfechos Secundários: duração da EOC (em dias), total de gonadotrofinas utilizadas, número de oócitos captados, oócitos maduros, oócitos fertilizados, embriões formados e embriões transferidos.

Variáveis de caracterização da população do estudo: para a caracterização clínica das pacientes foram avaliados a idade, índice de massa corporal (IMC), causa da infertilidade, duração da infertilidade e o número de ciclo prévios de EOC.

3.5. Metodologias de avaliação dos desfechos primários

3.5.1. Dosagens hormonais séricas:

A coleta de sangue e as dosagens hormonais foram realizados antes do início da primeira EOC (Dosagem 1 – D1), no dia da primeira captação oocitária (Dosagem 2 – D2), no dia do início da utilização de testosterona transdérmica (Dosagem 3 – D3), 60 dias após utilização de testosterona transdérmica + COC (Dosagem 4 – D4) e no dia da segunda captação oocitária (Dosagem 5 – D5).

Aproximadamente, 10 mL de sangue venoso foram colhidos em tubo a vácuo contendo ativador de coágulo. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos. Após a centrifugação do sangue, o soro foi armazenado em criotubo, identificado com o número de registro da paciente e armazenado em freezer -80°C no biorrepositório denominado “Amostras do projeto observacional má resposta e testosterona”, até a realização das dosagens.

Todas as dosagens hormonais séricas foram realizadas no Laboratório Fleury de São Paulo. O estradiol foi avaliado pelo método de Imunoensaio competitivo por Eletroquimioluminescência utilizando o equipamento Cobas® 6000 E601 (Roche Diagnostics) com coeficiente de variação (CV) de 5,0% e sensibilidade de 0,5 ng/mL. A dosagem de SHBG foi realizada pelo método de Eletroquimioluminométrico, utilizando o mesmo equipamento da dosagem de estradiol, com CV de 5,0% e sensibilidade de 0,8 nmol/L. A dosagem de testosterona total foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta performance acoplado à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), utilizando o equipamento LC/MS-MS Thermo Scientific TSQ Altis, o qual é considerado o padrão ouro para dosagem de testosterona em mulheres e crianças. A sensibilidade do método de dosagem da testosterona total é de 9 ng/dL,

erro intraensaio de 2,2 a 3,7% e erro interensaio de 2,0 a 4,2%, ambos dependendo da concentração dosada. Para a obtenção da testosterona total em nmol/L foi multiplicado o valor obtido em ng/dL pelo fator de conversão 0,0347. Para obtenção do estradiol na unidade de pg/mL foi multiplicado o valor obtido em ng/dL por 10.

O Índice de Androgênio livre foi calculadoa por meio da fórmula: $IAL = TT \text{ (nmol/L)} / SHBG \text{ (nmol/L)} \times 100$ (Onde: TT refere-se à Testosterona total sérica e SHBG à globulina carreadora dos hormônios sexuais) (VERMEULEN et al., 1999). Para cálculo da testosterona livre, multiplicamos os valores de testosterona total pelo respectivo IAL dividido por 100.

3.6. Vieses

Para evitar as potenciais fontes de vieses, todas as pacientes elegíveis durante o período do estudo foram convidadas a participar do estudo. Todas as amostras coletadas foram processadas e dosadas por técnico sem acesso às informações clínicas das pacientes. A estatística que analisou os dados também não teve acesso a informações clínicas e a que grupo as amostras pertenciam.

3.7. Tamanho do estudo

O tamanho amostral foi representado pelo total de pacientes elegíveis que aceitaram participar do estudo, realizaram os dois ciclos (CC e CT) e tiveram as cinco amostras de sangue coletadas de julho 2017 a setembro de 2019.

3.8. Análises estatísticas

As variáveis (idade, IMC, duração da infertilidade e número de ciclos prévios), foram representadas pela mediana e intervalo interquartil e apresentadas de modo descritivo.

Uma análise exploratória de dados foi realizada por meio de medidas de posição central e de dispersão. O teste t pareado foi usado para comparar as variáveis duração da EOC, total de gonadotrofinas utilizadas e números de oócitos captados, oócitos maduros, oócitos fertilizados, embriões formados e embriões transferidos entre os Ciclos Controle e Testosterona.

A comparação entre os períodos de coleta e os ciclos, para cada variável, foi realizada considerando os contrastes ortogonais usando o modelo de regressão linear de efeitos mistos, ou seja, utilizando duas fontes de variabilidade, entre indivíduos dentro do mesmo período de dosagem (Ciclo Controle e Ciclo Testosterona) e dentro dos mesmos indivíduos em períodos de dosagens diferentes (D1, D2, D3, D4 e D5). As comparações estatísticas foram feitas entre D1 e D2, D1 e D3, D1 e D4, D2 e D5, D3 e D4, D3 e D5 e D4 e D5. Esses modelos foram implementados no programa SAS versão 9.4. A precisão das estimativas foi avaliada através da análise do IC de 95% e valores de p. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Fluxograma do estudo

No período de julho de 2017 a setembro de 2019, um total de 416 prontuários de mulheres admitidas por infertilidade conjugal no serviço de Reprodução Assistida do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da FMRP – USP foram analisados. Desses 416 prontuários, 363 mulheres não foram elegíveis por não cumprirem o Critério de Bolonha para má resposta ovariana.

Das 53 pacientes com risco de má resposta, 32 não foram incluídas: 11 por apresentarem hidrossalpinge, 4 por não terem condições financeiras para arcarem com um novo tratamento, 3 por não terem interesse em participar da pesquisa, 3 por uso de androgênios nos últimos 3 meses, 3 por azoospermia, 2 por anormalidade endócrina não tratada, 2 por apresentarem ciclo menstrual irregular, 1 por anormalidade uterina, 1 por doença grave requerendo tratamento regular, 1 por estar utilizando ACO previamente à EOC e 1 por gravidez antes do recrutamento para a pesquisa. Assim, as 21 elegíveis para constituir o estudo foram entrevistadas (Anexo A) e assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo B) (Anexo C) e, portanto, fizeram parte do Ciclo Controle. Das 21 pacientes que participaram do Ciclo Controle, 12 delas não chegaram a realizar o Ciclo Testosterona: 8 por não terem condições financeiras para novo tratamento, 2 desistiram do tratamento por TRA, 1 engravidou ao participar do Ciclo Controle e 1 engravidou após a ICSI ser convertida em Inseminação Intrauterina (IIU). Das 9 pacientes que participaram do Ciclo Controle, assim como do Ciclo Testosterona, 3 delas não foram submetidas à captação oocitária em algum dos ciclos estudados (1 por apresentar ausência de resposta folicular tanto no Ciclo Controle quanto no Ciclo Testosterona, 1 por apresentar ausência de resposta folicular no Ciclo Testosterona e 1 por ter desistido do Ciclo Testosterona depois de utilizar a testosterona transdérmica, porém antes do início da EOC). Dessa forma, 6 pacientes realizaram ambos os ciclos e coletaram amostras de sangue para dosagens hormonais em cinco momentos (D1: antes do início da primeira EOC; D2: no dia da captação oocitária; D3: no dia do início da utilização de testosterona transdérmica; D4: 60 dias após utilizar a testosterona transdérmica + COC; D5: no dia da segunda captação oocitária), sendo analisadas no presente estudo (Figura 3).

Figura 3: Fluxograma representativo do recrutamento de pacientes para coleta de sangue no período de julho/2017 a setembro/2019.

Nota: ICSI: Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide, IIU: Inseminação Intrauterina, TRA: Tratamento de Reprodução Assistida; COC: Contraceptivo Oral Combinado; EOC: Estimulação Ovariana Controlada.

4.2. Caracterização das pacientes incluídas no estudo

As seis pacientes que finalizaram os Ciclos Controle e Testosterona tiveram as variáveis clínicas (idade, IMC, tempo de infertilidade e número de ciclos prévios) analisadas descritivamente por meio da mediana e intervalo interquartil (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados descritivos das pacientes nos Ciclo Controle e Testosterona.

<i>Variável</i>	<i>Ciclo Controle Mediana (IIQ)</i>	<i>Ciclo Testosterona Mediana (IIQ)</i>
Idade (anos)	37.5 (36 - 39)	37.5 (37 - 39)
IMC (kg/m ²)	21.96 (20.93 - 25,39)	21.96 (20.93 – 25.39)
Duração Infertilidade (meses)	90 (60 – 104)	95 (64 – 108)
Nº de ciclos prévios	2 (2 – 2)	3 (3 – 3)

Nota: IIQ: intervalo interquartil (25 – 75)

4.3. Efeitos adversos relatados durante o uso da testosterona transdérmica em gel

Ao utilizarem a testosterona transdérmica em gel foi relatada a presença de sangramento vaginal irregular (6/6 pacientes; 100%), sensibilidade mamária (2/6 pacientes; 33,3 %) e pele oleosa e acne (1/6 pacientes; 16,6%). Todavia os efeitos adversos foram leves e não interferiram com o uso regular da medicação.

4.4. Análise das dosagens hormonais realizadas em diferentes momentos do estudo

A comparação entre as concentrações séricas de SHBG, testosterona total, testosterona livre e estradiol realizadas antes do início da primeira EOC (D1), no dia

da recuperação dos oócitos da primeira EOC (D2), no dia do início da testosterona (D3), 60 dias após o uso de testosterona + COC (D4) e no dia da segunda recuperação de oócitos (D5) foram analisadas e estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações séricas de SHBG, testosterona total, testosterona livre, estradiol e índice de androgênio livre em diferentes momentos do tratamento.

	D1	D2	D3	D4	D5
Dosagem Hormonal	Mediana (IIQ)	Mediana (IIQ)	Mediana (IIQ)	Mediana (IIQ)	Mediana (IIQ)
SHBG (nmol/L)	116 (81 – 127) ^a	148 (96 – 168)	114 (100 – 162)	140,5 (121 – 179) ^a	120.5 (105 – 131)
Testosterona Total (ng/dL)	19 (13 – 24) ^a	34 (32 – 52)	20 (15 – 23) ^b	36 (28 – 99) ^{a,b}	31.5 (21 – 44)
Testosterona Livre (ng/dL)	0.11 (0.06 – 0.18) ^a	0.36 (0.25 – 0.66)	0.12 (0.06 – 0.18) ^b	0.38 (0.19 – 1.65) ^{a,b}	0.35 (0.15 – 0.55)
Índice Androgênio livre (%)	0,62 (0.51 – 0.77) ^a	1,07 (0.8 – 1.28)	0.62 (0.42 – 0.8) ^b	1.07 (0.68 – 1.67) ^{a,b}	1.13 (0.73 – 1.26)
Estradiol (pg/mL)	49 (35 – 59) ^a	345 (202 – 351) ^a	52 (50 – 73) ^b	12.5 (8 – 23) ^c	209 (91 – 254) ^{b,c}

Nota: %:percentagem; IIQ: interval interquartil. D1 (antes do início da primeira EOC); D2 (no dia da captação oocitária da primeira EOC); D3 (no dia do início da testosterona transdérmica; D4 (60 dias após uso testosterona transdérmica + COC); D5 (no dia da segunda captação oocitária. As análises estatísticas foram feitas entre D1 e D2, D1 e D3, D1 e D4, D2 e D5, D3 e D4, D3 e D5 e D4 e D5. Letras iguais na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Ao compararmos as concentrações séricas de SHBG, observamos concentrações significativamente menores em D1 do que em D4 ($p = 0,028$).

Quanto as concentrações séricas de testosterona total e testosterona livre, observamos concentrações significativamente maiores em D4 do que em D1 (respectivamente, $p = 0,009$ e $p = 0,041$) e em D3 (respectivamente, $p = 0,010$ e $p = 0,031$). O índice de androgênios livres também foi significativamente maior em D4 do que em D1 ($p = 0,041$) e em D3 ($p = 0,031$).

Ao analisarmos as concentrações de estradiol, observamos concentrações séricas significativamente menores em D1 do que em D2 ($p < 0,001$) e significativamente maiores em D5 do que em D3 ($p = 0,001$) e D4 ($p = 0,002$).

4.5. Resposta à EOC e resultados da ICSI dos Ciclos controle e testosterona

Os resultados da resposta à EOC e ICSI foram comparados entre os Ciclos Controle e Testosterona, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre o total de gonadotrofinas utilizadas no Ciclo Controle e no Ciclo Testosterona ($p = 0,1063$), a duração da EOC no Ciclo Controle e no Ciclo Testosterona ($p = 0,099$), o número de oócitos recuperados no Ciclo Controle e no Ciclo Testosterona ($p = 0,4186$), o número de oócitos maduros no Ciclo Controle e no Ciclo Testosterona ($p = 0,4186$), o número de oócitos fertilizados no Ciclo Controle e no Ciclo Testosterona ($p = 0,1852$) e o número de embriões formados no Ciclo Controle e no Ciclo Testosterona ($p = 0,1747$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Resposta à EOC e resultados de ICSI de pacientes com risco de má resposta nos Ciclos Controle e Testosterona.

Variável	Ciclo Controle Mediana (IIQ)	Ciclo Testosteron Mediana (IIQ)	p-valor
Total de gonadotrofinas (UI)	750 (450 – 1800)	1275 (975 - 2250)	0.1063
Duração da EOC (dias)	6.5 (6 – 7)	10 (8 – 12)	0.099
Nº oócitos captados	0 (0 – 1)	1.5 (0 – 3)	0.4186
Nº oócitos maduros	0 (0 – 1)	1.5 (0 – 3)	0.4186
Nº fertilizados	0 (0 – 0)	0.5 (0 – 2)	0.1852
Nº embriões formados	0 (0 – 0)	0.5 (0 – 2)	0.1747
Nº embriões transferidos	0 (0 – 0)	0 (0 – 2)	-

Nota: IIQ: intervalo interquartil (25 – 75)

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A suplementação de testosterona transdérmica em gel é considerada uma terapia adjuvante simples, financeiramente acessível, de fácil aplicação, entretanto há preocupações a respeito da sua segurança (ACHILLI et al., 2017; ISLAM et al., 2019).

Evidenciamos que a utilização de testosterona transdérmica na dose de 25mg a cada 48h, maior do que as doses utilizadas em outros estudos em pacientes potencialmente más respondedoras (MASSIN et al., 2006; BALASCH et al., 2006; SIPE et al., 2010; FABREGUES et al., 2009; KIM; HOWLES; LEE, 2011; KIM et al., 2014; BOSDOU et al., 2016; DOAN et al., 2017) e durante um período de utilização maior do que já descrito na literatura (tempo máximo de 4 semanas, utilizado no estudo de KIM et al., 2014), ocasionou efeitos adversos leves, principalmente representados por sangramento vaginal irregular, sensibilidade mamária e pele oleosa e acne. Os nossos resultados foram previamente descritos em outros estudos, um deles utilizou a testosterona transdérmica adesiva na dose de 150µg/dia e 300µg/dia em mulheres na pós-menopausa com baixa libido por 52 semanas (DAVIS et al., 2008) e reportou sangramento vaginal irregular e pele oleosa e acne como alguns dos efeitos adversos descritos pelas pacientes, outro estudo utilizou a similarmente a testosterona transdérmica adesiva na dose de 300 µg/dia por 6 meses em mulheres naturalmente na menopausa com baixa libido e relatou efeitos adversos como sangramento vaginal irregular, pele oleosa e acne e sensibilidade mamária (PANAY et al., 2010). Nossos achados foram distintos dos evidenciados por Kim et al., (2014), o qual utilizou a testosterona transdérmica em gel na dose de 12,5mg diariamente, em mulheres potencialmente más respondedoras por 2, 3 ou 4 semanas previamente a EOC, não sendo relatado nenhum efeito adverso pelas usuárias. É possível que o uso de uma dose maior de testosterona transdérmica no nosso estudo, por um maior tempo, seja o responsável pelos efeitos adversos descritos. Todavia, nenhuma paciente do nosso estudo descontinuou o tratamento, mostrando uma tolerabilidade aceitável referente a dose e tempo de administração da testosterona em gel.

Nas condições basais de ambos os ciclos (ciclo controle – D1 e ciclo testosterona – D3) não observamos diferença estatisticamente significativa entre as concentrações séricas de SHBG, testosterona total, testosterona livre e estradiol,

evidenciando ausência de efeito da primeira EOC nestas variáveis em D3. Além disso, salienta-se que as concentrações séricas de SHBG e dos hormônios analisados encontram-se dentro dos parâmetros de normalidade para faixa etária de mulheres de 20 a 49 anos (Reference Interval Study for children and randomly selected adults – ROCHE, 2015)

Ao analisarmos o Ciclo Controle das pacientes potencialmente más respondedoras, observamos concentrações séricas de estradiol significativamente maiores após a EOC (D2) do que antes da EOC (D1). A estimulação ovariana controlada utilizando gonadotrofinas tem como objetivo o crescimento folicular múltiplo (ATA et al., 2015), estimulando a expressão da aromatase nas células da granulosa, com consequente elevação dos níveis de estradiol (CHENG et al., 2002). Uma vez que as pacientes más respondedoras possuem poucos folículos capazes de serem recrutados por meio da EOC, um aumento de cerca de 7 vezes da concentração de estradiol entre o dia de início da EOC e o dia da captação dos oócitos, observado no nosso estudo, condiz com a baixa reserva ovariana e o pequeno número de oócitos recuperados destas pacientes (BAHCECI et al., 2007). As concentrações séricas de testosterona total, testosterona livre e SHBG aumentaram, mas não significativamente, após a EOC, o que pode ser decorrente da pequena casuística avaliada no presente estudo, resultando em um baixo poder de teste para estas comparações. Alguns estudos demonstram que a concentração sérica de testosterona possui uma correlação positiva com o pico de estradiol após a EOC e também após a administração do hCG (FRATTARELLI; GERBER, 2006; QIN et al., 2011). Por sua vez, a concentração de SHBG também tende a aumentar em decorrência ao aumento do estradiol secundário à EOC, a qual se liga aos hormônios esteroides como estradiol e testosterona deixando apenas uma fração dos mesmos biodisponíveis (RIVERA-WOLL et al., 2004). Observamos concentrações significativamente maiores de testosterona total após o uso da testosterona transdérmica associada ao COC (D4), quando comparadas às suas concentrações basais antes da primeira EOC (D1) e antes da sua administração no Ciclo Teste (D3). Como utilizamos uma dose de testosterona transdérmica maior do que a previamente utilizada e por um maior tempo de uso, com o intuito de promover um aumento não muito expressivo das concentrações séricas do hormônio biologicamente ativo (não ligado a SHBG), o que poderia cursar com efeito deletério sobre o recrutamento folicular (HILLIER; ROSS, 1979; BILLIG; FURUTA; HSUEH, 1993; FRANKS; HARDY, 2018), optamos por

associar a ela o COC, que, ao promover elevação da SHBG (KRIPLANI et al., 2010), controlaria a elevação dos níveis de androgênios livres. Como esperado, observamos maiores concentrações séricas de SHBG após a utilização da testosterona transdérmica associada ao COC do que as suas concentrações basais (D1). Um achado interessante foi uma redução não significativa das concentrações séricas de estradiol após a administração da testosterona transdérmica associada ao COC, o que pode ser decorrente da elevação das concentrações séricas de SHBG. A estratégia utilizada aparentemente foi efetiva em promover elevação das concentrações séricas de testosterona livre, que foram significativamente maiores em D4 do que as em D1 e D3. Nossos achados corroboram com os de MASSIN et al., 2006, SIPE et al., 2009 e BOSDOU et al., 2016, que utilizaram a testosterona transdérmica em mulheres potencialmente más respondedoras com dose e duração, respectivamente de 10mg/dia por 15 dias, 2,5mg/dia por 12 dias e 10mg/dia por 21 dias. No Ciclo Testosterona, similarmente ao observado no Ciclo Controle, evidenciou-se maiores concentrações séricas de estradiol após a EOC (D5) do que antes do uso da testosterona associada ao COC (D3) e após o uso (D4). Este achado era esperado, uma vez que o uso das gonadotrofinas exógenas impede o feedback negativo pelo aumento das concentrações endógenas de estradiol (GARNETT et al., 2019) produzido pelos folículos em crescimento. Estes achados corroboram os de Guo et al. 2014 que ao comparar as dosagens de estradiol antes da EOC e depois da EOC de pacientes normorespondedoras e pacientes más respondedoras, segundo os Critérios de Bolonha, observou que ambos os grupos, após o uso de gonadotrofinas, apresentam concentrações de estradiol significativamente maiores quando comparadas com as concentrações basais antes da EOC.

A interpretação dos desfechos secundários nos ciclos controle e testosterona fica bastante limitada, principalmente, pela pequena casuística analisada e pelo fato das pacientes terem utilizado dois protocolos diferentes de EOC ao longo do estudo (quatro delas utilizaram o protocolo de mínima estimulação com citrato de clomifeno e dose baixa de menopina e duas delas o protocolo com dose máxima de menopina), não sendo possível analisar separadamente as usuárias dos dois protocolos. Não se evidenciou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos desfechos secundários analisados (dose total de gonadotrofinas, duração da EOC, número de oócitos captados, oócitos maduros e oócitos fertilizados, número de embriões formados e de embriões transferidos) nos Ciclos Controle e

Testosterona, corroborando os achados de MASSIN et al. (2006), SIPE et al. (2010) e BOSDOU et al. (2016). Todavia, nossos achados sugerem necessidade de uma maior dose total de gonadotrofinas e maior duração da EOC após a administração da testosterona transdérmica, na dose de 25 mg a cada 48 horas por 60 dias, do que no Ciclo Controle. Apesar dos nossos achados evidenciarem a possível necessidade de uma maior dose total de gonadotrofinas e maior duração da EOC pelas pacientes no Ciclo Testosterona, estes não apresentam diferença estatística. Estes achados diferem de alguns estudos, os quais demonstraram que com o uso da testosterona transdérmica é necessário menor dose total de gonadotrofinas e menor duração da EOC (BALASCH et al., 2006; FABREGUES et al., 2009; KIM; HOWLES; LEE, 2011 e KIM et al., 2014). Observamos também um aumento não estatisticamente significativo no número de oócitos captados, oócitos maduros e oócitos fertilizados, assim como no número de embriões formados após a administração da testosterona transdérmica. Estes dados corroboram com os de KIM; HOWLES; LEE, 2011; KIM et al. 2014; DOAN et al., 2017; SAHARKHIZ et al. 2018 e BERCAIRE et al. 2018, os quais evidenciaram um aumento significativo e expressivo dessas variáveis quando comparado às pacientes más respondedoras que não utilizaram a testosterona transdérmica. Apesar desse aumento não ser estatisticamente significativo, o aumento de um oócito na captação de pacientes potencialmente más respondedoras já está associado a uma melhora na chance de gestação da paciente (SFAKIANOUDIS et al., 2019). No nosso estudo, a medida de tamanho de efeito de Cohen (COHEN et al., 1988) para o número de oócitos captados foi de 0,6. Considerando essa medida de tamanho de efeito e assumindo um poder de teste de 80%, necessitaríamos de 24 pacientes analisadas no estudo, para evidenciarmos diferença estatisticamente significativa do uso da testosterona no número de oócitos captados. Portanto, apesar de no presente estudo não ser possível demonstrar nenhum efeito benéfico significativo da suplementação da dose utilizada de testosterona transdérmica em gel nos 60 dias prévios a EOC, em pacientes potencialmente más respondedoras, nos resultados das TRA, o baixo poder de teste (0,56) relacionado a pequena casuística analisada não nos possibilita afirmar não haver diferença. Assim, estudos com maiores casuísticas seriam necessários para avaliar melhor estes desfechos.

Como previamente citado, uma importante limitação do nosso estudo foi o pequeno tamanho amostral analisado, justificado pelos restritivos critérios de

elegibilidade e pelas limitações financeiras apresentadas pelas pacientes para custeio das gonadotrofinas. Apesar de incluirmos apenas pacientes encaminhadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), no nosso serviço as pacientes custeiam as medicações utilizadas para a EOC, de modo que os protocolos de EOC dependem também dos recursos disponíveis pelas pacientes. Isto também justificou o uso de dois diferentes protocolos de EOC no presente estudo, outra limitação já citada. Uma outra limitação importante do nosso estudo foi o desenho observacional (estudo caso-controle), sendo que os ensaios clínicos randomizados e controlados (RCT) são o delineamento mais adequado para se testar novas intervenções terapêuticas. Uma forma de tentar minimizar a limitação relacionada ao delineamento observacional, foi considerar cada paciente controle e caso dela mesma. Todavia, às vezes a paciente realizava o Ciclo Controle, porém não tinha condições financeiras de realizar o Ciclo Testosterona, reduzindo assim ainda mais o n amostral. Inicialmente propusemos a realização de um RCT, testando a intervenção aqui analisada. Todavia, não conseguimos recursos financeiros para custear, além da intervenção, as medicações utilizadas para a EOC, de modo que o estudo não foi aprovado no CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) para ser desenvolvido como um RCT.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A testosterona transdérmica em gel, na dose de 25mg em dias alternados, por um período de 60 dias, associada ao COC, antes da EOC em pacientes potencialmente más respondedoras se mostrou bem tolerada, promovendo efeitos adversos leves, principalmente representados por sangramento vaginal irregular, relatado por todas as pacientes incluídas no estudo.

Apesar da administração da testosterona em gel por 60 dias ser associada ao uso de COC, promovendo aumento da SHBG, observamos concentrações significativamente maiores de testosterona total e livre séricas após a sua administração (D4) do que as observadas em condições basais antes da primeira (D1) e da segunda (D3) EOC. O índice de androgênios livres também foi significativamente maior em D4 do que em D1 e em D3. Como esperado, as concentrações séricas de estradiol foram significativamente maiores após a EOC, tanto sem como após o uso da testosterona transdérmica.

Em nosso estudo não foi possível evidenciar benefício da administração da testosterona em gel, na dose de 25 mg em dias alternados por 60 dias, associada ao uso de COC, previamente a EOC em pacientes potencialmente más respondedoras nos resultados das TRA. Todavia, a casuística e o poder de teste são insuficientes para comprovar estes achados. Estudos clínicos randomizados e controlados, bem delineados, são necessários para comprovar nossos achados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPHA SCIENTISTS IN REPRODUCTIVE MEDICINE AND ESHRE SPECIAL INTEREST GROUP OF EMBRYOLOGY. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. **Hum Reprod**, v.26, n.6, p.1270-1283, Jun 2011.

ARSLAN, M.; BOCCA, S.; MIRKIN, S.; BARROSO, G.; STADTMAUER, L.; OEHNINGER, S. Controlled ovarian hyperstimulation protocols for in vitro fertilization: two decades of experience after the birth of Elizabeth Carr. **Fertil Steril**, v.84, n.3, p.555-569, Set 2005.

ASSOU, S.T.; ANAHORY, V.; PANTESCO, T.; CARROUL, F.; PELLESTOR, B.; KLEIN, L.; REYFTMANN, H.; DECHANUD, L.; DE VOS, J.; HAMAMAH, S. The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. **Hum Reprod**, v.21, n.7, p.1705-1719, Jul 2006.

ATA, B.; SELI, E. Strategies for controlled ovarian stimulation in the setting of ovarian aging. **Seminars in reproductive medicine**, v.33, n.6, p.436-448, Nov 2015.

BAKER, V.L.; BROWN, M.B.; LUKE, B.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J. Gonadotropin dose is negatively correlated with live birth rate: analysis of more than 650,000 assisted reproductive technology cycles. **Fertil Steril**, v.104, n.5, p.1145-1152, Nov 2015.

BAKER, V.L.; GRACIA C.; GLASSNER M.J.; SCHNELL V.L.; DOODY K.; CODDINGTON C.C.; SHIN S.S.; MARSHALL L.A.; ALPER M.M.; MORALES A.J.; PAVONE M.E.; BEHERA M.A.; ZBELLA E.A.; SHAPIRO B.S.; STRASESKI J.A.; BROYLES D.L. Multicenter evaluation of the Access AMH antimüllerian hormone assay for the prediction of antral follicle count and poor ovarian response to controlled ovarian stimulation. **Fertil Steril**, v.110, n.3, p.506-513, Ago 2018.

BALASCH, J.; FÁBREGUES, F.; PEÑARRUBIA, J.; CARMONA, F.; CASAMITJANA, R.; CREUS, M.; MANAU, D.; CASALS, G.; VANRELL, J.A. Pretreatment with transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in poor-responder IVF patients with normal basal concentrations of FSH. **Hum Reprod**, v.21, n.7, p.1884-1893, Jul 2006.

BARBIERI, R.L.; SLUSS, P.M.; POWERS, R.D.; MCSHANE, P.M.; VITONIS, A.; GINSBURG, E.; CRAMER, D.C. Association of body mass index, age, and cigarette smoking with serum testosterone levels in cycling women undergoing in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v.83, n.2, p.302-308, Fev 2005.

BERCAIRE, L.; NOGUEIRA, S.M.; LIMA, P.C.; ALVES, V.R.; DONADIO, N.; DZIK, A.; CAVAGNA, M. ANDRO-IVF: a novel protocol for poor responders to IVF controlled ovarian stimulation. **JBRA Assist Reprod**, v.22, n.1, p.52-55, Mar 2018.

BERG, S. AMA backs global health experts in calling infertility a disease. **AMA Wire**, 2017. Disponível em: <<https://wire.ama-assn.org/ama-news/ama-backs-global-health-experts-calling-infertility-disease>> 2017. Acesso em: 16 Jan 2020.

BERKKANOGLU, M.; OZGUR, K. What is the optimum maximal gonadotropin dosage used in microdose flare-up cycles in poor responders? **Fertil Steril**, v.94, n.2, p.662–665, Jul 2010.

BILLIG, H.; FURUTA, I.; HSUEH, A.J. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. **Endocrinology**, v.133, n.5, p.2204-2212, Nov 1993.

BOSDOU, J.K.; VENETIS, C.A.; DAFOPOULOS, K.; ZEPIRIDIS, L.; CHATZIMELETIOU, K.; ANIFANDIS, G.; MITSOLI, A.; MAKEDOS, A.; MESSINIS, I.E.; TARLATZIS, B.C.; KOLIBIANAKIS, E.M. Transdermal testosterone pretreatment in poor responders undergoing ICSI: a randomized clinical trial. **Hum Reprod**, v.31, n.5, p.977-985, Mai 2016.

BROEKMANS, F.J.; KWEE, J.; HENDRIKS, D.J.; MOL, B.W.; LAMBALK, C.B. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. **Hum Reprod Update**, v.12, n.6, p.685-718, Nov-Dez 2006.

BURGER, H.G. Androgen production in women. **Fertil Steril**, v.77, n.4, Suppl 4 S3–5, Abr 2002.

CASSON, P.R.; LINDSAY, M.S.; PISARSKA, M.D.; CARSON, S.A.; BUSTER, J.E.; Dehydroepiandrosterone supplementation augments ovarian stimulation in poor responders: a case series. **Hum Reprod**, v.15, n.10, p.2129-2132, Out 2000.

CHAKRAVARTY, B. N. H. H.; SHIRAZEE, P.; DAM, S. K.; GOSWAMI, R.; CHATTERJEE and S. GHOSH. Oral dydrogesterone versus intravaginal micronised progesterone as luteal phase support in assisted reproductive technology (ART) cycles: results of a randomised study. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.97, n.5, p.416-420, Dez 2005.

COHEN, J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences New York, NW, Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale. 1988. Disponível em: <<http://www.utstat.toronto.edu/~brunner/oldclass/378f16/readings/CohenPower.pdf>>. Acesso em: 16 Jan 2020.

ACHILLI, C.; PUNDIR, J.; RAMANATHAN, P.; SABATINI, L.; HAMODA, H.; PANAY, N.; Efficacy and safety of transdermal testosterone in postmenopausal women with hypoactive sexual desire disorder: a systematic review and meta-analysis. **Fertil Steril**, v.107, n.2, p.475-482, Feb 2017.

STOCCO, C. Aromatase Expression in the Ovary: Hormonal and Molecular Regulation. **Steroids**, v.73, n.5, p.473-487, Mai 2008.

CHENG, G.; WEIHUA, Z.; MAKINEN, S.; MAKELA, S.; SAJI, S.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A.; HOVATTA, O. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. **Biol Reprod**, v.66, n.1, p.77-84, Jan 2002.

DAVISON, S. L.; DAVIS, S. R. Androgens in women. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.85, n.2-5, p.363-366, Jun 2003.

DAVIS, S.R.; MOREAU, M.; KROLL, R.; BOUCHARD, C.; PANAY, N.; GASS, M.; BRAUNSTEIN, G.D.; HIRSCHBERG, A.L.; RODENBERG, C.; PACK, S.; KOCH, H.; MOUFAREGE, A.; STUDD, J.; APHRODITE Study Team. Testosterone for low libido in postmenopausal women not taking estrogen. **N Engl J Med**, v.359, n.19, p.2005-2017, Nov 2008.

DE PLACIDO, G.; ALVIGGI, C.; PERINO, A.; STRINA, I.; LISI, F.; FASOLINO, A.; DE PALO, R.; RANIERI, A.; COLACURCI, N.; MOLLO, A. Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (rFSH) step-up protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women with initial inadequate ovarian response to rFSH. A multicentre, prospective, randomized controlled trial. **Hum Reprod**, v.20, n.2, p.390-396, Feb 2005.

DOAN, H.T.; QUAN, L.H.; NGUYEN, T.T. The effectiveness of transdermal testosterone gel 1% (androgel) for poor responders undergoing in vitro fertilization. **Gynecol Endocrinol**, v.33, n.12, p.977-979, Dez 2017.

EIMERS, J. M.; TE VELDE, E. R.; GERRITSE, R.; VOGELZANG, E.T.; LOOMAN, C. W.; HABBEMA, J. D. The prediction of the chance to conceive in subfertile couples. **Fertil Steril**, v.61, n.1, p.44-52, Jan 1994.

ELGINDY, E.A.; EL-HAIEG, D.O.; EL-SEBAEY, A. Anti-Mullerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. **Fertil Steril**, v.89, n.6, p.1670-1676, Jun 2008.

FERRARETTI, A.P.A.; LA MARCA, B.C.; FAUSER, B.; TARLATZIS, G.; NARGUND, L.; GIANAROLI, L.; ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. **Hum Reprod**, v.26, n.7, p.1616-1624, Jul 2011.

FERRARIO, M.; SECOMANDI, R.; CAPPATO, M.; GALBIGNANI E.; FRIGERIO, L.; ARNOLDI, M.; FUSI, F.M. Ovarian and adrenal androgens may be useful markers to predict oocyte competence and embryo development in older women. **Gynecol Endocrinol**, v.31, n.2, p.125-130, Feb 2015.

FRAGOULI, E.; ALFARAWATI, S.; SPATH, K.; JAROUDI, S.; SARASA, J.; ENCISO, M.; WELLS, D. The origin and impact of embryonic aneuploidy. **Hum Genet**, v.132, n.9, p.1001–1013, Set 2013.

FRANKS, S.; HARDY, K. Androgen Action in the Ovary. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 9:452: 30147675, Ago 2018.

FRATTARELLI, J.L.; PETERSON, E.H. Effect of androgen levels on in vitro fertilization cycles. **Fertil Steril**, v.81, n.6, p.1713-1714, Jun 2004.

FRATTARELLI, J. L.; GERBER, M.D. Basal and cycle androgen levels correlate with *in vitro* fertilisation stimulation parameters but do not predict pregnancy outcome. **Fertil Steril**, v.86, n.1, p.51–57, Jul 2006.

FURGER, C.L.; CRONIER, C.; POIROT, C.; POUCHELET, M. Human granulosa cells in culture exhibit functional cyclic AMP-regulated gap junctions. **Mol Hum Reprod**, v.2, n.8, p.541-548, Ago 1996.

FÁBREGUES, F.; PEÑARRUBIA, J.; CREUS, M.; MANAU, D.; CASALS, G.; CARMONA, F.; BALASCH, J. Transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in low-responder IVF patients: a randomized, clinical trial. **Hum Reprod**, v.24, n.2, p.349-359, Feb 2009.

GANESH, A.N.; CHAKRAVORTY, R.; MUKHERJEE, S.; GOSWAMI, K.; CHAUDHURY, B.; CHAKRAVARTY. Comparison of oral dydrogesterone with progesterone gel and micronized progesterone for luteal support in 1,373 women undergoing in vitro fertilization: a randomized clinical study. **Fertil Steril**, v.95, n.6, p.1961-1965, Mai 2011.

GARNETT, E.; BRUNO-GASTON, J.; CAO, J.; ZARUTSKIE, P.; DEVARAJ, S. The importance of estradiol measurement in patients undergoing in vitro fertilization. **Clin Chim Acta**, pii: S0009-8981(19)32052-2, Nov 2019.

GHAYEE, H.K.; AUCHUS, R.J. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. **Rev Endocr Metab Disord**, v.8, n.4, p.289–300, Dez 2007.

GONZÁLEZ-COMADRAN, M.M.; DURAN, I.; SOLÀ, F.; FÁBREGUES, CARRERAS, R.; CHECA, M.A. Effects of transdermal testosterone in poor responders undergoing IVF: systematic review and meta-analysis. **Reprod Biomed Online**, v.25, n.5, p.450-459, Nov 2012.

GUO, J.; ZHANG, Q.; LI, Y.; HUANG, J.; WANG, W.; HUANG, L.; ZHAO, X.; YANG, D. Predictive value of androgens and multivariate model for poor ovarian response. **Reprod Biomed Online**, v.28, n.6, p.723-732, Jun 2014.

GRONDAHL, M.L.; ANDERSEN, C.Y.; BOGSTAD, J.; NIELSEN, F.C.; MEINERTZ, H.; BORUP, R. Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. **Hum Reprod**, v.25, n.4, p.957–968, Abr 2010.

GROOME, N.P.; ILLINGWORTH, P.J.; O'BRIEN, M.; PAI, R.; RODGER, F.E.; MATHER, J.P.; MCNEILLY, A.S. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. **Clin Endocrinol Metab**, v.81, n.4, p.1401-1405, Apr 1996.

HILLIER, S.G.; ROSS, G.T. Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats. **Biol Reprod**, v.20, n.2, p.261-268, Mar 1979.

HILLIER, S.G.; DE ZWART, F.A. Evidence that granulosa cell aromatase induction/activation by follicle-stimulating hormone is an androgen receptor-regulated process in-vitro. **Endocrinology**, v.109, n.4, p.1303-1305, Out 1981.

ISLAM, R.M.; BELL, R.J.; GREEN, S.; PAGE, M.J.; DAVIS, S.R. Safety and efficacy of testosterone for women: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trial data. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v.7, n.10, p.754-766, Out 2019.

IMUDIA, A. N.; GOLDMAN, R. H.; AWONUGA, A. O.; WRIGHT, D. L.; STYER, A. K.; TOTH, T. L. The impact of supraphysiologic serum estradiol levels on peri-implantation embryo development and early pregnancy outcome following in vitro fertilization cycles. **J Assist Reprod Genet**, v.31, n.1, p.65-71, Jan 2014.

JAMALUDIN, R.; AHMAD, M.F.; PARK, D.K.; ZAIN, M.M.; YOON, T.K.; LEE, W. S.; KOONG, M.K.; LEE, K.A. The stimulation protocol in poor responder IVF; a minimal or high-dose stimulation? - A meta-analysis. **Horm Mol Biol Clin Investig**. 2019 Nov 29. [Epub a head of print]. doi: 10.1515/hmbci-2019-0018.

JAYAPRAKASAN, K.; CAMPBELL, B.K.; HOPKISSON, J.F. Effect of pituitary desensitization on the early growing follicular cohort estimated using anti-Mullerian hormone. **Hum. Reprod**, v.23, n.11, p.2577-2583, Nov 2008.

JUNGHEIM, E.S.; MEYER, M.; BROUGHTON, D.E. Best practices for controlled ovarian stimulation in IVF. **Semin Reprod Med**, v.33, n.2, p.77–82, Mar 2015.

KAILASAM, C.; KEASY, S. D.; WILSON, P.; FORD, W. C.; JENKINS, J. M. Defining poor ovarian response during IVF cycles, in women aged <40 years, and its relationship with treatment outcome. **Hum Reprod**, v.19, n.7, p.1544-1547, Jul 2004.

KIM, C.H.; HOWLES, C.M.; LEE, H.A. The effect of transdermal testosterone gel pretreatment on controlled ovarian stimulation and IVF outcome in low responders. **Fertil Steril**, v.95, n.2, p.679-683, Feb 2011.

KIM, C.H.; AHN, J.W.; MOON, J.W.; KIM, S.H.; CHAE, H.D.; KANG, B.M. Ovarian Features after 2 Weeks, 3 Weeks and 4 Weeks Transdermal Testosterone Gel Treatment and Their Associated Effect on IVF Outcomes in Poor Responders. **Dev Reprod**, v.18, n.3, p.145-152, Set 2014.

KRIPLANI, A.; PERIYASAMY, A.J.; AGARWAL, N.; KULSHRESTHA, V.; KUMAR, A.; AMMINI, A.C. Effect of oral contraceptive containing ethinyl estradiol combined with drospirenone vs. desogestrel on clinical and biochemical parameters in patients with polycystic ovary syndrome. **Contraception**, v.82, n.2, p.139-146, Ago 2010.

LA MARCA, A.; STABILE, G.; ARTENISIO, A.C.; VOLPE, A. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. **Hum Reprod**, v.21, n.12, p.3103-3107, Dez 2006.

LA MARCA, A.; SIGHINOLFI, G.; RADI, D.; ARGENTO, C.; BARALDI, E.; ARTENISIO, A.C.; STABILE, G.; VOLPE, A. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). **Hum Reprod Update**, v.16, n.2, p.113-130, Mar-Abr 2010.

LAWLOR, D.A.; NELSON, S.M. Effect of age on decisions about the numbers of embryos to transfer in assisted conception: a prospective study. **Lancet**, v.379, n.9815, p.521-527, Feb 2012.

LAZER, T.; DAR, S.; SHLUSH, E.; AL KUDMANI, B.S.; QUACH, K.; SOJECKI A.; GLASS, K.; SHARMA, P.; BARATZ, A.; LIBRACH, C.L. Comparison of IVF Outcomes between Minimal Stimulation and High-Dose Stimulation for Patients with Poor Ovarian Reserve. **Int J Reprod Med**, 2014:581451.

LEKAMGE, D.N.; BARRY, M.; KOLO, M.; LANE, M.; GILCHRIST, R.B.; TREMELLEN, K.P. Anti-Müllerian hormone as a predictor of IVF outcome. **Reprod Biomed Online**, v.14, n.5, p.602-610, Mai 2007.

LOBO, R.A. The role of the adrenal in polycystic ovarian syndrome. **Semin Reprod Endocrinol**, v.2, p.251-262, 1984.

RIVERA-WOLL, L.M.; PAPALIA, M.; DAVIS, S.R.; BURGER, H.G. Androgen insufficiency in women: diagnostic and therapeutic implications. **Hum Reprod Update**, v.10, n.5, p.421-432, Set-Out 2004.

MAGOFFIN, D.A. Ovarian theca cell. **Int J Biochem Cell Biol**, v.37, n.7, p.1344–1349, Jul 2005.

MAHMOUD YOUSSEF, M.A.; VAN WELY, M.; ABOULFOUTOUH, I.; EL-KHYAT, W.; VAN DER VEEN, F.; AL-INANY, H. Is there a place for corifollitropin alfa in IVF/ICSI cycles? A systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility**, v.97, n.4, p.876-885, Abr 2012.

MAMAN, E.; GEVA, L. L.; YERUSHALMI, G.; BAUM, M.; DOR, J.; HOURVITZ, A. ICSI increases ongoing pregnancy rates in patients with poor response cycle: multivariate analysis of 2819 cycles. **Reprod Biomed Online**, v.25, n.6, p.635-641, Dez 2012.

MASSIN, N., CEDRIN-DURNERIN, I.; COUSSIEU, C.; GALEY-FONTAINE, J.; WOLF, J.P.; HUGUES, J.N. Effects of transdermal testosterone application on the ovarian response to FSH in poor responders undergoing assisted reproduction technique--a prospective, randomized, double-blind study. **Hum Reprod**, v.21, n.5, p. 1204-1211, Mai 2006.

MILLER, W.L.; AUCHUS, R.J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocr Rev**, v.32, n.1, p.81–151, Fev 2011.

MOHSEN, I.A.; EL DIN, R.E. Minimal stimulation protocol using letrozole versus microdose flare up GnRH agonist protocol in women with poor ovarian response undergoing ICSI. **Gynecol Endocrinol**, v.29, n.2, p.105-108, Fev 2013.

MORGANTE, G.; MASSARO, M.G.; DI SABATINO, A.; CAPPELLI, V.; DE LEO, V. Therapeutic approach for metabolic disorders and infertility in women with PCOS. **Gynecol Endocrinol**, v.34, n.1, p.4-9, Jan 2018.

MUTTUKRISHNA, S.; MCGARRIGLE, H.; WAKIM, R.; KHADUM, I.; RANIERI, D.M.; SERHAL, P. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? **BJOG**, v.112, n.10, p.1384-1390, Oct 2005.

BAHCECI, M.; ULUG, U.; TURAN, E.; AKMAN, M.A. Comparisons of follicular levels of sex steroids, gonadotropins and insulin like growth factor-1 (IGF-1) and epidermal growth factor (EGF) in poor responder and normoresponder patients undergoing ovarian stimulation with GnRH antagonist. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.130, n.1, p.93-98, Jan 2007.

NAGELS, H.E.; RISHWORTH, J.R.; SIRISTATIDIS, C.S.; KROON, B. Androgens (dehydroepiandrosterone or testosterone) for women undergoing assisted reproduction. **Cochrane Database Syst Rev**, v.11: CD009749.

NATIONAL CENTER FOR CHRONIC DISEASE PREVENTION AND HEALTH PROMOTION. **2015 ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY – Fertility Clinic Success Rates Report**. Disponível em: <<ftp://ftp.cdc.gov/pub/Publications/art/ART-2015-Clinic-Report-Full.pdf>>. 2015. Acesso em: 16 Jan 2020.

PANAY, N.; AL-AZZAWI, F.; BOUCHARD, C.; DAVIS, S.R.; EDEN, J.; LODHI, I.; REES, M.; RODENBERG, C.A.; RYMER, J.; SCHWENKHAGEN, A.; STURDEE, D.W. Testosterone treatment of HSDD in naturally menopausal women: the ADORE study. **Climacteric**, v.13, n.2, p.121-131, Apr 2010.

OATWAY, C.; GUNBY, J.; DAYA, S. Day three versus day two embryo transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. **Cochrane Database Syst Rev**, 2004(2): CD004378.

OUDENDIJK, J.F.; YARDE, F.; EIJKEMANS, M.J.; BROEKMANS, F.J.; BROER, S.L. The poor responder in IVF: is the prognosis always poor?: a systematic review. **Hum Reprod Update**. v.18, n.1, p.1-11, Jan-Feb 2012.

OZCAN CENKSOY, P.; FICICIOGLU, C.; KIZILKALE, O.; SUHHA BOSTANCI, M.; BAKACAK, M.; YESILADALI, M.; KASPAR, C. The comparison of effect of microdose GnRH-a flare-up, GnRH antagonist/aromatase inhibitor letrozole and GnRH antagonist/clomiphene citrate protocols on IVF outcomes in poor responder patients. **Gynecol Endocrinol**, v.30, n.7, p.485-489, Jul 2014.

PANDIAN, Z.; MCTAVISH, A.R.; AUCOTT, L.; HAMILTON, M.P; BHATTACHARYA, S. Interventions for 'poor responders' to controlled ovarian hyper stimulation (COH) in in-vitro fertilisation (IVF). **Cochrane Database Syst Rev**, v.1: CD004379, 2010.

PIGNY, P.; MERLEN, E.; ROBERT, Y.; CORTET-RUDELLI, C.; DECANter, C.; JONARD, S.; DEWAILLY, D. Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, n.12, p.5957–5962, Dez 2003.

PILTONEN, T.; KOIVUNEN, R.; PERHEENTUPA, A.; MORIN-PAPUNEN, L.; RUOKONEN, A.; TAPANAINEN, J.S. Ovarian age-related responsiveness to human chorionic gonadotropin in women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, n.8, p.3769-3775, Ago 2004.

PU, D.; WU, J.; LIU, J. Comparisons of GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol in poor ovarian responders undergoing IVF. **Human Reproduction**, v.26, n.10, p.2742–2749, Out 2011.

POLYZOS, N.P.; DEVROEY, P. A systematic review of randomized trials for the treatment of poor ovarian responders: is there any light at the end of the tunnel? **Fertil Steril**, v.95, n.5, p.1058-1061, Nov 2011.

QUIGLEY, C.A.; DE BELLIS, A.; MARSCHKE, K.B.; EL-AWADY, M.K.; WILSON, E.M.; FRENCH, F.S. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. **Endocr Rev**, v.16, n.3, p.271–321, Jun 1995.

QIN, Y.; ZHAO, Z.; SUN, M.; GENG, L.; CHE, L.; CHEN, Z.J. Association of basal serum testosterone levels with ovarian response and *in vitro* fertilisation outcome. **Reprod. Biol. Endocrinol**, 9:9, Jan 2011. doi:10.1186/1477-7827-9-9

Roche. Reference Interval Study for children and randomly selected adults - Elecsys® Fertility Tests. 2015. Disponível em: <<https://diagnostics.roche.com/global/en/home.html>>. Acesso em 16 Jan 2020.

RODRIGUES, J.K.; NAVARRO, P.A.; ZELINSKI, M.B.; STOUFFER, R.L.; XU, J. Direct actions of androgens on the survival, growth and secretion of steroids and anti-Müllerian hormone by individual macaque follicles during three-dimensional culture. **Hum Reprod**, v.30, n.3, p.664-674, Mar 2015.

SAHARKHIZ, N.; ZADEMODARES, S.; SALEHPOUR, S.; HOSSEINI, S.; NAZARI, L.; TEHRANI, H.G. The effect of testosterone gel on fertility outcomes in women with a poor response in in vitro fertilization cycles: A pilot randomized clinical trial. **J Res Med Sci**, v.23, n.3, Jan 2018.

SEN, A.; HAMMES, S.R. Granulosa cell-specific androgen receptors are critical regulators of ovarian development and function. **Mol Endocrinol**, v.24, n.7, p.1393–1403, Jul 2010.

SIPE, C.S.; THOMAS, M.R.; STEGMANN, B.J.; VAN VOORHIS, B.J. (2010). Effects of exogenous testosterone supplementation in gonadotrophin stimulated cycles. **Hum Reprod**, v.25, n.3, p.690-696, Mar 2010

SOMIGLIANA, E.; PAFFONI, A.; BUSNELLI, A.; CARDELLICCHIO, L.; LEONARDI, M.; FILIPPI, F.; RAGNI, G.; FEDELE, L. IVF outcome in poor responders failing to produce viable embryos in the preceding cycle. **Reprod Biomed Online**, v.16, n.6, p.569-576, Jun 2013.

SPINDER, T.; SPIJKSTRA, J.J.; VAN DEN TWEEL, J.G.; BURGER, C.W.; VAN KESSEL, H.; HOMPE, P.G.; GOOREN, L.J. The effects of long term testosterone administration on pulsatile luteinizing hormone secretion and on ovarian histology in eugonadal female to male transsexual subjects. **J Clin Endocrinol Metabol**, v.69, n.1, p.151–157, Jul 1989.

VEGUNTA, S.; KLING, J.M.; KAPOOR, E. Androgen Therapy in Women. **J Womens Health (Larchmt)**, v.29, n.1, p.57-64, Jan 2020.

SFAKIANOUDIS, K.; PANTOS, K.; GRIGORIADIS, S.; RAPANI, A.; MAZIOTIS, E.; TSILOULOU, P.; GIANNELLOU, P.; KONTOGEORGI, A.; PANTOU, A.; VLAHOS, N.; KOUTSILIERIS, M.; SIMOPOULOU, M. What is the true place of a double stimulation and double oocyte retrieval in the same cycle for patients diagnosed with poor ovarian reserve? A systematic review including a meta-analytical approach. **J Assist Reprod Genet**. 2019. Dec 3 [Epub ahead of print]. doi: 10.1007/s10815-019-01638-z

SALLAM, H.N.; EZZELDIN, F.; AGAMEYA, A.F.; RAHMAN, A.F.; EL-GAREM, Y. Defining poor responders in assisted reproduction. **Int J Fertil Womens Med**, v.50, n.3, p.115-120, Mai-Jun 2005.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Mol Reprod Dev**, v.61, n.3, p.414-424, Mar 2002.

TATONE, C.; AMICARELLI, F.; CARBONE, M.C.; MONTELEONE, P.; CASERTA, D.; MARCI, R.; ARTINI, P.G.; PIOMBONI, P.; FOCARELLI, R. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. **Hum Reprod Update**, v.14, n.2, p.131–142, Mar-Apr 2008.

THE ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP. Female contraception over 40. **Hum Reprod Update**, v. 15, n. 6, p.599-612, Nov-Dez 2009.

UBALDI, F., VAIARELLI, A.; D'ANNA, R.; RIENZI, L. Management of poor responders in IVF: is there anything new? **Biomed Res Int**, 2014:352098.

UBALDI, F.M.; RIENZI, L.; FERRERO, S.; BARONI, E.; SAPIENZA, F.; COBELLIS, L.; GRECO, E. Management of poor responders in IVF. **Reprod Biomed Online**, v.10, n.2, p.235-246, Feb 2005.

VAN ROOIJ, I.A.; BROEKMANS, F.J.; TE VELDE, E.R.; FAUSER, B.C.; BANCSI, L.F.; DE JONG, F.H.; THEMME, A.P. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. **Hum Reprod**, v.17, n.12, p.3065-3071, Dez 2002.

VENDOLA, K.A.; ZHOU, J.; ADESANYA, O.O.; WEIL, S.J.; BONDY, C.A. (1998). Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. **J Clin Invest**, v.101, n.12, p.2622-2629, Jun 1998.

VENDOLA, K.; ZHOU, J.; WANG, J.; FAMUYIWA, O.A.; BIEVRE, M.; BONDY, C.A. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. **Biol Reprod**, v.61, n.2, p.353-357, Ago 1999.

VERMEULEN, A.; VERDOUK, L.; KAUFMAN, J.M. A critical evaluation of simple methods for the stimulation of free testosterone. **J Clin Endocrinol Metab**, v.84, n.10, p.3666-3672, Out 1999.

WALTERS, K.A. Role of androgens in normal and pathological ovarian function. **Reproduction**, v.149, n.4, p.193-218, Abr 2015.

WEIL, S.J.; VENDOLA, K.; ZHOU, J.; ADESANYA, O.O.; WANG, J.; OKAFOR, J.; BONDY, C.A. Androgen receptor gene expression in the primate ovary: cellular localization, regulation, and functional correlations. **J Clin Endocrinol Metab**, v.83, n.7, p.2479-2485, Jul 1998

WEIL, S.; VENDOLA, K.; ZHOU, J.; BONDY, C.A. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. **J Clin Endocrinol Metab**, v.84, n.8, p.2951-2956, Ago 1999.

WELT, C.K.; MCNICHOLL, D.J.; TAYLOR, A.E.; HALL, J.E. Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. **J Clin Endocrinol Metab**, v.84, n.1, p.105-111, Jan 1999.

8. APÊNDICE

APÊNDICE A - Causa da infertilidade, protocolo de estimulação, número de oócitos captados e dosagens hormonais das pacientes incluídas no Ciclo Controle e Testosterona.

<i>Pacientes</i>	<i>Causa Infertilidade</i>	<i>Protocolo Estimulação</i>	<i>D1 Testo. Livre (ng/dL)</i>	<i>D2 Testo. Livre (ng/dL)</i>	<i>Nº Oócitos Captados</i>	<i>D3 Testo. Livre (ng/dL)</i>	<i>D4 Testo. Livre (ng/dL)</i>	<i>D5 Testo. Livre (ng/dL)</i>	<i>Nº Oócitos Captados</i>
			<i>Estradiol (pg/mL)</i>	<i>Estradiol (pg/mL)</i>		<i>Estradiol (pg/mL)</i>	<i>Estradiol (pg/mL)</i>	<i>Estradiol (pg/mL)</i>	
			<i>SHBG (nmol/L)</i>	<i>SHBG (nmol/L)</i>		<i>SHBG (nmol/L)</i>	<i>SHBG (nmol/L)</i>	<i>SHBG (nmol/L)</i>	
1	Laqueadura + Astenoterato + Idade avançada	Alta dose	0,21 31 46	0,27 167 55	0	0,15 52 50	0,3 23 90	0,25 91 55	2

2	Fator tubáreo + Astenoerato	Estimulação Mínima	0,12	0,26	0	0,09	6,87	0,40	0
			50	202		45	15	72	
			162	168		181	160	118	
3	Endometriose + leiomiomatose uterina	Alta dose	0,14	0,74	0	0,18	1,65	1,44	3
			78	419		73	5	254	
			108	157		100	206	161	
4	Endometriose + fator masculino + idade avançada	Estimulação Mínima	0,07	0,37	3	0,06	0,23	0,14	0
			48	341		50	10	216	
			81	96		162	179	105	

5	Oligoastenoterato espermia	Estimulação Mínima	0,21 35 127	0,51 349 183	1	0,19 52 120	0,39 57 121	0,19 202 123	1
6	Endometrioma + salpingectomy bilateral + astenoterato + idade avançada	Estimulação Mínima	0,04 59 124	0,25 351 139	0	0,07 80 108	0,05 8 121	0,51 556 131	3

ANEXOS

9. ANEXO

Anexo A – Ficha entrevista inicial

“PROJETO MÁ RESPOSTA E TESTOSTERONA”

NOME DA PACIENTE: _____

DATA: _____

CICLO MENSTRUAL: _____

Menarca (idade): _____

Regular (sem uso de anticoncepcional)? ☐ SIM ☐ NÃO

Qual o intervalo entre as menstruações (em dias)? _____ Encurtamento do ciclo? _____

Quantos dias menstruando? _____ Dia de início da última menstruação: _____

TEM FILHOS? ☐ NÃO ☐ SIM - QUANTOS? _____

JÁ ABORTOU? ☐ NÃO ☐ SIM - Quantas vezes, quando? _____

DURAÇÃO DA INFERTILIDADE (meses): _____

PATOLOGIAS ASSOCIADAS:

Anormalidade uterina? ☐ NÃO ☐ SIM - Qual? _____

Anormalidade endócrina não tratada ou descontrolada? ☐ NÃO ☐ SIM - Qual? _____

Doença grave em tratamento regular? ☐ NÃO ☐ SIM - Qual? _____

Já realizou quimioterapia? ☐ NÃO ☐ SIM - Pq? Qual medicação? Qnt tempo? Quando? _____

Doença cardiovascular? ☐ NÃO ☐ SIM - Qual? _____

Dislipidemia? ☐ NÃO ☐ SIM - Qual? _____

Doença autoimune? ☐ NÃO ☐ SIM - Qual? _____

Endocrinopatia? ☐ NÃO ☐ SIM - Qual? _____

MEDICAÇÕES UTILIZADAS

Uso de androgênios nos últimos 3 meses? ☐ NÃO ☐ SIM - Qual? _____

Já usou anticoncepcional: ☐ NÃO ☐ SIM - Qual? Qnd? Qnt tempo? _____

Outras medicações em uso (vitaminas, tireoide, diabetes, antidepressivo, etc): _____

EXAMES REALIZADOS:

Histerossalpingografia (HSG)? ☐ NÃO ☐ SIM - Quando? HC? Resultado _____

Videolaparoscopia (VLPSC)? ☐ NÃO ☐ SIM - Quando? HC? Resultado _____

Cirurgia nos ovários? ☐ NÃO ☐ SIM - Quando? HC? Resultado _____

HÁBITOS:

Fuma? ☐ NÃO ☐ SIM - Qnt tempo? N cigarros/dia: _____

Bebida alcoólica? ☐ NÃO ☐ SIM - Quantas vezes por semana? _____

Exercício físico? ☐ NÃO ☐ SIM - Qual? Qnts vezes por semana? _____

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) Ciclo Controle (CC).

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – USP
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
Avenida Bandeirantes, 3900 – 1º andar – Ribeirão Preto – SP – CEP 14049-900
Fone (016) 3602-2231 - Fax (016)3633-0946
Setor de Reprodução Humana

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Grupo Controle)

1. NOME DA PESQUISA E PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Você está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada "Efeito da testosterona transdérmica em mulheres com provável má resposta submetidas à estimulação ovariana controlada sobre o perfil de expressão gênica em células do cumulus" sob responsabilidade da Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro.

2. DESCRIÇÃO DA PESQUISA

Para a realização das Técnicas de Reprodução Assistida, as mulheres recebem medicações para estimular o crescimento de um número maior de óvulos, o que é chamado de estimulação ovariana controlada. Algumas mulheres apresentam um maior risco de responderem mal (má resposta) a essas medicações, ou seja, podem conseguir um número reduzido de óvulos e, portanto apresentarem uma menor chance de engravidarem.

Algumas mulheres com risco de má resposta fazem uso de testosterona (um hormônio masculino) antes do início da estimulação ovariana controlada para tentar obter um maior número de óvulos, mas isto ainda não foi bem comprovado.

Você apresenta maior risco de má resposta a essas medicações e não utilizou testosterona e por isto está sendo convidada a participar deste estudo como grupo controle.

Neste trabalho, iremos tentar entender melhor como a testosterona age nas mulheres com má resposta. Para isto, propomos estudar o material genético das células que protegem os óvulos (chamadas células do cumulus) e comparar esses resultados entre mulheres com má resposta que utilizaram testosterona antes do início da estimulação ovariana controlada (grupo testosterona) e aquelas que não usaram testosterona (grupo controle). Também propomos dosar alguns hormônios no sangue para tentar entender o mecanismo de ação da testosterona e obteremos alguns dados de seu prontuário (número de óvulos captados, número de óvulos maduros captados, número de óvulos fertilizados, número de embriões formados, a duração da estimulação ovariana, presença ou não de gravidez clínica e ocorrência de aborto ou nascido vivo).

3. COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE

Aproximadamente, 10 mL de sangue (uma colher de sopa) serão colhidos da veia de seu braço em dois momentos:

1º) No dia da primeira consulta para realização do ultrassom basal e início do uso dos medicamentos para estimular os seus ovários (dia de início da estimulação ovariana);

2º) no dia da aspiração dos óvulos.

Salientamos que a coleta de sangue pode gerar um discreto desconforto no local da picada e, eventualmente, um pequeno hematoma (mancha roxa) no local da picada. O sangue será armazenado em tubos específicos para congelamento que serão mantidos em uma

Rubrica Participante/Pesquisador: _____/_____
Versão 3 (28-Nov-2016)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – USP
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
Avenida Bandeirantes, 3900 – 1º andar – Ribeirão Preto – SP – CEP 14049-900
Fone (016) 3602-2231 - Fax (016)3633-0946
Setor de Reprodução Humana

temperatura de -196°C (Biorrepositório "Amostras do projeto observacional má resposta e testosterona").

4. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS

No momento da aspiração dos folículos para obtenção dos óvulos (dia da captação), você estará sedada. O médico puncionará seu ovário para obter o óvulo que naturalmente está envolvido pelas células do cumulus (figura abaixo).

Estas células são removidas dos óvulos na sala da embriologia antes da realização do procedimento de injeção do espermatozoide no óvulo. Vale ressaltar que as células do cumulus são jogadas fora, não sendo de interesse da reprodução assistida. Estas células serão armazenadas em tubos específicos para congelamento que serão mantidos em uma temperatura de -196°C (Biorrepositório "Amostras do projeto observacional má resposta e testosterona"). Realizaremos uma varredura do DNA (material genético) total de suas células do cumulus com a técnica de "Sequenciamento de Nova Geração" que nos direcionará na busca de possíveis genes desregulados pela técnica de "PCR em tempo real". Os dados obtidos da análise genética serão extremamente sigilosos e ao fim da pesquisa serão divulgados em revistas científicas (sem que seu nome apareça).

5. OBSERVAÇÕES

Devemos ressaltar que a sua participação no presente estudo não implicará na realização de nenhum procedimento complementar durante o seu tratamento para tentar engravidar. E, portanto, não haverá riscos para você assim como não lhe trará despesas a mais.

As amostras de sangue e de células do cumulus serão armazenadas no container de nitrogênio líquido (biorrepositório) denominado de "Amostras do projeto observacional má resposta e testosterona" por no máximo 10 anos e caso haja amostras remanescentes de materiais colhidos (sangue ou células do cumulus), elas somente poderão ser utilizadas para a realização de pesquisas futuras, caso você dê a sua autorização expressa, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido específico da nova(s) pesquisa(s). A qualquer momento, você poderá manifestar vontade de retirar a sua aceitação em manter células do cumulus e sangue armazenados, sendo que você assinará um documento e as amostras serão entregues a você.

Rubrica Participante/Pesquisador: _____
 Versão 3 (28-Nov-2016)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – USP
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
 Avenida Bandeirantes, 3900 – 1º andar – Ribeirão Preto – SP – CEP 14049-900
 Fone (016) 3602-2231 - Fax (016)3633-0946
 Setor de Reprodução Humana

6. INFORMAÇÕES ADICIONAIS: Todas dúvidas com relação ao estudo que, porventura, possam ocorrer durante o seu tratamento para engravidar, serão prontamente esclarecidas pelos pesquisadores responsáveis pelo presente estudo. Você tem a liberdade de retirar o seu consentimento e de deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento. Asseguramos o total sigilo em relação aos nomes dos integrantes deste estudo, bem como garantimos que será mantido o caráter confidencial de toda informação relacionada a sua privacidade. Asseguramos o compromisso de que você será devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de participação neste projeto, bem como de que será garantida a continuidade do seu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Você, _____, RG nº: _____

abaixo assinada, declara que foi informada e está inteiramente de acordo com o exposto acima e aceita livremente participar do estudo em questão, fornecendo amostras de sangue e células do cumulus. Autoriza a pesquisadora abaixo mencionada a utilizá-las para a pesquisa : "Efeito da testosterona transdérmica em mulheres com provável má resposta submetidas à estimulação ovariana controlada sobre o perfil de expressão gênica em células do cumulus", estando ciente que terá a liberdade de retirar seu consentimento e de deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento.

Ribeirão Preto _____ / _____ / _____

Assinatura- Paciente

Assinatura do Pesquisador

CONTATO:

Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro – CRM: 84930 – SP (PESQUISADORA RESPONSÁVEL)

Telefone de contato: 16-3602-2231 Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar (Hospital das Clínicas- Setor de Reprodução Humana), Ribeirão Preto – SP. CEP: 14049-900.

Vanessa Silvestre Innocenti Giorgi (ALUNA DOUTORADO)

Telefone de contato: 14-99701-6788

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar (Hospital das Clínicas- Setor de Reprodução Humana), Ribeirão Preto – SP. CEP: 14049-900.

Paula Muzetti de Chico (ALUNA MESTRADO)

Telefone de contato: 16-99788-7273

Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar (Hospital das Clínicas- Setor de Reprodução Humana), Ribeirão Preto – SP. CEP: 14049-900.

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP-USP
(016) 3602-2228

Rubrica Participante/Pesquisador: _____ / _____

Versão 3 (28-Nov-2016)

Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) Ciclo Testosterona (CT).

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – USP
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
Avenida Bandeirantes, 3900 – 1º andar – Ribeirão Preto – SP – CEP 14049-900
Fone (016) 3602-2231 - Fax (016)3633-0946
Setor de Reprodução Humana

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Grupo Testosterona)

1. NOME DA PESQUISA E PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Você está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada "Efeito da testosterona transdérmica em mulheres com provável má resposta submetidas à estimulação ovariana controlada sobre o perfil de expressão gênica em células do cumulus" sob responsabilidade da Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro.

2. DESCRIÇÃO DA PESQUISA

Para a realização das Técnicas de Reprodução Assistida, as mulheres recebem medicações para estimular o crescimento de um número maior de óvulos, o que é chamado de estimulação ovariana controlada. Algumas mulheres apresentam um maior risco de responderem mal (má resposta) a essas medicações, ou seja, podem conseguir um número reduzido de óvulos e, portanto apresentarem uma menor chance de engravidarem.

Algumas mulheres com risco de má resposta fazem uso de testosterona (um hormônio masculino) antes do início da estimulação ovariana controlada para tentar obter um maior número de óvulos, mas isto ainda não foi bem comprovado.

Você apresenta maior risco de má resposta a essas medicações e utilizou testosterona e por isto está sendo convidada a participar deste estudo como grupo testosterona.

Neste trabalho, iremos tentar entender melhor como a testosterona age nas mulheres com má resposta. Para isto, propomos estudar o material genético das células que protegem os óvulos (chamadas células do cumulus) e comparar esses resultados entre mulheres com má resposta que utilizaram testosterona antes do início da estimulação ovariana controlada (grupo testosterona) e aquelas que não usaram testosterona (grupo controle). Também propomos dosar alguns hormônios no sangue para tentar entender o mecanismo de ação da testosterona e obteremos alguns dados de seu prontuário (número de óvulos captados, número de óvulos maduros captados, número de óvulos fertilizados, número de embriões formados, a duração da estimulação ovariana, presença ou não de gravidez clínica e ocorrência de aborto ou nascido vivo).

3. COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE

Aproximadamente, 10 mL de sangue (uma colher de sopa) serão colhidos da veia de seu braço em dois momentos:

- 1º) No dia da primeira consulta para realização do ultrassom basal e início do uso dos medicamentos para estimular os seus ovários (dia de início da estimulação ovariana);
- 2º) no dia da aspiração dos óvulos.

Salientamos que a coleta de sangue pode gerar um discreto desconforto no local da picada e, eventualmente, um pequeno hematoma (mancha roxa) no local da picada. O

Rubrica Participante/Pesquisador: _____/_____
Versão 3 (28-Nov-2016)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – USP
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
Avenida Bandeirantes, 3900 – 1º andar – Ribeirão Preto – SP – CEP 14049-900
Fone (016) 3602-2231 - Fax (016)3633-0946
Setor de Reprodução Humana

sangue será armazenado em tubos específicos para congelamento que serão mantidos em uma temperatura de -196°C (Biorrepositório "Amostras do projeto observacional má resposta e testosterona").

4. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS

No momento da aspiração dos folículos para obtenção dos óvulos (dia da captação), você estará sedada. O médico puncionará seu ovário para obter o óvulo que naturalmente está envolvido pelas células do cumulus (figura abaixo).

Estas células são removidas dos óvulos na sala da embriologia antes da realização do procedimento de injeção do espermatozoide no óvulo. Vale ressaltar que as células do cumulus são jogadas fora, não sendo de interesse da reprodução assistida. Estas células serão armazenadas em tubos específicos para congelamento que serão mantidos em uma temperatura de -196°C (Biorrepositório "Amostras do projeto observacional má resposta e testosterona"). Realizaremos uma varredura do DNA (material genético) total de suas células do cumulus com a técnica de "Sequenciamento de Nova Geração" que nos direcionará na busca de possíveis genes desregulados pela técnica de "PCR em tempo real". Os dados obtidos da análise genética serão extremamente sigilosos e ao fim da pesquisa serão divulgados em revistas científicas (sem que seu nome apareça).

5. OBSERVAÇÕES

Devemos ressaltar que a sua participação no presente estudo não implicará na realização de nenhum procedimento complementar durante o seu tratamento para tentar engravidar. E, portanto, não haverá riscos para você assim como não lhe trará despesas a mais.

As amostras de sangue e de células do cumulus serão armazenadas no container de nitrogênio líquido (biorrepositório) denominado de "Amostras do projeto observacional má resposta e testosterona" por no máximo 10 anos e e caso haja amostras remanescentes de materiais colhidos (sangue ou células do cumulus), elas somente poderão ser utilizadas para a realização de pesquisas futuras, caso você dê a sua autorização expressa, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido específico da nova(s) pesquisa(s). A qualquer momento, você poderá manifestar vontade de retirar a sua aceitação em manter células do cumulus e sangue armazenados, sendo que você assinará um documento e as amostras serão entregues a você.

Rubrica Participante/Pesquisador: _____ / _____
 Versão 3 (28-Nov-2016)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – USP
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
Avenida Bandeirantes, 3900 – 1º andar – Ribeirão Preto – SP – CEP 14049-900
Fone (016) 3602-2231 - Fax (016) 3633-0946
Setor de Reprodução Humana

6. INFORMAÇÕES ADICIONAIS: Todas dúvidas com relação ao estudo que, porventura, possam ocorrer durante o seu tratamento para engravidar, serão prontamente esclarecidas pelos pesquisadores responsáveis pelo presente estudo. Você tem a liberdade de retirar o seu consentimento e de deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento. Asseguramos o total sigilo em relação aos nomes dos integrantes deste estudo, bem como garantimos que será mantido o caráter confidencial de toda informação relacionada a sua privacidade. Asseguramos o compromisso de que você será devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de participação neste projeto, bem como de que será garantida a continuidade do seu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Você, _____, RG nº: _____
 abaixo assinada, declara que foi informada e está inteiramente de acordo com o exposto acima e aceita livremente participar do estudo em questão, fornecendo amostras de sangue e células do cumulus. Autoriza a pesquisadora abaixo mencionada a utilizá-las para a pesquisa : "Efeito da testosterona transdérmica em mulheres com provável má resposta submetidas à estimulação ovariana controlada sobre o perfil de expressão gênica em células do cumulus", estando ciente que terá a liberdade de retirar seu consentimento e de deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento.

Ribeirão Preto ____/____/____

Assinatura- Paciente

Assinatura do Pesquisador

CONTATO:

Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro – CRM: 84930 – SP (PESQUISADORA RESPONSÁVEL)
 Telefone de contato: 16-3602-2231 Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar (Hospital das Clínicas- Setor de Reprodução Humana), Ribeirão Preto – SP. CEP: 14049-900.

Vanessa Silvestre Innocenti Giorgi (ALUNA DOUTORADO)

Telefone de contato: 14-99701-6788

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar (Hospital das Clínicas- Setor de Reprodução Humana), Ribeirão Preto – SP. CEP: 14049-900.

Paula Muzetti de Chico (ALUNA MESTRADO)

Telefone de contato: 16-99788-7273

Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar (Hospital das Clínicas- Setor de Reprodução Humana), Ribeirão Preto – SP. CEP: 14049-900.

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP-USP

(016) 3602-2228

Rubrica Participante/Pesquisador: _____/_____

Versão 3 (28-Nov-2016)