

Agonista versus Antagonista do GnRH em ciclos de reprodução assistida:

DNA fragmentação e apoptose das células da granulosa

HELOISA LOPES LAVORATO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Área de concentração Tocoginecologia.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Agonista versus Antagonista do GnRH em ciclos de reprodução assistida:

DNA fragmentação e apoptose das células da granulosa

HELOISA LOPES LAVORATO

Orientador: Prof. Dr. José Gonçalves Franco Jr

Co-Orientador: Prof. Dr. Mario Cavagna

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Área de concentração Tocoginecologia.

**BOTUCATU – SP
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Lavorato, Heloisa Lopes.

Agonista versus antagonista do gnrh em ciclos de reprodução assistida : dna fragmentação e apoptose das células da granulosa / Heloisa Lopes Lavorato. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Jose Gonçalves Franco Jr

Coorientador: Mario Cavagna

Capes: 40101150

1. Apoptose. 2. Reprodução humana. 3. Fecundidade humana.

Palavras-chave: Agonista do GnRH; Antagonista do GnRH; Apoptose; Células da granulosa; Fragmentação do DNA.

Agradecimientos

Agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação não é tarefa fácil, pois a elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas.

Meu maior agradecimento é dirigido aos meus pais, que sempre confiaram e acreditaram em mim e me ensinaram que para obtermos o melhor que esta vida pode nos prover temos que trabalhar para tal e por terem sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Agradeço em especial a meu pai, por ter me ensinado a arte de pensar o trabalho acadêmico com rigor e disciplina. Agradeço, de forma muito carinhosa, a atuação de minha mãe no período de construção deste trabalho. Sua paciência infinita e sua crença absoluta na capacidade de realização a mim atribuída foram, indubitavelmente, os elementos propulsores desta dissertação. Um agradecimento especial para minha irmã que sempre foi um exemplo tanto na área pessoal quanto na área profissional. À minha madrinha que sempre esteve presente para me fornecer apoio e sábios conselhos. Aos meus primos e tios que sempre estiveram presentes nos grandes momentos da minha vida e em particular à Tamiris que me ajudou mais do que precisava.

Meu imenso agradecimento a toda equipe do CRH pelo auxílio na realização de todo o projeto. À Elisângela por ser sempre prestativa e paciente. Ao Dr. João pelo auxílio intelectual necessário para a confecção desta dissertação. À Claudia por ser minha madrinha profissional e um exemplo à ser seguido e à Laura Vagnini por me ensinar todas as técnicas presentes no trabalho e pelo auxílio constante tanto no âmbito pessoal quanto no profissional. Dedico o meu infinito agradecimento ao meu orientador Dr. Franco Jr e ao meu co-orientador Dr. Mário Cavagna pela oportunidade de trabalharmos juntos para a realização deste projeto e pela confiança em mim depositada.

Um enorme agradecimento às pacientes que se submeteram à pesquisa, pois sem elas o conhecimento aqui registrado não existiria.

Agradeço também a todos os professores da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial aos do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, por dividirem seu conhecimento através de diferentes disciplinas e agradeço à CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

E por fim, aos meus amigos, com destaque para Lost, Xuxa, Hã, Tops, Caracas, Gui, Cesar e Paulo que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho e fizeram meu dia a dia mais valioso, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Sumário

Capítulo 1	
Resumo	2
Introdução	3
Análogos agonistas do GnRH	5
Análogos antagonistas do GnRH	6
Protocolos de estimulação ovariana	8
Pobre resposta ovariana	12
Ovulação	13
Fase lútea	15
Considerações finais	16
Referências bibliográficas	17
Capítulo 2	30
Abstract	32
Background	33
Methods	34
Results	41
Discussion	47
Competing interests	51
References	52
Anexo	
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	58

Capítulo 1

Agonistas do GnRH, Antagonistas do GnRH e a Reprodução assistida

Heloisa Lopes Lavorato¹

¹Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP -
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, Brasil

Resumo

Os agonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (Gonadotropin-releasing hormone / GnRH) foram introduzidos na estimulação ovariana para fertilização in-vitro (FIV) com o objetivo de evitar o pico prematuro do hormônio luteinizante (LH). Embora sejam acompanhados de algumas desvantagens, os agonistas do GnRH tornaram-se bem aceitos na prática clínica com sua utilização sendo associada a aumento das taxas de gravidez. O desenvolvimento dos antagonistas do GnRH, capazes de bloqueio imediato da hipófise ofereceu uma nova opção terapêutica. Estudos comparativos entre os dois análogos têm sugerido que o uso de antagonistas está associado a uma menor duração do estímulo ovulatório e uma diminuição da incidência de síndrome de hiperestimulação ovariana, enquanto as taxas de gravidez e de nascidos vivos não parecem sofrer influências significativas do tipo de análogo do GnRH utilizado. Por outro lado, os agonistas do GnRH apresentam outras aplicações em ciclos de reprodução assistida além do bloqueio hipofisário.

Introdução

A compreensão atual da ação do gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) começou no início do século 20 com a observação de que lesões da hipófise anterior ocasionavam a atrofia genital, fazendo parte dos primórdios da identificação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal [1]. O GnRH, que foi isolado e teve sua estrutura elucidada em 1971, consiste em um decapeptídeo com fórmula $\text{Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$ secretado pelos neurônios localizados no núcleo arqueado no hipotálamo mediobasal [2, 3]. Os vasos sanguíneos do sistema porta hipofisário levam a molécula de GnRH para o lobo anterior da hipófise, onde se liga a receptores específicos localizados na membrana celular. A ligação do GnRH a seus receptores (GnRHR) ocasiona à ativação da enzima fosfolipase C, aumentando a produção de trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 mobiliza o cálcio presente nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático, elevando a concentração citoplasmática de Ca^{2+} . O DAG atua juntamente com o cálcio e ativa a proteína quinase C (PKC). A ação desses segundos mensageiros desencadeia a cascata de fosforilação que envolve a produção de AMP cíclico e ativação de proteínas quinases associadas à mitógeno (MAPKs), culminando na liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) [4].

Para que o controle simultâneo da secreção de dois hormônios através do GnRH seja efetivo, a liberação deste hormônio acontece de forma intermitente (a cada 70-90 minutos [5]). A secreção pulsátil se faz necessária devido à meia-vida muito curta do GnRH e a pulsatilidade varia de frequência e amplitude durante todo o ciclo menstrual. O aumento e a diminuição no ritmo da liberação do GnRH levam a comprometimento do sistema reprodutor, provando que a periodicidade e a amplitude do ritmo da liberação deste hormônio são essenciais para que a produção de gonadotrofinas pela hipófise seja apropriada [6]. Estimulação pulsátil dos GnRHR induzem a síntese e liberação pulsátil das gonadotrofinas

(FSH e LH) [7]. FSH e LH induzem por sua vez a maturação folicular e controle da esteroidogênese ovariana. Nas mulheres, a secreção de gonadotrofina é modulada - entre outros fatores - pelo estrogênio e progesterona. Altos níveis de estrogênio por meio do ciclo de feedback positivo com a glândula pituitária levam liberação de níveis elevados de LH (pico de LH). Este pico de LH induz a ovulação no folículo dominante, a retomada da meiose e, posteriormente, luteinização como indicado pelo aumento dos níveis de progesterona.

As primeiras terapias com fertilização *in vitro* (FIV) foram realizadas em ciclos naturais, porém a taxa de sucesso destes ciclos é pequena e, entre os motivos, está a baixa taxa de sucesso na coleta de oócitos para os procedimentos laboratoriais [8]. Para melhorar os resultados dos ciclos de FIV, são utilizados atualmente vários esquemas de estimulação da ovulação, baseados principalmente no uso de gonadotrofinas para induzir o crescimento coordenado de múltiplos folículos e com isso fornecendo maior números de oócitos para os procedimentos [9]. Contudo, a estimulação pode desencadear um pico prematuro espontâneo de LH que perturba a maturação do oócito e têm um efeito negativo sobre a qualidade do gameta, fertilização, receptividade endometrial, e em última análise, as taxas de gravidez [10]. Estima-se que o pico prematuro de LH ocorre em aproximadamente 20% de todos os ciclos de FIV / intracytoplasmic sperm injections (ICSI). Para prevenir esta resposta desencadeada pela hipófise, análogos do GnRH tanto agonistas quanto antagonistas, vem sendo empregados para causar dessensibilização (bloqueio) dos gonadotrófos (células produtoras de gonadotrofinas) hipofisários ao GnRH, aumentando o aproveitamento de cada ciclo de FIV [11]. De fato, hoje os análogos do GnRH têm grande e intensa aplicação em reprodução assistida.

Considerando o extenso das medicações, o objetivo dessa revisão é avaliar os dados disponíveis na literatura a respeito das aplicações dos análogos de GnRH, tanto agonista quanto antagonista, nos ciclos de FIV.

Análogos agonistas do GnRH

A meia-vida plasmática do GnRH circulante é extremamente curta, 2-5 minutos após sua liberação, sendo a molécula rapidamente degradada por endopeptidases da glândula pituitária, que preferencialmente interagem com as ligações peptídicas na posição 6 da molécula [5]. Esta deterioração rápida de GnRH garante que os pulsos hipotalâmicos de GnRH sejam reconhecidos como eventos únicos pelo receptor hipofisário. É a administração contínua de GnRH leva à supressão da liberação de gonadotrofinas hipofisárias pela inibição (downregulation) dos GnRHR das células gonadotróficas.

A elucidação da seqüência de aminoácidos de GnRH [2, 3, 12] foi rapidamente seguida por tentativas de sintetizar análogos de GnRH, seja com ação agonística ou antagônica. Substituições de aminoácidos na cadeia protéica do GnRH revelaram a especificidade das regiões para estabilidade, ligação aos receptores e ativação do gonadotrófos pituitários [13]. Modificações, principalmente nas posições 6 e 10 deram origem a análogos do GnRH (GnRH-a) com potência maior do que o hormônio original, elevando a capacidade de ligação com os receptores específicos em mais de 100 vezes e estendendo a meia-vida de minutos para horas [1]. A potência foi aumentada basicamente pela substituição de Glicina na posição 6 por D-aminoácidos [14, 15]. O fenômeno de uma liberação inicial das gonadotrofinas (denominado efeito “flare”) em resposta ao agonista de GnRH, seguido de supressão dos GnRHR hipofisários por mecanismos de clustering (agrupamento) e internalização foi esclarecido em 1978 [16]. Até o final da década 80, o chamado protocolo longo com GnRH-a, baseado no fenômeno da downregulation hipofisária, foi estabelecido na FIV, reduzindo significativamente a taxa de cancelamento de ciclo, melhorando os resultados e permitindo alguma flexibilidade na programação da coleta dos oócitos [17]. Seguiu-se uma vasta expansão FIV prática clínica. De fato, o advento dos agonistas GnRH marcou o início da gestão moderna na estimulação ovariana para reprodução assistida [5].

Há sete GnRH-a aprovados para uso clínico: leuprorelina, buserelina, goserelina, histrelina, deslorelina, nafarelina e triptorrelina. Estes agonistas podem ser administrados por via nasal, subcutânea ou por liberação controlada com a utilização (intramuscular ou subcutânea) de preparado de depósito ou implantes [18]. “Sprays” nasais requerem 2-4 administrações por dia para manter uma concentração eficaz de fármaco. Injeções subcutâneas podem ser dadas uma vez por dia. Na via nasal, a taxa de absorção do agonista é imprevisível. Perdas consideráveis do peptídeo podem ocorrer por proteólise e deglutição, proporcionando um nível de dessensibilização flutuante, mas na maioria dos casos é suficiente para evitar picos prematuros de LH [19, 20]. Injeções subcutâneas diárias têm efeito mais estável. Após a injeção subcutânea, o agonista é rapidamente absorvido e concentrações sanguíneas permanecem elevadas por muitas horas. Quatro agonistas (buserelina, leuprorelina, nafarelina, e triptorrelina) são rotineiramente utilizados em reprodução. Por causa de sua longa duração de ação, preparações de depósito (como goserelina) não são utilizadas como primeira escolha em ciclos de FIV/ICSI [18].

Análogos antagonistas do GnRH

Em paralelo com o desenvolvimento dos GnRH-a, outros análogos estruturais do GnRH foram sintetizados e, apesar de também se ligarem ao GnRHR da hipófise, não são funcionais na indução das reações necessárias para liberação de gonadotrofina [21, 22]. Assim ao contrário dos agonistas, os denominados antagonistas do GnRH (GnRH-ant) agem ocupando diretamente os receptores do GnRH, bloqueando-os de forma competitiva [23], causando uma supressão imediata e reversível na liberação das gonadotrofinas [11, 23-26]. O mecanismo de ação dos GnRH-ant é dependente do equilíbrio entre o GnRH endógeno e o antagonista

aplicado. A modificação da dose do GnRH-ant administrada ao paciente altera esse equilíbrio mostrando que o efeito antagônico destes compostos é dose-dependente [27-29].

Levou um considerável período de tempo após a elucidação da estrutura e da função do GnRH para que fossem obtidos antagonistas clinicamente úteis com efeitos coleterais reduzidos. Os antagonistas de primeira geração, contendo substituições dos aminoácidos Histidina e Triptorelina nas posições 2 e 3, respectivamente, tiveram baixas atividades supressiva. A potência na segunda geração foi incrementada após a incorporação de um ácido D-amino na posição 6, mas resultou em aumentou nas reações anafiláticas por indução da liberação de histamina em grandes quantidades. Estes problemas foram resolvidos na terceira geração através da substituição de D-Arginina na posição 6 por aminoácidos D-ureidoalkil [13, 18]. Exemplos de GnRH-ant de terceira geração são cetorelix, iturelix, azaline B, ganirelix, abarelix e antarelix. A administração resulta na redução dos níveis séricos de do LH (cerca de 70%) e FSH (cerca de 30%) após cerca de seis horas [18, 30-32]. Dois antagonistas do GnRH, cetorelix e ganirelix, estão licenciados e disponíveis comercialmente, ambos para uso injetável.

Os GnRH-ant vêm sendo utilizados no arsenal terapêutico na área da reprodução desde o final da década de 90 [11, 23-26, 33] e possuem a vantagem da flexibilidade na medida em que pode ser administrado em qualquer momento durante a fase folicular do ciclo de tratamento. A supressão mais rápida da liberação de gonadotrofina permite regimes de tratamento mais curtos para a estimulação ovariana. Assim, as desvantagens associadas à administração de GnRH-a podem ser evitadas, incluindo a formação de cisto ovariano e sintomas de privação estrogênica [5, 18].

Protocolos de estimulação ovariana

Poucos ensaios clínicos randomizados comparando as diferentes apresentações dos GnRH-a disponíveis (mensal de depósito, dose diárias injetáveis, administração nasal diárias) foram publicados. Em 2005, metaanálise da Cochrane Collaboration não relatou diferenças significativas nos resultados na comparação entre as formas de depósito e de administração diária dos GnRH-a [34]. Por outro lado, os protocolos de administração têm recebido mais atenção.

No denominado protocolo longo, GnRH-a é iniciado na fase média lútea do ciclo anterior e mantido até a administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) para indução da maturidade dos oócitos. A variação deste protocolo consiste na alteração do início do GnRH-a para o primeiro dia do ciclo menstrual. O mecanismo agonista implica na liberação inicial de gonadotrofina antes que os receptores sejam efetivamente bloqueados. Dessa forma, a estimulação ovariana normalmente começa cerca de 2 semanas depois do início das aplicações do GnRH-a, após a instalação do bloqueio pituitário e a ocorrência da menstruação. Há flexibilidade na programação nesta fase, já que alguns dias a mais de bloqueio hipofisário não afetam de forma significativa a estimulação subsequente ou os resultados do ciclo [35]. Algumas mulheres experimentam efeitos colaterais hipoestrogênicos de gravidade variável durante este tempo. Não é evidente se a resposta do ovário às gonadotrofinas exógenas é afetada pelo GnRH-a, embora em casos de pacientes com reserva ovariana baixa esse efeito hipoestrogênico seja mais considerado. O início do GnRH-a na fase lútea média ($\pm 21^{\text{o}}$ dia) do ciclo anterior é mais bem sucedida do que o início na fase folicular (quando cistos foliculares persistentes tendem a se formar) ou do que qualquer outro momento do ciclo [36, 37]. Uma questão é a possibilidade de ocorrência gravidez prévia ao bloqueio, mas aparentemente este não leva a efeitos prejudiciais para os conceitos [38].

O denominado protocolo curto emprega a liberação de FSH endógeno induzida pelo GnRH-a para estimular o ovário associado à administração das gonadotrofinas exógenas. Mais comumente, o GnRH-a é iniciado no dia 1 ou 2 do ciclo e as gonadotrofinas no dia 3. Crescimento folicular leva $\pm 10-12$ dias, que é adequada para o estabelecimento do bloqueio pituitário e assim evitar um pico prematuro de LH [39]. Há pouca flexibilidade com esse protocolo já que o início da estimulação é dependente do início da menstruação.

Varição do protocolo curto é o denominado protocolo ultracurto, onde o período de administração de GnRH-a limita-se a 3 ou 7 dias. Este protocolo é baseado na suposição de que a supressão do aumento de LH endógeno pode ser obtido através de período muito curto de uso do GnRH-a, mantendo um desejado efeito *flare-up* inicial [18].

Metaanálise comparando os protocolos longo e curto mostrou que com o uso do protocolo longo há obtenção de taxas de gravidez maiores, embora mais unidades de gonadotrofinas são necessárias [40]. Em meta análise recente [41] analisando vários protocolos de estimulação ovariana com GnRH-a, foi encontrado taxa de gravidez maior quando era empregado protocolo longo em comparação aos protocolos curto ou ultracurto. Além disso, não houve diferença nos resultados entre as variações do protocolo longo.

Com relação aos GnRH-ant, vários estudos tentaram determinar a dose mínima eficaz para alcançar a supressão da hipófise e duas estratégias surgiram. Uma delas é a administração de dose única de depósito em dia pré-estabelecido (8^{o} - 9^{o}) do ciclo de estimulação ou quando o folículo líder atinge o diâmetro 14mm. A ação de ± 4 dias é suficiente para impedir que o pico de LH em 80% das mulheres [42]. As pacientes podem receber injeções adicionais de GnRH-ant após 4 dias, caso os critérios para a administração de hCG não tenham sido atingidos. A outra estratégia é a administração de múltiplas doses diárias de GnRH-ant, que podem ser usados iniciando de forma fixa no 6^{o} dia do ciclo, ou de forma flexível, quando o maior folículo atingir 14 mm de diâmetro. As dose diárias são

mantidas até a administração do hCG [43, 44]. Esse protocolo com múltiplas doses é atualmente o mais utilizado.

Inicialmente grandes estudos prospectivos comparando o protocolo padrão longo do GnRH-a e protocolo multidoses do GnRH-ant revelou que com o último se obtinha um número ligeiramente menor de folículos e oócitos e também havia uma redução na taxa de gravidez de 5% (odds ratio (OR): 0,75, 95% intervalo de confiança (IC): 0,62-0,97) [45]. A melhor taxa de gravidez em ciclos com GnRH-a foi atribuída ao maior número de oócitos e embriões, o que possibilitaria maior oportunidade de seleção para transferência. Foi ponderado que para algumas pacientes o início do GnRH-ant, principalmente nos esquemas fixos ao 6 dia do ciclo, estaria sendo muito precoce, levando a alterações na resposta ovulatória e conseqüentemente nos resultados do tratamento. Se o início do antagonista é atrasado, a teoria é que a janela de resposta ao FSH endógeno é estendida, maximizando o potencial de recrutamento de oócitos [1].

Alguns pontos a favor do uso dos GnRH-ant tem sido postulados: duração do ciclo de tratamento é mais compacta e fisiológica (essencialmente limitada a um único mês), redução na dose total de gonadotrofinas, livres dos efeitos hipostrogênicos e redução na ocorrência de síndrome de hiperestimulação ovariano [1, 5, 46]. Nos estudos iniciais sobre a dose foi observada uma relação inversa entre a dose antagonista e taxas de implantação, sugerindo um potencial efeito embriotóxico [47]. Estas preocupações não foram confirmadas em ciclos de descongelamento com embriões resultantes dos ciclos com GnRH-ant [48], e não foram constatadas também diferenças nas taxas de gravidez em comparação com transferência de embriões descongelados provenientes de ciclos em que GnRH-a foi utilizado [49]. Estudos asseguram que a utilização dos GnRH-ant nos ciclos de FIV não é prejudicial para os conceitos [50] e a ocorrência de má formações é equiparada com a ocorrência observada nos resultados dos ciclos utilizando agonistas do GnRH [51].

No estudo de Murber *et al.* [52], os agonistas do GnRH apresentaram um número maior de oócitos coletados, menor taxa de anormalidades citoplasmáticas nos oócitos maduros, maior taxa de fertilização normal e maior número de zigotos com morfologia pronuclear normal, já os antagonistas apresentaram maior número de blastômero nos embriões no segundo dia. Como neste estudo também não houve diferença nas taxas de gestação, os autores concluem que as vantagens e desvantagens dos efeitos dos análogos do GnRH nos oócitos e embriões se compensam [52].

Em uma metaanálise um total de 22 ensaios clínicos randomizados envolvendo 3176 indivíduos, utilizando ambos GnRH-a e GnRH-ant em vários protocolos foram examinados para determinar se a taxa de nascido vivo é dependente do tipo de análogo utilizado e / ou o tipo de protocolo [53]. Nenhuma diferença significativa foi observada na probabilidade de nascido vivo entre os dois análogos do GnRH (OR: 0,86, 95% IC: 0,72-1,02). Este resultado se manteve estável em análise de subgrupo que estratificou os estudos por tipo de população estudada, tipo gonadotrofina usada na estimulação da ovulação, protocolo com agonista utilizado, tipo de agonista utilizado, protocolo com antagonista utilizado e tipo de antagonista utilizado.

Para averiguar a eficácia e a segurança dos protocolos de bloqueio hipofisário, metaanálise [26, 54] foi realizada reunindo 45 estudos randomizados e somando 7511 mulheres. Nesta metaanálise, os índices de gravidez (OR = 0.88, IC 95% = 0.77-1.00) e nascidos vivos (OR: 0,86, 95% IC: 0,69-1,08) não apresentaram diferenças significativas, comprovando que a eficácia de ambos os protocolos são semelhantes. No entanto, as incidências de síndrome de hiperestimulação ovariana diferiram entre os tratamentos, sendo que os antagonistas apresentaram uma redução significativa desta intercorrência [26, 54] (OR: 0,43, 95% IC: 0,33-0,57).

Pobre resposta ovariana

A pobre resposta ovariana é definida como uma produção reduzida de folículos e oócitos após a hiperestimulação ovariana controlada. A resposta diminuída ao tratamento resulta de uma baixa reserva ovariana que pode ser resultado de diversos fatores como idade avançada, cirurgias ovarianas prévias ou endometriose severa. Porém não há uma causa identificável em grande parte dos casos. As pacientes com pobre resposta ovariana apresentam diminuição nas taxas de fertilização e baixa qualidade embrionária quando comparadas com as pacientes com resposta normal ao tratamento, caracterizando um problema para a reprodução humana assistida [55].

A utilização GnRH-a em seu protocolo longo usual nestas pacientes, acarreta em uma supressão exacerbada na produção endógena de gonadotrofinas sem trazer real vantagem nos resultados da FIV [56]. Para alterar isso, diversas estratégias foram sugeridas, como a diminuição na dose dos agonistas e na duração do tratamento ou o uso de protocolos onde o efeito do flare-up pudesse ser utilizado (associação de estimulação folicular endógena e exógena) [56]. Com a introdução dos GnRH-ant nos ciclos de FIV, novas estratégias para o tratamento das pobres respondedoras surgiram [57]. O GnRH-ant possui diversas vantagens teóricas sobre o agonista do GnRH, pois permite um controle no grau de supressão hipofisária em decorrência de sua atuação dose-dependente e não causa a diminuição da secreção de gonadotrofinas durante a fase de recrutamento folicular [57].

Diversos estudos comparando a eficiência dos análogos do GnRH nos ciclos de FIV de pacientes com pobre resposta ovariana foram realizados e reunidos em uma metaanálise [58]. Quando comparado o protocolo longo do agonista do GnRH com os protocolos de antagonista do GnRH, a metaanálise mostrou um aumento no número de oócitos recuperados com a utilização do antagonista, porém não encontrou diferença na taxa de cancelamento do ciclo, número de oócitos maduros e taxas de gravidez clínica [58]. Porém, quando comparado o

antagonista do GnRH com o agonista do GnRH no protocolo flare-up, um número maior de oócitos foi recuperado utilizando o agonista do GnRH, mas nenhuma diferença nos outros parâmetros analisados foi encontrada [58].

A maior dificuldade encontrada nas metaanálises sobre o assunto é falta de padronização na definição da paciente a ser considerada pobre respondedora, pois, apenas com uma definição rigorosa destas pacientes, estudos comparativos significativos poderão ser realizados [59]. Visando o fim deste impasse, foi publicado um consenso realizado pela ESHRE onde foi definido que para a paciente ser considerada pobre respondedora, dois dos seguintes critérios devem estar presentes: 1. Idade avançada ou outro fator de risco para pobre resposta ovariana; 2. Baixa resposta ovariana prévia; 3. Teste de reserva ovariana anormal; Ficou definido também que pacientes que possuem duas baixas respostas ovarianas prévias, utilizando estimulação máxima, serão consideradas baixa respondedoras sem necessidade da presença de outros critérios [60]. Em contrapartida, pacientes que não possuem baixa resposta ovariana prévia, ou seja, pacientes com idade elevada e teste de reserva ovariana anormal serão definidas como baixa respondedora esperada [60]. Com esta definição, uma população homogênea poderá ser criada nos futuros estudos, dos quais seus resultados poderão ser comparados e conclusões confiáveis sobre os protocolos de tratamento para este grupo de pacientes poderão ser deduzidas [60].

Ovulação

Convencionalmente o hCG tem sido usado por muitos anos como um substituto eficaz do LH para desencadear o processo de maturação dos oócitos em ciclos com estimulação ovariana. Isto é possível devido ao compartilhamento entre esses dois hormônios de subunidade alfa similar. Contudo, um dos efeitos colaterais indesejáveis de hCG é o aumento

da produção do fator de crescimento endotelial vaso-ativo (vaso- active endothelial growth factor VEGF). VEGF é importante no desenvolvimento e manutenção da vascularização no corpo lúteo e na decídua endometrial. No entanto, ele também está implicado na fisiopatologia da síndrome de hiperestimulação ovariana [61]. O risco é tanto maior quanto mais folículos forem recrutados, e em especial nos pacientes com síndrome dos ovários micropolicísticos.

Administração do GnRH-a, pelo seu efeito *flare up* inicial, induz de modo dose-dependente a liberação de LH pela hipófise similarmente a um pico espontâneo de LH no meio do ciclo e, portanto, fornece uma alternativa à administração de hCG em protocolos de estimulação ovariana. De fato, GnRH-a têm sido utilizados para induzir a maturação final do oócito após estimulação ovariana controlada tanto em ciclos FIV quanto para outros procedimentos de reprodução assistida [62-64]. Em particular, o desencadeamento da maturação oocitária com GnRH-a tem sido sugerido como uma medida para evitar a síndrome da hiperestimulação ovariana [65-67].

GnRH-a tem sido aplicado com sucesso em ciclos de GnRH-ant para a indução do aumento de LH endógeno, demonstrando que a hipófise permanece responsiva sob a influência de antagonista de baixa dose diária [68-71]. Metaanálise analisando o desencadeamento da maturação oocitária com GnRH-a em ciclos com bloqueio hipofisário com GnRH-ant [72] concluiu que o número de oócitos maduros coletados e as taxas de clivagem embrionária são comparáveis aos obtidos com hCG. No entanto, a probabilidade da ocorrência de gravidez após uso do GnRH-a é significativamente menor em comparação ao tratamento padrão com HCG.

Fase lútea

Em ciclos naturais o pico de LH inicia o processo de ovulação. Segue-se a ruptura do folículo com liberação todo o complexo cumulus-oócito expandido e a parede residual do folículo converte-se então no corpo lúteo. Posteriormente, a secreção pulsátil de LH promove o desenvolvimento contínuo e mantém o tempo de vida normal do corpo lúteo. O aumento exponencial de hCG secretado pelo blastocisto implantado e seu trofoblasto estendem a vida útil do corpo lúteo até que a placenta assuma a função endócrina.

A depleção das células da granulosa devido à aspiração folicular e a supressão da liberação do LH pelos análogos (agonistas e antagonista) do GnRH tem sido associados ao defeito da fase lútea em ciclos de reprodução assistida. Assim, ao longo dos anos, tem havido uma preocupação contínua com respeito à ocorrência de deficiência da fase lútea principalmente em ciclos de IVF/ICSI [73, 74], tornando a utilização de hCG, progesterona e, por vezes, estradiol (E2) um procedimento rotineiro reprodução assistida para o suporte da fase lútea.

O propósito de análogos do GnRH na FIV é evitar a do pico de LH, mas as funções subseqüentes de LH ainda são muito necessárias. Os GnRH-a possui um início tardio em sua ação bloqueadora e também apresenta uma recuperação hipofisária mais tardia, estendendo consequentemente a inibição da secreção de LH para a fase lútea. Portanto, a deficiência potencial em função lútea deve ser corrigida. Tentativas para permitir a recuperação mais rápida da hipófise por interrupção precoce da GnRH-a têm repetidamente falhado [75, 76]. Por outro lado, apesar da meia vida menor do análogo, a função do corpo lúteo parece estar comprometida igualmente em ciclos com GnRH-ant. Aparentemente, o processo que culmina na luteólise é também iniciado prematuramente com o uso deste análogo e as taxas de gravidez estão comprometidas sem o uso de suporte lúteo [77, 78].

Os efeitos da administração de GnRH-a na fase lútea vem sendo objeto de diferentes

estudos. Lemay et al [79, 80] sugeriram que GnRH-a pode atuar como um agente luteolítico devido à dessensibilização dos receptores de GnRH. Além disso, Dubourdiou *et al.*[81] e Herman *et al.*[82] relataram deteriorização da função do corpo lúteo com administração de GnRH-a. Contudo, uma série de estudos mostram que a administração inadvertida de GnRH-a na fase lútea não compromete a continuidade da gravidez, sendo sugerido, ao contrário, possível efeito favorável sobre a implantação [83, 84]. Recentemente diferentes estudos analisando administração única [85-88] ou múltipla [89-91] do GnRH-a vêm, de fato, sugerindo efeito benéfico no suporte da fase lútea. O mecanismo do presumido efeito benéfico é pouco definido. Foi aventado que o GnRH-a pode colaborar na manutenção do corpo lúteo, agir diretamente sobre o endométrio através de receptores locais, ou possuir um efeito direto sobre os embriões ou ainda por alguma combinação dessas possibilidades. Metaanálise recente [92] demonstrou que a administração de uma dose única de GnRH-a na fase lútea pode aumentar taxa de implantação e gravidez em ciclos com protocolo de estimulação ovariana com GnRH-ant.

Considerações finais

Apesar da maior prática na utilização dos agonistas do GnRH como método de bloqueio hipofisário e de sua confiabilidade adquirida através dos anos de uso, os estudos demonstram que os antagonistas possuem eficácia equiparada com a vantagem de poder reduzir os episódios de síndrome de hiperestimulação ovariana. A estratificação da população que se submete às técnicas de FIV com subsequente análise das categorias beneficiadas com a alteração do método de bloqueio hipofisário ainda se faz necessária.

Apesar dos análogos de GnRH terem adquirido lugar importante na reprodução assistida, a descoberta de GnRHR extra-pituitários em humanos faz com que estudo dos aspectos relacionados a possíveis efeitos diretos dos análogos sobre estruturas como o ovário, oócitos, células da granulosa, e embrião sejam necessários.

Referências bibliográficas

1. Hayden C: **GnRH analogues: applications in assisted reproductive techniques.** *Eur J Endocrinol* 2008, **159 Suppl 1**:S17-25.
2. Cheng CK, Leung PC: **Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans.** *Endocr Rev* 2005, **26**:283-306.
3. Schally AV, Nair RM, Redding TW, Arimura A: **Isolation of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalami.** *J Biol Chem* 1971, **246**:7230-7236.
4. Ortmann O, Diedrich K: **Pituitary and extrapituitary actions of gonadotrophin-releasing hormone and its analogues.** *Hum Reprod* 1999, **14 Suppl 1**:194-206.
5. Griesinger G, Felberbaum RE, Schultze-Mosgau A, Diedrich K: **Gonadotropin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive techniques: are there clinical differences between agents?** *Drugs* 2004, **64**:563-575.
6. Bliss SP, Navratil AM, Xie J, Roberson MS: **GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility.** *Front Neuroendocrinol* 2010, **31**:322-340.
7. Conn PM, Crowley WF, Jr.: **Gonadotropin-releasing hormone and its analogues.** *N Engl J Med* 1991, **324**:93-103.
8. Pelinck MJ, Hoek A, Simons AH, Heineman MJ: **Efficacy of natural cycle IVF: a review of the literature.** *Hum Reprod Update* 2002, **8**:129-139.
9. Queenan JT, Jr., Whiman-Elia G: **An appreciation of modern ART.** *Clin Obstet Gynecol* 2000, **43**:942-957.

10. Loumaye E: **The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilization and embryo transfer.** *Hum Reprod* 1990, **5**:357-376.
11. Huirne JA, Homburg R, Lambalk CB: **Are GnRH antagonists comparable to agonists for use in IVF?** *Hum Reprod* 2007, **22**:2805-2813.
12. Watson CJ, Bossenmaier I, Cardinal R, Petryka ZJ: **Repression by hematin of porphyrin biosynthesis in erythrocyte precursors in congenital erythropoietic porphyria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974, **71**:278-282.
13. Schally AV: **Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: their impact on the control of tumorigenesis.** *Peptides* 1999, **20**:1247-1262.
14. Karten MJ, Rivier JE: **Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective.** *Endocr Rev* 1986, **7**:44-66.
15. Koch Y, Baram T, Hazum E, Fridkin M: **Resistance to enzymic degradation of LH-RH analogues possessing increased biological activity.** *Biochem Biophys Res Commun* 1977, **74**:488-491.
16. Conn PM, Crowley WF, Jr.: **Gonadotropin-releasing hormone and its analogs.** *Annu Rev Med* 1994, **45**:391-405.
17. Smitz J, Devroey P, Camus M, Deschacht J, Khan I, Staessen C, Van Waesberghe L, Wisanto A, Van Steirteghem AC: **The luteal phase and early pregnancy after combined GnRH-agonist/HMG treatment for superovulation in IVF or GIFT.** *Hum Reprod* 1988, **3**:585-590.
18. van Loenen AC, Huirne JA, Schats R, Hompes PG, Lambalk CB: **GnRH agonists, antagonists, and assisted conception.** *Semin Reprod Med* 2002, **20**:349-364.

19. Broekmans FJ, Bernardus RE, Berkhout G, Schoemaker J: **Pituitary and ovarian suppression after early follicular and mid-luteal administration of a LHRH agonist in a depot formulation: decapeptyl CR.** *Gynecol Endocrinol* 1992, **6**:153-161.
20. Holland FJ, Fishman L, Costigan DC, Luna L, Leeder S: **Pharmacokinetic characteristics of the gonadotropin-releasing hormone analog D-Ser(TBU)-6EA-10luteinizing hormone-releasing hormone (buserelin) after subcutaneous and intranasal administration in children with central precocious puberty.** *J Clin Endocrinol Metab* 1986, **63**:1065-1070.
21. Hazum E, Keinan D: **Gonadotropin releasing hormone activation is mediated by dimerization of occupied receptors.** *Biochem Biophys Res Commun* 1985, **133**:449-456.
22. Gregory H, Taylor CL, Hopkins CR: **Luteinizing hormone release from dissociated pituitary cells by dimerization of occupied LHRH receptors.** *Nature* 1982, **300**:269-271.
23. Cheung LP, Lam PM, Lok IH, Chiu TT, Yeung SY, Tjer CC, Haines CJ: **GnRH antagonist versus long GnRH agonist protocol in poor responders undergoing IVF: a randomized controlled trial.** *Hum Reprod* 2005, **20**:616-621.
24. Sbracia M, Colabianchi J, Giallonardo A, Giannini P, Piscitelli C, Morgia F, Montigiani M, Schimberni M: **Cetrorelix protocol versus gonadotropin-releasing hormone analog suppression long protocol for superovulation in intracytoplasmic sperm injection patients older than 40.** *Fertil Steril* 2009, **91**:1842-1847.

25. **Comparable clinical outcome using the GnRH antagonist ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH surges in women undergoing ovarian stimulation.** *Hum Reprod* 2001, **16**:644-651.
26. Al-Inany HG, Youssef MA, Aboulghar M, Broekmans F, Sterrenburg M, Smit J, Abou-Setta AM: **Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology.** *Cochrane Database Syst Rev* 2011:CD001750.
27. Duijkers IJ, Klipping C, Willemsen WN, Krone D, Schneider E, Niebch G, Hermann R: **Single and multiple dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix in healthy female volunteers.** *Hum Reprod* 1998, **13**:2392-2398.
28. Oberye JJ, Mannaerts BM, Huisman JA, Timmer CJ: **Pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of ganirelix (Antagon/Orgalutran). Part II. Dose-proportionality and gonadotropin suppression after multiple doses of ganirelix in healthy female volunteers.** *Fertil Steril* 1999, **72**:1006-1012.
29. Oberye JJ, Mannaerts BM, Kleijn HJ, Timmer CJ: **Pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of ganirelix (Antagon/Orgalutran). Part I. Absolute bioavailability of 0.25 mg of ganirelix after a single subcutaneous injection in healthy female volunteers.** *Fertil Steril* 1999, **72**:1001-1005.
30. Rivier J, Porter J, Hoeger C, Theobald P, Craig AG, Dykert J, Corrigan A, Perrin M, Hook WA, Siraganian RP, et al.: **Gonadotropin-releasing hormone antagonists with N omega-triazolylornithine, -lysine, or -p-aminophenylalanine residues at positions 5 and 6.** *J Med Chem* 1992, **35**:4270-4278.

31. Garnick MB, Campion M: **Abarelix Depot, a GnRH antagonist, v LHRH superagonists in prostate cancer: differential effects on follicle-stimulating hormone. Abarelix Depot study group.** *Mol Urol* 2000, **4**:275-277.
32. Cook T, Sheridan WP: **Development of GnRH antagonists for prostate cancer: new approaches to treatment.** *Oncologist* 2000, **5**:162-168.
33. Lainas TG, Petsas GK, Zorzovilis IZ, Iliadis GS, Lainas GT, Cazlaris HE, Kolibianakis EM: **Initiation of GnRH antagonist on Day 1 of stimulation as compared to the long agonist protocol in PCOS patients. A randomized controlled trial: effect on hormonal levels and follicular development.** *Hum Reprod* 2007, **22**:1540-1546.
34. Albuquerque LE, Saconato H, Maciel MC: **Depot versus daily administration of gonadotrophin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in assisted reproduction cycles.** *Cochrane Database Syst Rev* 2005:CD002808.
35. Chuang CC, Chen CD, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS: **Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization.** *Fertil Steril* 2003, **79**:63-68.
36. Pellicer A, Simon C, Miro F, Castellvi RM, Ruiz A, Ruiz M, Perez M, Bonilla-Musoles F: **Ovarian response and outcome of in-vitro fertilization in patients treated with gonadotrophin-releasing hormone analogues in different phases of the menstrual cycle.** *Hum Reprod* 1989, **4**:285-289.
37. San Roman GA, Surrey ES, Judd HL, Kerin JF: **A prospective randomized comparison of luteal phase versus concurrent follicular phase initiation of gonadotropin-releasing hormone agonist for in vitro fertilization.** *Fertil Steril* 1992, **58**:744-749.

38. Janssens RM, Brus L, Cahill DJ, Huirne JA, Schoemaker J, Lambalk CB: **Direct ovarian effects and safety aspects of GnRH agonists and antagonists.** *Hum Reprod Update* 2000, **6**:505-518.
39. Smitz J, Devroey P, Van Steirteghem AC: **Endocrinology in luteal phase and implantation.** *Br Med Bull* 1990, **46**:709-719.
40. Daya S: **Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles.** *Cochrane Database Syst Rev* 2000:CD001299.
41. Maheshwari A, Gibreel A, Siristatidis CS, Bhattacharya S: **Gonadotrophin-releasing hormone agonist protocols for pituitary suppression in assisted reproduction.** *Cochrane Database Syst Rev* 2011:CD006919.
42. Olivennes F, Alvarez S, Bouchard P, Fanchin R, Salat-Baroux J, Frydman R: **The use of a GnRH antagonist (Cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 versus 2 mg.** *Hum Reprod* 1998, **13**:2411-2414.
43. Albano C, Smitz J, Camus M, Riethmuller-Winzen H, Van Steirteghem A, Devroey P: **Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation.** *Fertil Steril* 1997, **67**:917-922.
44. **A double-blind, randomized, dose-finding study to assess the efficacy of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). The ganirelix dose-finding study group.** *Hum Reprod* 1998, **13**:3023-3031.

45. Al-Inany H, Aboulghar M: **GnRH antagonist in assisted reproduction: a Cochrane review.** *Hum Reprod* 2002, **17**:874-885.
46. Tarlatzis BC, Kolibianakis EM: **GnRH agonists vs antagonists.** *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007, **21**:57-65.
47. Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL: **Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome.** *Hum Reprod* 2000, **15**:165-170.
48. Kol S, Lightman A, Hillensjo T, Devroey P, Fauser B, Tarlatzis B, Mannaerts B, Itskovitz-Eldor J: **High doses of gonadotrophin-releasing hormone antagonist in in-vitro fertilization cycles do not adversely affect the outcome of subsequent freeze-thaw cycles.** *Hum Reprod* 1999, **14**:2242-2244.
49. Seelig AS, Al-Hasani S, Katalinic A, Schopper B, Sturm R, Diedrich K, Ludwig M: **Comparison of cryopreservation outcome with gonadotropin-releasing hormone agonists or antagonists in the collecting cycle.** *Fertil Steril* 2002, **77**:472-475.
50. Ludwig M, Riethmuller-Winzen H, Felberbaum RE, Olivennes F, Albano C, Devroey P, Diedrich K: **Health of 227 children born after controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization using the luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix.** *Fertil Steril* 2001, **75**:18-22.
51. Bonduelle M, Obery J, Mannaerts B, Devroey P: **Large prospective, pregnancy and infant follow-up trial assures the health of 1000 fetuses conceived after treatment with the GnRH antagonist ganirelix during controlled ovarian stimulation.** *Hum Reprod* 2010, **25**:1433-1440.

52. Murber A, Fancsovits P, Ledo N, Gilan ZT, Rigo J, Jr., Urbancsek J: **Impact of GnRH analogues on oocyte/embryo quality and embryo development in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles: a case control study.** *Reprod Biol Endocrinol* 2009, **7**:103.
53. Kolibianakis EM, Collins J, Tarlatzis BC, Devroey P, Diedrich K, Griesinger G: **Among patients treated for IVF with gonadotrophins and GnRH analogues, is the probability of live birth dependent on the type of analogue used? A systematic review and meta-analysis.** *Hum Reprod Update* 2006, **12**:651-671.
54. Gilliam ML: **Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology.** *Obstet Gynecol* 2011, **118**:706-707.
55. Mahutte NG, Arici A: **New advances in the understanding of endometriosis related infertility.** *J Reprod Immunol* 2002, **55**:73-83.
56. Pu D, Wu J, Liu J: **Comparisons of GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol in poor ovarian responders undergoing IVF.** *Hum Reprod* 2011, **26**:2742-2749.
57. Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J: **Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review.** *Hum Reprod Update* 2003, **9**:61-76.
58. Franco JG, Jr., Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Felipe V, Cornicelli J, Cavagna M, Oliveira JB: **GnRH agonist versus GnRH antagonist in poor ovarian responders: a meta-analysis.** *Reprod Biomed Online* 2006, **13**:618-627.
59. Vollenhoven B, Osianlis T, Catt J: **Is there an ideal stimulation regimen for IVF for poor responders and does it change with age?** *J Assist Reprod Genet* 2008, **25**:523-529.

60. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L: **ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria.** *Hum Reprod* 2011, **26**:1616-1624.
61. Levin ER, Rosen GF, Cassidenti DL, Yee B, Meldrum D, Wisot A, Pedram A: **Role of vascular endothelial cell growth factor in Ovarian Hyperstimulation Syndrome.** *J Clin Invest* 1998, **102**:1978-1985.
62. Segal S, Casper RF: **Gonadotropin-releasing hormone agonist versus human chorionic gonadotropin for triggering follicular maturation in in vitro fertilization.** *Fertil Steril* 1992, **57**:1254-1258.
63. Lanzone A, Fulghesu AM, Villa P, Guida C, Guido M, Nicoletti MC, Caruso A, Mancuso S: **Gonadotropin-releasing hormone agonist versus human chorionic gonadotropin as a trigger of ovulation in polycystic ovarian disease gonadotropin hyperstimulated cycles.** *Fertil Steril* 1994, **62**:35-41.
64. Buckett WM, Bentick B, Shaw RW: **Induction of the endogenous gonadotrophin surge for oocyte maturation with intra-nasal gonadotrophin-releasing hormone analogue (buserelin): effective minimal dose.** *Hum Reprod* 1998, **13**:811-814.
65. Kol S, Lewit N, Itskovitz-Eldor J: **Ovarian hyperstimulation: effects of GnRH analogues. Ovarian hyperstimulation syndrome after using gonadotrophin-releasing hormone analogue as a trigger of ovulation: causes and implications.** *Hum Reprod* 1996, **11**:1143-1144.
66. Lewit N, Kol S, Manor D, Itskovitz-Eldor J: **Comparison of gonadotrophin-releasing hormone analogues and human chorionic gonadotrophin for the induction of ovulation and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: a case-control study.** *Hum Reprod* 1996, **11**:1399-1402.

67. Felberbaum RE, Reissmann T, Kupker W, Bauer O, al Hasani S, Diedrich C, Diedrich K: **Preserved pituitary response under ovarian stimulation with HMG and GnRH antagonists (Cetrorelix) in women with tubal infertility.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995, **61**:151-155.
68. Kol S: **Prediction of ovarian hyperstimulation syndrome: why predict if we can prevent!** *Hum Reprod* 2003, **18**:1557-1558.
69. Kol S: **Luteolysis induced by a gonadotropin-releasing hormone agonist is the key to prevention of ovarian hyperstimulation syndrome.** *Fertil Steril* 2004, **81**:1-5.
70. Orvieto R: **Can we eliminate severe ovarian hyperstimulation syndrome?** *Hum Reprod* 2005, **20**:320-322.
71. Griesinger G, Schultz L, Bauer T, Broessner A, Frambach T, Kissler S: **Ovarian hyperstimulation syndrome prevention by gonadotropin-releasing hormone agonist triggering of final oocyte maturation in a gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in combination with a "freeze-all" strategy: a prospective multicentric study.** *Fertil Steril* 2011, **95**:2029-2033, 2033 e2021.
72. Griesinger G, Diedrich K, Devroey P, Kolibianakis EM: **GnRH agonist for triggering final oocyte maturation in the GnRH antagonist ovarian hyperstimulation protocol: a systematic review and meta-analysis.** *Hum Reprod Update* 2006, **12**:159-168.
73. Fatemi HM, Popovic-Todorovic B, Papanikolaou E, Donoso P, Devroey P: **An update of luteal phase support in stimulated IVF cycles.** *Hum Reprod Update* 2007, **13**:581-590.
74. Pritts EA, Atwood AK: **Luteal phase support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials.** *Hum Reprod* 2002, **17**:2287-2299.

75. Beckers NG, Laven JS, Eijkemans MJ, Fauser BC: **Follicular and luteal phase characteristics following early cessation of gonadotrophin-releasing hormone agonist during ovarian stimulation for in-vitro fertilization.** *Hum Reprod* 2000, **15**:43-49.
76. Pantos K, Meimeth-Damianaki T, Vaxevanoglou T, Kapetanakis E: **Prospective study of a modified gonadotropin-releasing hormone agonist long protocol in an in vitro fertilization program.** *Fertil Steril* 1994, **61**:709-713.
77. Albano C, Grimbizis G, Smitz J, Riethmuller-Winzen H, Reissmann T, Van Steirteghem A, Devroey P: **The luteal phase of nonsupplemented cycles after ovarian superovulation with human menopausal gonadotropin and the gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix.** *Fertil Steril* 1998, **70**:357-359.
78. de Jong D, Macklon NS, Fauser BC: **A pilot study involving minimal ovarian stimulation for in vitro fertilization: extending the "follicle-stimulating hormone window" combined with the gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix.** *Fertil Steril* 2000, **73**:1051-1054.
79. Lemay A, Faure N, Labrie F: **Sensitivity of pituitary and corpus luteum responses to single intranasal administration of (D-ser[TBU]6-des-gly-NH₂(10)) luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide (Buserelin) in normal women.** *Fertil Steril* 1982, **37**:193-200.
80. Lemay A, Faure N, Labrie F, Fazekas AT: **Gonadotroph and corpus luteum responses to two successive intranasal doses of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist at different days after the midcycle luteinizing hormone surge.** *Fertil Steril* 1983, **39**:661-667.

81. Dubourdieu S, Charbonnel B, Massai MR, Marraoui J, Spitz I, Bouchard P: **Suppression of corpus luteum function by the gonadotropin-releasing hormone antagonist Nal-Glu: effect of the dose and timing of human chorionic gonadotropin administration.** *Fertil Steril* 1991, **56**:440-445.
82. Herman A, Ron-El R, Golan A, Nachum H, Soffer Y, Caspi E: **Impaired corpus luteum function and other undesired results of pregnancies associated with inadvertent administration of a long-acting agonist of gonadotrophin-releasing hormone.** *Hum Reprod* 1992, **7**:465-468.
83. Papanikolaou EG, Platteau P, Albano C, Kolibianakis E, Devroey P: **Achievement of pregnancy three times in the same patient during luteal GnRH agonist administration.** *Reprod Biomed Online* 2005, **10**:347-349.
84. Tan HH, Yeong CT, Loh KE: **Perinatal outcome of pregnancies after inadvertent exposure to gonadotrophin-releasing hormone analogue.** *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006, **46**:336-340.
85. Isik AZ, Caglar GS, Sozen E, Akarsu C, Tuncay G, Ozbicer T, Vicdan K: **Single-dose GnRH agonist administration in the luteal phase of GnRH antagonist cycles: a prospective randomized study.** *Reprod Biomed Online* 2009, **19**:472-477.
86. Razieh DF, Maryam AR, Nasim T: **Beneficial effect of luteal-phase gonadotropin-releasing hormone agonist administration on implantation rate after intracytoplasmic sperm injection.** *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009, **48**:245-248.
87. Tesarik J, Hazout A, Mendoza C: **Enhancement of embryo developmental potential by a single administration of GnRH agonist at the time of implantation.** *Hum Reprod* 2004, **19**:1176-1180.

88. Tesarik J, Hazout A, Mendoza-Tesarik R, Mendoza N, Mendoza C: **Beneficial effect of luteal-phase GnRH agonist administration on embryo implantation after ICSI in both GnRH agonist- and antagonist-treated ovarian stimulation cycles.** *Hum Reprod* 2006, **21**:2572-2579.
89. Qublan H, Amarin Z, Al-Qudah M, Diab F, Nawasreh M, Malkawi S, Balawneh M: **Luteal phase support with GnRH-a improves implantation and pregnancy rates in IVF cycles with endometrium of ≤ 7 mm on day of egg retrieval.** *Hum Fertil (Camb)* 2008, **11**:43-47.
90. Pirard C, Donnez J, Loumaye E: **GnRH agonist as novel luteal support: results of a randomized, parallel group, feasibility study using intranasal administration of buserelin.** *Hum Reprod* 2005, **20**:1798-1804.
91. Pirard C, Donnez J, Loumaye E: **GnRH agonist as luteal phase support in assisted reproduction technique cycles: results of a pilot study.** *Hum Reprod* 2006, **21**:1894-1900.
92. Oliveira JB, Baruffi R, Petersen CG, Mauri AL, Cavagna M, Franco JG, Jr.: **Administration of single-dose GnRH agonist in the luteal phase in ICSI cycles: a meta-analysis.** *Reprod Biol Endocrinol* 2010, **8**:107.

Capítulo 2

GnRH agonist versus GnRH antagonist in assisted reproduction cycles: DNA fragmentation and apoptosis of granulosa cells

Heloisa Lopes Lavorato¹, Joao Batista A Oliveira^{1,2,3}, Claudia G Petersen^{1,2,3}, Ana L Mauri^{2,3}, Fabiana C Massaro^{2,3}, Liliane FI Silva^{1,2,3}, Andreia Nicoletti², Mario Cavagna^{2,3,4}, Ricardo LR Baruffi^{2,3}, José G Franco Jr^{1,2,3,*}

¹Department of Gynaecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, Brazil

²Center for Human Reproduction Prof Franco Jr, Ribeirao Preto, Brazil

³Paulista Centre for Diagnosis, Research and Training, Ribeirao Preto, Brazil

⁴Women's Health Reference Center, Hospital Perola Byington, Sao Paulo, Brazil

*Corresponding author

E-mail addresses:

HLL: heloisalavorato@yahoo.com.br

JBAO: joabatista@crh.com.br

CGP: petersenclaudia@crh.com.br

ALM: analucia@crh.com.br

FCM: fabiana@crh.com.br

LFIS: liliane@crh.com.br

AN: andreia@crh.com.br

MC: mariocavagna@crh.com.br

RLRB: baruffir@crh.com.br

JGF*: crh@crh.com.br

Abstract

Background: The expression of the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) receptor has been demonstrated in the human ovary, and it has therefore been suggested that GnRH agonists have different effects on the intraovarian system compared with GnRH antagonists, particularly in the granulosa cell (GC) layer. This study aimed to compare the level of apoptosis and DNA fragmentation in human GCs exposed to agonist or antagonist of GnRH in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles supplemented with recombinant LH (r-LH).

Methods: Patients without ovulatory dysfunction aged ≤ 37 years and in the first ICSI cycle were prospectively randomised to receive either a long GnRH agonist protocol or a multi-dose antagonist protocol. In both groups, the GCs were collected during oocyte denudation and separated from blood cells by centrifugation on a 60% isolate solution. It should be emphasized that the study examined only GCs that had been directly detached from the oocyte cumulus complexes. The GCs were then analyzed for DNA fragmentation by TUNEL assay and for apoptosis using annexin-V. The primary outcome measurements were given as the percentage of GCs with DNA fragmentation and apoptosis out of the total number of GCs analyzed. The comparison of the agonist versus the antagonist group was performed using the Mann-Whitney test.

Results: DNA fragmentation: 32 patients were included in either the GnRH agonist group (n = 16) or antagonist group (n = 16). The percentage of GCs with positive DNA fragmentation did not differ significantly ($P = 0.76$) between the agonist group ($15.5 \pm 9.4\%$) and the antagonist group ($18.8 \pm 13.3\%$). Apoptosis: 28 patients were included in either the GnRH agonist group (n = 14) or antagonist group (n = 14). The percentage of GCs positive for apoptosis did not differ significantly ($P = 0.78$) between the agonist group ($34.6 \pm 14.7\%$) and the antagonist group ($36.5 \pm 22\%$).

Conclusions: The results suggests that, despite the different mechanisms of action of the GnRH analogues, therapy with either an agonist or antagonist of GnRH is associated with comparable levels of DNA fragmentation and apoptosis in granulosa cells in IVF/ICSI cycles supplemented with r-LH.

Key words: GnRH agonist, GnRH antagonist, granulosa cells, DNA fragmentation, apoptosis, recombinant LH

Background

Apoptosis, or programmed cell death, is a suicidal process crucial for the maintenance of ovarian homeostasis. It is responsible for the selection of the dominant follicle and the collapse of other follicles recruited at the beginning of the cycle and for the degeneration of corpus luteum [1]. In this way, GCs play a crucial role in oocyte maturation processes. Apoptosis or even necrosis may influence oocyte and embryo quality. Several factors can act as triggers of apoptosis in granulosa cells (GCs), including the exogenous hormones used in *in vitro* fertilisation (IVF).

The first IVF therapies were performed in natural cycles. However, to obtain the development of multiple ovarian follicles, controlled ovarian stimulation is now widely implemented in assisted reproduction treatment. Specifically, in stimulated IVF cycles, pharmacological doses of gonadotropins create a hormonal environment that induces the growth of a cohort of follicles that would otherwise degenerate under natural conditions. However, this process is risky due to the possibility of the occurrence of unintended ovulation induced by the endogenous hormonal environment. The use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogues in IVF cycles suppresses endogenous gonadotropin secretion, thus preventing the premature LH surge and controlling ovarian cycles. GnRH agonists

(GnRH-a) cause pituitary desensitisation by clustering and internalising GnRH receptors after an enhanced liberation of gonadotropins (flare up) [2, 3]. GnRH antagonists (GnRh-ant) act through an immediate competitive blockage of GnRH receptors [3]. Thus, GnRH-ant cause an immediate, reversible and fast suppression of the release of gonadotropins [2-5]. The discovery of GnRH receptors in GCs at the mRNA and protein levels [6] led researchers to study the effects of GnRH analogues on these cells. It has been established that GnRH-a directly induces apoptosis in GCs [7]. It was also reported that GnRH-ant reduces apoptosis in rat GCs and in human GCs *in vitro* [8, 9]; however, when the effects of GnRH-a and GnRH-ant were compared, no differences in the apoptosis rate in GCs were found [10, 11].

In contrast, it has been demonstrated that the LH supplementation in IVF cycles using a GnRH-a or GnRH-ant improves the clinical and laboratory outcomes of the cycle [12, 13]. In addition to a relationship to GC physiopathology, the inclusion of LH in the stimulation protocol of patients with GnRH-a-induced pituitary desensitisation seems to prevent apoptosis in GCs [14].

Therefore, to better comprehend the action of GnRH analogues on ovarian activity, the present randomised study aimed to compare the effects of GnRH-a and GnRH-ant on DNA fragmentation and apoptosis in GCs in IVF/ICSI cycles supplemented with LH.

Methods

Participants

This prospective study was conducted on women undergoing the first intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycle at the Center for Human Reproduction Professor Franco Junior. The inclusion criteria were as follows: age ≤ 37 years, first IVF/ICSI cycle, BMI < 30 kg/m², regular menses and the presence of both ovaries. The exclusion criteria were as follows:

polycystic ovarian syndrome, severe endometriosis, ovarian cyst assessed by transvaginal ultrasound and basal FSH in the early follicular phase of ≥ 10 IU/ml. Written consent was taken from all the patients, and the study was performed according to the standards of the Institutional Ethics Committee.

Randomisation

A double randomisation was performed. First, a computer-generated table (first randomisation) indicated the protocol of ovarian stimulation for each case: GnRH-a or GnRH-ant. At the moment the protocol of ovarian stimulation was prescribed, lots were drawn (second randomisation) to determine to which case each patient would correspond (e.g., case #1 and/or case #10). Only one nurse, blinded to subject identity, performed all lot drawings. In this manner, each patient were randomly allocated into one of two groups:

- GnRH-a group: long GnRH agonist (leuprolide acetate, Lupron®, Abbott, Brazil) protocol
- GnRH-ant group: multi-dose GnRH antagonist (cetorelix, Cetrotide®, Serono, Brazil) protocol

Ovarian stimulation

GnRH Agonist Protocol: First, pituitary down-regulation was started during the second phase of the previous menstrual cycle with the GnRH-a leuprolide acetate (Lupron®, Abbott, Brazil) at a dose of 1 mg/day for 14 days. Then, ovarian stimulation was started with a fixed dose of 150 to 225 IU recombinant FSH (rFSH / Gonal F®; Serono, SP, Brazil) with 75 IU/day recombinant LH (rLH / Luveris®; Serono, SP, Brazil) for 7 days. On the 8th day of ovarian stimulation, follicular development was monitored by 7 MHz transvaginal ultrasound (Medison Digital Color MT; Medison Co. Ltd., Seoul, Korea). The dose of rFSH was adapted according to ovarian response, and the supplementation with rLH was increased to 150

IU/day when one or more follicles measuring ≥ 10 mm in diameter were found.

GnRH Antagonist Protocol: On the 3rd day of the menstrual cycle, ovarian stimulation was started with a fixed dose of 150 to 225 IU rFSH with 75 IU/day rLH for 5 days. On the 8th day of the menstrual cycle (6th day of ovarian stimulation), follicular development was monitored by 7 MHz transvaginal ultrasound (Medison Digital Color MT; Medison Co. Ltd., Seoul, Korea). The dose of rFSH was adapted according to the ovarian response, and the supplementation with rLH was increased to 150 IU/day when one or more follicles measuring ≥ 10 mm in diameter were found. The GnRH-ant cetrotirelix (Cetrotide®, Serono, Brazil) at a dose of 0.25 mg/day s.c. was started when at least one follicle ≥ 14 mm was observed on ultrasound.

For both groups, (GnRH-a and GnRH-ant), 250 μ g recombinant hCG (r-hCG / Ovidrel®; Serono, SP, Brazil) was administered s.c. when at least two follicles reached a mean diameter ≥ 17 mm for the final oocyte maturation. GnRH-a and GnRH-ant were given until the administration of hCG. Oocyte retrieval was performed by transvaginal aspiration under ultrasound guidance 34 – 36 hours after the r-hCG injection.

Isolation of granulosa cells

The retrieved oocytes from both groups were incubated in culture medium (P1; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) at 37°C and 5.5% CO₂ for 1 hour. The GCs were removed by exposing the oocytes to modified human tubal fluid medium (mHTF, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) containing 40 IU/ml hyaluronidase (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) for 30 sec, after which the coronal cells were manually removed using a stripper (Cook, Australia). The GCs were separated from blood cells by centrifugation on a 60% Isolate®

(Irvine Scientific, USA) solution and subjected to the DNA fragmentation and apoptosis analyses. It should be emphasised that the study examined only the GCs that were directly detached from the oocyte cumulus complexes.

Determination of DNA fragmentation (Figure 1)

DNA fragmentation in the GCs was measured using terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay, which was performed using an in situ cell death detection kit with tetramethylrhodamine-labelled dUTP (Roche, Monza, Italy). TUNEL identifies DNA breaks by labelling the free 3'-OH termini with modified nucleotides in an enzymatic reaction with TdT. TdT catalyses the polymerisation of labelled nucleotides to the free 3'-OH DNA ends in a template-independent manner. The slides with GCs from the GnRH-a and GnRH-ant groups were air-dried, fixed in formaldehyde solution for 30 min, and permeabilised with 0.1% Triton X-100 (VETEC Quimica Fina Ltd., Duque de Caxias, Brazil) in 0.1% sodium citrate at 4°C for 10 min. After washing with phosphate-buffered saline (PBS), the slides were processed for the TUNEL assay. The TdT-labelled nucleotide mix was added to each slide and incubated in the dark in a humidified atmosphere for 2 h at 37 °C. After the enzymatic reaction was stopped, the slides were rinsed twice in PBS and then counterstained with Vectashield Mounting Medium with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1.5 µg/mL; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The final evaluation was performed using a fluorescent microscope, and the percentage of TUNEL-positive GCs was determined. The number of cells per field stained with DAPI (blue) was counted; in the same field, the number of TUNEL-positive cells (red) was expressed as a percentage of cells with DNA fragmentation. The same technician, blinded to subject identity, performed all examinations.

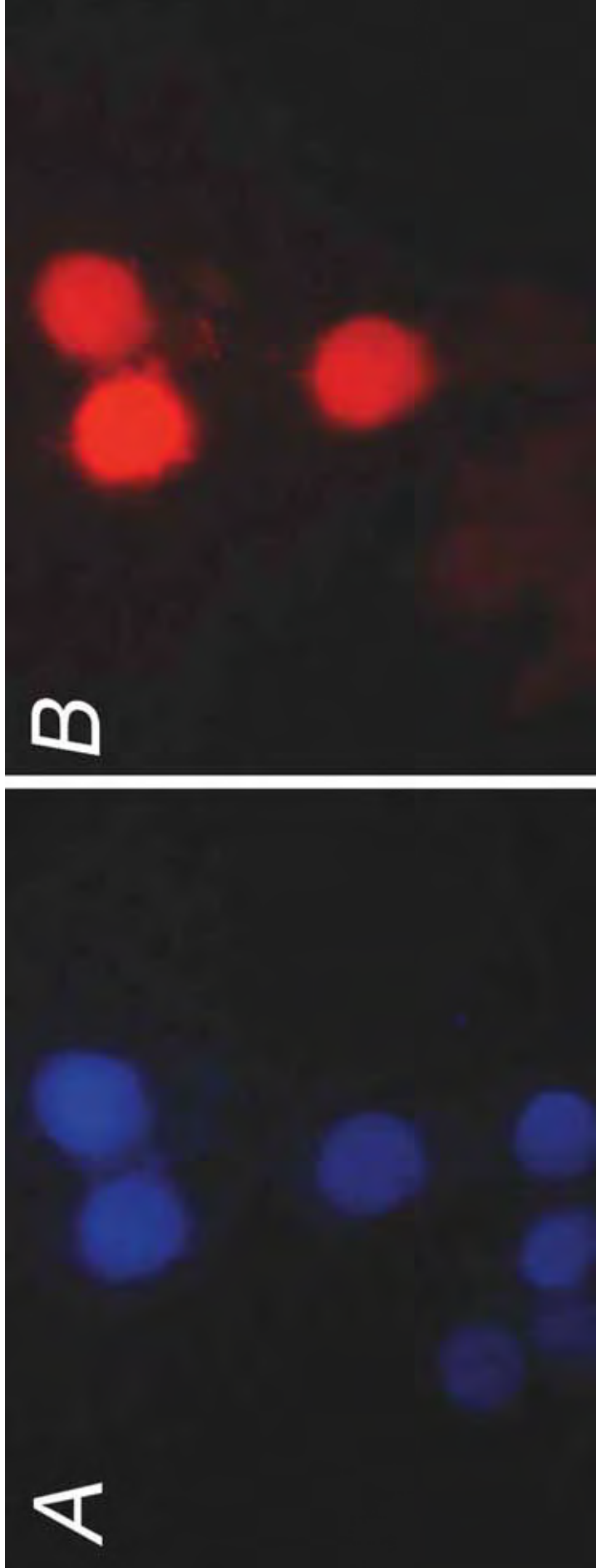


Figure 1. Determination of DNA fragmentation. (A) Cell identification - cell stained with DAPI (blue). (B) DNA fragmentation - cell with red fluorescence (TUNEL-positive)

Determination of apoptosis (Figure 2)

Phosphatidylserine, a membrane phospholipid, becomes translocated onto the outer leaflet of the cell membrane during the early stages of apoptosis. The presence of green annexin V fluorescence can serve as a marker of early apoptosis because annexin V specifically and reversibly binds to externalised phosphatidylserine. The GCs were incubated with 3 μ l annexin-V, 1 μ l propidium iodide (Alexa Fluor 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit; Molecular Probes, Eugene, OR) and 1 μ l Hoechst 33342 at room temperature for 15 min in the dark. Propidium iodide (PI) is a red fluorescent dye that allows the identification of necrotic cells because it is impermeable to live cells (i.e., it is unable to penetrate the nucleus of live cells but stains the nucleus of necrotic cells). Hoechst 33342 is a blue fluorescent dye that allows the identification of cells because it is cell-permeable. After incubation, the suspension was centrifuged at 800 g for 10 min, and the pellet was mounted on poly-L-lysine-coated slides for examination by fluorescence microscopy. Normal cells were Annexin V(-)/PI(-), early apoptotic cells were Annexin V(+)/PI(-) and necrotic cells were Annexin V(+/-)/PI(+). The percentages of apoptotic GCs (GCs stained in green, positive for annexin-V, but which excluded the red propidium iodide dye) were determined. The same technician, blinded to subject identity, performed all examinations.

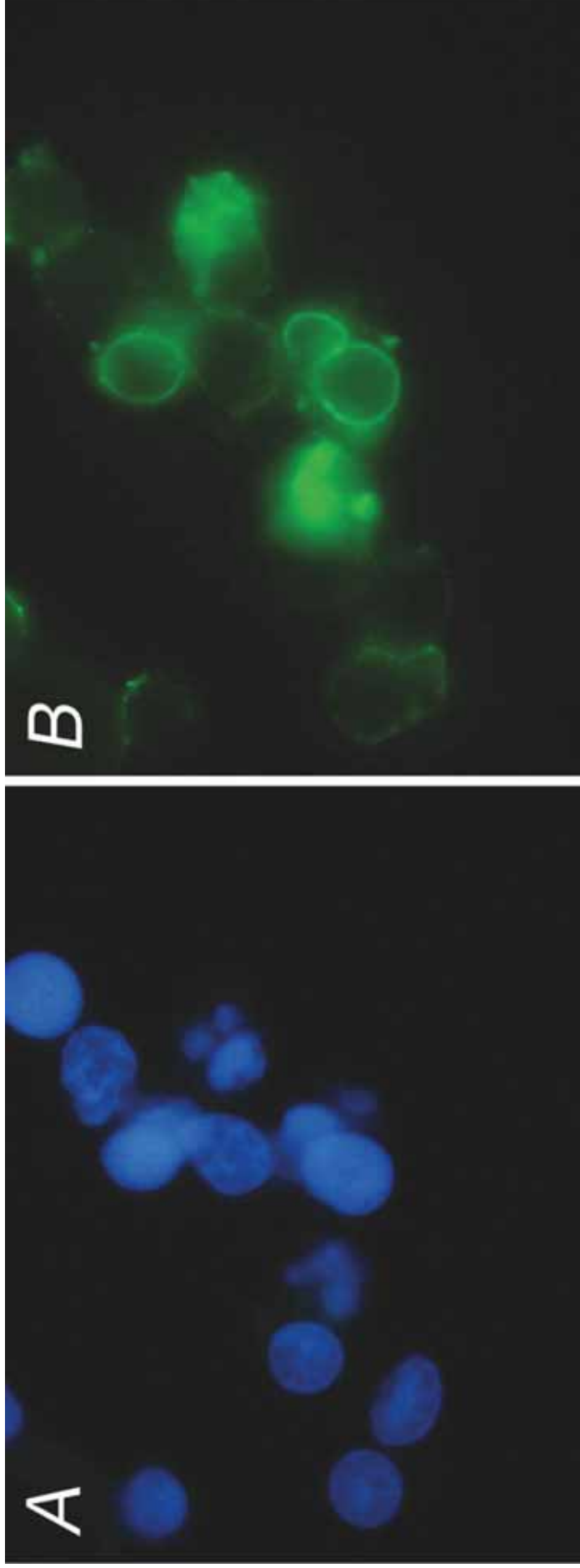


Figure 2. Determination of apoptosis. (A) Cell identification - viable cells are blue (Hoechst 33342). (B) Identification of apoptotic cells - GCs are green (positive for annexin V, negative for red propidium iodide dye)

Statistical analysis

The data were analyzed using InStat version 3.0 (GraphPad Software, San Diego California, USA) on a Macintosh computer (Apple Computer Inc., Cupertino, California, USA). The primary outcome measurements were given as the percentages of GCs with DNA fragmentation and apoptosis out of the total number of GCs analyzed. The statistical analysis first sought to verify the homogeneity between the agonist- and antagonist-treated groups at the level of individual variables (age, body mass index, FSH) and then to check whether there were differences in DNA fragmentation and apoptosis between the groups. The comparison of the agonist and the antagonist groups was performed using Student's t-tests, Mann-Whitney tests and chi-squared tests when appropriate. The significance level was set at $P < 0.05$. The sample size of 14 patients in each treatment group was calculated to have an 80% power to detect a mean difference of 2 with a α of 0.05.

Results

DNA fragmentation:

Thirty-two patients were included in either the GnRH-a group ($n = 16$) or in the GnRH-ant group ($n = 16$). There was no significant difference ($P > 0.05$) between the group of patients receiving the long GnRH-a protocol and the group of patients receiving the multidose GnRH-ant protocol with respect to baseline demographic characteristics, such as maternal age, body mass index (BMI), duration of infertility, smoking, alcohol use and infertility aetiology. With respect to the parameters of the cycle of ovarian stimulation, an equal distribution ($P > 0.05$) of the main cycle characteristics was observed for the GnRH-a and GnRH-ant groups. The data are summarised in Table 1.

The average DNA fragmentation was $17.1 \pm 11.5\%$ (range: 6-60%, median: 14%) for

the general population, $15.5 \pm 9.4\%$ (range: 7 - 48%, median: 13.5%) for the GnRH-a group, and $18.8 \pm 13.3\%$ (range 6-60%, median: 14.5%) for the GnRH-ant group. The percentage of positive DNA fragmentation in the GCs did not differ significantly ($P = 0.76$) between the GnRH-a group and the GnRH-ant group. These data are shown in Figure 3.

Apoptosis:

Twenty-eight patients were included in either the GnRH-a group (n = 14) or the GnRH-ant group (n = 14). As in the DNA fragmentation analysis, there was no significant difference ($P > 0.05$) in the baseline characteristics between the group of patients who received the long GnRH-a protocol and the group of patients receiving the multidose GnRH-ant protocol. With respect to the parameters of the cycle of ovarian stimulation, an equal distribution ($P > 0.05$) of the main cycle characteristics was observed for the GnRH-a and GnRH-ant groups. These data are summarised in Table 2.

The average level of apoptosis was $35.6 \pm 18.5\%$ (range: 6-87%, median: 32.5%) for the general population, $34.6 \pm 14.6\%$ (range: 6 - 59%, median: 35.5%) for the GnRH-a group, and $36.5 \pm 22\%$ (range: 13-87%, median: 31%) for the GnRH-ant group. The percentage of positive DNA fragmentation in the GCs did not differ significantly ($P = 0.78$) between the GnRH-a group and the GnRH-ant group. These data are shown in Figure 4.

Table 1. DNA fragmentation analysis. The baseline demographic characteristics of the patients and the characteristics of IVF/ICSI cycle stimulation

	GnRH agonist group	GnRH antagonist group	P
Patients (n)	16	16	
Age (y)	33.7±2.7 (29-37)	32.1±3.1 (27-37)	0.12
BMI	23.7± 3.1	23.4 ± 2.7	0.75
Tobacco use (n)	0	0	
Regular alcohol use (n)	6.2% (1/16)	6.2% (1/16)	1
Aetiology			0.27
Male	56.3% (9/16)	56.3% (9/16)	
Idiopathic	31.3% (5/16)	12.5% (2/16)	
Tuboperitoneal	12.5% (2/16)	31.3% (5/16)	
Duration of infertility (y)	2.8±1.1	3.9±3.0	0.59
Total dose FSH (IU)	2140±707	1798±636	0.20
LH (IU)	1017±300	1012±267	0.90
Time of stimulation (d)	10.1±1.8	10.1±2.4	0.95
Follicles ≥18 mm (n)	4.2±1.5	4.2±1.9	0.71
Oocytes (n)			
Mature	7.5±4.6	11.6±6.5	0.09
Total	11.4±6.8	15.4±7.8	0.08

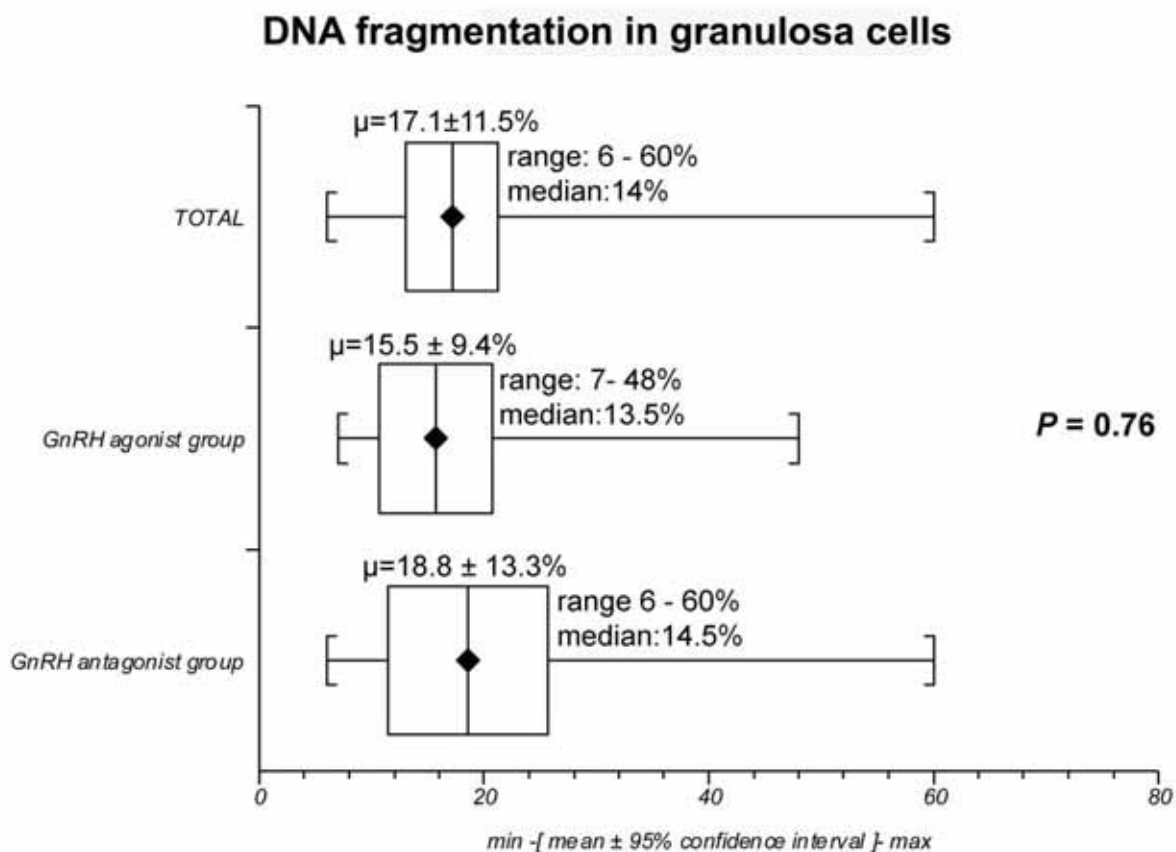


Figure 3. DNA fragmentation in granulosa cells. The average level of DNA fragmentation was $17.1 \pm 11.5\%$ (range: 6-60%, median: 14%) for the general population, $15.5 \pm 9.4\%$ (range: 7-48%, median: 13.5%) for the GnRH-a group, and $18.8 \pm 13.3\%$ (range 6-60%, median: 14.5%) for the GnRH-ant group. The percentage of positive DNA fragmentation in granulosa cells did not differ significantly ($P = 0.76$) between the GnRH-a group and the GnRH-ant group

Table 2: Analysis of apoptosis. The baseline demographic characteristics of the patients and the characteristics of IVF/ICSI stimulation.

	GnRH agonist group	GnRH antagonist group	P
Patients (n)	14	14	
Age (y)	33.3±2.5 (29-37)	32.4±4.3 (27-37)	0.42
BMI	22.7±3.6	23.2±3.02	0.71
Tobacco use (n)	0	0	
Regular alcohol use (n)	7.1% (1/14)	7.1% (1/14)	1
Aetiology			0.36
Male	50% (7/14)	57.1% (8/14)	
Idiopathic	35.7% (5/14)	14.3% (2/14)	
Tuboperitoneal	14.3% (2/14)	28.6% (4/14)	
Duration of infertility (y)	4.09±2.9	4.91±3.8	0.78
Total dose FSH (IU)	2012 ±746	1805±658	0.51
LH (IU)	1034±288	986±268	0.89
Time of stimulation (d)	10.2±1.7	10±2.5	0.96
Follicles ≥18 mm (n)	4.1±1.6	4.6±1.9	0.59
Oocytes (n)			
Mature	8.4±4.3	12.1±5.9	0.14
Total	11.8±7.0	15.6±6.8	0.08

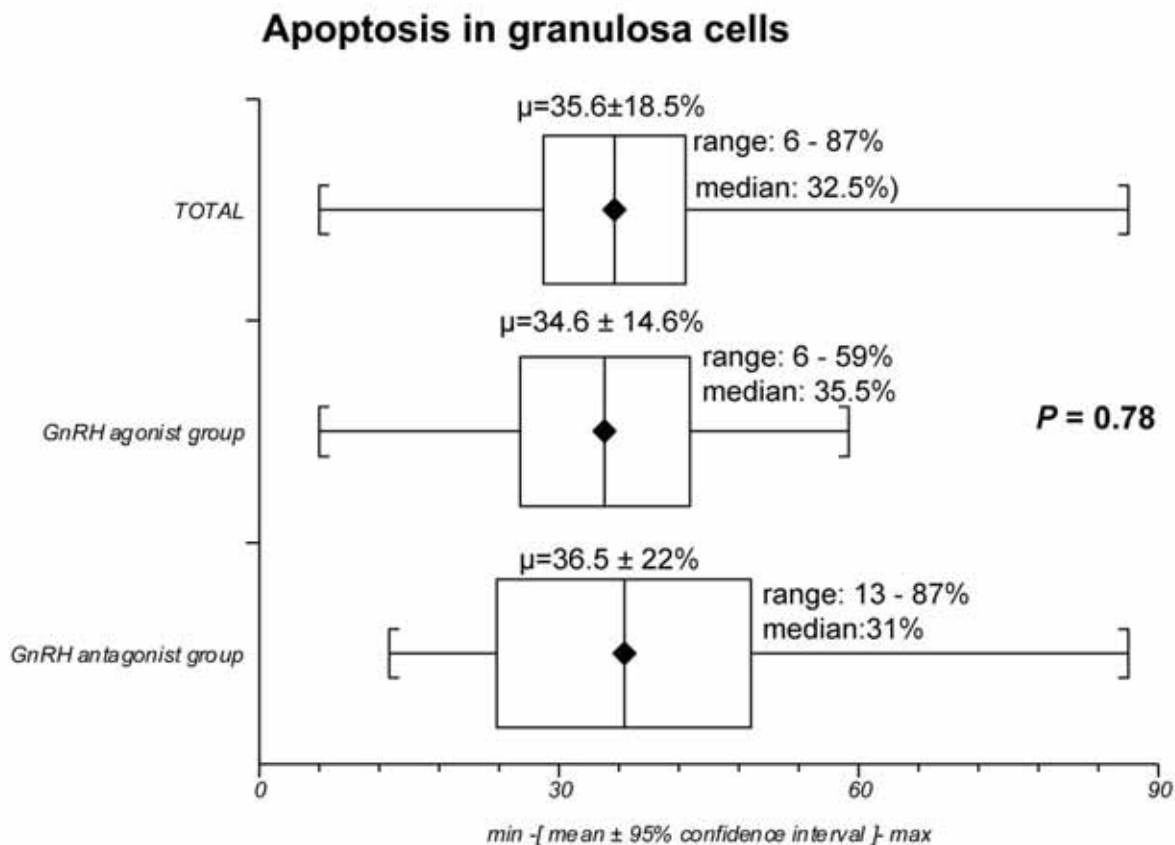


Figure 4. Apoptosis in granulosa cells. The average level of apoptosis was $35.6 \pm 18.5\%$ (range: 6-87%, median: 32.5%) for the general population, $34.6 \pm 14.6\%$ (range: 6 - 59%, median: 35.5%) for the GnRH-a group, and $36.5 \pm 22\%$ (range 13-87%, median: 31%) for the GnRH-ant group. The percentage of positive DNA fragmentation in the GCs did not differ significantly ($P = 0.78$) between the GnRH-a group and the GnRH-ant group

Discussion

During the natural process of folliculogenesis, granulosa cells undergo a dynamic process of differentiation that induces changes in functional activities and creates a unique hormone microenvironment that plays important roles in the processes of oocyte maturation [15]. Particularly during the final stages of folliculogenesis, the main activity of granulosa cells seems to be the synchronisation of the nuclear and cytoplasmic maturity of the oocyte through the suppression of transcription [16-18]. However, the majority of selected follicles are destroyed by atresia, a process that under natural conditions occurs through apoptosis initiated in the granulosa cells. Thus, the GCs are highly sensitive to the apoptotic process [19]. In contrast, during stimulated IVF/ICSI cycles, pharmacological doses of gonadotropins and adjuvant drugs, such as GnRH analogues, create a supraphysiological hormonal environment that induces the growth of a cohort of follicles, which would become atretic under natural conditions. Due to the influence of steroidogenesis and/or the physical properties of the developing ovarian follicles, this iatrogenic hormonal environment can impact the physiological process of differentiation of granulosa cells [20].

Despite the fact that human ovaries express GnRH receptors, the exact mechanism of action of GnRH in the ovaries is not yet fully understood. Thus, when using GnRH analogues in IVF cycles, it is still not clear what action these substances could have on ovarian cell activity. It is known that GnRH receptors are found in the luteal and granulosa cells of the antral follicles but not in primordial and pre-antral follicles [21, 22]. This correlation between the expression of GnRH receptors and the stage of follicular development may suggest a direct influence of GnRH on folliculogenesis and oocyte development. With respect to GC apoptosis, the physiological role of which may not only be related to follicular atresia but also potentially linked to oocyte quality, a possible direct action of GnRH and GnRH-a has been shown [7-9, 23-26]. The inhibition of the local activity of vascular endothelial growth factor

by GnRH produces an increase in ovarian apoptosis via an imbalance in the levels of the BCL2 family members [23, 27]. GnRH is also related to the declining levels of nitric oxide [28] associated with the growth of luteal cells. In addition, GnRH has been associated with the increased expression of Bax, which is associated with apoptosis in luteal cells [7]. In contrast, a possible inhibitory action of GnRH-ant on apoptosis has been reported in vitro [9, 25]. However, some studies [29, 30] have shown that different types of GnRH analogues, both agonists and antagonists, have anti-proliferative and/or pro-apoptotic effects. In most cases, these studies on the action of GnRH and GnRH analogues in GC apoptosis have been performed in vitro [7, 9, 24, 25]; therefore, further in vivo studies are still needed to corroborate the importance this evidence and to investigate the differences in the actions of each specific GnRH analogue.

Annexin V interacts strongly and specifically with phosphatidylserine, which is transferred to the outer layer of the cell membrane at the beginning of apoptosis. Using the Annexin V affinity assay, the amount of apoptotic cells can be determined in a fast, simple, and sensitive way [31, 32]. In a more advanced phase of apoptosis, the execution endocaspases are responsible for DNA fragmentation, resulting in 3' hydroxyl-termini at the site of DNA strand breaks. The TUNEL assay attaches labelled nucleotides to these single- or double-strand breaks, thus allowing the detection of apoptosis [33]. Using these two techniques, this study showed that the treatments with GnRH-a or GnRH-ant are similar with respect to the frequency of apoptosis ($34.6 \pm 14.6\%$ vs. $36.5 \pm 22\%$, respectively; $P = 0.78$) and DNA fragmentation ($15.5 \pm 9.4\%$ vs. $18.8 \pm 13.3\%$, respectively; $P = 0.76$) in the population of granulosa cells associated with oocytes. In other studies, no significant differences were evident between GnRH-a and GnRH-ant treatments in vivo. Giampietro *et al.* [10] also used the Annexin V and TUNEL assays to report similar levels of apoptosis and DNA fragmentation in granulosa cells suspended in follicular fluid between the GnRH-a- and

GnRH-ant-treated cells. The differences in these levels of apoptosis from those reported in our study (agonist: $7.87 \pm 1.27\%$; antagonist: $9.92 \pm 0.98\%$) may be due to technical differences. The granulosa cells examined in the Giampietro study were from follicular fluid, whereas our study examined detached cells directly from the oocytes. Giampietro *et al.* [10] used flow cytometry instead of immunofluorescence for the analysis of Annexin V assay. However, TUNEL assays were analyzed by immunofluorescence in both studies, and the results were quite similar (immunofluorescence = $18.00 \pm 3.87\%$ in the GnRH-a group; $20.50 \pm 6.56\%$ in the GnRH-ant group). In contrast, Hassun *et al.* [11] analyzed individual oocyte cumulus complexes with Cytosoft in ViaCount mode and found that GnRH-a and GnRH-ant protocols induce similar levels of apoptosis in granulosa cells. However, considering the low number of studies that are not all randomised, further randomised controlled trials with larger sample sizes will be helpful to corroborate the action of GnRH on GC apoptosis in vivo.

In our study, regardless of the GnRH analogue used (agonist or antagonist), all IVF/ICSI cycles were stimulated by r-LH in addition to r-FSH. Some studies have reported the beneficial effects of r-LH on ovarian physiology and its clinical outcomes [12, 34]. Ruvolo *et al.* [14] suggested that supplementation with r-LH improves the quality of the chromatin in cumulus cells and protects these cells from apoptosis, possibly by acting directly on granulosa cells or via a paracrine effect. These authors suggested that maintaining the physiological function of the cumulus cells over time would also maintain the nuclear and cytoplasmic maturation of the oocyte, thereby improving the intrinsic quality of the oocytes at the time of retrieval. However, it should be noted that in our study, in addition to a lack of differences between the agonist and antagonist groups, the overall incidence of apoptosis was consistent with those reported in the literature for IVF/ICSI cycles without r-LH supplementation, even when considering differences in the study designs, populations, and methods of analysis. Ruvolo *et al.* [14] reported levels of DNA fragmentation in GCs of

18.2% and 12.1% in IVF/ICSI cycles with GnRH-a with or without r-LH supplementation, respectively, according to TUNEL staining. We observed a general level of $17.1 \pm 11.5\%$, which is similar to the value reported in IVF/ICSI cycles without r-LH. Using similar techniques, Giampetro *et al.* [10] reported similar levels of DNA fragmentation in IVF/ICSI cycles without LH but with much lower levels of apoptosis.

An interesting point to consider is the exact origin of the granulosa cells. There are two types of granulosa cells: the cumulus cells, which surround the oocyte, and the mural granulosa cells, which surround the antrum. Several studies have investigated the incidence of apoptosis in GCs and its relationship to IVF/ICSI results, but most those studies have assessed the apoptosis of cells suspended in follicular aspirates. Thus, those values represent of the level of apoptosis within the mural granulosa cells that had detached from the follicular wall during follicle aspiration [11, 35-38]. However, trials have demonstrated that cumulus cells in human and animals have a low level of apoptosis compared with mural cells [26, 39-41]. It has been demonstrated that paracrine factors secreted by the oocyte, such as bone morphogenetic proteins 15 and 6, protect cumulus cells from apoptosis [42]. Thus, the clinical significance of the levels of apoptosis in the GCs directly detached from oocytes still needs further evaluation. We were not able to detect a reduction in the levels of apoptosis in the oocysts linked to the GCs. In our study and in that of Hassun *et al.* [11], both of which only used detached GC directly from oocytes, higher rates of apoptosis were observed compared with the study by Giampetro *et al.* [10], who used exfoliated mural granulosa cells.

In conclusion, the results suggest that despite the different mechanisms of action of the GnRH analogues, both the GnRH agonist and antagonist are associated with comparable levels of DNA fragmentation and apoptosis in granulosa cells in IVF/ICSI cycles supplemented with r-LH. However, considering the low number of published trials regarding

this issue, particularly randomised, in vivo experiments, further clinical studies will be helpful to clarify the in vivo action of GnRH analogues on GCs.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

HLL designed and coordinated the study. All authors were responsible for the data collection, analysis, and interpretation presented in the manuscript. HLL, JBAO, CGP and JGF performed the statistical analyses and wrote the manuscript. JGF reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors wish to thank the American Journal Experts for revising the English text.

References

1. Amsterdam A, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Land-Bracha A, Rimon E, Sasson R, Hirsh L: **Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary.** *Steroids* 2003, **68**:861-867.
2. Huirne JA, Homburg R, Lambalk CB: **Are GnRH antagonists comparable to agonists for use in IVF?** *Hum Reprod* 2007, **22**:2805-2813.
3. Cheung LP, Lam PM, Lok IH, Chiu TT, Yeung SY, Tjer CC, Haines CJ: **GnRH antagonist versus long GnRH agonist protocol in poor responders undergoing IVF: a randomized controlled trial.** *Hum Reprod* 2005, **20**:616-621.
4. Sbracia M, Colabianchi J, Giallonardo A, Giannini P, Piscitelli C, Morgia F, Montigiani M, Schimberni M: **Cetrorelix protocol versus gonadotropin-releasing hormone analog suppression long protocol for superovulation in intracytoplasmic sperm injection patients older than 40.** *Fertil Steril* 2009, **91**:1842-1847.
5. Olivennes F, Belaisch-Allart J, Empeaire JC, Dechaud H, Alvarez S, Moreau L, Nicollet B, Zorn JR, Bouchard P, Frydman R: **Prospective, randomized, controlled study of in vitro fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist (cetrorelix) or a depot formula of an LH-RH agonist (triptorelin).** *Fertil Steril* 2000, **73**:314-320.
6. Choi JH, Gilks CB, Auersperg N, Leung PC: **Immunolocalization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and type I GnRH receptor during follicular development in the human ovary.** *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91**:4562-4570.
7. Park EJ, Shin JW, Seo YS, Kim DW, Hong SY, Park WI, Kang BM: **Gonadotropin-releasing hormone-agonist induces apoptosis of human granulosa-luteal cells via**

- caspase-8, -9 and -3, and poly-(ADP-ribose)-polymerase cleavage.** *Biosci Trends* 2011, **5**:120-128.
8. Zhao XJ, Huang YH, Yu YC, Xin XY: **GnRH antagonist cetrorelix inhibits mitochondria-dependent apoptosis triggered by chemotherapy in granulosa cells of rats.** *Gynecol Oncol* 2010, **118**:69-75.
 9. Vitale AM, Abramovich D, Peluffo MC, Meresman G, Tesone M: **Effect of gonadotropin-releasing hormone agonist and antagonist on proliferation and apoptosis of human luteinized granulosa cells.** *Fertil Steril* 2006, **85**:1064-1067.
 10. Giampietro F, Sancilio S, Tiboni GM, Rana RA, Di Pietro R: **Levels of apoptosis in human granulosa cells seem to be comparable after therapy with a gonadotropin-releasing hormone agonist or antagonist.** *Fertil Steril* 2006, **85**:412-419.
 11. Hassun Filho PA, Ribeiro MA, da Rocha AM, Allegreti JR, Serafini PC, da Motta EL: **Effect of GnRH down-regulation on cumulus cell viability and apoptosis as measured by fluorescence-activated cell sorting.** *J Assist Reprod Genet* 2008, **25**:467-471.
 12. Franco JG, Jr., Baruffi RL, Oliveira JB, Mauri AL, Petersen CG, Contart P, Felipe V: **Effects of recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-agonist protocol: a matched case-control study.** *Reprod Biol Endocrinol* 2009, **7**:58.
 13. Propst AM, Hill MJ, Bates GW, Palumbo M, Van Horne AK, Retzliff MG: **Low-dose human chorionic gonadotropin may improve in vitro fertilization cycle outcomes in patients with low luteinizing hormone levels after gonadotropin-releasing hormone antagonist administration.** *Fertil Steril* 2011, **96**:898-904.
 14. Ruvolo G, Bosco L, Pane A, Morici G, Cittadini E, Roccheri MC: **Lower apoptosis rate in human cumulus cells after administration of recombinant luteinizing**

- hormone to women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization procedures.** *Fertil Steril* 2007, **87**:542-546.
15. Nottola SA, Heyn R, Camboni A, Correr S, Macchiarelli G: **Ultrastructural characteristics of human granulosa cells in a coculture system for in vitro fertilization.** *Microsc Res Tech* 2006, **69**:508-516.
 16. Eppig JJ: **Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles.** *Biol Reprod* 1991, **45**:824-830.
 17. Eppig JJ: **Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals.** *Reproduction* 2001, **122**:829-838.
 18. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL: **The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:2890-2894.
 19. Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA: **Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival.** *J Anim Sci* 2004, **82 E-Suppl**:E40-52.
 20. Gersak K, Tomazevic T: **Subpopulations of human granulosa-luteal cells in natural and stimulated in vitro fertilization-embryo transfer cycles.** *Fertil Steril* 1996, **65**:608-613.
 21. Brus L, Lambalk CB, de Koning J, Helder MN, Janssens RM, Schoemaker J: **Specific gonadotrophin-releasing hormone analogue binding predominantly in human luteinized follicular aspirates and not in human pre-ovulatory follicles.** *Hum Reprod* 1997, **12**:769-773.
 22. Cheung LW, Wong AS: **Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues.** *FEBS J* 2008, **275**:5479-5495.

23. Parborell F, Pecci A, Gonzalez O, Vitale A, Tesone M: **Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: regulation by epidermal growth factor and the expression of Bcl-2-related genes.** *Biol Reprod* 2002, **67**:481-486.
24. Tsai NM, Hsieh RH, Au HK, Shieh MJ, Huang SY, Tzeng CR: **Effects of gonadotrophin-releasing hormone agonists on apoptosis of granulosa cells.** *Ann N Y Acad Sci* 2005, **1042**:531-537.
25. Hong IS, Cheung AP, Leung PC: **Gonadotropin-releasing hormones I and II induce apoptosis in human granulosa cells.** *J Clin Endocrinol Metab* 2008, **93**:3179-3185.
26. Kaneko T, Saito H, Takahashi T, Ohta N, Saito T, Hiroi M: **Effects of controlled ovarian hyperstimulation on oocyte quality in terms of the incidence of apoptotic granulosa cells.** *J Assist Reprod Genet* 2000, **17**:580-585.
27. Abramovich D, Parborell F, Tesone M: **Effect of a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory treatment on the folliculogenesis and ovarian apoptosis in gonadotropin-treated prepubertal rats.** *Biol Reprod* 2006, **75**:434-441.
28. Yang H, Bhat GK, Wadley R, Wright KL, Chung BM, Whittaker JA, Dharmarajan AM, Sridaran R: **Gonadotropin-releasing hormone-agonist inhibits synthesis of nitric oxide and steroidogenesis by luteal cells in the pregnant rat.** *Biol Reprod* 2003, **68**:2222-2231.
29. Kim DK, Yang JS, Maiti K, Hwang JI, Kim K, Seen D, Ahn Y, Lee C, Kang BC, Kwon HB, et al: **A gonadotropin-releasing hormone-II antagonist induces autophagy of prostate cancer cells.** *Cancer Res* 2009, **69**:923-931.
30. Maudsley S, Davidson L, Pawson AJ, Chan R, Lopez de Maturana R, Millar RP: **Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists promote proapoptotic**

- signaling in peripheral reproductive tumor cells by activating a Galphai-coupling state of the type I GnRH receptor.** *Cancer Res* 2004, **64**:7533-7544.
31. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP: **Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure.** *Cytometry* 1998, **31**:1-9.
32. Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, Heidendal GA, Reutelingsperger CP: **Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications.** *J Nucl Med* 2005, **46**:2035-2050.
33. Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z: **Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death.** *Methods Cell Biol* 2011, **103**:55-98.
34. Caserta D, Lisi F, Marci R, Ciardo F, Fazi A, Lisi R, Moscarini M: **Does supplementation with recombinant luteinizing hormone prevent ovarian hyperstimulation syndrome in down regulated patients undergoing recombinant follicle stimulating hormone multiple follicular stimulation for IVF/ET and reduces cancellation rate for high risk of hyperstimulation?** *Gynecol Endocrinol* 2011, **27**:862-866.
35. Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Takahashi T, Hiroi M: **The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs.** *Fertil Steril* 1997, **68**:312-317.
36. Oosterhuis GJ, Michgelsen HW, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I: **Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: a possible indicator of in vitro fertilization outcome.** *Fertil Steril* 1998, **70**:747-749.

37. Bencomo E, Perez R, Arteaga MF, Acosta E, Pena O, Lopez L, Avila J, Palumbo A: **Apoptosis of cultured granulosa-lutein cells is reduced by insulin-like growth factor I and may correlate with embryo fragmentation and pregnancy rate.** *Fertil Steril* 2006, **85**:474-480.
38. Suh CS, Jee BC, Choi YM, Kim JG, Lee JY, Moon SY, Kim SH: **Prognostic implication of apoptosis in human luteinized granulosa cells during IVF-ET.** *J Assist Reprod Genet* 2002, **19**:209-214.
39. Acosta E, Pena O, Naftolin F, Avila J, Palumbo A: **Angiotensin II induces apoptosis in human mural granulosa-lutein cells, but not in cumulus cells.** *Fertil Steril* 2009, **91**:1984-1989.
40. Yang MY, Rajamahendran R: **Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells.** *Biol Reprod* 2000, **62**:1209-1217.
41. Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB: **Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins.** *J Cell Sci* 2005, **118**:5257-5268.
42. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT: **Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals.** *Anim Reprod Sci* 2004, **82-83**:431-446.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

O Protocolo de Pesquisa: “**Agonista versus antagonista do GnRH em ciclos de reprodução assistida: DNA fragmentação e apoptose das células da granulosa**” e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram avaliados por este Comitê de Ética em Pesquisa e considerados **APROVADOS** sem restrições.

Para tal aprovação, foram seguidas as exigências das Resoluções nacionais 196/96 e 251/97, relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos. No presente projeto, foram devidamente enfatizados itens que correspondem ao objetivo do Estudo e seu racional; adequação dos materiais e métodos; referência bibliográfica pertinente; responsabilidade do pesquisador na condução do estudo, bem como possibilidade de interrupção do estudo no caso do paciente julgar conveniente.

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da legislação 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo. Solicitamos que este CEP seja informado quando da inclusão do primeiro paciente.

Atenciosamente

Dr. Jorge Yoshinori Shida
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do CRSM