



Ana Márcia de Miranda Cota

AGONISTA VERSUS ANTAGONISTA DO GnRH EM CICLOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA: MORFOLOGIA OOCITÁRIA

Orientador: Dr. João Batista Alcântara Oliveira

Co-Orientadora: Dra. Cláudia Guilhermino Petersen

Mestrado

**FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”**

UNESP

2012

Ana Márcia de Miranda Cota

Agonista versus antagonista do GnRH em ciclos de reprodução assistida: morfologia oocitária

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia – área de concentração Tocoginecologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Ginecologia.

Orientador: João Batista Alcântara Oliveira
Co-Orientadora: Cláudia Guilhermino Petersen

Botucatu / São Paulo
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**

Cota, Ana Márcia de Miranda.

Agonista versus antagonista do GnRH em ciclos de reprodução assistida :
morfologia oocitária / Ana Márcia de Miranda Cota. – Botucatu : [s.n], 2012

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

Orientador: João Batista Alcântara Oliveira

Coorientador: Cláudia Guilhermino Petersen

Capes: 40101150

1. Tecnologia de reprodução humana. 2. Fertilização in vitro.

Palavras-chave: Análogo do GnRH; Fertilização in vitro; Morfologia oocitária;
Reprodução assistida.

W_{xw}|v_tàTMÜ|t

W_{xw}|vÉ xáá**t** àxáx AAA

T Éá Åxâá **c** t|á?

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.”

— *Bertrand Russell*

T É T UÅtÇwÉ?

O AMOR

O amor, quando se revela,
Não se sabe revelar.
Sabe bem olhar p'ra ele,
Mas não lhe sabe falar.

Quem quer dizer o que sente
Não sabe o que há de dizer.
Fala: parece que mente
Cala: parece esquecer

Ah, mas se ele adivinhasse,
Se pudesse ouvir o olhar,
E se um olhar lhe bastasse
Pr'a saber que o estão a amar!

Mas quem sente muito, cala;
Quem quer dizer quanto sente
Fica sem alma nem fala,
Fica só, inteiramente!

Mas se isto puder contar-lhe
O que não lhe ousa contar,
Já não terei que falar-lhe
Porque lhe estou a falar...

— *Fernando Pessoa*

Á|{tá y|{tá?

— â·át

Por ela é que eu faço bonito
Por ela é que eu faço o palhaço
Por ela é que saio do tom
E me esqueço no tempo e no espaço
Quase levito
Faço sonhos de crepon

E quando ela está nos meus braços
As tristezas parecem banais
O meu coração aos pedaços
Se remenda prum número a mais

Por ela é que o show continua
Eu faço careta e trapaça
É pra ela que faço cartaz
É por ela que espanto de casa
As sombras da rua
Faço a lua
Faço a brisa
Pra Luisa dormir em paz

— *Chico Buarque*

UxtàÜ|é ; t|Çwt |ÇàÜt@ØàxÜÉ<

Olha

Será que ela é moça

Será que ela é triste

Será que é o contrário

Será que é pintura

O rosto da atriz

Se ela dança no sétimo céu

Se ela acredita que é outro país

E se ela só decora o seu papel

E se eu pudesse entrar na sua vida

Olha

Será que ela é louça

Será que é de éter

Será que é loucura

Será que é cenário

A casa da atriz

Se ela mora num arranha-céu

E se as paredes são feitas de giz

E se ela chora num quarto de hotel

E se eu pudesse entrar na sua vida

Aí, diz quantos desastres te na
minha mão

Diz se é perigoso a gente ser feliz

Olha

Será que é uma estrela

Será que é mentira

Será que é comédia

Será que é divina

A vida da atriz

Se ela um dia despencar do céu

E se os pagantes exigirem bis

E se o arcanjo passar o chapéu

— *Edu Lobo e Chico Buarque*

Sim, me leva pra sempre, Beatriz

Me ensina a não andar com os pés
no chão

Para sempre é sempre por um triz

T Éá Åxâá |ÜÅûÉá?

Irmão, Irmãos

Cada irmão é diferente.

Sozinho acoplado a outros
sozinhos.

A linguagem sobe escadas, do mais
moço,

ao mais velho e seu castelo de
importância.

A linguagem desce escadas, do
mais velho
ao mísero caçula.

São seis ou são seiscentas
distâncias que se cruzam, se
dilatam
no gesto, no calar, no pensamento?
Que léguas de um a outro irmão.
Entretanto, o campo aberto,
os mesmos copos,

o mesmo vinhático das camas
iguais.

A casa é a mesma. Igual,
vista por olhos diferentes?

São estranhos próximos, atentos
à área de domínio, indevassáveis.
Guardar o seu segredo, sua alma,
seus objetos de toalete. Ninguém
ouse
indevida cópia de outra vida.

Ser irmão é ser o quê? Uma
presença
a decifrar mais tarde, com saudade?
Com saudade de quê? De uma
pueril
vontade de ser irmão futuro, antigo
e sempre?

— *Carlos Drummond de Andrade*

Á zÜtÇwxá tÅ|ztá

_â?]â? _£?

U|? VöÜ|á? T Ä|Çx? VÜ|á? i °

“Já chamei pessoas próximas de "amigo" e descobri que não eram... Algumas pessoas nunca precisei chamar de nada e sempre foram e serão especiais para mim.”

— Clarice Lispector

X t àÉwÉá Éá Åxâá y tÅ|Ä|tÜxáAAAA

..... todos vocês com certeza contribuíram e fazem
parte de mais essa etapa vencida!!!!

` â|àÉ ÉuÜ|ztwt t àÉwÉá4444

T zÜtwxv|ÅxÇàÉá

Ao Dr. João Batista, meu orientador, pela oportunidade e incentivo na realização desse trabalho, pela disponibilidade, dedicação e compreensão durante a execução do mesmo e pelo generoso acolhimento.

À Dra Cláudia Petersen, minha co-orientadora, obrigada pelas orientações, ensinamentos e disponibilidade.

Ao Prof. Franco Júnior pela oportunidade e confiança na realização desse trabalho no CRH. Muito obrigada!

Dr. Ricardo Marinho e Dr. João Pedro por terem me despertado para a área científica ainda no início do curso de medicina. Obrigada pela inestimável ajuda e pela contribuição em minha formação acadêmica e profissional.

À Maria Clara pelo companheirismo e gentilezas sempre!

Aos amigos e colegas da Clínica Pró-Criar e do Hospital Mater Dei, pelo apoio, ajuda, substituições e trocas realizadas quando precisei. Muito obrigada a todos!

À Ana Cláudia e ao pessoal da pós-graduação, pela simpatia, disponibilidade e ajuda nas questões burocráticas!

Às pacientes que aceitaram a participar do estudo. Espero que tenham realizado ou venham a realizar o seu sonho de ter um filho.

X Ñ•zÜtyx

“O preferível não é o desejo de acreditar,
mas o desejo de descobrir, que é exatamente o oposto.”

— *Bertrand Russell*

f |zÄtá x T uÜxä|t†Æxá

µm	micrômetro (s)
CP	corpúsculo polar
E2	estradiol
et al	e colaboradores
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
FSH	<i>follicle stimulating hormone</i> / hormônio folículo estimulante
hCG	<i>human chorionic gonadotropin</i> / gonadotrofina coriônica humana
IC	intervalo de confiança
ICSI	<i>intracytoplasmic sperm injection</i> / injeção intracitoplasmática de espermatozóides
LH	<i>luteinizing hormone</i> / hormônio luteinizante
MI	metáfase I
MII	metáfase II
mm	milímetros
OR	odds ratio
r-FSH	hormônio folículo estimulante recombinante
r-hCG	gonadotrofina coriônica humana recombinante

r-LH hormônio luteinizante recombinante

SC subcutâneo

UI unidade internacional

VG vesícula germinativa

ZP zona pelúcida

Çw/vx

CAPÍTULO I - Correlação entre os distúrbios oocitários e os resultados da fertilização *in vitro* _____ 20

Resumo.....	22
Palavras-chaves.....	23
Introdução.....	24
A- Alterações citoplasmáticas.....	26
B- Alterações extracitoplasmáticas.....	29
B.1. Forma do oócito.....	29
B.2. Espaço perivitelino.....	30
B.3. Zona pelúcida.....	31
B.4. Corpúsculo polar.....	32
Considerações finais.....	33
Referências bibliográficas.....	34
Figura 1.....	37
Figura 2.....	38
Figura 3.....	39
Figura 4.....	40
Figura 5.....	41

CAPÍTULO II – Agonista versus Antagonista do GnRH em ciclos de reprodução assistida: morfologia oocitária _____ 42

Abstract.....	44
Keywords.....	45
Background.....	46
Methods.....	48
Participants.....	48
Randomization.....	48
Ovarian stimulation.....	48
Statistical analysis.....	50
Results.....	52
Discussion.....	54

Conclusion.....58

Competing interests.....59

Author’s contributions.....59

 Acknowledgements.....59

References.....60

Figure 165

Table 1.....66

Table 2.....67

Table 3.....68

ANEXOS_____69

 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....70

 Consentimento Livre e Esclarecido.....72

VtÑ•àâĂÉ D

VÉÜÜxĂt†ûÉ xÇàÜx Éá w|áĂÉÜy|áĂÉá

ÉÉv|àöÜ|Éá x Éá ÜxáâĂàtwÉá wt yxÜà|Ă|ét†ûÉ |Ç

ä|àÜÉ

Correlação entre os distúrbios oocitários e os resultados da fertilização *in vitro*

Ana Márcia de Miranda Cota¹

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

Resumo

Na reprodução assistida, a seleção de gametas com o objetivo de alcançar melhores resultados clínicos é uma tarefa crucial dos embriologistas. A qualidade do oócito é um fator chave na fertilidade feminina, refletindo o potencial intrínseco de desenvolvimento do gameta, além de ter um papel crucial não só na fecundação, mas também no desenvolvimento embrionário subsequente. Após a desnudação, consegue-se definir a maturidade oocitária, com a identificação do primeiro corpúsculo polar, além de permitir a avaliação da morfologia oocitária, analisando as características da zona pelúcida, do espaço perivitelino e do citoplasma.

Os distúrbios oocitários são classificados em 2 tipos: citoplasmáticos, que incluem a presença de granulações e/ou de inclusões citoplasmáticas (vacúolos, corpos refrativos, agregados do retículo endoplasmático) e extracitoplasmáticos (alterações na forma do oócito, alterações na zona pelúcida, no espaço perivitelino e alterações do corpúsculo polar). Essas variações na morfologia oocitária podem ocorrer devido a fatores como idade da mulher, problemas genéticos e alterações no ambiente hormonal a que o oócito é exposto com a hiperestimulação ovariana.

A classificação da morfologia oocitária, bem como sua correlação com o desenvolvimento embrionário e taxa de gravidez são bastante controversas na literatura. Vários estudos não demonstram nenhuma associação entre os distúrbios oocitários e os resultados da fertilização *in vitro*, enquanto outros relatam uma associação entre a morfologia oocitária e desenvolvimento embrionário. Essas diferenças nos resultados podem ser explicadas devido a utilização de diferentes critérios morfológicos e devido a uma falta de padronização nessa avaliação oocitária.

Palavras-chaves:

Fertilização *in vitro*; dismorfismo; morfologia oocitária; reprodução assistida

Introdução

Na reprodução assistida, a seleção de gametas com o objetivo de alcançar melhores resultados clínicos é uma tarefa crucial dos embriologistas. Esta questão tem especial importância quando as considerações éticas, legais ou mesmo religiosas impõem limites à seleção do embrião, conseqüentemente, à formação de embriões excedentes. A qualidade do oócito é um fator chave na fertilidade feminina, refletindo o potencial intrínseco de desenvolvimento do gameta, além de ter um papel crucial não só na fecundação, mas também no desenvolvimento embrionário subsequente [1].

Para a apreciação da morfologia dos oócitos é necessário que seja feito a desnudação (retirada do cumulus oophorus e das células da corona radiata) para a sua execução. Após a desnudação, consegue-se definir a maturidade oocitária, com a identificação do primeiro corpúsculo polar, além de permitir a avaliação da morfologia oocitária, analisando as características da zona pelúcida, do espaço perivitelino e do citoplasma [2]. Um oócito considerado com uma boa morfologia é um oócito de forma arredondada, com um único corpúsculo polar (CP) intacto, zona pelúcida (ZP) clara, um espaço perivitelino pequeno, um citoplasma transparente, homogêneo, sem granulações ou inclusões [2-6]. No entanto, cerca de 60 a 80% dos oócitos maduros captados apresentam pelo menos uma alteração em sua morfologia [6-8].

Os dismorfismos oocitários são classificados em 2 tipos básicos: citoplasmáticos e extracitoplasmáticos. Os dismorfismos citoplasmáticos incluem a presença de granulações e/ou de inclusões citoplasmáticas (vacúolos, corpos refrativos, agregados do retículo endoplasmático). Alterações na forma do oócito, da ZP (espessa, fina, escura), no espaço perivitelino (grande, pequeno, presença de fragmentos) e do CP (degeneração, fragmentação) são classificados como dismorfismos extracitoplasmáticos. Os dismorfismos podem ocorrer devido a fatores como idade e problemas genéticos, além de fatores relacionados com o tratamento propriamente dito, como por exemplo, a hiperestimulação ovariana e o ambiente hormonal a que o oócito é exposto [9-11].

A classificação da morfologia oocitária, bem como sua correlação com o desenvolvimento embrionário e taxa de gravidez são bastante controversas na literatura. Alguns estudos não demonstram nenhuma associação com os resultados da fertilização *in vitro* (FIV) [3], enquanto outros relatam uma associação entre morfologia oocitária e desenvolvimento embrionário [4]. Essas diferenças nos resultados podem ser explicadas devido a utilização de diferentes critérios morfológicos e devido a uma falta de padronização nessa avaliação oocitária.

Tendo por base essas considerações, para compreender melhor o valor diagnóstico e prognóstico das alterações morfológicas, o objetivo desta revisão é avaliar os dados disponíveis na literatura a respeito da influência dos diferentes distúrbios oocitários, sobre os resultados da FIV.

A) Alterações citoplasmáticas (Figura 1)

Para que o oócito seja capaz de ser fertilizado por um espermatozóide, é necessário que ele passe por uma série de eventos que leve tanto à sua maturidade nuclear quanto citoplasmática, eventos esses que podem ocorrer de forma independente [2, 12, 13]. Após a desnudação, é possível verificar a presença do primeiro corpúsculo polar, o que comprova a maturidade nuclear do oócito. No entanto, a avaliação da maturação citoplasmática ainda não é bem estabelecida. Alguns autores correlacionam essa maturidade citoplasmática com a ausência de inclusões citoplasmáticas, ou seja, um oócito maduro no que se refere ao citoplasma, seria aquele sem granulações, vacúolos, com um citoplasma claro e homogêneo [14]. Portanto, a presença de inclusões citoplasmáticas poderia significar uma imaturidade citoplasmática o que influenciaria na fertilização e desenvolvimento embrionário. Apesar dos oócitos com imaturidade citoplasmática poderem ser fertilizados, eles podem ocasionar um desenvolvimento embrionário inadequado [14].

Na literatura ainda não existe uma padronização em se definir e conceituar as granulações citoplasmáticas. Existem diversas formas de se nomeá-las: granulações, granulações centrais, granulações homogêneas ou granulações heterogêneas, o que torna muito difícil uma avaliação nos dados. Em relação às inclusões citoplasmáticas (vacúolos, corpos refrativos e agregados do retículo endoplasmático) os dados também são bastante confusos. Alguns estudos os avaliam de forma agrupada [4, 15], enquanto outros analisam separadamente [2, 16], dificultando a interpretação.

Xia [4] evidenciou que a presença de inclusões citoplasmáticas interferia negativamente na taxa de fertilização e na qualidade embrionária dos oócitos com espaço perivitelino normal e primeiro corpúsculo polar intacto. Loutradis *et al.* [14] observaram que oócitos com citoplasma escuro, fragmentos e vacúolos citoplasmáticos geravam embriões de pior qualidade e consequentemente obtiveram uma menor taxa de gravidez quando comparados com embriões originados de oócitos com citoplasma normal. Além desses artigos, Ten *et al.* [16] relataram que oócitos com um citoplasma

escuro diminuía a chance de ter um embrião de boa qualidade em 83% (OR 0,17 95% IC 0,04 – 0,74). Em recente meta-análise, Setti *et al.* [13] observaram que a presença de corpos refrativos e de vacúolos reduziam significativamente a taxa de fertilização dos oócitos (OR 0,66 95%IC 0,51 – 0,84 e OR 0,59 95% IC 0,42 – 0,83 para corpos refrativos e vacúolos respectivamente).

Em outro estudo, Balaban *et al.* [15] verificaram que anormalidades citoplasmáticas severas ou múltiplas interferiam no desenvolvimento e na qualidade embrionária. Embriões de boa qualidade no dia 3 (grau 1 e 2) eram, em sua maioria, derivados de oócitos morfológicamente normais ou de embriões com apenas uma alteração extracitoplasmática. Apenas cerca de 3,5% dos embriões grau 1 e 2 no terceiro dia eram derivados de oócitos com alterações citoplasmáticas severas. Além disso, observaram que o encontro de alterações citoplasmáticas, principalmente os vacúolos e as granulações centrais, apresentaram um grande impacto negativo sobre a taxa de sobrevivência dos embriões ao congelamento e descongelamento e sua evolução para blastocisto. Somente 8,3% dos embriões originados de oócitos com presença de vacúolos ou granulações evoluíram para a formação de blastocistos de boa qualidade, sendo que nenhum deles realizou o “hatching” (eclosão). Esse achado está de acordo com o encontrado em outros artigos [6, 7].

Rienzi *et al.* [2] evidenciaram em seu estudo que a presença de vacúolos citoplasmáticos estavam correlacionados com um decréscimo significativo na taxa de fertilização (OR 2,09 95% IC 1,02 – 4,31, $P = 0,04$) e que o único dismorfismo oocitário que influenciava negativamente na qualidade embrionária era a presença das granulações centrais. Quando um oócito apresentava granulações citoplasmáticas, a incidência de embriões de boa qualidade era significativamente diminuída (OR 2,26 95% IC 1,25 – 4,08 $P = 0,007$).

Em seu estudo, Yakin *et al.* [7] demonstraram que oócitos com alterações citoplasmáticas obtiveram uma menor taxa de fertilização e de clivagem quando comparado com oócitos com citoplasma normal, sem no entanto haver diferença

estatística. Além disso, foi demonstrado que as alterações oocitárias não tiveram nenhum efeito adverso sobre a qualidade embrionária no dia 3. Entretanto, a presença de inclusões citoplasmáticas e a associação de anormalidades tiveram um impacto significativo sobre a taxa de formação de blastocisto. Nesse mesmo estudo, foi avaliado se o dismorfismo oocitário estava relacionado ou não à aneuploidia. Foi observado que oócitos com morfologia oocitária normal e alterada geravam embriões com uma taxa de aneuploidia semelhante. Contudo, dentre as alterações morfológicas a que apresentou uma maior associação com aneuploidias, apesar de sem significância estatística, foi o dismorfismo citoplasmático.

No entanto, outros estudos [5, 17, 18] não encontraram correlação entre a morfologia oocitária e a taxa de fertilização e a qualidade embrionária após a ICSI. Serhal *et al.* [19] demonstraram que a taxa de fertilização e de clivagem não era afetada pelas alterações das características morfológicas do citoplasma dos oócitos. No entanto, a presença de oócitos com granulações e inclusões citoplasmáticas, tais como, vacúolos, corpos refrativos e agregados do retículo endoplasmático, reduziu significativamente a taxa de implantação. Corroborando com esse achado, Kahraman *et al.* [17] não encontraram diferença significativa na taxa de fertilização, qualidade embrionária e taxa de gravidez em oócitos com ou sem granulações citoplasmáticas. Entretanto, observou-se uma menor taxa de implantação e de gravidez evolutiva com oócitos com granulações centrais.

B) Alterações extracitoplasmáticas

Balaban *et al.* [15], em seu estudo, analisaram as anormalidades extracitoplasmáticas de forma agrupada e observaram que a presença dessas não interferia no desenvolvimento embrionário. A maioria dos embriões de boa qualidade foi derivada de oócitos em metáfase II (MII) considerados morfologicamente normais ou de oócitos com uma única anormalidade extracitoplasmática. Além disso, demonstraram que a sobrevivência dos embriões após o congelamento/descongelamento e seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto não era afetada se os embriões fossem originados de um oócito com uma única alteração extracitoplasmática.

B1) Forma do oócito (Figura 2)

O oócito humano maduro tem uma forma arredondada e possui um diâmetro de aproximadamente 110 a 115µm. A maioria dos estudos não encontra uma associação entre as alterações na forma dos oócitos e os resultados da fertilização *in vitro* [2, 3, 13, 15]. De Sutter *et al.* [5] não encontraram correlação entre as alterações na forma dos oócitos e taxa de fertilização e qualidade embrionária. Além disso, Yakin *et al.* [7] demonstraram que a forma do oócito não teve influência sobre a taxa de formação de blastocisto. Setti *et al.* [13], em sua meta-análise, não encontraram correlação entre alterações na forma dos oócitos e taxa de fertilização (OR 0,99 95% IC 0,83 – 1,17) e qualidade embrionária (OR 1,02 95% IC 0,83 – 1,25).

B2) Espaço perivitelino (Figura 3)

O espaço perivitelino é a região preenchida por líquido entre a membrana plasmática do oócito e a zona pelúcida, sendo considerado normal quando é pequeno e não apresenta fragmentos.

Xia [4] em seu estudo, demonstrou que oócitos com um espaço perivitelino normal apresentavam uma taxa de fertilização (60,3% para oócitos com espaço perivitelino normal x 37,5% para oócitos com espaço perivitelino aumentado) e um desenvolvimento embrionário significativamente melhor quando comparado com oócitos com um espaço perivitelino aumentado. Além disso, o espaço perivitelino aumentado diminuiu significativamente a taxa de sobrevivência dos embriões grau 2, ou seja, embriões de boa qualidade, ao congelamento/descongelamento quando comparado com os embriões grau 2 originado de oócitos com morfologia normal. No entanto, a taxa de formação de blastocistos desses embriões não foi afetada. Corroborando com esses achados, Rienzi *et al.* [2] evidenciaram em seu estudo que a presença de um espaço perivitelino aumentado estava correlacionado com um decréscimo significativo na taxa de fertilização (OR 1,44 95% IC 1,06 – 1,97 $P = 0,02$). De acordo com esses achados, recente meta-análise também demonstrou que um espaço perivitelino aumentado reduzia a probabilidade de fertilização de um oócito (OR 0,86 95% IC 0,74 – 0,99) [13]. Essa interferência do espaço perivitelino aumentado sobre a taxa de fertilização e desenvolvimento do embrião poderia estar relacionada a uma exocitose prematura dos grânulos corticais, sugerindo um citoplasma pós-maduro no momento da ICSI [20].

Em contrapartida, Hassan-Ali *et al.* [21] não encontraram correlação entre a presença de granulações no espaço perivitelino e a taxa de fertilização, taxa de clivagem e de implantação embrionária. Esses autores concluíram que a presença de granulações no espaço perivitelino provavelmente se trata de um fenômeno fisiológico relacionado à maturidade oocitária, principalmente porque a incidência dessa alteração se mostrou significativamente mais freqüente em oócitos em estágio de MII (oócitos maduros), quando comparado com oócitos imaturos (estágio de metáfase I (MI) e em

estágio de vesícula germinativa (VG) (34,4%; 4,4% e 0%, respectivamente). Outros estudos [3, 5, 15] também não encontraram associação entre alterações do espaço perivitelino e taxa de fertilização, taxa de clivagem e qualidade embrionária.

B3) Zona pelúcida (Figura 4)

A zona pelúcida é uma camada acelular de glicoproteína que reveste todo o oócito, medindo aproximadamente cerca de 15 a 20µm. É formada por três glicoproteínas: ZP1, ZP2 e ZP3. Tanto a ZP2 quanto a ZP3 agrupam-se em filamentos, enquanto a ZP1 entrecruza esses filamentos, formando uma rede tridimensional. Dessa forma, a zona pelúcida desempenha um importante papel desde a fertilização, através da interação entre os gametas, promove a reação acrossômica, impede a polispermia, além de manter o revestimento e fornecer proteção ao embrião em seu estágio inicial [22].

Diferentes estudos não observaram influência da presença de zona pelúcida escura na taxas de fertilização, clivagem e implantação e na qualidade embrionária [3, 5, 16]. Corroborando com esses autores, Setti *et al.* [13] também não encontraram em sua meta-análise influencia da zona pelúcida sobre a taxa de fertilização do oócito (OR 0,94 95% IC 0,77 – 1,13) e qualidade embrionária (OR 1,17 95% IC 0,93 – 1,47). Além disso, Balaban *et al.* [15] não encontraram alteração significativa na sobrevivência dos embriões originados de oócitos com zona pelúcida escura após o congelamento e descongelamento e nem afetou o desenvolvimento embrionário para o estágio de blastocisto.

Entretanto, com relação à espessura, Bertrand *et al.* [22] relataram que a zona pelúcida dos oócitos fertilizados eram significativamente mais finas que a dos oócitos que não fertilizaram ($16.6 \pm 3.2\mu\text{m} \times 18.9 \pm 4.0\mu\text{m}$, $P < 0.001$), sem no entanto, afetar a taxa de gravidez.

B4) Corpúsculo polar (Figura 5)

O primeiro corpúsculo polar é uma estrutura oval que mede aproximadamente cerca de 15µm de diâmetro, sendo liberado após a telófase da primeira divisão meiótica, indicando que o oócito está maduro para a fertilização.

Alterações na morfologia do primeiro corpúsculo polar podem significar uma maturação nuclear acelerada e um longo período de tempo em estágio de MII antes de sua fertilização, além do fato, dessas alterações poderem estar associadas a uma assincronia entre a maturação nuclear e a maturação citoplasmática [23]. É necessário um período de tempo entre a extrusão do primeiro corpúsculo polar e a fertilização para que o oócito adquira a competência para uma fertilização adequada [4].

Rienzi *et al.* [2] evidenciaram em seu estudo que embora a presença de alterações no primeiro corpúsculo polar fossem relativamente rara (4,4%), quando presente estavam relacionadas com um decréscimo significativo na taxa de fertilização (OR 2,02 95% IC 1,09 – 3,77, $P = 0,02$). Setti *et al.* [13] em recente meta-análise, encontraram que fragmentação no primeiro corpúsculo polar não interferia na taxa de fertilização de um oócito e nem na qualidade embrionária, mas um aumento em seu tamanho reduzia significativamente a taxa de fertilização (OR 0,29 95% IC 0,09 – 0,90).

No entanto, segundo Ciotti *et al.* [24], nenhuma correlação significativa foi encontrada entre a morfologia do primeiro corpúsculo polar e a taxa de fertilização, taxa de clivagem, qualidade embrionária, taxa de implantação e taxa de gravidez.

Considerações Finais

Apesar de recente meta-análise [13] ter demonstrado associação entre a presença de alterações morfológicas específicas e redução na taxa de fertilização, a análise particular de cada estudo revela a contradição dos dados da literatura a cerca da correlação entre a presença dos distúrbios oocitários e os resultados da fertilização *in vitro*. Isso se deve principalmente porque não há uma padronização na definição das alterações oocitárias, além de não haver uma uniformidade na coleta dos parâmetros a serem analisados. Alguns estudos analisam os parâmetros morfológicos dos oócitos individualmente, enquanto outros avaliam em conjunto ou até mesmo desenvolvem um escore para a sua análise. Os dados contraditórios sublinham a importância de uma investigação mais intensiva e coordenada para chegar a um consenso e explorar plenamente o potencial preditivo do exame morfológico não invasivo de oócitos humanos.

Referências Bibliográficas

1. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG: **Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality.** *Hum Reprod update* 2008, **14**:159-177.
2. Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E, Litwicka K, Greco E: **Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome.** *Fertil Steril* 2008, **90**:1692-1700.
3. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R: **Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection.** *Hum Reprod* 1998, **13**:3431-3433.
4. Xia P: **Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality.** *Hum Reprod* 1997, **12**:1750-1755.
5. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M: **Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection.** *Hum Reprod* 1996, **11**:595-597.
6. Balaban B, Urman B: **Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation.** *Reprod Biomed Online* 2006, **12**:608-615.
7. Yakin K, Balaban B, Isiklar A, Urman B: **Oocyte dysmorphism is not associated with aneuploidy in the developing embryo.** *Fertil Steril* 2007, **88**:811-816.
8. Van Blerkom J, Henry G: **Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation.** *Hum Reprod* 1992, **7**:379-390.
9. de Bruin JP, Dorland M, Spek ER, Posthuma G, van Haaften M, Looman CW, te Velde ER: **Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries.** *Biol Reprod* 2004, **70**:419-424.
10. Rashidi BH, Sarvi F, Tehrani ES, Zayeri F, Movahedin M, Khanafshar N: **The effect of HMG and recombinant human FSH on oocyte quality: a randomized single-blind clinical trial.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005, **120**:190-194.

11. 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.
12. Figueira RCS, Braga DPAF, Semiao-Francisco L, Madaschi C, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr.: **Metaphase II human oocyte morphology: contributing factors and effects on fertilization potential and embryo developmental ability in ICSI cycles.** *Fertil Steril* 2010, **94**:1115-1117.
13. Setti AS, Figueira RC, Braga DP, Colturato SS, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr.: **Relationship between oocyte abnormal morphology and intracytoplasmic sperm injection outcomes: a meta-analysis.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011, **159**:364-370.
14. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinis S, Michalas S: **Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection.** *Fertil Steril* 1999, **72**:240-244.
15. Balaban B, Ata B, Isiklar A, Yakin K, Urman B: **Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos.** *Hum Reprod* 2008, **23**:1778-1785.
16. Ten J, Mendiola J, Vioque J, de Juan J, Bernabeu R: **Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality.** *Reprod Biomed Online* 2007, **14**:40-48.
17. Kahraman S, Yakin K, Donmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzalioglu N: **Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection.** *Hum Reprod* 2000, **15**:2390-2393.
18. Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S, Cruz M, Casper RF: **Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles.** *Hum Reprod* 2001, **16**:2118-2123.
19. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM: **Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection.** *Hum Reprod* 1997, **12**:1267-1270.
20. Mikkelsen AL, Lindenberg S: **Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality.** *Hum Reprod* 2001, **16**:1714-1718.

21. Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J: **Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection.** *Hum Reprod* 1998, **13**:3425-3430.
22. Bertrand E, Van den Bergh M, Englert Y: **Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate?** *Hum Reprod* 1995, **10**:1189-1193.
23. Eichenlaub-Ritter U, Schmiady H, Kentenich H, Soewarto D: **Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation.** *Hum Reprod* 1995, **10**:2343-2349.
24. Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S: **First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate.** *Hum Reprod* 2004, **19**:2334-2339.

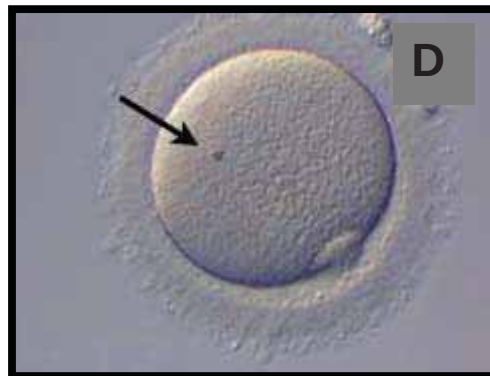
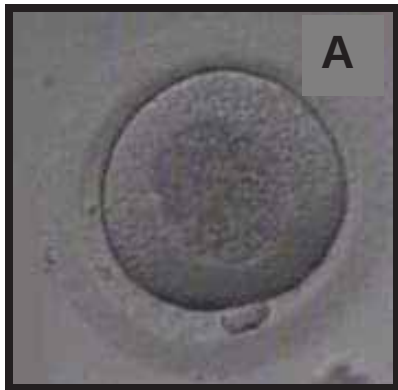


Figura 1 – Alterações oocitárias citoplasmáticas: granulações e inclusões citoplasmáticas. **A-** granulações. **B-** vacúolos. **C-** agregado do retículo endoplasmático. **D-** corpo refrativo.



Figura 2 – Alterações oocitárias extracitoplasmáticas: oócito com forma irregular

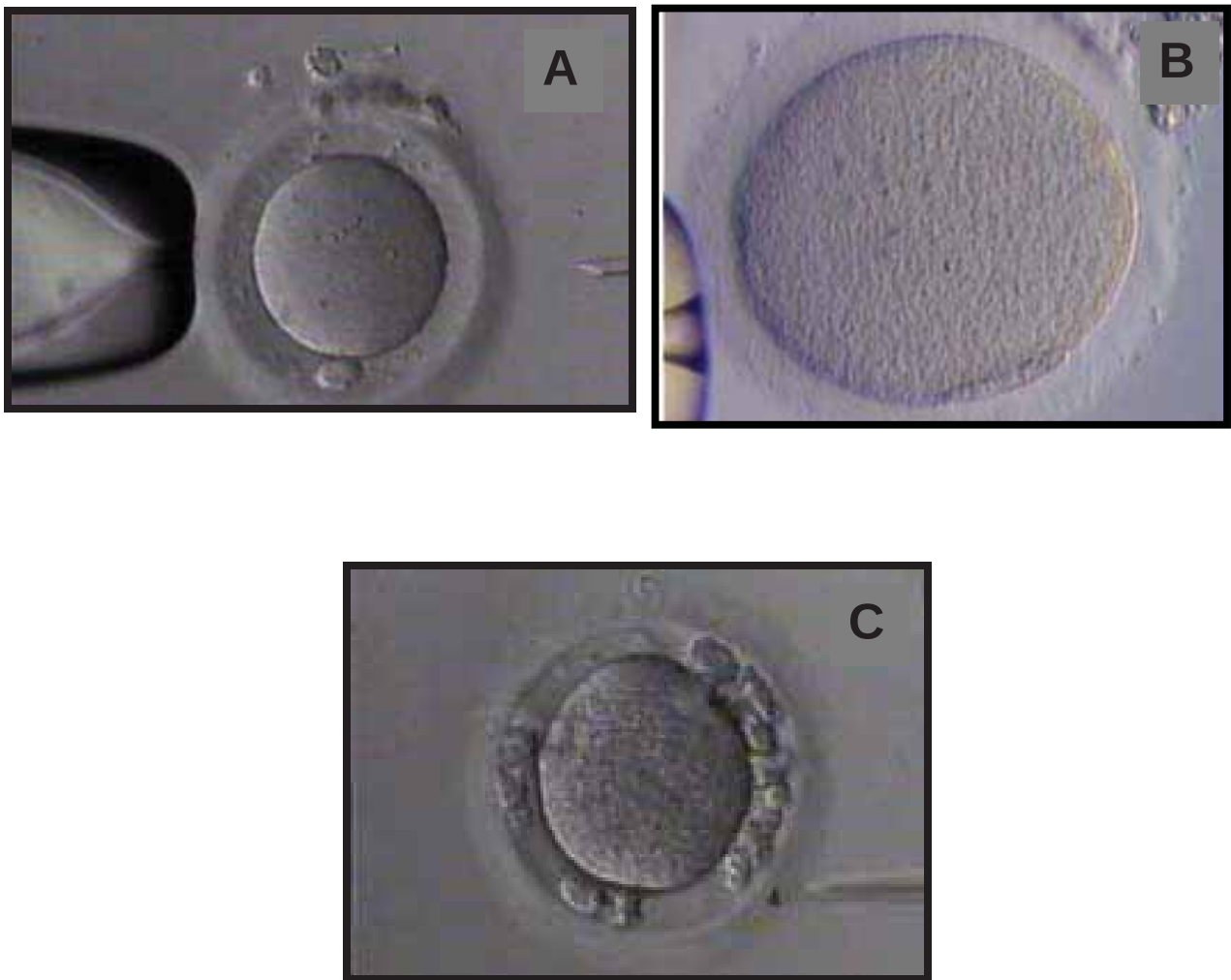


Figura 3 – Alterações oocitárias extracitoplasmática: alterações no espaço perivitelino. **A:** espaço perivitelino aumentado. **B:** espaço perivitelino pequeno. **C:** espaço perivitelino com fragmentos.

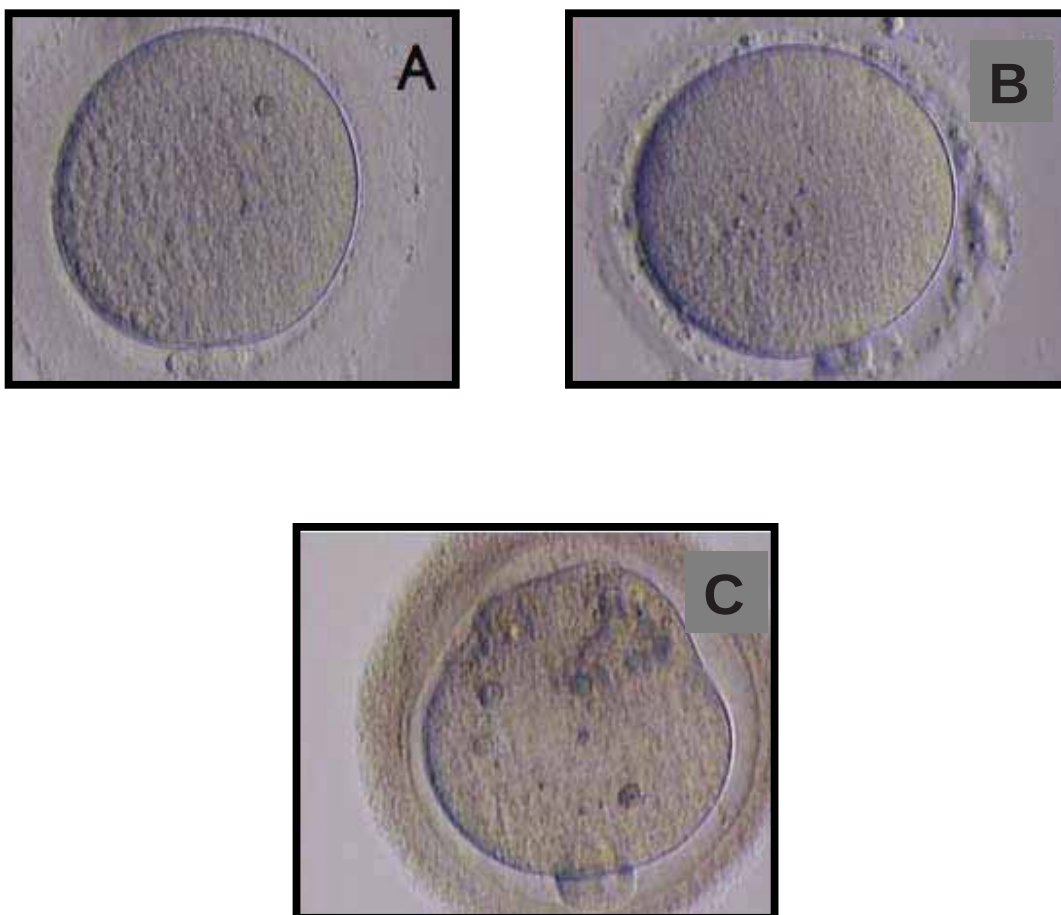


Figura 4 – Alterações oocitárias extracitoplasmática: alterações na zona pelúcida. **A:** ZP espessa. **B:** ZP fina. **C:** ZP escura.

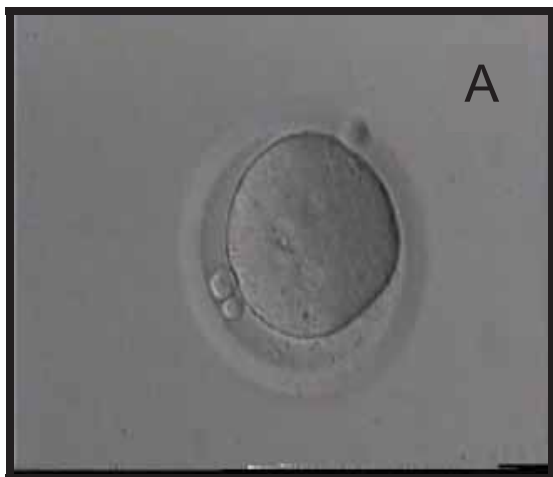


Figura 5 – Alterações oocitárias extracitoplasmática: alterações no corpúsculo polar. **A:** corpúsculo polar duplo **B:** corpúsculo polar fragmentado.

VtÑ•àâÄÉ E

T zÉÇ|ààt äxÜáâá tÇàtzÉÇ|ààt wÉ ZÇ e [

xÅ v|vÄÉá wx ÜxÑÜÉwâ†ûÉ táá|áà|wtM ÅÉÜyÉÄÉz|t

ÉÉv|àöÜ|t

GnRH agonist versus GnRH antagonist in assisted reproduction cycles: oocyte morphology

Ana Marcia de Miranda Cota¹, 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 Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, Brazil

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

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

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

*Corresponding author

E-mail addresses:

AMMC: anamarcia.cota@procriar.com.br

JBAO*: joaobatista@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

Texto padronizado de acordo com as normas de publicação da revista a que foi enviado: Reproductive Biology and Endocrinology

Abstract

Background: The selection of developmentally competent human gametes may increase the efficiency of assisted reproduction. Spermatozoa and oocytes are usually assessed according to morphologic criteria. Oocyte morphology can be affected by the age of the female, genetic aspects, and factors related to controlled ovarian stimulation. However, there is a lack of evidence in the literature concerning the effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogues, either agonists or antagonists, on oocyte morphology. The aim of this randomized study was to investigate if the prevalence of oocyte dysmorphism is influenced by the type of pituitary suppression used in ovarian stimulation.

Methods: A total of 64 patients at the first intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycle, were prospectively randomized to receive treatment with either a GnRH agonist with a long-term protocol (n: 32) or a GnRH antagonist with a multi-dose protocol (n: 32). Before being subjected to ICSI, the oocytes at metaphase II from both groups were morphologically analyzed under an inverted light microscope at a 400x magnification. The oocytes were classified as follows: normal or with cytoplasmic dysmorphism, extracytoplasmic dysmorphism, or both. The resulting measure was the detection of dysmorphic oocytes among the total number of oocytes analyzed.

Results: Out of a total of 681 oocytes, 189 (27.8%) were morphologically normal, 220 (32.3%) showed cytoplasmic dysmorphism, 124 (18.2%) showed extracytoplasmic alterations, and 148 (21.7%) exhibited both types of dysmorphisms. No significant difference was observed in oocyte dysmorphisms between the agonist- and antagonist-treated groups ($P>0.05$). Analysis for each dysmorphism revealed that the most common conditions were alterations in polar body shape (31.3%) and presence of diffuse cytoplasmic granulations (22.8%), refractile bodies (18.5%) and central cytoplasmic granulations (13.6%). There was no significant difference between each individual oocyte dysmorphism in the agonist- and antagonist-treated groups ($P>0.05$).

Conclusions: Our randomized data indicate that in terms of the quality of oocyte morphology there is no difference in use antagonist multi-dose protocol or long agonist protocol. If a GnRH analogue used for pituitary suppression in IVF cycles influences the

prevalence of various oocyte dysmorphisms, there does not appear to be a difference between the agonists and antagonists.

Key Words: Oocyte morphology; *in vitro* fertilization; gonadotropin-releasing hormone analogues; assisted reproduction technique

Background

In assisted reproduction, the selection of sperm, oocytes, and embryos to achieve better clinical results is an important task for embryologists. This goal has particular relevance when religious, ethical, or legal considerations limit embryo selection after fertilization. The morphological evaluation of oocytes, although subjective, is still the standard criterion to help identify the cells with the greatest potential for development. The denudation not only allows for the evaluation of oocyte maturity by identifying the first polar body but also enables the assessment of morphology by analyzing the characteristics of the zona pellucida, perivitelline space, and the cytoplasm [1]. Oocyte dysmorphisms may occur due to age, genetic changes, and factors related to the treatment itself, including the ovarian stimulation and the hormonal environment to which the oocyte is exposed [2-4].

The first therapeutic uses of *in vitro* fertilization (IVF) were performed in natural cycles without ovarian stimulation. However, there is currently a consensus that better results are obtained with the induction of ovulation. Thus, different protocols are being developed, many of which rely primarily on the administration of gonadotropins to induce multifollicular development, thus increasing the number of available oocytes and thereby the number of developing embryos to be selected and transferred. However, the induction of ovulation might induce an premature surge of luteinizing hormone (LH), which would cause premature luteinization or ovulation and thereby prevent the collection of oocytes [5-9].

Both agonist and antagonist analogues of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) play an important role in reducing the incidence of premature LH surges by reversibly blocking the secretion of the pituitary gonadotropins. It is estimated that without the use of GnRH analogues, a surge in LH occurs in approximately 20% of all IVF cycles/intracytoplasmic sperm injections (ICSI) [10, 11]. As a result, the frequency of cancelled assisted conception cycles has decreased and pregnancy rates have increased. GnRH agonists (GnRH-a) have been used in assisted reproduction

treatments since the 1980s. They suppress the release of gonadotropins, including follicle-stimulating hormone (FSH) and LH, by desensitizing pituitary receptors, a phenomenon called "down regulation" [8, 12]. GnRH antagonists (GnRH-ant) have only recently (since the late 1990s) been used as part of the therapeutic arsenal in the field of assisted reproduction [13]. They act by directly binding the GnRH receptors and block them in a competitive manner [8]. Thus, GnRH-ant cause an immediate, reversible, and fast suppression of gonadotropin release [6, 8, 12, 14].

Although the human ovary expresses GnRH receptors, the mechanism of the action of GnRH on the ovary remains controversial and is not completely understood. Thus, when GnRH analogues are used in IVF cycles, their mechanism of action on the oocytes is unknown. GnRH receptors are found in the luteal cells and granulosa cells of the antral follicles but not in primordial and pre-antral follicles [15, 16]. This correlation between the expression of GnRH receptors and the stage of follicular development suggests a direct influence of GnRH on folliculogenesis and oocyte development. Unfortunately, there are few studies on the possible action of GnRH analogues on oocyte phenotype [1, 4, 17]. In addition, these results are contradictory.

To better understand the action of GnRH analogues on the ovaries, the objective of this prospective, randomized study was to evaluate if the prevalence of oocyte dysmorphism is influenced by the type of pituitary suppression (GnRH-a or GnRH-ant) used in ovarian stimulation.

Methods

Participants

This prospective study was conducted on 64 women during the first ICSI cycle at the Center for Human Reproduction Professor Franco Junior. Inclusion criteria were as follows: age ≤ 37 years, first IVF/ICSI cycle, BMI < 30 kg/m², regular menses, and both ovaries present. The exclusion criteria were as follows: polycystic ovarian syndrome, severe endometriosis, ovarian cyst as assessed by transvaginal ultrasound, and basal FSH ≥ 10 IU/ml. Written consent was obtained from all the patients, and the study was performed according to the norms of the institutional ethics committee.

Randomization

A double randomization was performed. First, a computer-generated table (first randomization) indicated which ovulation induction protocol (GnRH-a or GnRH-ant) was assigned. Then, lots were drawn (second randomization) to determine to which case that specific patient would correspond (i.e., case #1 or case #30). One nurse, blinded to subject identities, performed all the lot draws. In this manner, each patient was randomly allocated into one of two groups:

- 1- GnRH-a group (n=32): long-term GnRH agonist (leuprolide acetate, Lupron®, Abbott, Brazil) protocol
- 2- GnRH-ant group (n=32): multi-dose GnRH antagonist (cetrorelix, Cetrotide®, Serono, Brazil) protocol

Ovarian stimulation

GnRH-a Protocol: Pituitary down-regulation began during the luteal phase of the previous menstrual cycle with the GnRH-a leuprolide acetate (Lupron®) at a dose of 1 mg/day for 14 days. The ovaries were then stimulated with a fixed dose of 150 to 225 IU recombinant FSH (rFSH; Gonal F®; Serono) and 75 IU/day recombinant LH (rLH;

Luveris®; Serono) for a period of 7 days. On the Day 8 of ovarian stimulation, follicular development was monitored by transvaginal ultrasound at 7 MHz (Medison Digital Color MT; Medison Co. Ltd., Seoul, Korea). The rFSH dose was adapted according to the ovarian response, and rLH supplementation was increased to 150 IU/day when one or more follicles measuring ≥ 10 mm in diameter were found.

GnRH-ant Protocol: On Day 3 of the cycle, ovarian stimulation was induced with a fixed dose of 150 to 225 IU rFSH and 75 IU/day rLH for a period of 5 days. On Day 8 of the menstrual cycle (Day 6 of ovarian stimulation), follicular development was monitored by transvaginal ultrasound at 7 MHz. The rFSH dose was adapted according to the ovarian response, and rLH supplementation was increased to 150 IU/day when one or more follicles measuring ≥ 10 mm in diameter were found. The GnRH-ant cetrorelix (Cetrotide®) at a dose of 0.25 mg/day s.c. was started when at least one follicle ≥ 14 mm was observed by ultrasound.

To induce the final oocyte maturation in both groups (GnRH-a and GnRH-ant), 250 μ g of recombinant hCG (r-hCG; Ovidrel®, Serono) was administered s.c. when at least two follicles reached a mean diameter of ≥ 17 mm. GnRH-a and GnRH-ant were administered until the day of the hCG injection. Oocyte retrieval was performed by transvaginal aspiration under ultrasound guidance 34 to 36 hours following the r-hCG injection.

Preparation of oocytes

The retrieved oocytes were incubated in culture medium (P1; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) at 37°C and 5.5% CO₂ for 1 hour. Cumulus cells were removed by exposing the oocytes to modified human tubal fluid medium (mHTF; Irvine Scientific) containing 40 IU/ml hyaluronidase (Irvine Scientific) for 30 sec, after which coronal cells were manually removed using a stripper buffer (Cook, Australia). The denuded oocytes were classified according to their level of maturation. Oocytes with the first polar body, i.e., at the metaphase II (MII) stage, were considered to be mature and were used for the ICSI procedure.

Oocyte morphology (Figure 1)

Two to four hours after the retrieval and before being subjected to ICSI, MII oocytes from both groups were morphologically analyzed under an inverted light microscope (Nikon Eclipse TE 300 inverted microscope) by a single operator blinded to subject identities. The oocytes were classified as follows: [1, 17-19]

- Normal: clear, homogenous cytoplasm with a uniform texture, a round or ovoid first polar body (PB) with a smooth surface, and a zona pellucida and perivitelline space of normal size
- Cytoplasmic dysmorphism: presence of vacuoles, refractile bodies, granularity, and smooth endoplasmic reticulum (SER) aggregations
- Extracytoplasmic dysmorphism: alterations of the zona pellucida (thick and/or dark), perivitelline space (large), polar body (fragmented, large, and/or degenerated), and oocyte shape (irregular).
- Both cytoplasmic and extracytoplasmic dysmorphisms.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the software R, version 2.13.0. The primary outcomes were to compare the frequency of oocyte dysmorphism in each group (agonist X antagonist). First, a statistical analysis was performed to verify the homogeneity of the variables at the individual level (age, body mass index (BMI), FSH) between the GnRH-a and GnRH-ant groups. Then, the differences between the groups at the level of oocyte (presence or absence of dysmorphism) were analyzed. To verify the homogeneity of the non-normal quantitative variables of the groups, the Mann-Whitney test was performed; for the normal quantitative variables, the Student's *t*-test was used. The chi-squared test was used for the qualitative variables. To test if either group had a significant effect on the proportion of oocytes with dysmorphisms or if a particular dysmorphism was more prevalent in any of the groups, a logistic regression model by the generalized estimating equations (GEE) method was used.

The variables describing the morphological oocyte features were presented as the absolute and percent frequency. The data from the logistic regression analyses were presented as the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI). The significance level was set at $P < 0.05$.

The sample size was calculated by a virtual comparison between two proportions. Data from the literature show that at least 20% of the MII oocytes have normal morphology [20-22]. Thus, a sample size of 300 oocytes in each group confers an 80% power to detect an increase of 10% in one of the groups with an alpha significance level of 0.05 (two-tailed).

Results

Basic demographic characteristics, such as maternal age, BMI, duration of infertility, smoking, alcohol use, and infertility etiology, were not significantly different ($P>0.05$) between the GnRH-a and GnRH-ant patient groups. The distribution ($P>0.05$) of the main characteristics of the ovarian stimulation cycle observed for the GnRH-a and GnRH-ant groups was equal. These data are summarized in Table 1.

A total of 681 oocytes were obtained: 330 oocytes from the GnRH-a group and 351 from the GnRH-ant group. Of these, 189 (27.8%) were morphologically normal, 220 (32.3%) had cytoplasmic dysmorphisms, 124 (18.2%) had extracytoplasmic alterations, and 148 (21.7%) had both dysmorphisms. The oocyte dysmorphisms were not significantly different between the GnRH-a and GnRH-ant groups ($P>0.05$). Logistic regression analysis revealed that the probability of finding a normal oocyte in the GnRH-ant group was higher (OR:1.29, 95% CI: 0.76-2.22) than for the GnRH-a group. On the other hand, the probability of detecting an oocyte with cytoplasmic dysmorphism in the GnRH-ant group was similar (OR:1.05, 95% CI: 0.62-1.81) to the probability in the GnRH-a group. However, the probability of detecting an oocyte with extracytoplasmic dysmorphism or both dysmorphisms in the GnRH-ant group was lower (OR: 0.78, 95% CI: 0.38-1.59 and OR: 0.77, 95% CI: 0.38-1.54, respectively) than for the GnRH-a group. Again, these observations were not significantly different. These data are summarized in Table 2.

It is possible that the oocytes exhibited more than one change in morphology. When each dysmorphism was analyzed, it was observed that alterations in polar body shape (31.8%, 217/681), the presence of diffuse cytoplasmic granulations (22.8%; 155/681), refractile bodies (18.5%; 126/681) and central cytoplasmic granulations (13.6%; 93/681) were the most common alterations. Other morphological abnormalities were present in less than 10% of the oocytes analyzed. Interestingly, cytoplasmic vacuoles (0.7%; 5/681) and changes in oocyte shape (1.9%; 13/681) had low incidences. The individual incidences of oocyte dysmorphism obtained from the GnRH-

a and GnRH-ant groups were not significantly different ($P > 0.05$). These data are summarized in Table 3.

Discussion

Oocyte quality is a major determinant of embryo quality and the subsequent success of the treatment. Thus, to improve the outcomes of assisted reproduction procedures, it is important to identify non-invasive parameters to evaluate oocyte quality. Among these, the examination of the egg phenotype using optical microscopy is the most commonly used method.

A normal MII oocyte has a round shape, a single intact polar body, a clear zona pellucida, a small perivitelline space, and a transparent and smooth cytoplasm without granules or inclusions [1, 18, 21, 23, 24]. However, most of the oocytes collected after ovarian stimulation in infertile patients or in some fertile donors have some type of dysmorphism [18, 19, 21, 23-28]. Various studies have demonstrated the clinical importance of oocyte dysmorphism. Indeed, specific intra- and extracellular morphological changes in oocytes, such as granulations, cytoplasmic inclusions, and abnormalities of the polar body, zona pellucida, perivitelline space, and oocyte shape, have been shown to be related to fertilization, cleavage, embryo development, and clinical outcomes [1, 17, 20, 21, 24-38]. However, the results are controversial. Other studies have not found a negative prognostic value of oocyte morphology on the results of IVF, depending on the dysmorphism and results analyzed [18, 30, 37-42]. The variance in results can be explained by the use of different morphological criteria and/or a lack of standardization in the assessment of oocytes. Additionally, the factors involved in the induction of the morphological changes can contribute to this variation in the results.

GnRH receptors are expressed in human ovaries, but the action of GnRH analogues on oocyte morphology and quality remains controversial. In the present study, no significant difference was observed between the incidence of oocyte dysmorphisms and the type of analogue used for pituitary suppression in the IVF cycles. In contrast to our findings, Murber *et al.* [4] found a significantly higher incidence of cytoplasmic changes in the GnRH-ant group than in the GnRH-a group (62.1% and

49.9%, respectively; $P < 0.01$). In another study in which different stimulation protocols were evaluated, Otsuki *et al.* [17] found that SER aggregations were more frequent in short GnRH-a protocols compared with long-term protocols. However, differences in the study design (both are retrospective studies [4, 17]) in the populations, and in the analysis methods impair the comparison with our findings. On the other hand, our findings are in agreement with those of Rienzi *et al.* [1], who analyzed 1,191 MII oocytes. In their retrospective study that included three different protocols for controlled ovarian hyperstimulation, a long-term GnRH-a protocol (268 cycles), a GnRH-ant protocol (142 cycles), and a natural cycle with minimal stimulation (106 cycles), no correlation was found between the protocol used for ovarian hyperstimulation and oocyte morphology [1].

Pharmacological doses of gonadotropins in stimulated cycles create a hormonal environment that induces the growth of a cohort of follicles that would otherwise degenerate under *in vivo* conditions. Thus, the type of gonadotropin used is also a factor that likely influences the quality of the oocyte. In our study, regardless of the analogue used (agonist or antagonist), all cycles were stimulated by r-LH in addition to r-FSH, and this factor has yet to be analyzed. Some studies have reported the beneficial effects of using r-LH on ovarian physiology and clinical outcomes [43, 44]. In addition, Ruvolo *et al.* [45] suggested that supplementation with r-LH improves the chromatin quality of cumulus cells and protects them from apoptosis, possibly acting directly on granulosa cells or via a paracrine effect. These authors suggested that by maintaining the physiological function of the cumulus cells over time, the nuclear and cytoplasmic maturation of the oocyte would also be maintained, thereby allowing a better intrinsic quality of the oocytes at the time of retrieval. Thus, it can be hypothesized that the r-LH used in our study had a positive action on oocyte morphology, which compensated for any possible deleterious effect of GnRH-a or GnRH-ant on ovarian physiology. In fact, Hernadez *et al.* [46] reported that a GnRH-ant inhibited the cell cycle by decreasing the synthesis of growth factors and thereby compromised the mitotic program of follicles and oocyte quality. However, this hypothesis needs to be tested by additional controlled trials. It should be noted that in

our study, the overall incidences of oocyte dysmorphism in both the GnRH-a and GnRH-ant groups were similar to that reported in the literature, suggesting that any beneficial effects were associated with the protocols used for ovarian stimulation. In addition, Rashidi *et al.* [3] performed a randomized study comparing human menopausal gonadotropin (hMG) with r-FSH and did not find differences in the morphology of the MII oocytes retrieved.

Although there are several studies that have evaluated the clinical protocols of ovarian stimulation, very little is known regarding the correlation between these protocols and oocyte morphology. The majority of available studies that focus on oocyte morphology have examined its association with the results of IVF and not with ovarian stimulation protocol [24, 25, 29, 31, 38, 40]. In a recent meta-analysis [37], the oocyte dysmorphisms that were negatively correlated with fertilization rate, i.e., a lower chance of the fertilization of an oocyte, included changes in the first polar body, increase in perivitelline space, and the presence of refractile bodies and cytoplasmic vacuoles. The present study found that 72.2% of oocytes had at least one morphologic change, which is consistent with the 60-80% value reported in the literature: Figueira *et al.* [47] (60.2%); Rienzi *et al.* [1] and Yakin *et al.* [20] (84%); Kahraman *et al.* [30] (65.8%); Aguiar *et al.* [48] (67.3%); Balaban *et al.* [23] (63.1%); and De Sutter *et al.* [18] (63.5%). Among the dysmorphisms, cytoplasmic changes occurred the most frequently (32.3%), followed by the occurrence of simultaneous cytoplasmic and extracytoplasmic changes (21.7%), and only extracytoplasmic changes occurred with the lowest frequency (18.2%). Different data were reported by Balaban *et al.* [23], who showed a higher percentage of extracytoplasmic changes, followed by the percentage of both extra- and cytoplasmic changes and finally by that of cytoplasmic changes. Mikkelsen and Lindenberg [49] also found a higher incidence of extracytoplasmic changes, followed by that of cytoplasmic changes.

When the dysmorphisms were individually evaluated, the most common cytoplasmic change found was cytoplasmic granularity (diffuse and central), followed by refractile bodies, SER aggregations and, finally, the presence of vacuoles. Balaban *et*

al. [23] found a different order of prevalence (in decreasing order of frequency): dark cytoplasm, refractile bodies, and granular cytoplasm. Rienzi *et al.* [1] found an order of prevalence similar to ours: cytoplasmic granularity was the most frequent, followed by refractile bodies, vacuoles, and SER; the only difference was in the order of vacuoles and SER. In our study, the most prevalent changes in the extracytoplasmic dysmorphisms were related to the first polar body, followed by changes in the perivitelline space, zona pellucida, and the oocyte shape, similar to that reported by Rienzi *et al.* [1]. However, Balaban *et al.* [23] showed that the most frequent extracytoplasmic alterations were an increase in the perivitelline space, followed by a dark pellucida area and shape abnormalities. Aguiar *et al.* [48] showed that 42.8% of oocytes had multiple changes, 40% had cytoplasmic inclusions, 14.3% exhibited fragmentation of the polar body, and 2.9% had an increased perivitelline space.

Conclusion

Our randomized data indicate that in terms of the quality of oocyte morphology there is no difference in use antagonist multi-dose protocol or long agonist protocol. If a GnRH analogue used for pituitary suppression in IVF cycles influences the prevalence of various oocyte dysmorphisms, there does not appear to be a difference between the agonists and antagonists. To the best of our knowledge, this is the first randomized trial that has analyzed this association. A future randomized controlled trial with a larger sample size would be helpful to corroborate these findings.

Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Author's contributions

AMMC participated in the design of the study, data interpretation, and the drafting of the manuscript. All authors were responsible for the data collection, analysis, and interpretation presented in the manuscript. JBAO participated in the design of the study, collected the data, and coordinated the study. CGP conducted the laboratory analysis of oocytes. JGFJ participated in the critical revision of 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. Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E, Litwicka K, Greco E: **Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome.** *Fertil Steril* 2008, **90**:1692-1700.
2. de Bruin JP, Dorland M, Spek ER, Posthuma G, van Haaften M, Looman CW, te Velde ER: **Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries.** *Biol Reprod* 2004, **70**:419-424.
3. Rashidi BH, Sarvi F, Tehrani ES, Zayeri F, Movahedin M, Khanafshar N: **The effect of HMG and recombinant human FSH on oocyte quality: a randomized single-blind clinical trial.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005, **120**:190-194.
4. 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.
5. Janssens RM, Lambalk CB, Vermeiden JP, Schats R, Bernards JM, Rekers-Mombarg LT, Schoemaker J: **Dose-finding study of triptorelin acetate for prevention of a premature LH surge in IVF: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study.** *Hum Reprod* 2000, **15**:2333-2340.
6. 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.
7. Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M: **Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception: a Cochrane review.** *Reprod Biomed Online* 2007, **14**:640-649.
8. 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.
9. **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.

10. Kadoch IJ, Al-Khaduri M, Phillips SJ, Lapensee L, Couturier B, Hemmings R, Bissonnette F: **Spontaneous ovulation rate before oocyte retrieval in modified natural cycle IVF with and without indomethacin.** *Reprod Biomed Online* 2008, **16**:245-249.
11. Bauman R, Mihaljevic D, Kupesic S, Kurjak A: **In vitro fertilization in spontaneous cycles--our experience.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002, **102**:184-187.
12. Huirne JA, Homburg R, Lambalk CB: **Are GnRH antagonists comparable to agonists for use in IVF?** *Hum Reprod* 2007, **22**:2805-2813.
13. Bodri D, Sunkara SK, Coomarasamy A: **Gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists for controlled ovarian hyperstimulation in oocyte donors: a systematic review and meta-analysis.** *Fertil Steril* 2011, **95**:164-169.
14. Olivennes F, Belaisch-Allart J, Emperaire 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 (cetorelix) or a depot formula of an LH-RH agonist (triptorelin).** *Fertil Steril* 2000, **73**:314-320.
15. 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.
16. Cheung LW, Wong AS: **Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues.** *FEBS J* 2008, **275**:5479-5495.
17. Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H: **The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes.** *Hum Reprod* 2004, **19**:1591-1597.
18. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M: **Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection.** *Hum Reprod* 1996, **11**:595-597.
19. Alikani M, Palermo G, Adler A, Bertoli M, Blake M, Cohen J: **Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes.** *Zygote* 1995, **3**:283-288.
20. Yakin K, Balaban B, Isiklar A, Urman B: **Oocyte dysmorphism is not associated with aneuploidy in the developing embryo.** *Fertil Steril* 2007, **88**:811-816.

21. Balaban B, Urman B: **Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation.** *Reprod Biomed Online* 2006, **12**:608-615.
22. Van Blerkom J, Henry G: **Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation.** *Hum Reprod* 1992, **7**:379-390.
23. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R: **Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection.** *Hum Reprod* 1998, **13**:3431-3433.
24. Xia P: **Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality.** *Hum Reprod* 1997, **12**:1750-1755.
25. Balaban B, Ata B, Isiklar A, Yakin K, Urman B: **Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos.** *Hum Reprod* 2008, **23**:1778-1785.
26. Ebner T, Moser M, Tews G: **Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI?** *Reprod Biomed Online* 2006, **12**:507-512.
27. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G: **Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection.** *Hum Reprod* 2000, **15**:427-430.
28. Ten J, Mendiola J, Vioque J, de Juan J, Bernabeu R: **Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality.** *Reprod Biomed Online* 2007, **14**:40-48.
29. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM: **Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection.** *Hum Reprod* 1997, **12**:1267-1270.
30. Kahraman S, Yakin K, Donmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzalioglu N: **Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection.** *Hum Reprod* 2000, **15**:2390-2393.
31. Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S, Cruz M, Casper RF: **Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles.** *Hum Reprod* 2001, **16**:2118-2123.

32. Farhi J, Nahum H, Weissman A, Zahalka N, Glezerman M, Levran D: **Coarse granulation in the perivitelline space and IVF-ICSI outcome.** *J Assist Reprod Genet* 2002, **19**:545-549.
33. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, Tews G: **Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development.** *Fertil Steril* 2005, **83**:1635-1640.
34. Otsuki J, Nagai Y, Chiba K: **Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality.** *J Assist Reprod Genet* 2007, **24**:263-270.
35. Wilding M, Di Matteo L, D'Andretti S, Montanaro N, Capobianco C, Dale B: **An oocyte score for use in assisted reproduction.** *J Assist Reprod Genet* 2007, **24**:350-358.
36. Navarro PA, de Araujo MM, de Araujo CM, Rocha M, dos Reis R, Martins W: **Relationship between first polar body morphology before intracytoplasmic sperm injection and fertilization rate, cleavage rate, and embryo quality.** *Int J Gynaecol Obstet* 2009, **104**:226-229.
37. Setti AS, Figueira RC, Braga DP, Colturato SS, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr.: **Relationship between oocyte abnormal morphology and intracytoplasmic sperm injection outcomes: a meta-analysis.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011, **159**:364-370.
38. Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F: **Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature.** *Hum Reprod update* 2011, **17**:34-45.
39. Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J: **Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection.** *Hum Reprod* 1998, **13**:3425-3430.
40. Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S: **First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate.** *Hum Reprod* 2004, **19**:2334-2339.
41. De Santis L, Cino I, Rabbellotti E, Calzi F, Persico P, Borini A, Coticchio G: **Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality.** *Reprod Biomed Online* 2005, **11**:36-42.
42. Chamayou S, Ragolia C, Alecci C, Storaci G, Maglia E, Russo E, Guglielmino A: **Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos.** *Reprod Biomed Online* 2006, **13**:661-667.

43. 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.
44. 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.
45. Ruvoilo 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.
46. Hernandez ER: **Embryo implantation and GnRH antagonists: embryo implantation: the Rubicon for GnRH antagonists.** *Hum Reprod* 2000, **15**:1211-1216.
47. Figueira RCS, Braga DPAF, Semiao-Francisco L, Madaschi C, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr.: **Metaphase II human oocyte morphology: contributing factors and effects on fertilization potential and embryo developmental ability in ICSI cycles.** *Fertil Steril* 2010, **94**:1115-1117.
48. Aguiar LP, Moraes LM, Lamita RM, Marinho RM, Caetano JPJ: **Correlação entre a morfologia do oócito e o desenvolvimento embrionário: Proposta de escore para qualidade embrionária.** *Reprod Hum* 2003, **3**:19-24.
49. Mikkelsen AL, Lindenberg S: **Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality.** *Hum Reprod* 2001, **16**:1714-1718.

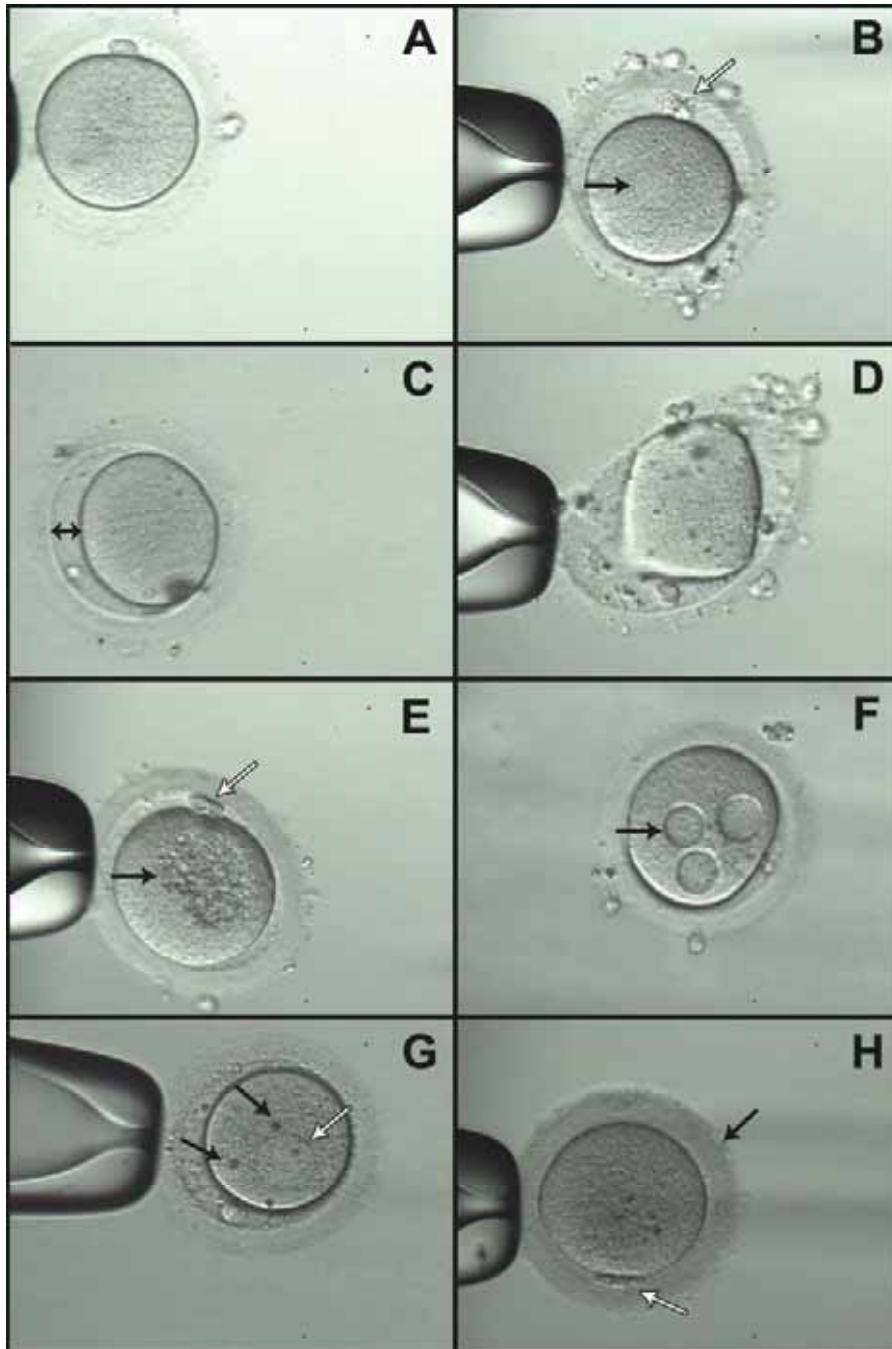


Figure 1. Oocytes with normal and abnormal morphology: (A) normal oocyte, (B) Black arrow: smooth endoplasmic reticulum (SER) aggregations; White arrow: abnormal polar body (C) large perivitelline space (D) abnormal oocyte shape (E) Black arrow: central cytoplasmic granulation; White arrow: abnormal polar body (F) cytoplasmic vacuoles (G) Black arrow: refractile bodies; White arrow: smooth endoplasmic reticulum (SER) aggregations (H) Black arrow: dark thick zona pellucida and cytoplasm; White arrow: abnormal polar body

Table 1. The basic demographic characteristics of the patients and the cycle of ovarian stimulation.

		Agonist group	Antagonist group	<i>P</i>
Patients (n)		32	32	
Age (years)		33.2 ± 3.0	32.5 ± 3.0	0.39
BMI (kg/m ²)		23.5 ± 3.2	23.2 ± 3.0	0.48
Duration of infertility (years)		4.4 ± 3.0	4.1 ± 3.0	0.33
Infertility				0.11
	Primary	56.2% (18/32)	78.1% (25/32)	
	Secondary	43.8% (14/32)	21.9% (7/32)	
Tobacco use (%)		3.1% (1/32)	0 (0/32)	0.31
Regular alcohol use		12.5% (4/32)	3.1% (1/32)	0.35
Etiology				0.59
	Male factor	50% (16/32)	53.1% (17/32)	
	Idiopathic	34.4% (11/32)	21.9% (7/32)	
	Tubal factor	9.3% (3/32)	18.7% (6/32)	
	Male + Tuboperitoneal	6.3% (2/32)	6.3% (2/32)	
Total dose FSH (UI)		2185.5 ± 617	1877.3 ± 817	0.09
Total dose LH (UI)		1094.5 ± 258	1026.5 ± 385	0.87
Time of stimulation (days)		11 ± 1.8	10.4 ± 3.2	0.82
Follicles (n) (hCG day)				
	Total (≥10 mm)	15.9 ± 8.3	17.7 ± 9.2	0.49
	≥16 mm	6.9 ± 3.1	7.5 ± 3.6	0.47
	≥18 mm	4.1 ± 2.1	4.1 ± 1.8	0.65
Retrieved oocytes:				
	Total	12.5 ± 6.9	13.4 ± 7.0	0.57
	Metaphase II stage	9.3 ± 5.9	9.8 ± 6.0	0.77
	Metaphase I stage	1.3 ± 1.5	1.4 ± 1.4	0.22
	Germinal vesicles stage	1.3 ± 2.5	0.9 ± 1.4	0.88

Table 2. The comparison of the overall prevalence of oocyte dysmorphisms in the GnRH agonist and GnRH antagonist groups.

Oocyte characteristics	Total n: 681	Group Agonist n: 330	Group Antagonist n: 351	P	Odds ratio (95% CI)
Oocytes:				0.34	1.29 (0.75-2.22)
		Normal	27.8% (189)	25.8% (85)	29.6% (104)
		Dysmorphic	72.2% (492)	74.2% (245)	70.4% (247)
Cytoplasmic dysmorphism	32.3% (220)	32.1% (106)	32.5% (114)	0.84	1.05 (0.61-1.80)
Extracytoplasmic dysmorphism	18.2% (124)	19.4% (64)	17.1% (60)	0.48	0.78 (0.37-1.59)
Cytoplasmic + extracytoplasmic dysmorphism	21.7% (148)	22.7% (75)	20.8% (73)	0.45	0.77(0.38-1.54)

Table 3. The comparison between the prevalence of specific dysmorphisms in the GnRH agonist and GnRH antagonist groups.

Oocyte characteristics	Total n: 681	Agonist n: 330	Antagonist n: 351	P	Odds ratio (95% CI)
Cytoplasmic dysmorfism (presence of)					
Central cytoplasmic granulation	22.8% (155)	25.2% (83)	20.5% (72)	0.17	0.95 (0.44 - 2.06)
Diffuse granulation	13.6% (93)	12.1% (40)	15.1% (53)	0.32	1.06 (0.48 - 2.44)
Refractile bodies	18.5% (126)	20.3% (67)	16.8% (59)	0.27	0.88 (0.32 - 2.43)
SER aggregations	2.3% (16)	1.8% (6)	2.8% (10)	0.45	1.41 (0.25 - 7.85)
Vacuoles	0.7% (5)	0.9% (3)	0.6% (2)	0.93	0.66 (0.07 - 6.37)
Extracytoplasmic (alteration of)					
Polar body shape	31.3% (213)	30.9% (102)	31.6% (111)	0.90	0.78 (0.38 - 1.61)
Perivitelline space	6.8% (46)	8.2% (27)	5.4% (19)	0.19	0.66 (0.28 - 1.52)
Zona pellucida	3.4% (23)	4.8% (16)	2.0% (7)	0.06	0.40 (0.15 - 1.06)
Oocyte shape	1.9% (13)	1.1% (7)	1.7% (6)	0.78	0.79 (0.26 - 2.35)

* oocytes could present more than 1 dysmorphism.

Τ ΧάΕά



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

Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 28 de abril de 2011.

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DATA DA APROVAÇÃO: 27/04/2011

Protocolo nº: 011/11

TÍTULO DO ESTUDO: "Agonista versus Antagonista do GnRH em ciclos de Reprodução assistida: Morfologia oocitária".

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Ana Márcia de Miranda Cota.

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tendo a referida aprovação constado em ata.



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



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: Morfologia oocitária”**, 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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: “Agonista versus Antagonista do GnRH em ciclos de reprodução assistida: morfologia oocitária.”

Nome da Voluntária: _____

Você em breve será submetida à Fertilização “in vitro” (bebê de proveta) com transferência de embriões para tratamento de infertilidade. Por isso está sendo convidada a participar de um estudo clínico que envolve avaliação de esquema de aplicação de remédios para a indução da ovulação.

Nos últimos anos, muitas mulheres com problemas para engravidar têm-se submetido às Técnicas de Reprodução Assistida, que envolvem vários tratamentos, como o “bebê de proveta”. Como parte das Técnicas de Reprodução Assistida, os ovários da mulher são estimulados com medicamentos, para que ocorra o desenvolvimento dos óvulos.

Em mulheres sem problemas de fertilidade, no início de cada ciclo menstrual (regra), vários óvulos, que ainda não estão maduros, começam a se desenvolver e a crescer dentro dos ovários, através da ação do hormônio chamado hormônio folículo estimulante (FSH), produzido naturalmente no organismo pela glândula hipófise. No entanto, dentre os vários óvulos que começam a se desenvolver no início de cada ciclo menstrual, geralmente apenas um amadurece completamente. Quando o folículo, pequena “bolsa” que abriga o óvulo durante o processo de amadurecimento, atinge um tamanho adequado (próximo a 20mm), ocorre a liberação, também pela glândula hipófise, de grande quantidade do hormônio luteinizante (LH) que amadurece e libera do óvulo do ovário (evento chamado de ovulação). Este óvulo maduro sai de dentro do folículo, sai do ovário e vai até a trompa uterina (canal que liga o ovário ao útero), onde encontra com os espermatozóides, ocorrendo a fecundação (união do óvulo com o espermatozóide).

Já a fertilização “in vitro” requer que seja coletado um grande número de óvulos que fecundados no laboratório com os espermatozóides, irão dar origem aos embriões (os bebês de proveta) que serão colocados no útero. O desenvolvimento e amadurecimento destes óvulos são induzidos por injeções diárias do mesmo hormônio folículo estimulante (FSH) produzido pelo organismo, sendo aplicado via subcutânea (abaixo da pele). A partir do momento em que os folículos maiores atingem tamanho próximo à 20mm, uma injeção de um outro hormônio (gonadotrofina coriônica humana - hCG), é administrada por via intramuscular (no músculo) ou subcutânea, para induzir o amadurecimento dos óvulos e a coleta ser agendada .

Um dos problemas da estimulação da ovulação para fertilização “in vitro” é a liberação natural do hormônio luteinizante (LH) e a ocorrência da ovulação. Quando a liberação natural do LH ocorre torna impossível colher os óvulos ou, quando é possível, os óvulos não tem boa qualidade, o que prejudica o tratamento. Para evitar esse problema, uma das bases dos esquemas de indução da ovulação é a inclusão de medicação chamada de análogos do hormônio liberador das gonadotrinas (GnRH) que impede a liberação natural do LH. Há diferentes tipos de análogos de GnRH: os agonistas e os antagonistas.

Esse estudo procura comparar a ação desses dois tipos de análogos sobre a morfologia, forma dos óvulos, com o intuito de verificar se há diferença entre os dois.

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

Comparar se a prevalência das alterações na forma dos oócitos é influenciada pelo tipo de análogos do GnRH usada na estimulação ovariana em ciclos de fertilização “in vitro”.

O resultado da pesquisa aumentará as opções de tratamento, representando benefício para quem necessita de fertilização “in vitro”.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você concordar em participar deste estudo, no momento quem que for prescrito seu esquema de indução da ovulação para o tratamento de fertilização “in vitro”, será realizado sorteio entre os dois protocolos. Dessa forma as pacientes serão divididas de forma aleatória (ao acaso) em 2 grupos:

- 1) grupos que utilizará esquema longo com agonista do GnRH
- 2) grupo que utilizará esquema com antagonista do GnRH

Com exceção dos análogos de GnRH, todas as medicações para estimular a ovulação serão iguais nos dois esquemas, bem como as dose, calculadas de acordo com a idade da paciente. Do mesmo modo todos os outros procedimentos da fertilização in vitro serão iguais nos dois grupos.

É importante ressaltar que os dois protocolos de indução que serão comparados já foram (e são) utilizados mundialmente. Do mesmo modo todas as medicações que serão utilizadas são aprovadas para uso médico no Brasil pelas autoridades competentes. Não será testada nenhuma medicação experimental.

As avaliações feitas do número de folículos e dos óvulos são parte da rotina do tratamento (fertilização in vitro), não representando uma avaliação extra por conta do estudo.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Como a indicação para tratamento de seu problema de infertilidade é a fertilização “in vitro”, você terá que ser submetida a algum esquema de indução da ovulação. Não há métodos alternativos a esses procedimentos. Conduto você pode simplesmente não querer que a decisão sobre seu esquema siga os padrões do estudo (decisão aleatória) e resolva não participar.

RISCOS

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. A coleta dos óvulos faz parte dos procedimentos rotineiros do seu tratamento, não sendo prevista coleta adicional. Para a coleta de óvulos, que é parte de seu tratamento regular, é necessária sedação feita pela veia e posteriormente os ovários ficam aumentados de tamanho o que pode levar a algum desconforto na sua barriga. O aumento dos ovários é resultado de qualquer estimulação dos ovários pelos hormônios utilizados, não dos análogos do GnRH.

Por outro lado, as avaliações dos óvulos e embriões não os prejudicam, sendo parte da rotina dos procedimentos de FIV/ICSI.

BENEFÍCIOS

O resultado da pesquisa propiciará mais opções de protocolo para estimulação ovariana, representando benefício para quem necessita de fertilização “in vitro”.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pela equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Lembramos que não é esperado nenhum dano para a sua saúde decorrente diretamente desse estudo.

Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS (Ressarcimento e indenização)

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e as análises relativas ao estudo serão imediatamente interrompidas.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, entre em contato com a Dra. Ana Márcia de Miranda Cota (RG M7167976 SSP-MG) nos telefones (16) 8124-9303 / (16) 3877-5788 ou nos endereços Av João Fiusa 689 Ribeirão Preto – São Paulo / R: Gal Ososrio 1149/66 ou com qualquer médico do Centro de Reprodução Humana Professor Franco Jr.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que poderei usar esquema de indução da ovulação que está em avaliação.

Entendo que as avaliações que serão realizadas fazem parte da rotina da fertilização in vitro necessária a meu tratamento, e que procedimentos adicionais não serão realizados.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento com todas as páginas adicionais rubricadas.

(Nome do Paciente – letra de forma)

Eu, abaixo assinado, explico completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima

_____/_____/_____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano