Paulo Homem de Mello Bianchi

**O papel da emergência de ondas foliculares na
sincronização da estimulação ovariana para fertilização *in vitro***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Paulo César Serafini

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bianchi, Paulo Homem de Mello

O papel da emergência de ondas foliculares na sincronização da estimulação ovariana para fertilização *in vitro* / Paulo Homem de Mello Bianchi. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: Paulo César Serafini.

Descritores: 1.Fertilização *in vitro* 2.Indução da ovulação 3.Ovário/fisiologia
4.Fase lútea 5. Ensaio clínico aleatório controlado

USP/FM/DBD-277/13

*Dedico este estudo a meus pais, **Rogério e Marília**, médicos,
meus primeiros e maiores Professores.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ...

Ao **Professor Dr. Edmund Chada Baracat** pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa e pelo incentivo e apoio, principalmente nos momentos mais críticos.

Ao **Professor Dr. Paulo Serafini** pela paciência e apoio, dentro e fora da instituição, mas, sobretudo por ter me inoculado com o “vírus” da curiosidade científica, fruto de seu próprio exemplo.

Ao **Professor Dr. Pietro Sampaio Baruselli** pela grande contribuição que deu a este estudo, sempre disponível para discutirmos as correlações entre animais e humanos, o que enriqueceu sobremaneira a discussão. Agradeço também pelo acolhimento que me deu junto ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

À **Srta. Lais Mendes Vieira**, doutoranda da Disciplina de Reprodução Animal da FMVZ USP, por toda a ajuda com a análise dos dados.

À **Srta. Gabriela Romanenghi Fanti Carvalho Araujo Gouveia**, embriologista do CRH HCFMUSP, pela contribuição e dedicação a esta pesquisa.

À enfermeira **Josy**, às auxiliares de enfermagem **Aurea**, **Regina** e **Andréia**, bem como a **Sra. Eunice Del Gaudio** pela dedicação as pacientes e a ajuda na coleta dos materiais.

À meus amigos, os **Drs. Pedro Monteleone, Rodrigo Rodrigues, Dani Ejzemberg, Gustavo Kroger, Oscar Duarte, Lucas Yamakami, Eduardo Myiadahira, Renato Tomioka, Marcos Shiroma, Fernanda Imperial, Tatiane Medeiros e Gustavo Teles**, médicos do CRH HCFMUSP, pela colaboração, paciência e compreensão.

Ao meu grande amigo, o **Dr André Monteiro da Rocha**, por todos os ensinamentos e por ter me apresentado o conceito das ondas foliculares e me instigado a esta pesquisa.

Ao **laboratório Merck-Serono**, na pessoa da **Srta Gracy Ferreira**, pela doação da medicação utilizada na pesquisa.

Aos meus pais **Rogério e Marília**, minhas irmãs **Ana Maria e Beatriz** e à minha esposa **Luciana** por todo o apoio, compreensão e paciência. Agradeço também por serem meus revisores mais críticos.

Por fim, agradeço a todas as **pacientes** que se dispuseram a participar deste estudo, na esperança de contribuir para o desenvolvimento científico, não para benefício próprio, mas para que o conhecimento gerado pudesse ajudar outras pessoas.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Siglas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	10
2.1 Geral	11
2.2 Específicos	11
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	12
3.1 Casuística	13
3.2 Métodos	14
3.2.1 Alocação	14
3.2.2 Estimulação ovariana	16
3.2.2.1 Grupo Controle	16
3.2.2.2 Grupos Experimentais	17
3.2.3 Coleta dos oócitos e fertilização <i>in vitro</i>	18
3.2.4 Classificação embrionária e vitrificação	19
3.2.5 Preparação do útero para transferência de embriões vitrificados, aquecimento embrionário e transferência uterina	20
3.2.6 Determinações hormonais	21
3.2.7 Cálculo amostral	22
3.2.8 Análise Estatística	22

4 RESULTADOS	24
4.1 Características basais dos grupos	25
4.2 Efeito das intervenções (aspiração do folículo dominante ou aplicação de hCG) nos grupos experimentais	27
4.3 Desempenho dos protocolos e dinâmica folicular durante a estimulação ovariana	31
4.4 Desempenho laboratorial	40
4.5 Avaliação da influência do corpo lúteo sobre o desempenho laboratorial..	41
 5 DISCUSSÃO	 43
 6 CONCLUSÕES	 54
 REFERÊNCIAS	 56

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Carta da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APÊNDICE 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenvolvimento dos folículos antrais de acordo com a “Teoria do Momento Oportuno” em um intervalo interovulatório. OV: ovulação. M: menstruação	04
Figura 2	Dinâmica folicular humana segundo a teoria das ondas foliculares. 0: dia da ovulação; A: Mulheres com duas ondas foliculares; B: mulheres com três ondas foliculares	06
Figura 3	Fluxograma de randomização em bloco para os grupos controle, experimental 1 e 2 de pacientes que preencheram os critérios de inclusão.....	15
Figura 4	Variação da quantidade de folículos com diâmetro menor a 10mm nos grupos experimentais, antes e depois das intervenções. (A) Grupo “hCG” (média $\pm$ erro padrão); (B) Grupo “aspiração” (média $\pm$ erro padrão)	29
Figura 5	Variação dos níveis séricos de estradiol e de progesterona durante a estimulação ovariana de acordo com o grupo. (A) Estradiol (média $\pm$ erro padrão); (B) Progesterona (média $\pm$ erro padrão)	34
Figura 6	Variação dos níveis séricos médios de progesterona e de hCG no grupo “hCG”	35
Figura 7	Velocidade de crescimento do maior folículo durante a estimulação ovariana	36
Figura 8	Relação entre a velocidade média de crescimento do maior folículo e a dose total de FSH recombinção utilizada durante o estímulo	37
Figura 9	Variação da quantidade de folículos pequenos, médios e grandes nos grupos ao longo da estimulação ovariana (média $\pm$ erro padrão)	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características basais dos grupos com variáveis quantitativas e qualitativas	26
Tabela 2	Efeito das intervenções (aspiração do dominante ou aplicação do hCG) na quantidade de folículos com diâmetro <10mm e nos níveis séricos de FSH, LH, estradiol e progesterona	28
Tabela 3	Momento da intervenção, quantidade de folículos com diâmetro <10mm e diâmetro médio destes folículos no início da onda folicular em cada grupo experimental	31
Tabela 4	Características da estimulação ovariana	32
Tabela 5	Quantidade de visitas para controle do tratamento após o início da gonadotrofina exógena até o término da estimulação ovariana	33
Tabela 6	Resultados laboratoriais	40
Tabela 7	Comparação entre o lado do corpo lúteo/folículo dominante aspirado e o lado contralateral	42

LISTA DE ABREVIATURAS

FIV	fertilização <i>in vitro</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
hCG	gonadotrofina coriônica humana
OMS	Organização Mundial da Saúde
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
LH	hormônio luteinizante
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
ACO	contraceptivo hormonal oral
OV	ovulação
M	menstruação

LISTA DE SÍMBOLOS

g	grama
IU	unidade internacional
kg	quilograma
L	litro
m ²	metro quadrado
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mUI	miliunidade internacional
µg	micrograma
ng	nanograma
pg	picograma
®	marca registrada
%	porcento
/	por
>	maior
≥	maior ou igual
<	menor
≤	menor ou igual
x	vezes
±	mais ou menos

LISTA DE SIGLAS

CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CRH-HCFMUSP	Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas

RESUMO

Bianchi PHM. *O papel da emergência de ondas foliculares na sincronização de estimulação ovariana para fertilização in vitro* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: A estimulação ovariana, parte fundamental dos tratamentos de fertilização *in vitro*, baseia-se no conhecimento da fisiologia deste órgão. Recentemente um novo modelo de foliculogênese, a teoria das ondas foliculares, foi descrito em humanos. A sincronização do início da estimulação com o surgimento de uma onda folicular melhora o desempenho dos tratamentos em animais. Os protocolos de estimulação ovariana para fertilização *in vitro* humana não são sincronizados com o início de uma onda folicular. O presente estudo tem como objetivos avaliar duas estratégias de controle da emergência de uma onda folicular (aspiração do folículo dominante e indução da ovulação mediada pelo hCG) e descrever a estimulação ovariana sincronizada com o início de uma onda.

MÉTODOS: Participaram deste estudo controlado pacientes com indicação de fertilização *in vitro* (fatores tubário e/ou masculino de infertilidade), randomizadas em três grupos: controle, “hCG” e “aspiração”. No grupo controle (n=6), a aplicação do FSH recombinante (150UI/d) teve início no terceiro dia do ciclo menstrual, seguindo o protocolo flexível do antagonista do GnRH. Nos grupos experimentais foram realizadas ultrassonografias transvaginais seriadas até a identificação de um folículo dominante $\geq 15\text{mm}$. Neste momento, no grupo “hCG” (n=5) foi aplicada dose de 250 μg de hCG recombinante e, após dois dias, retomado o seguimento ultrassonográfico seriado. No grupo “aspiração” (n=5) o folículo dominante e os subordinados $>10\text{mm}$ foram aspirados e o seguimento ultrassonográfico seriado foi retomado após um dia depois. Quando foi detectada o aumento do número de folículos $<10\text{mm}$, caracterizando a emergência de uma onda folicular, iniciou-se a estimulação ovariana nos grupos experimentais seguindo o mesmo protocolo do grupo controle. Os embriões produzidos foram criopreservados para transferência posterior devido a assincronia endometrial.

RESULTADOS: As duas intervenções resultaram na emergência de ondas foliculares em todas as mulheres, um dia após a aspiração do folículo dominante e dois dias após a aplicação do hCG. A dose total de gonadotrofinas utilizada, o tempo de estimulação, a variação dos níveis séricos de estradiol, a variação do número de folículos pequenos, médios e grandes durante o tratamento, o número de oócitos obtidos, a taxa de fertilização e o número de embriões de morfologia adequada e inadequada foram semelhantes nos três grupos. A velocidade de crescimento do maior folículo foi menor nos grupos experimentais até o 5º dia do estímulo, aumentando a partir daí. Os níveis séricos de progesterona foram maiores nos grupos experimentais a partir do quinto dia do estímulo até o final

do tratamento. Não houve influência mecânica da presença do corpo lúteo na dinâmica folicular e nos desempenho laboratorial dos oócitos ipsilaterais. Oito pacientes realizaram transferências embrionárias e três apresentaram resultado positivo do β hCG, todas dos grupos experimentais. CONCLUSÕES: As intervenções propostas são capazes de desencadear a emergência de uma onda folicular, permitindo a sincronização do estímulo ovariano com a emergência de uma onda. O estímulo ovariano sincronizado com a emergência de uma onda folicular resultou na produção de embriões viáveis.

Descritores: Fertilização *in vitro*; Indução da ovulação; Ovário/fisiologia; Fase lútea; Ondas foliculares; Ensaio clínico aleatório controlado

SUMMARY

Bianchi PHM. *Ovarian stimulation protocols synchronized with follicular wave emergence for in vitro fertilization* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

INTRODUCTION: Ovarian stimulation, an important step of *in vitro* fertilization treatments, relies on the understanding of ovarian physiology. Recently, a new model of human folliculogenesis has been suggested, based on waves of coordinated follicular development. In animal studies, it has been shown that ovarian stimulation synchronized with the emergence of a follicular wave results in better treatment outcomes. Ovarian stimulation protocols for in vitro fertilization in humans are not synchronized with wave emergence. Therefore, the objectives of this study were to investigate two strategies to control a follicular wave emergence (aspiration of the dominant follicle and hCG mediated ovulation induction) and to describe the effects of synchronizing the beginning of stimulation with the start of a follicular wave.

METHODS: Women with indications of *in vitro* fertilization due to tubal and/or male factor infertility were invited to participate in this controlled trial. Participants were randomized to the following groups: control, “hCG” and “aspiration”. Patients on the control group (n=6) were submitted to the flexible GnRH antagonist protocol starting recombinant FSH administration (150 IU/d) on the third day of the menstrual cycle. Women on the experimental groups underwent serial transvaginal sonography until a dominant follicle ≥ 15 mm was identified. In the “hCG” group (n=5) 250 μ g of recombinant hCG was administered; serial transvaginal sonography was resumed two days later. In the “aspiration” group (n=5) the dominant and subordinated follicles larger than 10mm were aspirated; serial transvaginal sonography was resumed one day later. When a follicular wave emergence was detected (increase in the number of follicles < 10 mm), patients were submitted to an ovarian stimulation protocol similar to the control group. Embryos were cryopreserved for future transfer due to endometrial asynchrony.

RESULTS: A follicular wave emerged one day after the dominant follicle aspiration or two days after the administration of recombinant hCG in all women. Total dose of gonadotropins administered, stimulation length, variation of serum estradiol during stimulation, variation in the number of small, medium and large follicles during stimulation, number of oocytes harvested, fertilization rates and the number of embryos with adequate and inadequate morphology were similar in the three groups. The largest follicle growth rate was inferior for women in both experimental groups until day 5 of stimulation, increasing thereafter. Serum progesterone levels were superior in both experimental groups between the 5th day and the end of stimulation. The presence of the corpus luteum did not influence mechanically the follicular dynamics nor the laboratory

performance of the ipsilateral oocytes. Eight patients have already been submitted to embryo transfers; three had a positive β hCG test, all from the experimental groups. **CONCLUSIONS:** Both interventions are able to induce a follicular wave emergence allowing the synchronization of ovarian stimulation. The synchronized ovarian stimulation resulted in the production of viable embryos.

Descriptors: Fertilization in vitro; Ovulation induction; Ovary/Physiology; Luteal phase; Follicular waves; Randomized controlled trial

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A estimulação ovariana com gonadotrofinas exógenas é uma etapa fundamental nos tratamentos de fertilização *in vitro* (FIV). A obtenção de maior quantidade de oócitos competentes, ou seja, capazes de serem fertilizados, compensa eventuais dificuldades laboratoriais e permite a avaliação e seleção dos embriões com maior chance de implantação, contribuindo de forma significativa para o aumento progressivo das taxas de gestação ^(1, 2).

A compreensão da fisiologia ovariana e dos fenômenos envolvidos com o desenvolvimento e maturação da unidade folículo oocitária é essencial para a elaboração dos protocolos de estímulo ovariano.

A unidade funcional do ovário é o folículo, que é formado durante a vida fetal a partir da migração das células germinativas primordiais (ovogônias) provenientes do saco vitelínico. Ao chegarem às cristas genitais e após breve período de multiplicação por mitose, as ovogônias iniciam a primeira divisão da meiose, que é interrompida na prófase dando origem ao oócito primário. Os oócitos primários são envolvidos por uma camada de células que dará origem a granulosa e por células que dão origem à teca (responsáveis pela síntese dos esteroides sexuais), formando em conjunto os folículos primordiais, que constituem a reserva folicular de cada mulher ^(3, 4).

A ativação do folículo primordial e o seu desenvolvimento inicial ocorrem por mecanismos ainda não completamente compreendidos. Acredita-se que este

processo seja controlado por fatores autócrinos e parácrinos ovarianos ⁽⁵⁾. É apenas no estágio antral (terciário) que o folículo adquire os receptores para as gonadotrofinas, tornando-se ao mesmo tempo sensível e dependente dos efeitos tróficos do hormônio folículo estimulante (FSH), que controla as fases finais do desenvolvimento folicular até o estágio pré-ovulatório (quaternário) ⁽⁶⁾.

Com o amadurecimento do eixo hipotálamo-hipófise-ovário na puberdade, inicia-se a secreção cíclica das gonadotrofinas, que orquestram as modificações morfológicas e funcionais cíclicas no sistema reprodutor feminino durante a menacme. Destas, a menstruação é um evento físico marcante e, como tal, tem sido utilizado como ponto de referência nos estudos, isto é, as observações acerca da fisiologia reprodutiva feminina têm sido feitas no intervalo entre duas menstruações, estabelecendo-se o ciclo menstrual que inicia no primeiro dia do sangramento vaginal e termina no dia anterior ao próximo ⁽⁷⁾.

O modelo atual de folículo-logênese ovariana humana baseia-se em observações histológicas de ovários removidos cirurgicamente e em determinações hormonais durante o ciclo menstrual (intervalo entre duas menstruações), e também é complementado por observações realizadas em animais ^(8, 9). De acordo com este modelo, aparentemente os folículos primordiais são constante e aleatoriamente ativados, e iniciam o seu desenvolvimento até o estágio terciário. Aqueles que estiverem no estágio antral no momento em que há elevação dos níveis de FSH desenvolvem-se, enquanto os demais sofrem atresia (Figura 1) ^(5, 8, 9). Este ambiente hormonal, favorável ao crescimento folicular final, ocorre apenas em um momento durante o intervalo intermenstrual, logo após a menstruação, e, por este motivo,

chamado fase folicular. Este modelo recebeu também a denominação “Teoria do Momento Oportuno”⁽¹⁰⁾.

Figura 1 - Desenvolvimento dos folículos antrais de acordo com a “Teoria do Momento Oportuno” em um intervalo interovulatório. OV: ovulação. M: menstruação. Fonte: Baerwald et al. (2012)⁽⁹⁾

A degeneração do corpo lúteo (luteólise), formado no ciclo anterior após a ovulação do folículo dominante, se associa à redução dos níveis séricos de progesterona e estradiol e promove a descamação endometrial. A retroalimentação negativa que estes esteroides exercem sobre o hipotálamo e a hipófise é reduzida, com consequente elevação do FSH que promove o crescimento de um conjunto de folículos antrais (recrutamento) na fase folicular⁽⁶⁾. Com a ovulação e a formação do corpo lúteo (fase lútea), há redução dos níveis séricos de FSH e o ambiente hormonal torna-se desfavorável à evolução dos folículos terciários⁽⁹⁾.

O desenvolvimento da ultrassonografia acrescentou uma nova dimensão ao estudo da foliculogênese, e permitiu que fosse possível avaliar a dinâmica das modificações morfológicas cíclicas ovarianas. Ao aplicar esta tecnologia em estudos com animais domésticos, foi proposto um novo modelo de dinâmica folicular. Ginther⁽¹¹⁾ verificou que, em equinos, os folículos desenvolvem-se em coortes que crescem sincronicamente a intervalos regulares, que ocorrem mais de uma vez durante o período interovulatório. A esses conjuntos ou coortes chamou de ondas foliculares, e o início de uma onda chamou de “emergência” da onda. Tal fenômeno vem sendo observado em diversas espécies de animais mono-ovulatórios, como os bovinos, caprinos e, mais recentemente, nos seres humanos⁽¹²⁻¹⁵⁾.

Mudando o paradigma de observação do tradicional intervalo intermenstrual para o interovulatório, Angela Baerwald et al.^(13, 14) avaliaram, por meio de ultrassom transvaginal de alta definição, 50 mulheres eutróficas voluntárias. Observaram que, entre duas ovulações consecutivas, 68% das mulheres apresentaram duas ondas de crescimento folicular e as demais (32%), três ondas, demonstrando, assim, que o recrutamento folicular em seres humanos também ocorre mais de uma vez durante o ciclo (Figura 2). A primeira onda inicia-se no dia da ovulação e seus folículos não atingem o estado pré-ovulatório, e entram em atresia (onda anovulatória). Naquelas mulheres que apresentam duas ondas foliculares, a segunda onda se inicia, em geral, 14 dias após a ovulação, isto é, por volta do início da menstruação e termina quando um dos folículos atinge o estágio pré-ovulatório e se rompe (onda ovulatória). Em mulheres com três ondas foliculares a segunda onda é anovulatória e começa em média 12 dias após a ovulação, portanto antes do início da menstruação. A terceira onda se inicia seis dias depois da segunda, por volta do

quarto dia do ciclo menstrual, e finda/termina com a ovulação. A emergência de cada onda é precedida pelo aumento súbito do nível sérico de FSH (pico de FSH) ^(13, 15) que permite o crescimento inicial sincrônico, com igual velocidade, dos folículos que a compõem.

Figura 2 - Dinâmica folicular humana segundo a teoria das ondas foliculares. 0: dia da ovulação; A: Mulheres com duas ondas foliculares; B: mulheres com três ondas foliculares. Fonte: de Mello Bianchi et al. (2010)⁽¹⁶⁾.

A sensibilidade de cada folículo ao FSH é diferente, portanto sua concentração sérica deve ultrapassar certo limiar (limiar estimulatório) para que um conjunto de folículos antrais cresça de forma sincrônica. Com o crescimento, os folículos produzem estradiol e inibina que exercem retroalimentação negativa progressiva sobre a hipófise de modo que a concentração de FSH sérico decresça ^(6, 17). A redução do FSH, abaixo do limiar estimulatório, está associada ao fenômeno de seleção e dominância. Quando um folículo, chamado de dominante, continua seu crescimento para eventualmente tornar-se ovulatório, os demais, chamados de subordinados, param de crescer e entram em atresia. Aparentemente a dominância depende de uma maior sensibilidade do folículo dominante a concentrações progressivamente menores de FSH e da maior expressão de receptores para o hormônio luteinizante (LH), de forma que, quando caem os níveis séricos de FSH os folículos sensíveis ao LH continuam a crescer com baixas concentrações daquele hormônio e tornam-se dominantes ^(6, 17, 18). Diferentemente do observado em bovinos, em humanos a maioria das ondas foliculares anovulatórias não exhibe o fenômeno de seleção, isto é, não surge um folículo dominante ^(13, 14).

A estimulação ovariana com gonadotrofinas exógenas tem como objetivo evitar o fenômeno de seleção e dominância. A manutenção dos níveis de FSH acima do limiar estimulatório por maior tempo, permite o crescimento de alguns dos folículos subordinados ⁽⁶⁾. Os protocolos utilizados atualmente para fertilização *in vitro*, apoiados na “Teoria do Momento Oportuno”, preconizam o início das gonadotrofinas exógenas na fase folicular, no terceiro dia do ciclo menstrual. O objetivo é aproveitar este momento favorável ao crescimento folicular, que ocorre apenas uma vez durante o ciclo, após a menstruação.

Os tratamentos de reprodução assistida em animais domésticos, fundamentados na teoria das ondas foliculares, têm como objetivo a produção de uma quantidade maior de animais com alto valor, principalmente em bovinos ⁽¹⁸⁾. Foi constatado que o início da estimulação em sincronia com o início de uma onda folicular produz resultados melhores, com incremento na quantidade e qualidade dos oócitos obtidos ^(19, 20). Como a primeira onda folicular emerge no dia da ovulação, uma opção é detectar a ovulação e iniciar a estimulação ovariana neste dia ⁽²⁰⁾. Entretanto, a monitorização com intuito de detectar a emergência natural de uma onda é muito trabalhosa e onerosa quando se lida com rebanhos, por isto são utilizados métodos para controlar a emergência e sincronizar a estimulação ovariana ⁽²¹⁾. Sabe-se que a eliminação do folículo dominante provoca o surgimento de uma onda, portanto os dois métodos mais comumente utilizados em reprodução animal assistida, para controlar a emergência de ondas foliculares, são a aspiração do folículo dominante ou a aplicação de doses altas de estradiol e progesterona por curto período em qualquer momento do ciclo estral, o que provoca atresia do folículo dominante e o surgimento de nova coorte folicular ⁽²¹⁻²³⁾.

Aplicando o conhecimento das ondas foliculares aos protocolos atuais de estimulação ovariana em humanos, que tem início com administração de drogas entre o segundo e o terceiro dia do ciclo menstrual, nota-se que em grande parte das vezes o início do tratamento não ocorre em sincronia com a emergência de uma nova onda folicular. Tal fato pode justificar certa assimetria de crescimento folicular, comumente observada em estimulação ovariana para a FIV ⁽¹⁶⁾.

O surgimento teoria sobre a foliculogênese ⁽¹³⁾ permite o desenvolvimento de novos protocolos de estimulação ovariana, com melhorias potenciais no resultado dos tratamentos de reprodução humana assistida ⁽¹⁶⁾. Baerwald et al.⁽²⁴⁾ avaliaram o desempenho da estimulação ovariana sincronizada com a emergência de uma onda folicular e observaram benefícios para as más respondedoras à estimulação prévia. Entretanto, no estudo de Baerwald et al.⁽²⁴⁾ não houve tentativa de controle da emergência da onda; a sincronização fundamentou-se nos resultados do estudo anterior dos mesmos autores ⁽¹³⁾, pressupondo a emergência natural de uma onda folicular por volta do primeiro dia do ciclo menstrual.

No presente estudo propôs-se controlar a emergência de ondas foliculares através da aspiração do folículo dominante ou da indução da ovulação com gonadotrofina coriônica humana - hCG. Buscou-se avaliar a eficácia dessas duas intervenções e, ainda, descrever a estimulação ovariana sincronizada com a onda folicular por elas desencadeada, comparando a dinâmica folicular e os resultados desse tratamento com os de protocolo convencionalmente utilizado.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver protocolo de estimulação ovariana humana fundamentado no conceito de ondas foliculares.

2.2 Específicos

1. Verificar se a aplicação de gonadotrofina coriônica humana (hCG) recombinante quando o folículo dominante apresentar diâmetro $\geq 15\text{mm}$ é capaz de desencadear a ovulação e induzir a emergência de uma nova onda folicular;
2. Verificar se a aspiração do folículo dominante é capaz de induzir a emergência de uma nova onda folicular;
3. Descrever a dinâmica de desenvolvimento folicular, a duração da estimulação ovariana, a dose total de gonadotrofinas empregada, os níveis séricos de estradiol e de progesterona, a velocidade de crescimento folicular, o número de óocitos maduros obtidos e a qualidade embrionária em mulheres que realizaram estimulação ovariana baseada no conceito de ondas foliculares comparado a pacientes que receberam para estimulação ovariana, o protocolo flexível do antagonista do GnRH, fundamentado na teoria de crescimento folicular único durante o ciclo.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram convidadas a participar do estudo mulheres com infertilidade conjugal, que foram acompanhadas no Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CRH-HCFMUSP).

Critérios de inclusão:

- a) idade ≤ 35 anos;
- b) índice de massa corpórea (IMC) entre 19kg/m^2 e 30kg/m^2 ;
- c) fator tubário ou masculino de infertilidade com indicação de fertilização *in vitro*;
- d) útero normal de acordo com ultrassonografia e/ou histeroscopia recentes (menos que 6 meses, anteriores ao tratamento);
- e) dosagens séricas de FSH no segundo ou terceiro dia do ciclo menstrual $\leq 10\text{mUI/mL}$ e de estradiol $\leq 80\text{pg/mL}$;
- f) contagem de folículos antrais à ultrassonografia transvaginal nos primeiros cinco dias do ciclo menstrual entre 10 e 25;
- g) parceiro com pelo menos 5 milhões de espermatozoides móveis ao espermograma e com morfologia estrita, de acordo com critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) ⁽²⁵⁾, $>1\%$;

Critérios de não inclusão:

- a) fator ovulatório de infertilidade;
- b) não identificação de um ou ambos os ovários à ultrassonografia transvaginal;
- c) endocrinopatias não tratadas;
- d) tabagismo;
- e) uso de drogas recreativas;
- f) endometriose estágios III e IV;
- g) fator masculino grave.

Este estudo teve a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP sob o protocolo de número 1099/09 (Apêndice 1). Foi também registrado no *Clinical Trials* como estudo prospectivo randomizado sob o número: NCT 01668056.

Após detalhado esclarecimento sobre a pesquisa, incluindo seus riscos e possíveis benefícios, as mulheres foram incluídas no estudo mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2).

3.2 Métodos

3.2.1 Alocação

As mulheres que preencheram os critérios de inclusão foram separadas em três grupos (controle, experimental 1 e experimental 2) por sequência numérica

aleatória gerada por computador. O pesquisador principal (PHMB) não teve acesso à lista de randomização. A alocação das pacientes foi feita pela enfermeira responsável pelo CRH-HCFMUSP de acordo com a sequência numérica. O pesquisador e as participantes trabalharam “às cegas” quando a alocação não foi possível por causa do caráter das intervenções e do seguimento.

Figura 3 – Fluxograma de randomização em bloco para os grupos controle, experimental 1 e 2 de pacientes que preencheram os critérios de inclusão

3.2.2 Estimulação ovariana

3.2.2.1 Grupo Controle

As pacientes alocadas no grupo controle (n=6) realizaram tratamento de fertilização *in vitro* com o protocolo do antagonista do GnRH de forma flexível. Quando necessário, para programar o início do tratamento de forma a evitar que algum procedimento (aspiração folicular ou transferência embrionária) ocorresse no final de semana, algumas pacientes utilizaram contraceptivo hormonal oral (0,03mg de etinil estradiol e 0,15mg de levonorgestrel), de acordo com as normas assistenciais do CRH-HCFMUSP. No segundo dia do ciclo menstrual seguinte realizaram ultrassom transvaginal e dosagens séricas de FSH, LH, estradiol e progesterona. Quando a ecografia demonstrou espessura endometrial ≤ 5 mm e não foram identificados cistos ovarianos >10 mm, a estimulação ovariana teve início no terceiro dia do ciclo menstrual. Foi empregado o FSH recombinante (FSHr) (alfa folitrofina - Gonal F[®], Merck-Serono, São Paulo, Brasil) em dose diária de 150UI administrada por via subcutânea (Figura 3).

O desenvolvimento e crescimento foliculares bem como o desenvolvimento endometrial foram monitorizados por ultrassonografia transvaginal e dosagens sanguíneas de estradiol e progesterona em visitas realizadas cinco dias após o início da aplicação da medicação e a cada dois dias a partir deste momento, até atingir os critérios para aplicação do hCG recombinante. A dose inicial de FSHr foi aumentada em 75UI ao dia se no quinto dia do estímulo a quantidade de folículos fosse <4 ou se o maior folículo tivesse diâmetro <10 mm. Reduções na dose inicial de FSHr da ordem de 75UI ao dia foram efetuadas se no quinto dia de estímulo houvesse mais do

que 15 folículos em crescimento. Quando o maior folículo atingiu 13-14mm de diâmetro foi iniciada a administração diária do antagonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa; acetato de cetrorelix, Cetrotide[®], Merck-Serono, São Paulo, Brasil) na dose de 0,25mg por via subcutânea diariamente pela manhã, até a aplicação do hCGr. Quando pelo menos dois folículos atingiram diâmetro ≥ 18 mm, 250 μ g de hCG recombinante (choriogonadotrofina alfa, Ovidrel[®], Merck-Serono, São Paulo, Brasil) foram administrados por via subcutânea e 35-36 horas depois os oócitos foram coletados, como detalhado nos subtópicos abaixo. No dia da administração do hCG os níveis séricos de estradiol e progesterona foram mensurados também ⁽²⁶⁾.

3.2.2.2 Grupos Experimentais

As pacientes dos grupos experimentais 1 e 2 foram submetidas à ultrassonografia transvaginal a partir décimo dia de um ciclo menstrual espontâneo. Quando necessário, para programar o início do tratamento de forma a evitar que algum procedimento (aspiração folicular ou transferência embrionária) ocorresse no final de semana, algumas pacientes dos grupos experimentais 1 e 2 também utilizaram contraceptivo hormonal oral (0,03mg de etinil estradiol e 0,15mg de levonorgestrel) no mês anterior ao tratamento.

As diferenças entre os dois grupos ocorreram, quando foi identificado um folículo dominante, com diâmetro ≥ 15 mm. As pacientes do grupo experimental 1 (denominado “hCG”; n=5) receberam 250 μ g de hCGr recombinante (choriogonadotrofina alfa, Ovidrel[®], Merck-Serono, São Paulo, Brasil) e depois de

dois dias submeteram-se a ultrassom transvaginal e determinação sérica de progesterona, estradiol e β hCG para verificar se houve ovulação (definida por redução do diâmetro do folículo dominante e ou aumento do volume de líquido livre no recesso peritoneal retrouterino). No grupo experimental 2 (denominado "aspiração"; n=5), o diâmetro do folículo dominante ≥ 15 mm e os subordinados diâmetro ≥ 15 mm e >10 mm, respectivamente, foram aspirados por punção vaginal guiada por ultrassom e sob sedação. As pacientes de ambos os grupos submeteram-se às ultrassonografias transvaginais diárias a partir do segundo dia após a administração de hCG ou do primeiro dia após a aspiração folicular, até que um novo conjunto de folículos com diâmetro <10 mm fosse identificado, caracterizando a emergência de uma nova onda folicular de acordo com os critérios de Baerwald et al.⁽¹⁴⁾. Níveis séricos de FSH, LH, estradiol e progesterona foram mensurados e foi iniciada a estimulação ovariana como descrita acima para o grupo controle (Figura 3).

3.2.3 Coleta dos oócitos e fertilização *in vitro*

A coleta dos oócitos foi realizada 35-36 horas após a administração do hCGr mediante punção vaginal guiada por ultrassom. Este procedimento foi realizado em ambiente cirúrgico. As pacientes receberam sedação, oxigênio-terapia, monitoramento eletrônico dos sinais vitais e assistência por anestesista durante todo o procedimento que durou aproximadamente de 10 a 30 minutos. Após o procedimento, as pacientes recuperaram-se em ambiente pós-operatório durante o período de cerca de 60-120 minutos.

A identificação dos oócitos, preparação e manuseio dos gametas, injeção intracitoplasmática de um único espermatozoide no óvulo (ICSI), o meio de cultura para FIV e o manuseio dos embriões foram realizados conforme descrito previamente ⁽²⁶⁾. Os oócitos são considerados maduros quando completaram a primeira divisão da meiose (extrusão do primeiro corpúsculo polar) e estão na metáfase da segunda divisão (metáfase II ou MII), aptos para a fertilização.

Os oócitos provenientes de cada ovário foram separados em placas de cultivo diferentes e identificados para posterior avaliação da influência da presença do corpo lúteo na qualidade dos óvulos/embriões obtidos neste ovário.

3.2.4 Classificação embrionária e vitrificação

A classificação embrionária foi realizada no terceiro dia de desenvolvimento *in vitro*, conforme normas internacionalmente estabelecidas ⁽²⁷⁾. Os critérios avaliados foram: o número de células, a regularidade dos blastômeros, a fragmentação e a presença/ausência de multinucleação. Embriões com excelente morfologia são aqueles que apresentam oito células simétricas, com menos de 10% de fragmentação e ausência de blastômeros multinucleados. Embriões de morfologia inadequada, nesta fase, são aqueles com atraso de desenvolvimento (seis células ou menos), irregularidade celular, mais de 25% de fragmentação ou blastômeros multinucleados ⁽²⁷⁾.

A estimulação ovariana nos grupos experimentais produz assincronia entre o desenvolvimento oocitário e o endometrial, pois é feita na fase lútea, o que poderia interferir negativamente com as taxas de gravidez. Para eliminar tal efeito todos os

embriões, tanto no grupo controle como nos experimentais, foram vitrificados no terceiro dia de desenvolvimento para transferência após preparo uterino, como descrito abaixo. Atualmente a criopreservação de embriões seguindo a técnica de vitrificação possibilita maiores taxas de sobrevivência após aquecimento ⁽²⁸⁾ e taxas de gravidez expressivas, em torno de 30% ⁽²⁹⁾ para transferências de embriões no terceiro dia de desenvolvimento e até 85% ⁽³⁰⁾ para blastocistos, comparáveis ou até superiores às taxas obtidas com embriões “a fresco”. A criopreservação/aquecimento de embriões seguiu as determinações do fabricante do *kit* (*Irvine Scientific*).

3.2.5 Preparação do útero para transferência de embriões vitrificados, aquecimento embrionário e transferência uterina

No ciclo menstrual que se seguiu à aspiração folicular para coleta de oócitos, as pacientes dos três grupos não sofreram qualquer tipo de tratamento/intervenção hormonal. No segundo ou terceiro dia do ciclo menstrual seguinte, voltaram a realizar ultrassom transvaginal e dosagens séricas de estradiol, progesterona e prolactina. Quando a ecografia demonstrou espessura endometrial $\leq 5\text{mm}$ e não foram identificados cistos ovarianos com diâmetro $>15\text{mm}$ iniciou-se a administração diária de valerato de estradiol na dose de 4mg por via oral (2mg a cada 12 horas). O desenvolvimento endometrial foi monitorizado por meio de ultrassom seriado, de acordo com o protocolo assistencial do Centro de Reprodução Humana da Disciplina de Ginecologia do HCFMUSP. Quando a espessura endometrial atingiu 8mm ou mais, após pelo menos 14 dias de estrogênioterapia, as pacientes receberam também 200mg de progesterona natural micronizada, por via vaginal, de 8 em 8 horas e a transferência embrionária ocorreu 4 dias depois.

No dia da transferência, os embriões foram aquecidos, reclassificados e sua viabilidade avaliada ⁽³¹⁾. Dois embriões foram transferidos para cada paciente por meio de cateter de Sydney (K-jets 7019-SIVF; Cook OB/GYN, Indianapolis, EUA). Os eventuais embriões excedentes permaneceram vitrificados.

A ocorrência de gestação foi avaliada 12 dias após a transferência embrionária por dosagem sérica da fração beta do hCG. Quando o resultado do teste foi positivo, a ultrassonografia transvaginal foi realizada 14 dias depois, para avaliação da quantidade e da posição dos sacos gestacionais, bem como a presença de batimentos cardíacos embrionários. No caso de insucesso do tratamento, as pacientes foram submetidas à transferência dos eventuais embriões excedentes vitrificados como descrito acima. Quando não havia mais nenhum embrião vitrificado, as pacientes saíram do estudo e foram encaminhadas para realização da fertilização *in vitro*, conforme protocolo convencional utilizado no CRH-HCFMUSP, de acordo com o estabelecido no Termo de Consentimento Esclarecido (Apêndice 1).

3.2.6 Determinações hormonais

As determinações séricas de FSH, LH, estradiol, progesterona, e da fração beta do hCG foram realizadas pelo Laboratório Central do HCFMUSP utilizando a técnica imunofluorométrica automatizada (AutoDELFIA) de acordo com as instruções do fabricante do *kit*.

3.2.7 Cálculo amostral

Por se tratar de estudo inédito sem referências ou dados prévios que permitam o cálculo do tamanho amostral, o mesmo foi um piloto com cinco pacientes em cada grupo experimental e seis pacientes no grupo controle. Os dados gerados possibilitarão calcular o tamanho da amostra com maior precisão em estudos futuros.

3.2.8 Análise Estatística

As variáveis quantitativas transversais (características basais e desempenho dos protocolos) foram descritas com o uso de medidas resumo (média e desvio padrão) para cada grupo. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos e o teste de Mann-Whitney para comparações apenas entre dois grupos⁽³²⁾. As medidas qualitativas também foram descritas segundo grupos; foi verificada a existência de associação entre os grupos com o teste da razão de verossimilhanças ou o teste exato de Fisher⁽³²⁾.

As medidas de avaliação da dinâmica folicular (velocidade de crescimento, tamanho dos folículos, níveis de estradiol e de progesterona) foram descritas com uso de medidas resumo (médias e desvio padrão) em cada um dos grupos e momentos de avaliação. As comparações entre os grupos e os momentos foram feitas por análises de variância (ANOVA) com medidas repetidas e dois fatores⁽³³⁾. Os parâmetros que apresentaram diferenças na comparação entre os grupos e momentos dois a dois foram então avaliados pelas comparações múltiplas de Tukey⁽³³⁾, ou pelas comparações múltiplas de Bonferroni⁽³³⁾. Os resultados foram ilustrados com uso de gráficos de perfis médios com os respectivos erros padrões.

As medidas de avaliação dos folículos nos dois grupos experimentais foram descritas segundo os grupos e o momento da intervenção, e segundo os grupos e o lado do corpo lúteo. As variáveis foram, então, comparadas com a aplicação da ANOVA com dois fatores e medidas repetidas.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características basais dos grupos

A idade das mulheres e de seus parceiros, características do ciclo menstrual (intervalo intermenstrual e duração do fluxo), tempo de infertilidade, medidas de reserva folicular ovariana (FSH e estradiol do terceiro dia do ciclo menstrual e a contagem de folículos antrais), características seminais (concentração e motilidade espermáticas e a proporção de espermatozoides de morfologia normal segundo os critérios da OMS ⁽²⁵⁾), fatores de infertilidade, a proporção de casais com infertilidade primária e secundária, bem como a proporção de mulheres que usaram anticoncepcional hormonal oral (ACO) antes do tratamento, o tempo de uso do ACO e o intervalo entre o término do ACO e o início do estímulo ovariano estão apresentados na Tabela 1 (variáveis quantitativas e qualitativas).

Tabela 1 – Características basais dos grupos com variáveis quantitativas e qualitativas.

VARIÁVEL	Grupo			p
	Controle média ± dp	“hCG” média ± dp	”aspiração” média ± dp	
Quantitativas				
Idade da mulher (anos)	29 ± 2,1	33 ± 2,2	31 ± 3,1	0,039*
Idade do homem (anos)	30,8 ± 3,4	40 ± 8,5	30 ± 4,7	0,089
Tempo de infertilidade (meses)	74 ± 28,8	91,2 ± 52	62,4 ± 27,4	0,628
Intervalo intermenstrual (dias)	29,3 ± 2,9	27,4 ± 3,7	28,8 ± 1,1	0,923
Fluxo menstrual (dias)	4,7 ± 1	4,6 ± 1,1	4,6 ± 0,5	0,963
FSH D3 (mUI/mL)	5,7 ± 1	5,5 ± 2,3	6,2 ± 0,4	0,847
Estradiol D3 (pg/mL)	34,2 ± 15,1	34,4 ± 16,2	34,2 ± 6,1	0,985
Contagem de folículos antrais	14,2 ± 6,5	12,6 ±3,2	12,6 ± 2,6	0,986
Concentração espermática (milhões/mL)	64,4 ± 33,2	99,8 ± 153,9	61,2 ± 61,7	0,833
Motilidade espermática progressiva (%)	44,3 ± 29	12,6 ± 11,3	33,2 ± 31,5	0,143
Espermatozóides normais (%)	2,2 ± 3,4	1 ± 1,7	2,2 ± 1,3	0,203
Tempo de uso de ACO (dias)	17,8 ± 2,2	20 ± 3,5	26 ± 12,3	0,327
Intervalo ACO – menstruação (dias)	4,2 ± 0,4	3,33 ± 1,2	3,6 ± 0,6	0,264
Intervalo ACO – início do estímulo (dias)	7,2 ± 0,4	17,6 ± 2,8	17 ± 1,7	0,016**
dp = desvio padrão; p = Teste de Kruskal–Wallis para comparação das médias entre os três grupos; * = média de idade maior no grupo “hCG”; ** = intervalo ACO – início do estímulo menos no grupo controle				
VARIÁVEL	Controle (%)	“hCG” (%)	”aspiração” (%)	p
Qualitativa				
Proporção de casais com infertilidade primária	50	60	100	0,845
Proporção de casais com infertilidade secundária	50	40	0	
Proporção de casais com fator tubário de infertilidade	50	20	40	
Proporção de casais com fator masculino de infertilidade	16,7	40	20	
Proporção de casais com fator tubário e masculino de infertilidade	33,3	40	40	0,604
Proporção de mulheres que usaram ACO antes do estímulo	83,3	60	60	
Proporção de mulheres que não usaram ACO antes do estímulo	16,7	40	40	

p = Razão de verossimilhanças para comparação das diferenças de proporções; ACO = anticoncepcional hormonal oral

Houve diferença significativa entre as médias de idade das mulheres, e as mais altas foram do grupo “hCG” (33±2,2 anos) do que nos outros grupos. Também

foi estatisticamente significativa a diferença entre o término do ACO e o início do estímulo ovariano, que foi menor no grupo controle ($7,2 \pm 0,4$ dias).

Os grupos foram semelhantes quanto: as medidas de reserva folicular ovariana, as características do ciclo menstrual, a distribuição dos fatores de infertilidade (tubário, masculino e tubário associado a masculino), e, o intervalo entre o término do ACO e o início da menstruação.

Houve diferença, porém, estatisticamente não significativa: entre as médias de idade dos parceiros - maior no grupo “hCG” do que nos outros dois; o tempo de infertilidade - maior no grupo “hCG”; e, a concentração espermática - maior no grupo “hCG”; a proporção de espermatozoides com motilidade progressiva - maior no grupo controle; a proporção de casais com infertilidade primária e secundária em cada grupo, bem como a proporção de pacientes que usaram ACO antes do tratamento - maior no grupo controle; e, o tempo de uso de ACO - maior no grupo “aspiração”.

4.2 Efeito das intervenções (aspiração do folículo dominante ou aplicação de hCG) nos grupos experimentais

A Tabela 2 apresenta a quantidade de folículos com diâmetro $<10\text{mm}$, os níveis séricos de FSH, LH, estradiol e progesterona no dia das intervenções e na primeira avaliação, realizada no dia seguinte à aspiração do folículo dominante e dos subordinados com diâmetro $>10\text{mm}$ (grupo “aspiração”) ou dois dias após a aplicação de hCG (grupo “hCG”).

Tabela 2 - Efeito das intervenções (aspiração do dominante ou aplicação do hCG) na quantidade de folículos com diâmetro <10mm e nos níveis séricos de FSH, LH, estradiol e progesterona

VARIÁVEL	“hCG”		”aspiração”		p
	No dia da intervenção (média±dp)	Depois da intervenção (dois dias) (média±dp)	No dia da intervenção (média±dp)	Depois da intervenção (um dia) (média±dp)	
Quantidade de folículos com diâmetro <10mm	8,8 ± 4,8	15,8 ± 7,2	11,6 ± 3,2	16,4 ± 4,2	< 0,001*
FSH (mUI/mL)	5,3 ± 1,9	8,9 ± 4,8	6,4 ± 3,2	8,4 ± 3,8	0,649
LH (mUI/mL)	8,6 ± 6,2	19,2 ± 12,4	14,5 ± 15,9	16,6 ± 13	0,517
Estradiol (pg/mL)	160 ± 120	75 ± 42	147 ± 55	103 ± 23	0,478
Progesterona (ng/mL)	0,4 ± 0,3	0,7 ± 0,6	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,4	0,937

dp = desvio padrão; p = Resultados do teste ANOVA; * Aumento significativo da quantidade de folículos com diâmetro <10mm após as intervenções; N = quantidade de folículos; FSH = hormônio folículo estimulante; LH = hormônio luteinizante

Ambas as intervenções resultaram no surgimento de um novo conjunto de folículos com diâmetro <10mm, como observado pelo aumento significativo da quantidade destes folículos após as intervenções em cada grupo experimental (Figura 4), caracterizando a emergência de uma onda folicular. Todas as pacientes do grupo “hCG” apresentaram a emergência de uma onda folicular dois dias após a intervenção. No grupo ”aspiração”, todas as pacientes apresentaram a emergência de uma onda folicular um dia após a intervenção.

Figura 4 - Variação da quantidade de folículos com diâmetro <10mm nos grupos experimentais, antes e depois das intervenções. (A) Grupo “hCG” (média $\pm$ erro padrão); (B) Grupo “aspiração” (média $\pm$ erro padrão)

A quantidade de folículos com diâmetro <10mm, antes das intervenções, foi semelhante no grupo “aspiração” e no grupo “hCG”; o mesmo ocorreu na avaliação após as intervenções ($p=0,591$; ANOVA).

Observou-se aumento dos níveis séricos médios de FSH e redução dos níveis séricos médios de estradiol, em ambos os grupos, após as intervenções. Entretanto, tais variações hormonais não foram estatisticamente significativas (Tabela 2). Também não houve variação hormonal significativa na comparação entre os dois grupos experimentais, independente do momento avaliado. Os níveis séricos médios de FSH e de estradiol foram semelhantes entre o grupo "aspiração" e o grupo "hCG" antes das intervenções, o mesmo foi observado após as intervenções ($p=0,649$ para FSH e $p=0,478$ para estradiol).

Da mesma forma, a elevação dos níveis séricos médios de LH observada em ambos os grupos não foi estatisticamente significativa ($p=0,517$). Cabe ressaltar, que no dia da intervenção, uma paciente em cada grupo apresentava elevação natural dos níveis séricos de LH, associado à presença de um folículo dominante com diâmetro igual a 16mm (grupo "aspiração" – no décimo primeiro dia do ciclo menstrual) e com diâmetro igual a 19mm (grupo "hCG" – no décimo dia do ciclo menstrual). Nestas duas pacientes os valores de LH continuaram a subir após as intervenções, o que pode ter influenciado na média dos grupos.

Os níveis séricos médios de progesterona permaneceram estáveis e abaixo de 1ng/mL, antes e depois das intervenções, em ambos os grupos. Também não houve diferença entre os grupos quanto aos níveis deste hormônio independentemente do momento avaliado (Tabela 2).

Não houve diferença entre os grupos experimentais quanto ao momento da intervenção em relação ao ciclo menstrual e quanto ao número de folículos com diâmetro <10mm no início da onda folicular (Tabela 3). Não houve, também,

diferença estatisticamente significativa entre o diâmetro médio dos folículos na emergência da onda folicular quando comparados os grupos “hCG” ($5,1 \pm 0,7\text{mm}$) e “aspiração” ($5,1 \pm 0,3\text{mm}$). O diâmetro médio dos folículos na emergência da onda folicular (grupos experimentais) foi semelhante ao tamanho médio dos folículos do grupo controle no início do estímulo ($4,7 \pm 0,4\text{mm}$) ($p=0,54$).

Tabela 3 - Momento da intervenção, quantidade de folículos com diâmetro $<10\text{mm}$ e diâmetro médio destes folículos no início da onda folicular em cada grupo experimental

VARIÁVEL	Grupo “hCG” (média $\pm$ dp)	Grupo “aspiração” (média $\pm$ dp)	p
Dia do ciclo menstrual no momento da intervenção	$11 \pm 3,5$	$12 \pm 1,6$	0,196
Quantidade de folículos $\varnothing < 10\text{mm}$ no início da onda folicular	$15,8 \pm 7,2$	$16,4 \pm 4,2$	0,753
Diâmetro médio dos folículos na emergência da onda (mm)	$5,1 \pm 0,7$	$5,1 \pm 0,3$	0,932

dp= desvio padrão; p = teste de Mann-Whitney

4.3 Desempenho dos protocolos e dinâmica folicular durante a estimulação ovariana

A dose total média de gonadotrofina exógena utilizada para a estimulação ovariana foi superior nos grupos experimentais em relação ao grupo controle (Tabela 4), apesar desta diferença não ter sido estatisticamente significativa. Em concordância, três mulheres em cada um dos grupos experimentais necessitaram de aumento da dose diária de FSHr, enquanto nenhuma mulher do grupo controle

necessitou de aumento da dose da medicação. Uma mulher do grupo controle e uma mulher do grupo “hCG” necessitou de redução da dose diária de FSHr, enquanto nenhuma paciente do grupo “aspiração” apresentou redução de dose.

Tabela 4 - Características da estimulação ovariana

VARIÁVEL	Grupo			p
	Controle (média ± dp)	“hCG” (média ± dp)	”aspiração” (média ± dp)	
Dose total de FSH (UI)	1346 ± 219	1755 ± 617	1754 ± 332	0,195
Quantidade de dias de estímulo	9,3 ± 1	10 ± 1,6	10,4 ± 1,1	0,352
Quantidade de dias de uso do antagonista GnRH	4,5 ± 0,5	4,4 ± 0,5	5,2 ± 1,3	0,514
Estradiol ao final do estímulo (pg/mL)	1359 ± 1018	1482 ± 750	1171 ± 379	0,873
Progesterona ao final do estímulo (ng/mL)	0,9 ± 0,5	0,5 ± 0,2	4,6 ± 9	0,555
Velocidade média de crescimento do maior folículo (mm/dia)	1,6 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,225

dp = desvio padrão; p= teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os três grupos

Houve também diferença, embora estatisticamente não significativa, entre a duração do estímulo ovariano (superior em ambos os grupos experimentais), a quantidade de dias de uso do análogo antagonista do GnRH (superior no grupo “aspiração”) e nos níveis séricos médios de estradiol (menores no grupo “aspiração”) e progesterona (maiores no grupo “aspiração”) ao final da estimulação.

A duração da estimulação ovariana variou entre as mulheres, a quantidade de visitas para avaliação da resposta ovariana entre o início do tratamento e a

determinação do momento da aspiração folicular, também foi variável. Oito pacientes fizeram três visitas, cinco quatro visitas e três cinco visitas (Tabela 5). Como o número de avaliações não foi uniforme, para avaliação da dinâmica ovariana optou-se por normalizar os pontos de comparação entre os grupos em: início do estímulo, primeiro controle (quinto dia da estimulação), segundo controle (sétimo dia da estimulação) e dia do hCG final.

Tabela 5 - Quantidade de visitas para controle do tratamento após o início da gonadotrofina exógena até o término da estimulação ovariana

Quantidade de visitas	Grupo			Total
	Controle	“hCG”	”aspiração”	
Três	4	2	2	8
Quatro	2	2	1	5
Cinco	0	1	2	3

A Figura 5 mostra a variação dos níveis séricos médios de estradiol (5A) e de progesterona (5B) ao longo da estimulação ovariana. Em todos os grupos houve aumento progressivo e significativo dos níveis séricos de estradiol durante o estímulo ovariano ($p < 0,001$), sem diferenças entre os grupos quanto aos valores observados a cada momento ($p = 0,776$) e sua variação no tempo ($p = 0,923$).

$p < 0,001$ (Momento); $p = 0,923$ ("aspiração" * "hCG" * controle) e $p = 0,776$ (Momento*Grupo)

A

$p < 0,001$ (Momento); $p = 0,004$ ("aspiração" e "hCG" * controle); $p = 0,072$ ("aspiração" * "hCG")

B

Figura 5 - Variação dos níveis séricos de estradiol e de progesterona durante a estimulação ovariana de acordo com o grupo. (A) Estradiol (média±erro padrão); (B) Progesterona (média±erro padrão)

Apenas nos grupos experimentais houve aumento significativo dos níveis séricos de progesterona durante a estimulação ovariana ($p=0,004$), a partir do

primeiro controle ($p < 0,001$). No grupo “hCG”, o aumento de progesterona tendeu a ser mais pronunciado do que no grupo “aspiração” ($p=0,072$). Uma mulher do grupo “hCG” não apresentou elevação dos níveis séricos de progesterona acima de 1ng/mL durante toda a estimulação ovariana, enquanto todas as pacientes do grupo “aspiração” apresentaram elevação de tal magnitude. No grupo “controle” os níveis séricos médios de progesterona permaneceram estáveis e abaixo de 1ng/mL até o final do tratamento.

Níveis séricos de hCG permaneceram detectáveis até o nono dia de estímulo nas pacientes do grupo experimental 1. O período no qual os níveis séricos de progesterona permaneceram elevados neste grupo coincidiu com o período em que os níveis séricos de hCG permaneceram detectáveis (Figura 6).

Figura 6 - Variação dos níveis séricos médios de progesterona e de hCG no grupo “hCG”.

A velocidade média de crescimento do maior folículo foi semelhante entre os grupos, considerando-se todo o período do estímulo ovariano (Tabela 4). Entretanto, ao analisar o parâmetro, em cada momento de observação, notou-se que nos grupos experimentais o crescimento do maior folículo foi significativamente mais lento do que no grupo “controle” até a primeira avaliação (quinto dia de estímulo ovariano) ($p=0,002$) (Figura 7). A partir de então, houve aumento da velocidade de crescimento do maior folículo nos grupos experimentais, equiparando-se ao do grupo “controle” ($p=0,282$), que permaneceu estável durante todo o tratamento. Entre a segunda avaliação (sétimo dia de estímulo) e o final do tratamento, a taxa de crescimento do maior folículo foi significativamente maior no grupo “hCG” do que nos outros dois grupos ($p=0,02$).

D0-D5 = entre o início do estímulo e o primeiro controle
D5-D7 = entre o primeiro e o segundo controle
D7-DhCG = entre o segundo controle e o término do estímulo
* $p = 0,002$ (Momento); $p=0,008$ (Momento*Grupo)
** $p=0,02$ a favor do grupo “hCG”

Figura 7 - Velocidade de crescimento do maior folículo durante a estimulação ovariana

A velocidade de crescimento do maior folículo apresentou relação inversa com a dose total de gonadotrofinas utilizadas para a estimulação ovariana (Figura 8) ($p=0,04$).

Velocidade de crescimento do folículo com diâmetro maior = $1,967 - 0,000278 \times (\text{dose total de FSH recombinante utilizada no estímulo})$

Figura 8 - Relação entre a velocidade média de crescimento do maior folículo e a dose total de FSH recombinante utilizada durante o estímulo

Para avaliar a variação de diâmetro dos folículos durante a estimulação, os mesmos foram classificados em três categorias: folículos pequenos (diâmetro médio $\leq 12\text{mm}$), médios (diâmetro médio entre 13mm e 17mm) e grandes (diâmetro médio $\geq 18\text{mm}$).

A variação da quantidade de folículos pequenos, médios e grandes ao longo do tratamento está representada graficamente na Figura 9. Houve redução progressiva do número de folículos pequenos ($p<0,001$) e aumento da quantidade de folículos médios ($p<0,001$) e grandes ($p<0,001$) durante a estimulação, principalmente no término do tratamento. A quantidade de folículos pequenos, médios e grandes foi semelhante entre os grupos a cada momento avaliado ($p=0,322$ para os folículos pequenos; $p=0,553$ para os folículos médios; $p=0,416$ para os folículos grandes).

$p < 0,001$ (Momento); $p=0,263$ ("controle" x "aspiração" x "hCG"); $p=0,974$ (Momento x Grupo)

$p < 0,001$ (Momento); $p=0,641$ ("controle" x "aspiração" x "hCG"); $p=0,973$ (Momento x Grupo)

$p < 0,001$ (Momento); $p=0,187$ ("controle" x "aspiração" x "hCG"); $p=0,491$ (Momento x Grupo)

Figura 9 - Variação da quantidade de folículos pequenos, médios e grandes nos grupos ao longo da estimulação ovariana (médias±erro padrão)

4.4 Desempenho laboratorial

A quantidade total média de oócitos coletados e a quantidade total média de oócitos maduros foi semelhante nos três grupos (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados laboratoriais

VARIÁVEL	Grupo			p
	Controle (média ± dp)	“hCG” (média ± dp)	“aspiração” (média ± dp)	
Quantidade de oócitos coletados	9,3 ± 3,8	10,6 ± 1,7	10,0 ± 1,9	0,799
Taxa de recuperação*	0,57	0,63	0,56	0,652
Taxa de aproveitamento folicular**	0,5 ± 0,6	0,8 ± 0,4	0,6 ± 0,2	0,231
Quantidade de oócitos em metáfase II	8,8 ± 3,5	8,4 ± 1,3	9,6 ± 1,9	0,727
Taxa de fertilização	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,448
Quantidade de embriões produzidos	6,0 ± 3,1	6,8 ± 1,3	7,2 ± 1,4	0,443
Quantidade de embriões com morfologia excelente	1,2 ± 1,2	0,4 ± 0,5	0,8 ± 0,8	0,462
Quantidade de embriões com morfologia inadequada	1 ± 1,3	3,6 ± 2,9	2,4 ± 2,5	0,239

dp = desvio padrão; *Taxa de recuperação = quantidade de oócitos coletados em relação à quantidade de folículos no final do tratamento; **Taxa de aproveitamento folicular = quantidade de oócitos coletados em relação à quantidade de folículos no início do tratamento; p = teste de Kruskal-Wallis

A taxa de recuperação folicular foi semelhante entre os grupos. Entretanto, a proporção de oócitos colhidos em relação à quantidade de folículos no início do tratamento (taxa de aproveitamento dos folículos) foi maior nos grupos experimentais, apesar desta diferença não ter sido estatisticamente significativa.

A taxa média de fertilização e, conseqüentemente, a quantidade total média de embriões foi semelhante entre os grupos. Com relação à classificação dos embriões no terceiro dia de desenvolvimento *in vitro*, também não houve diferença

estatisticamente significativa entre os grupos com relação à quantidade média de embriões de morfologia excelente e de morfologia inadequada, mas notou-se uma tendência a uma maior proporção de embriões de morfologia excelente no grupo “controle” e uma maior proporção de embriões de morfologia inadequada no grupo “hCG”.

Até o momento foram realizadas transferências embrionárias em oito das dezesseis pacientes: quatro do grupo “hCG”, três do grupo “aspiração” e uma do grupo “controle”. Ocorreram três gestações, duas resultaram em abortamento precoce (ambas do grupo “aspiração”) e outra está em curso, no primeiro trimestre (grupo “hCG”). Tais resultados ainda não permitem a comparação estatística entre os grupos.

4.5 Avaliação da influência do corpo lúteo sobre o desempenho laboratorial

Não houve diferença na quantidade média de oócitos coletados, na taxa de aproveitamento folicular, na quantidade média de oócitos maduros, na taxa de fertilização dos oócitos e na quantidade de embriões de morfologia inadequada obtidos a partir de oócitos do lado do corpo lúteo/folículo dominante aspirado, em relação ao lado contralateral (Tabela 7). Também não houve diferença destas variáveis comparando-se os dois protocolos (“hCG” e “aspiração”) entre si.

A análise da quantidade de embriões de morfologia excelente, gerados a partir de oócitos provenientes do ovário com o corpo lúteo/folículo dominante

aspirado, sugeriu menor valor do que no lado contralateral ($p=0,05$), independentemente do grupo analisado.

Tabela 7 - Comparação entre o lado do corpo lúteo/folículo dominante aspirado e o lado contralateral.

VARIÁVEL	Grupo “hCG” (média $\pm$ dp)		Grupo “aspiração” (média $\pm$ p)		p
	Lado CL	Contralateral	Lado Asp.	Contralateral	
Quantidade de oócitos coletados	5 $\pm$ 2	5 $\pm$ 1,5	4 $\pm$ 3	6 $\pm$ 3	0,503
Quantidade de M II	4 $\pm$ 1,5	5 $\pm$ 1,6	4 $\pm$ 2,5	6 $\pm$ 3,2	0,838
Aproveitamento folicular	0,8 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,3	0,744
Taxa de fertilização	0,9 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,2	0,769
Quantidade de embriões com morfologia excelente	0 $\pm$ 0	0,4 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,5	0,05
Quantidade de embriões com morfologia inadequada	1,7 $\pm$ 1,5	1,7 $\pm$ 1,5	0,4 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 1,9	0,107

p = Resultados do teste ANOVA; dp = desvio padrão; CL = corpo lúteo; Asp. = aspirado

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A sincronização do início da estimulação ovariana com a emergência de uma onda folicular permite melhor aproveitamento dos folículos recrutados e a obtenção de oócitos de melhor qualidade em animais mono-ovulatórios^(19, 20). Desta forma, o controle do surgimento de uma onda folicular é etapa fundamental dos protocolos de estimulação ovariana em animais⁽³⁴⁻³⁶⁾.

Em humanos, o uso de gonadotrofinas exógenas para controle do desenvolvimento folicular baseia-se em modelo de foliculogênese distinto, no qual o recrutamento e desenvolvimento, até o estágio antral, ocorrem de maneira constante ao longo de todo o ciclo reprodutivo⁽⁹⁾.

A descrição do fenômeno de ondas foliculares em mulheres permitiu a reavaliação dos protocolos para estímulo ovariano empregados atualmente⁽¹⁶⁾. Nota-se que, na maioria das vezes, não há sincronização do início da aplicação de gonadotrofinas exógenas com o surgimento de uma onda folicular. Apenas em um estudo na literatura médica⁽²⁴⁾ cita-se os efeitos desta sincronização no tratamento de más respondedoras à estimulação prévia. Contudo, não houve tentativa do controle da emergência da onda. O início do estímulo foi programado para o primeiro dia do ciclo menstrual, momento no qual estima-se que ocorra a emergência natural. Portanto, torna-se relevante a pesquisa e o desenvolvimento de novas formas de manipulação da dinâmica folicular humana, contemplando o controle das ondas, na tentativa de melhorar o desempenho dos tratamentos.

O presente estudo é o primeiro a avaliar estratégias de controle da emergência de ondas foliculares para sincronização da estimulação ovariana para fertilização *in vitro* em seres humanos.

A aplicação do hCG visa desencadear a ovulação e com ela a emergência da primeira onda folicular. Para tanto, é necessário que o folículo dominante apresente receptores de LH na granulosa, o que ocorre a partir de 12mm de diâmetro médio; a ovulação deve ocorrer aproximadamente 36-48 horas após a aplicação do hCG ⁽³⁷⁻³⁹⁾. A ruptura do folículo dominante provoca redução dos níveis séricos de estradiol e inibina, diminuindo o *feedback* negativo sobre o hipotálamo e a hipófise. O resultado é a elevação dos níveis séricos de FSH e, com isto, a emergência de uma onda de folículos antrais.

A aspiração do folículo dominante e dos subordinados é uma das estratégias aplicadas em animais para desencadear a emergência de uma onda folicular ^(40, 41). O objetivo é também reduzir os níveis séricos de estradiol e inibina, produzidos, sobretudo, pelo folículo dominante, com consequente elevação dos níveis séricos de FSH e o surgimento de uma coorte de folículos antrais em crescimento sincrônico. A aspiração de maiores folículos subordinados tem como objetivo sua destruição, do contrário um deles poderia assumir a dominância, o que inibiria a emergência de uma nova onda folicular.

O emprego do contraceptivo hormonal oral (ACO) não teve como objetivo o controle do surgimento de uma onda folicular, mas sim a programação do início do tratamento para datas mais adequadas. Tal estratégia é comum em centros onde não é possível realizar procedimentos aos finais de semana, como é o caso do CRH-

HCFMUSP⁽⁴²⁾. Alguns estudos indicam maior necessidade de gonadotrofinas e maior tempo de estimulação, bem como redução da taxa de implantação e de gestação em curso, quando os ACOs são utilizados previamente à estimulação⁽⁴³⁾. O tempo entre o término do uso do ACO e o início do estímulo ovariano parece ter influência no desempenho folicular^(44, 45). Evidências apontam que estimulações ovarianas iniciadas pelo menos cinco dias após o término do ACO não são mais prolongadas e nem consomem mais gonadotrofinas do que estimulações em ciclos menstruais naturais, não precedidos pelo uso de ACO, ou em protocolos que utilizam o agonista do GnRH como bloqueio hipofisário^(45, 46). Aparentemente há perda do efeito supressivo sobre o eixo hipotálamo - hipófise - ovário a partir do quinto dia após o término do ACO⁽⁴⁴⁾. Contudo, mantém-se a redução na taxa de implantação e de gestação em curso⁽⁴⁶⁾, possivelmente por causa de um efeito endometrial da droga. No presente estudo, o intervalo entre o término do ACO e o início do estímulo, apesar de mais curto no grupo controle, foi superior a cinco dias em todos os grupos, possivelmente reduzindo a interferência do contraceptivo sobre a dinâmica folicular durante a estimulação. O congelamento de todos os embriões produzidos para transferência futura, com intervalo livre de ACO de aproximadamente 60 dias, possivelmente também minimizou os efeitos desta droga na receptividade endometrial.

Os três grupos do estudo foram semelhantes em relação à maioria das características basais como padrão do ciclo menstrual, medidas de reserva ovariana, idade do parceiro, qualidade seminal, tempo e fatores de infertilidade. A escolha de critérios de inclusão e de exclusão rigorosos, e a distribuição aleatória dos indivíduos nos grupos contribuíram de forma significativa para esta semelhança. O pesquisador

principal não teve acesso à lista de números aleatórios usados para a alocação das pacientes, protegendo a sequência de randomização e minimizando o viés de alocação. Por outro lado, por causa das características da estimulação ovariana e à exigência que o pesquisador principal participasse de todas as avaliações das pacientes, não foi possível fazer o cegamento, nem do pesquisador nem das participantes da pesquisa, em relação ao protocolo adotado.

Houve diferença significativa entre a idade das mulheres, com maior média observada no grupo “hCG” (33 anos). A idade da mulher é a variável de maior valor prognóstico isolado em tratamentos de fertilização *in vitro* ^(47, 48), contudo o desempenho do tratamento é relativamente estável até os 35 anos, piorando progressivamente a partir de então. Como os critérios de inclusão estabeleceram limite de idade para as mulheres participantes do estudo, a diferença encontrada não apresenta significado clínico relevante, pois nenhuma paciente apresentava idade superior a 35 anos.

As duas intervenções foram capazes de desencadear a emergência de uma onda folicular nos prazos previamente estimados (dois dias após a aplicação do hCG recombinante e um dia após a aspiração do folículo dominante), conforme anteriormente considerado ⁽¹⁶⁾. Todas as pacientes do grupo “hCG” apresentaram também sinais ultrassonográficos de ovulação dois dias após a intervenção (redução do diâmetro do folículo dominante e/ou aumento do volume de líquido livre na pelve). Apesar de ter havido diferenças entre os níveis séricos médios de FSH e estradiol antes e depois das intervenções, concordantes com o mecanismo que promove a emergência de uma onda folicular discutido acima, estas não foram

estatisticamente significantes, o que pode ser atribuído à quantidade reduzida de participantes em cada grupo.

A estimulação ovariana resultou na redução progressiva da quantidade de folículos pequenos e no aumento progressivo da quantidade de folículos médios e grandes de forma similar nos três grupos. Em concordância, o nível sérico médio de estradiol, que é dependente da quantidade de folículos em crescimento, aumentou de forma semelhante nos três grupos. Foram encontradas diferenças no nível sérico médio de progesterona, que foi superior nos grupos experimentais do que no controle, o que indica atividade lútea durante a estimulação ovariana. Tal observação era esperada no grupo “hCG” por causa do desencadeamento da ovulação e formação do corpo lúteo. Porém, no grupo “aspiração” também houve luteinização do folículo dominante aspirado, com menor elevação da progesterona se comparado ao grupo “hCG”, mas, ainda assim, com níveis superiores a 1ng/mL até o final do tratamento. Portanto, em ambos os grupos experimentais, o desenvolvimento folicular/oocitário pode ter sofrido influência da progesterona.

O desempenho médio final dos três protocolos de estimulação ovariana foi estatisticamente semelhante. Contudo, a quantidade reduzida de participantes do estudo pode ter minimizado o efeito das diferenças entre os grupos. As possíveis diferenças na dose total de gonadotrofinas utilizadas na estimulação, na duração do tratamento, na taxa de aproveitamento folicular e na qualidade embrionária no terceiro dia de cultivo, pela maior relevância clínica, são discutidas abaixo.

A dose de FSHr utilizada e a duração da estimulação podem ser maiores quando se utilizam hCG e/ou aspiração do folículo dominante para controlar a

emergência de uma onda folicular, diferentemente do esperado segundo os estudos em animais ^(19, 20, 49). Houve inclusive necessidade de aumento da dose diária de FSHr em três pacientes de cada um dos grupos experimentais, enquanto nenhuma mulher do grupo controle necessitou de aumento da dose da medicação durante o tratamento.

O ajuste da dose de medicação em algumas mulheres dos grupos “hCG” e “aspiração” possivelmente tem relação com a diferença na velocidade de crescimento folicular observada. Apesar da velocidade de crescimento médio do maior folículo ter sido semelhante entre os três grupos ao longo do tratamento, foi significativamente menor entre o início e o quinto dia da estimulação nos grupos experimentais comparados ao controle. Tal fenômeno motivou o aumento da dose diária de FSHr em algumas pacientes e prolongou a duração do estímulo em outras, apesar de não ter havido diferença estatística entre os três grupos. No grupo controle a velocidade de crescimento do maior folículo foi estável durante toda a estimulação, não havendo necessidade de incremento da dose diária para nenhuma paciente.

A diferença na taxa de crescimento folicular no início do tratamento não pode ser atribuída às discordâncias quanto ao diâmetro dos folículos, visto que no início da estimulação o diâmetro médio foi semelhante nos três grupos. A presença do corpo lúteo não parece ter influenciado mecanicamente o crescimento dos folículos do ovário em que este se encontrava. Contudo, o corpo lúteo pode ter exercido influência hormonal na taxa de crescimento dos folículos de ambos os ovários nas mulheres dos grupos experimentais. Corroborar para esta hipótese o estudo de von-Wolff et al.⁽⁵⁰⁾ em que a estimulação ovariana foi iniciada na fase lútea para

preservação da fertilidade de mulheres com câncer, sem a preocupação com a sincronização da emergência de uma onda folicular. Os autores referem que também foram necessárias maiores quantidades de gonadotrofina exógena e um maior tempo de tratamento até a aspiração folicular quando comparado ao estímulo iniciado na fase folicular do ciclo menstrual. Por outro lado, a influência lútea não justifica as maiores necessidades de FSHr observados por Baerwald et al.⁽²⁴⁾ em mulheres submetidas à estimulação ovariana sincronizada com a emergência de uma onda na fase folicular do ciclo menstrual.

Outra explicação possível para a diferença observada entre os grupos na velocidade de crescimento do maior folículo é que no grupo controle os folículos estariam em estágio mais avançado de desenvolvimento no início do tratamento e, portanto, mais sensíveis aos efeitos do estímulo com FSHr. Pressupõe-se que a emergência da onda folicular no grupo controle tenha ocorrido alguns dias antes da aplicação do FSHr, estimulada pelo FSH endógeno. Contribui para esta hipótese o estudo de Cédrin-Drunerin et al.⁽⁴⁴⁾ que verificaram o desbloqueio do eixo hipotálamo – hipófise – ovariano cinco dias após o término da ingestão de contraceptivo hormonal oral. De fato, no grupo controle do presente estudo a menstruação ocorreu em média quatro dias após a suspensão do contraceptivo, indicando redução dos níveis séricos dos esteroides que compõem a droga. Consequentemente, deve ter havido redução do *feedback* negativo sobre o eixo e possivelmente elevação dos níveis séricos de FSH, provocando a emergência de uma onda folicular por volta de quatro a cinco dias após o término do ACO. Como a estimulação ovariana iniciou-se três dias após o começo da menstruação, portanto, possivelmente dois a três dias após a emergência da onda folicular, os folículos já

havia se desenvolvido naturalmente por alguns dias e podem ter se tornado mais sensíveis aos efeitos tróficos do FSHr. Em síntese, no grupo controle esta fase inicial de crescimento folicular mais lento, observada nos grupos experimentais, teria ocorrido anteriormente ao início do tratamento, sob o controle das gonadotrofinas endógenas, ao passo que nos grupos experimentais ocorreu durante o estímulo ovariano e foi perceptível na primeira visita de controle.

A aceleração do crescimento folicular que se observou nos grupos experimentais a partir do quinto dia da estimulação, não parece ter tido relação com o aumento da dose diária de FSHr, sugerindo uma característica do estímulo em sincronia com o início de uma onda folicular. Uma das possíveis explicações para o aumento mais pronunciado na velocidade no grupo “hCG”, a partir do sétimo dia da estimulação, é o efeito trófico deste hormônio sobre os folículos. A gonadotrofina coriônica humana, que atua nos receptores de hormônio luteinizante (LH), é capaz de manter o crescimento de folículos a partir de 10mm de diâmetro ⁽⁵¹⁻⁵⁴⁾. Como os níveis séricos desta gonadotrofina permaneceram detectáveis até o nono dia da estimulação e porque houve um aumento progressivo na quantidade de folículos médios ao longo do tratamento, possivelmente a partir do sétimo dia de estímulo, o hCG passou a promover o crescimento folicular em sincronia com o FSHr.

Deve-se ter cautela, entretanto, com relação às inferências realizadas nos parágrafos acima, pois a velocidade de crescimento do maior folículo pode não representar a velocidade de crescimento de todos os folículos da coorte em desenvolvimento.

Quanto ao desempenho laboratorial, apesar de não ter havido diferença estatisticamente significante, a quantidade de oócitos coletados e a taxa média de aproveitamento folicular podem ser maiores quando existe sincronia entre o início do tratamento e a emergência de uma onda folicular. Este dado estaria de acordo com o esperado a partir do modelo animal ⁽²⁰⁾. Inclusive, no estudo realizado em humanos por Baerwald et al. ⁽²⁴⁾, os autores observaram aumento da quantidade de oócitos coletados em pacientes más respondedoras, quando o estímulo ovariano foi sincronizado com o surgimento de uma onda folicular.

Por outro lado, a quantidade média de embriões de morfologia inadequada parece ter sido maior nos grupos experimentais (maior no grupo “hCG”), mas não houve significância estatística. Este dado está em desacordo com o observado em animais quando o estímulo é sincronizado com a emergência de uma onda folicular ⁽²⁰⁾. Tal efeito possivelmente não teria relação com o uso do hCG, pois no estudo de Motta et al. ⁽⁵⁵⁾ a morfologia embrionária foi superior quando o hCG foi utilizado no primeiro dia da estimulação ovariana, na fase folicular do ciclo menstrual.

A morfologia embrionária pode também ter sido influenciada por variações quanto a qualidade seminal. Deve-se também considerar que o desenvolvimento folicular, sob efeito da progesterona, possa ter algum impacto na qualidade oocitária. Em bovinos, a adição de progesterona exógena a protocolos de estimulação ovariana sincronizados com a emergência da primeira onda folicular está associada a embriões de melhor qualidade morfológica ⁽⁵⁶⁾. No entanto, algumas diferenças entre as espécies devem ser salientadas. O folículo ovulatório em bovinos desenvolve-se naturalmente em ambiente rico em progesterona; em humanos o ambiente hormonal

em que o folículo ovulatório é exposto naturalmente é pobre em progesterona (fase folicular do ciclo menstrual). Além disso, na reprodução assistida de animais são utilizadas amostras de sêmen com alto potencial reprodutivo, minimizando esta interferência sobre a morfologia embrionária. Em humanos, não raro são detectadas alterações seminais nos casais que necessitam de tratamentos de reprodução assistida, de forma isolada ou associada a outros fatores.

A avaliação da influência da presença do corpo lúteo/folículo aspirado na dinâmica folicular e no desempenho laboratorial dos oócitos e embriões ipsilaterais foi outra contribuição original deste estudo. As observações sugerem que o corpo lúteo não exerce efeito mecânico sobre o desenvolvimento dos folículos adjacentes, porém pode haver um efeito parácrino sobre a qualidade oocitária.

A necessidade de criopreservação embrionária por falta de sincronia entre o estágio de desenvolvimento endometrial e os embriões nos grupos experimentais pode influenciar nas taxas de sucesso deste tratamento em centros nos quais o programa de criopreservação é menos eficaz do que a transferência de embriões a fresco, limitando sua aplicação a locais com protocolos adequados de congelamento embrionário.

A maior limitação desta pesquisa foi a quantidade reduzida de casais que preencheram os critérios de inclusão. Isto limita a generalização dos resultados além de poder causar distorções, dificultando a interpretação dos achados. Serão necessários mais estudos para confirmar ou refutar as diferenças encontradas e determinar a real aplicação destes protocolos na prática clínica.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados observados permitem as conclusões seguintes:

- A aplicação de hCG recombinante quando o folículo dominante tem diâmetro médio $\geq 15\text{mm}$, em um ciclo menstrual natural, é capaz de desencadear a ovulação e a emergência de uma onda folicular dois dias depois;
- A aspiração do folículo dominante com diâmetro médio de 15mm e de seus subordinados com mais de 10mm é capaz de desencadear a emergência de uma onda folicular um dia depois;
- É possível sincronizar o início da estimulação ovariana com a emergência de uma onda folicular controlada com as duas intervenções propostas;
- Há atividade lútea, com produção de progesterona, durante a estimulação ovariana sincronizada com a emergência das ondas foliculares desencadeadas pelas duas intervenções;
- A estimulação ovariana sincronizada com a emergência de uma onda folicular controlada produz embriões viáveis.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

1. Macklon NS, Stouffer RL, Giudice LC, Fauser BC. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocr Rev.* 2006;27(2):170-207.
2. Zafeiriou S, Loutradis D, Michalas S. The role of gonadotropins in follicular development and their use in ovulation induction protocols for assisted reproduction. *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 2000;5(2):157-67.
3. Motta PM, Makabe S, Nottola SA. The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Hum Reprod Update.* 1997;3(3):281-95.
4. Rabinovici J, Jaffe RB. Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads. *Endocr Rev.* 1990;11(4):532-57.
5. Gougeon A. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Ann Endocrinol (Paris).* 2010;71(3):132-43.
6. Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev.* 1997;18(1):71-106.
7. Adams GP, Singh J, Baerwald AR. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. *Theriogenology.* 2012.

¹ De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

8. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod.* 1986;1(2):81-7.
9. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Hum Reprod Update.* 2012;18(1):73-91.
10. Adams GP, Jaiswal R. Follicular dynamics in cattle: Historical overview and research update. In: R J, editor. *Acta Scientiae Veterinariae* 2008. p. 387-96.
11. Ginther OJ. Ultrasonic imaging of equine ovarian follicles and corpora lutea. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1988;4(2):197-213.
12. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Folliculogenesis revisited: Characteristics of ovarian follicular waves during the menstrual cycle. *Fertility and Sterility.* 2002;78(3):S67-S68.
13. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biology of Reproduction.* 2003;69(3):1023-31.
14. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. *Fertil Steril.* 2003;80(1):116-22.
15. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Bergfelt DR, Baerwald AR, Pierson RA. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. *Biology of Reproduction.* 2004;71(4):1195-201.
16. de Mello Bianchi PH, Serafini P, Monteiro da Rocha A, Assad Hassun P, Alves da Motta EL, Sampaio Baruselli P, et al. Review: follicular waves in the human ovary: a new physiological paradigm for novel ovarian stimulation protocols. *Reprod Sci.* 2010;17(12):1067-76.
17. Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci.* 2003;78(3-4):239-57.

18. van Wagtendonk-de Leeuw AM. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*. 2006;65(5):914-25.
19. Menchaca A, Pinczak A, Rubianes E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on day 0 or day 3 postovulation in goats. *Theriogenology*. 2002;58(9):1713-21.
20. Nasser LF, Adams GP, Bo GA, Mapletoft RJ. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*. 1993;40(4):713-24.
21. Mapletoft R J BGA, Baruselli P S. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. *Anim Reprod*. 2009;6:114-24.
22. Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Effect of progestogen plus estradiol-17beta treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*. 1996;45(5):897-910.
23. Wiltbank JN, Kasson CW. Synchronization of estrus in cattle with an oral progestational agent and an injection of an estrogen. *J Anim Sci*. 1968;27(1):113-6.
24. Baerwald A, Anderson P, Yuzpe A, Case A, Fluker M. Synchronization of ovarian stimulation with follicle wave emergence in patients undergoing in vitro fertilization with a prior suboptimal response: a randomized, controlled trial. *Fertil Steril*. 2012.
25. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010;16(3):231-45.
26. Serafini P, Yadid I, Motta EL, Alegretti JR, Fioravanti J, Coslovsky M. Ovarian stimulation with daily late follicular phase administration of low-dose human chorionic gonadotropin for in vitro fertilization: a prospective, randomized trial. *Fertil Steril*. 2006;86(4):830-8.

27. Embryology ASiRMaESiGo. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.* 2011;26(6):1270-83.
28. Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2008;90(1):186-93.
29. Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, Hamilton R, et al. A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod.* 2008;23(9):1976-82.
30. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril.* 2011;96(2):344-8.
31. Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Physiology and culture of the human blastocyst. *J Reprod Immunol.* 2002;55(1-2):85-100.
32. Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology.* 2002;57(1):53-72.
33. Mapletoft R J BGA, Baruselli P S. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. 2009.
34. Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev.* 2002;42(6):601-11.
35. Andersen AG, Als-Nielsen B, Hornnes PJ, Franch Andersen L. Time interval from human chorionic gonadotrophin (HCG) injection to follicular rupture. *Hum Reprod.* 1995;10(12):3202-5.

36. Fischer RA, Nakajima ST, Gibson M, Brumsted JR. Ovulation after intravenous and intramuscular human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril*. 1993;60(3):418-22.
37. Ludwig M, Doody KJ, Doody KM. Use of recombinant human chorionic gonadotropin in ovulation induction. *Fertil Steril*. 2003;79(5):1051-9.
38. Bergfelt DR, Bo GA, Mapletoft RJ, Adams GP. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. *Anim Reprod Sci*. 1997;49(1):1-12.
39. Baracaldo MI, Martinez MF, Adams GP, Mapletoft RJ. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*. 2000;53(6):1239-50.
40. Barmat LI, Chantilis SJ, Hurst BS, Dickey RP. A randomized prospective trial comparing gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist/recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH) versus GnRH-agonist/rFSH in women pretreated with oral contraceptives before in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2005;83(2):321-30.
41. Griesinger G, Kolibianakis EM, Venetis C, Diedrich K, Tarlatzis B. Oral contraceptive pretreatment significantly reduces ongoing pregnancy likelihood in gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles: an updated meta-analysis. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2382-4.
42. Cédric-Durnerin I, Bständig B, Parneix I, Bied-Damon V, Avril C, Decanter C, et al. Effects of oral contraceptive, synthetic progestogen or natural estrogen pre-treatments on the hormonal profile and the antral follicle cohort before GnRH antagonist protocol. *Hum Reprod*. 2007;22(1):109-16.
43. Garcia-Velasco JA, Bermejo A, Ruiz F, Martinez-Salazar J, Requena A, Pellicer A. Cycle scheduling with oral contraceptive pills in the GnRH antagonist protocol vs the long protocol: a randomized, controlled trial. *Fertil Steril*. 2011;96(3):590-3.

44. Andersen AN, Witjes H, Gordon K, Mannaerts B, investigators X. Predictive factors of ovarian response and clinical outcome after IVF/ICSI following a rFSH/GnRH antagonist protocol with or without oral contraceptive pre-treatment. *Hum Reprod.* 2011;26(12):3413-23.
45. Dicker D, Goldman JA, Ashkenazi J, Feldberg D, Shelef M, Levy T. Age and pregnancy rates in in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1991;8(3):141-4.
46. Lintsen AM, Eijkemans MJ, Hunault CC, Bouwmans CA, Hakkaart L, Habbema JD, et al. Predicting ongoing pregnancy chances after IVF and ICSI: a national prospective study. *Hum Reprod.* 2007;22(9):2455-62.
47. Adams GP, Nasser LF, Bo GA, Garcia A, Del Campo MR, Mapletoft RJ. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology.* 1994;42(7):1103-13.
48. von Wolff M, Thaler CJ, Frambach T, Zeeb C, Lawrenz B, Popovici RM, et al. Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase. *Fertil Steril.* 2009;92(4):1360-5.
49. Filicori M, Cognigni GE, Samara A, Melappioni S, Perri T, Cantelli B, et al. The use of LH activity to drive folliculogenesis: exploring uncharted territories in ovulation induction. *Hum Reprod Update.* 2002;8(6):543-57.
50. Filicori M, Cognigni GE, Gamberini E, Parmegiani L, Troilo E, Roset B. Efficacy of low-dose human chorionic gonadotropin alone to complete controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril.* 2005;84(2):394-401.
51. Filicori M, Fazleabas AT, Huhtaniemi I, Licht P, Rao CV, Tesarik J, et al. Novel concepts of human chorionic gonadotropin: reproductive system interactions and potential in the management of infertility. *Fertil Steril.* 2005;84(2):275-84.

52. Serafini P, Yadid I, Motta EL, Alegretti JR, Fioravanti J, Coslovsky M. Ovarian stimulation with daily late follicular phase administration of low-dose human chorionic gonadotropin for in vitro fertilization: a prospective, randomized trial. *Fertil Steril*. 2006;86(4):830-8.
53. Motta EL, Smith GD, Serafini PC, Coslovsky M, Hassun P, Rocha AM, et al. Human choriogonadotropin prior to controlled ovarian stimulation and in vitro fertilization improves implantation, and pregnancy rates. *J Assist Reprod Genet*. 2009;26(6):305-11.
54. Nasser LF, Sá Filho MF, Reis EL, Rezende CR, Mapletoft RJ, Bó GA, et al. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*. 2011;76(2):320-7.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

CARTA DA COMISSÃO DE ÉTICA

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26/05/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 1099/09, intitulado: "**O PAPEL DA EMERGÊNCIA DE ONDAS FOLICULARES NA SINCRONIZAÇÃO DA INDUÇÃO DE OVULAÇÃO EM FERTILIZAÇÃO IN VITRO**", apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. EDMUND CHADA BARACAT**

Pesquisador (a) Executante: **DR. PAULO HOMEM DE MELLO BIANCHI**

Orientador (a): **DR. PAULO CÉSAR SERAFINI**

CAPPesq, 27 de maio de 2010

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APENDICE 2

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº..... APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: O papel da emergência de ondas foliculares na sincronização da indução de ovulação em fertilização *in vitro*
- 2.
- PESQUISADOR : Paulo Homem de Mello Bianchi
- CARGO/FUNÇÃO: Médico INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 109072
- UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto Central – Departamento de Ginecologia
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO	☐	RISCO MÉDIO	☒
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): o objetivo deste estudo é avaliar de forma prospectiva se uma nova forma de estimulação da ovulação para fertilização *in vitro* melhora o número e a qualidade dos óvulos obtidos, permitindo maiores chances de gravidez.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: se a senhora decidir participar deste estudo voluntariamente entrará em um sorteio para fazer parte de um dentre os três grupos descritos abaixo:

Grupo 1 (tratamento rotineiro): um exame de ultra som transvaginal e dosagens hormonais no sangue serão feitos no primeiro ou segundo dia da menstruação. Se os resultados dos exames forem adequados começará a usar todos os dias medicações (hormônios), aplicadas por injeções subcutâneas, para estimularmos o amadurecimento dos óvulos. Fará em média mais 3 ou 4 exames de ultra som por via vaginal e mais 1 ou 2 exames de sangue para controlarmos o desenvolvimento dos óvulos e doses de medicação.

Grupo 2 (experimental ou não rotineiro): o exame de ultra som transvaginal e a dosagem de hormônios no sangue serão feitos depois de aproximadamente cinco dias após o início da menstruação. De acordo com o resultado destes exames um hormônio será aplicado por injeção subcutânea para estimular a ovulação. Novos exames de ultra som e dosagens de hormônios no sangue serão feitos dois dias após a aplicação desta medicação. Quando os resultados estiverem adequados, fará um tratamento semelhante ao do grupo 1, isto é, começará a usar todos os dias medicações (hormônios), aplicadas por injeções subcutâneas, para estimular o amadurecimento dos óvulos. Será feito em média, mais 3 ou 4 exames de ultra som por via vaginal e mais 1 ou 2 exames de sangue para controlarmos o desenvolvimento dos óvulos e as doses de medicação.

Grupo 3 (experimental ou não rotineiro): da mesma forma que as pacientes do grupo 2, a senhora fará exame de ultra som transvaginal e dosagens de hormônios no sangue a partir do quinto dia após o início da menstruação. De acordo com os resultados, faremos uma aspiração folicular, isto é, a senhora tomará um tipo de anestesia leve (sedação) para não sentir dor; uma agulha será colocada pela vagina até os ovários, para aspirarmos os folículos (loais onde estão os óvulos dentro dos ovários). Este processo é semelhante ao de coleta dos óvulos que é feito em todos os tratamentos de fertilização in vitro e que será feito por todas as pacientes deste estudo que chegarem no final do tratamento, como descrito abaixo. Os eventuais óvulos obtidos com esta primeira aspiração não serão utilizados para formar embriões. Dois dias após a aspiração, fará exame de ultra som transvaginal e dosagens de hormônios no sangue. Quando os resultados estiverem adequados será feito um tratamento semelhante ao do grupo 1, isto é, começará a usar todos os dias medicações (hormônios), aplicadas por injeções subcutâneas, para estimular o amadurecimento dos óvulos. Fará em

media mais 3 ou 4 exames de ultra som por via vaginal e mais 1 ou 2 exames de sangue para controlarmos o desenvolvimento dos óvulos e as doses de medicação.

As etapas a seguir serão feitas por todas as pacientes, independente do grupo a que pertencerem.

Quando detectarmos que os óvulos estão maduros faremos a coleta. A senhora tomará um tipo de anestesia leve (sedação) para não sentir dor; uma agulha será colocada pela vagina até os ovários para colher os óvulos. Com a coleta dos óvulos obtemos, além dos óvulos, algumas outras células (células da granulosa) e um líquido (fluido folicular). Utilizamos apenas os óvulos para o tratamento e normalmente jogamos fora o líquido e as outras células. Gostaríamos de pedir sua autorização para não desprezar este material e sim congelá-lo. Ele pode ser útil para pesquisas futuras sobre a qualidade dos folículos e dos óvulos. Por favor, escolha uma das opções abaixo:

- a) não autorizo o congelamento das células da granulosa e do fluido folicular;
- b) autorizo o congelamento das células da granulosa e do fluido folicular e autorizo também seu uso futuro em pesquisas por este mesmo documento.

No mesmo dia da coleta dos óvulos, seu parceiro colherá uma amostra de sêmen (espermatozóides) e formaremos os embriões. Todos os embriões serão congelados; aproximadamente dois meses depois prepararemos seu útero com hormônios usados por via oral (boca) e vaginal (pela vagina). Em seguida, descongelaremos os embriões e os colocaremos de volta no útero. O exame de gravidez (dosagem de hormônio no sangue) será feito doze dias após a colocação dos embriões no útero.

Quando o resultado do teste de gravidez for negativo e não houver mais embriões congelados, a senhora poderá fazer até mais duas tentativas de fertilização in vitro utilizando o protocolo convencional de tratamento, respeitando sua posição na fila do Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da FMUSP, de acordo com as diretrizes assistenciais vigentes atualmente no Centro.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – os ultras sons serão realizados pela vagina, no ambulatório do Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas pelo pesquisador principal ou por outro membro da equipe; a coleta de sangue será feita por punção periférica da veia do antebraço; os óvulos serão colhidos por punção vaginal guiada por ultra som sob sedação (anestesia leve) e sem dor; a transferência dos embriões ao útero será feita com material específico colocado na cavidade do útero durante exame

vaginal, usando como guia um exame de ultra som abdominal (não há necessidade de anestesia pois é um procedimento indolor).

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: O ultra som transvaginal pode causar pequeno desconforto local mas não está associada a nenhum tipo de risco. A coleta de sangue pode provocar irritação local e raramente infecção. A punção ovariana pode provocar dor e desconforto na parte inferior do abdome e, em alguns casos raros, sangramento abdominal (até com necessidade de cirurgia) ou infecção abdominal. A transferência dos embriões pode causar leve cólica no momento mas não está associada a maiores complicações.

5 – Benefícios para o participante: As chances de gravidez por tratamento de fertilização in vitro, utilizando os protocolos atuais de estimulação da ovulação (pacientes do grupo 1 deste estudo), são de aproximadamente 40% para mulheres com menos de 35 anos. Acreditamos que a utilização dos protocolos experimentais propostos neste projeto (grupos 2 e 3) aumente a qualidade dos óvulos e, conseqüentemente, as chances de gravidez. Porém, somente no final do estudo poderemos concluir se haverá benefícios com estas novas estratégias de tratamento em fertilização *in vitro* que serão estudadas.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: a paciente poderá optar por participar ou não do estudo. Se decidir participar do estudo, os procedimentos aos quais será submetida serão decididos de forma aleatória (por sorteio), sem possibilidade de opção por procedimentos alternativos.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr **Paulo Homem de Mello Bianchi**, que pode ser encontrado no endereço **Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255, Instituto Central do Hospital das Clínicas, Departamento de Ginecologia** Telefone(s) 3069-6209. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

13 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo” O papel da emergência de ondas foliculares na sincronização da indução de ovulação em fertilização *in vitro*” Eu discuti com o Dr. **Paulo Homem de Mello Bianchi** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____