

MARCO TÚLIO VAINTRAUB

**ANÁLISE DOPPLERFLUXOMÉTRICA DAS ARTÉRIAS UTERINAS PARA  
DIAGNÓSTICO DO BLOQUEIO HIPOFISÁRIO, APÓS USO DE ANÁLOGO DO  
GNRH, EM CICLOS DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*.**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO DE MESTRADO EM  
GINECOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE MINAS GERAIS, COMO REQUISITO PARCIAL À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE EM GINECOLOGIA.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MEDICINA  
ORIENTADOR: PROF. DR. SELMO GEBER  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte

Departamento de Ginecologia  
Faculdade de Medicina da UFMG

2003

## RESUMO

Atualmente, quase todos os protocolos de fertilização *in vitro* incluem o uso de análogos do GnRH. Esta prática tem como objetivo evitar um indesejado pico prematuro de LH, com conseqüente ovulação precoce não programada, visando diminuir, desta forma, o risco de cancelamento dos ciclos. O diagnóstico do bloqueio hipofisário é realizado através da dosagem sérica de estradiol ( $E_2$ ), muitas vezes associada com a mensuração da espessura endometrial. Neste estudo, foi avaliada a Dopplerfluxometria das artérias uterinas como método diagnóstico do estado hipoestrogênico provocado pelo bloqueio hipofisário, após a administração de GnRH-a em ciclos de FIV. Setenta pacientes que se submeteram a tratamento de Reprodução Assistida foram selecionadas. Dez dias após a administração de GnRH-a, foram feitas dosagens séricas de  $E_2$  e ultrasonografia endovaginal para mensuração da espessura endometrial, avaliação da morfologia ovariana e Dopplerfluxometria das artérias uterinas. Considerando valores de  $E_2 \leq 30$  pg/ml como padrão ouro para ponto de corte, a medida da espessura endometrial apresentou uma sensibilidade de 77,8 % e uma especificidade de 61,7 %. Já com a Dopplerfluxometria, a sensibilidade foi de 72,2 % e a especificidade de 71 %. Ao combinarmos os dois métodos, encontrou-se uma especificidade de 83,15%. Conclui-se que o estudo Dopplerfluxométrico das artérias uterinas pode ser um instrumento importante no diagnóstico do estado hipoestrogênico em ciclos de reprodução assistida, após o uso de GnRH-a.

Aos meus pais, Sarah e José,  
à minha esposa Patrícia e  
ao meu filho Leonardo

## **AGRADECIMENTOS**

Como forma de reconhecimento a todas as pessoas que contribuíram para tornar possível a realização deste trabalho, gostaria de agradecer:

Ao Professor Dr. Selmo Geber, pela orientação, paciência, amizade, mostrando-se sempre disponível para minhas dúvidas e dificuldades, por suas críticas, ensinamentos, pelo incentivo e estímulo.

A todos os Professores do Curso de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, por contribuírem para a aquisição de conhecimento.

Aos Colegas de Mestrado, pela amizade e estímulo.

A minha esposa Patrícia, por seu amor, carinho, respeito, presença constante, e compreensão pelas horas dedicadas ao trabalho.

Ao meu filho, Leonardo, pela aceitação das horas de convivência que não pudemos aproveitar, em função da dedicação ao trabalho.

A meus pais Sarah e José, por seu amor, apoio, incentivo e, acima de tudo, por terem me ensinado a ser quem sou.

A todos, meu muito obrigado.

Enfim, agradeço a Deus por tudo.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade. Porque se tornará assim uma máquina utilizável, mas não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”.

Albert Einstein

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10

### **1- INTRODUÇÃO**

---

<b>1.1 – ANÁLOGOS DO HORMÔNIO LIBERADOR DAS GONADOTROFINAS</b>	<b>13</b>
<i>1.1.1- DESCOBRIMENTO E DESENVOLVIMENTO</i>	13
<i>1.1.2 - GNRH E REPRODUÇÃO</i>	14
<i>1.1.3 - DESENVOLVIMENTO DOS ANÁLOGOS DO GNRH</i>	17
Tabela 1- Sequência de aminoácidos dos análogos agonistas do GnRH	18
<i>1.1.4 – MECANISMO DE AÇÃO DOS ANÁLOGOS DO GNRH</i>	18
<i>1.1.5 – AGONISTAS DO GNRH NA HIPERESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA</i>	21
<b>1.2 – PROTOCOLOS DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA, COM USO DE AGONISTAS DO GNRH</b>	<b>23</b>
Figura 1- Representação esquemática de três protocolos básicos de hiperestimulação ovariana.	24
<b>1.3 – VIAS DE ADMINISTRAÇÃO:</b>	<b>25</b>
<b>1.4 – COMPLICAÇÕES E EFEITOS COLATERAIS DOS ANÁLOGOS DO GNRH</b>	<b>26</b>
<b>1.5 – AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DA FUNÇÃO HIPOFISÁRIA</b>	<b>27</b>
<i>1.5.1 - DOSAGEM DOS NÍVEIS HORMONAIS:</i>	27
<i>1.5.2 - AVALIAÇÃO DA ESPESSURA ENDOMETRIAL POR ULTRA-SONOGRAFIA:</i>	28
<i>1.5.3 - AVALIAÇÃO OVARIANA ATRAVÉS DA ULTRA-SONOGRAFIA ENDOVAGINAL</i>	32
<i>1.5.4 – UTILIZAÇÃO DA DOPPLERFLUXOMETRIA COLORIDA NA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO OVARIANA</i>	34

### **2 - OBJETIVO**

---

### **3 - METODOLOGIA:**

---

<b>3.1 - PACIENTES E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
<b>3.2 - VARIÁVEIS ANALISADAS:</b>	<b>43</b>

<b>3.3 - DOSAGEM DE ESTRADIOL</b>	<b>44</b>
<b>3.4 - ESTUDO DOPPLERFLUXOMÉTRICO</b>	<b>45</b>
FIGURA 2 –	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 3- Intervalos de confiança 90% para a média do IP da Artéria uterina direita, segundo E2.	48
Figura 4- - Intervalos de confiança 90% para a média do IP da Artéria uterina esquerda, segundo E2.	49
Figura 5 - Intervalos de confiança 90% para a média do IP da Artéria uterina direita, segundo ENDO.	50
Figura 6 - Intervalos de confiança 90% para a média do IP da Artéria uterina esquerda, segundo ENDO.	51
<b>3.5 - AVALIAÇÃO ULTRA-SONOGRÁFICA</b>	<b>52</b>
Figura 7 – foto do endométrio	53
<b>3.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>54</b>
<b>3.7 – MÉTODO BIBLIOGRÁFICO</b>	<b>54</b>
<b>4 - RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<hr/>	
Tabela 2. Distribuição das pacientes de acordo com os níveis séricos de estradiol e espessura endometrial.	57
Tabela 3. Correlação entre o índice de pulsatilidade das artérias uterinas e os níveis de Estradiol sérico.	58
Tabela 4. Correlação entre o índice de pulsatilidade das artérias uterinas e a espessura endometrial.	58
<b>5 – DISCUSSÃO</b>	<b>60</b>
<hr/>	
<b>5.-.CONCLUSÃO</b>	<b>65</b>
<hr/>	
<b>6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>66</b>
<hr/>	

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

E2	estradiol
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
GnRH-a	análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas
LHRH	hormônio liberador de hormônio luteinizante
FIV	fertilização in vitro
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection
FSH	hormônio folículo estimulante
LH	hormônio Luteinizante
IR	índice de resistência
IP	índice de pulsatilidade
USTV	ultra-sonografia transvaginal
HMG	gonadotrofina menopáusica humana
HCG	gonadotrofina coriônica humana
IGF-1	insulin-like growth factor 1
S	sístole
D	diástole

## LISTA DE FIGURAS

FIG.		PAG.
1	Representação esquemática de três protocolos básicos de hiperestimulação ovariana controlada	24
2	Estudo Dopplerfluxométrico de artéria uterina.	47
3	Intervalos de confiança 90% para a média do IP da Artéria uterina direita, segundo nível sérico de estradiol.	48
4	Intervalos de confiança 90% para a média do IP da Artéria uterina esquerda, segundo nível sérico de estradiol.	49
5	Intervalos de confiança 90% para a média do IP da Artéria uterina direita, segundo espessura endometrial.	50
6	Intervalos de confiança 90% para a média do IP da Artéria uterina esquerda, segundo espessura endometrial.	51
7	Medida ultra-sonográfica da espessura endometrial.	53

## LISTA DE TABELAS

TAB.	TÍTULO	PAG.
1	Seqüência de aminoácidos dos análogos agonistas do GnRH.	18
2	Distribuição das pacientes de acordo com os níveis séricos de estradiol e espessura endometrial.	57
3	Correlação entre o índice de pulsatilidade das artérias uterinas e os níveis de Estradiol sérico.	58
4	Correlação entre o índice de pulsatilidade das artérias uterinas e a espessura endometrial.	58

## 1- INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida, utilizadas para o tratamento da infertilidade conjugal, vêm sendo cada vez mais utilizadas, não somente pelos melhores resultados que vem apresentando, como também pela maior facilidade técnica e baixo risco do procedimento. Assim, este tratamento já faz parte do arsenal terapêutico disponível pela medicina reprodutiva, para o tratamento do casal infértil, devido às mais variadas etiologias.

O uso dos análogos do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH-a) em pacientes submetidas a tratamento com técnicas de Reprodução Assistida tem como objetivo impedir um possível pico prematuro do Hormônio Luteinizante (LH), e a conseqüente ovulação precoce (Hughes et al, 1992), o que impediria a captação ovular. Desde a introdução de seu uso na prática clínica, tem sido descritos um aumento nas taxas de gravidez e uma diminuição no número de ciclos cancelados (Tan et al, 1992). O principal efeito do GnRH-a é criar um bloqueio da função hipofisária, através da ocupação dos receptores hipofisários, levando a um estado de hipopituitarismo e conseqüente hipoestrogenismo temporário, com níveis de estrogênio sérico semelhantes aos encontrados em mulheres na pós-menopausa (Tan et al, 1994; Wikland et al, 1994). Este efeito, por sua vez, pode demorar um período de 7 a 20 dias para ocorrer (Brzyski et al, 1989). Assim, após o início do uso dos GnRH-a, é fundamental que se confirme a sua ação, antes do início do estímulo ovariano (Calhaz-Jorge et al, 1995).

A dosagem dos níveis séricos de Estradiol ( $E_2$ ) é considerada o método padrão ouro, uma vez que determina diretamente a resposta ovariana à estimulação gonadotrófica (Sampaio et al, 1991). Da mesma forma, a dosagem das gonadotrofinas (Hormônio Luteinizante - LH e Hormônio Folículo Estimulante – FSH) irá determinar diretamente, se a hipófise encontra-se bloqueada. Outro método bastante utilizado é a medida da espessura endometrial através da ultrasonografia endovaginal que, associado com a avaliação da morfologia ovariana, tem sua sensibilidade e especificidade elevados, uma vez que mede indiretamente a função ovariana. (Barash et al, 1998; Schulman et al, 1989 ).

A busca de um método de maior eficácia sem a necessidade de exame laboratorial, para avaliar este estado de hipoestrogenismo é importante, não só para as técnicas de reprodução assistida, mas também no seguimento de pacientes amenorréicas com ou sem falência ovariana, selecionando aquelas que responderiam positivamente ou não ao teste do progesterona (Nakamura et al, 1996).

## **1.1 – Análogos do hormônio liberador das gonadotrofinas**

### *1.1.1- Descobrimto e desenvolvimento*

A pequena área na base do crânio que margeia o hipotálamo e a pituitária sempre foi foco de curiosidade científica. Na história médica antiga, observou-se que as duas estruturas são conectadas, e que deveriam ter algum tipo de relação funcional. Galeno, médico da Roma antiga, propôs a idéia de que as impurezas do cérebro eram drenadas através da pituitária para a nasofaringe, tendo este conceito sido aceito por 16 séculos.

Somente no século XVII, dois cientistas (Schneider, na Alemanha, e Lower, na Inglaterra) propuseram a idéia de que várias substâncias eram “destiladas” da pituitária para a circulação, concordando com o conceito moderno de uma glândula com secreção interna, segundo a descrição de Medvei (1982).

Durante a Primeira Guerra Mundial, a privação nutricional foi suspeitada como causa de “amenorréia de guerra”. Após a Segunda Guerra Mundial, identificaram-se fatores psicogênicos como causa primária de amenorréia de guerra, como: stress, medo, ansiedade, perigo. Estes fatores foram implicados em diversos sintomas reprodutivos em humanos, variando desde ovulação paracíclica e sangramento uterino repentino, até involução de folículos ovarianos e atrofia testicular.

O conceito de que a glândula pituitária é regulada pelo hipotálamo foi formulado em 1933, por Hinsey e Markee, conforme descrito por Henzl et al, (1993). Os experimentos em animais demonstraram a relação entre o hipotálamo e a função pituitária gonadotrópica, assim como o sistema de circulação portal, com capilares conectando o hipotálamo com a hipófise anterior, e com fluxo sanguíneo direto do hipotálamo para a pituitária. Harris, em 1955, também provou que fibras nervosas dos núcleos hipotalâmicos liberam substâncias nos capilares deste sistema portal e que estes neurohumores, tendo sido transportados para várias células tróficas da hipófise anterior, regulam suas funções. Estas descobertas inspiraram trabalhos com extratos de pituitária e sua purificação (Henzl et al, 1993).

Em 1971, Schally e Guillemin, dois cientistas que não se conheciam, isolaram, pela primeira vez, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), conseguindo também sua definição estrutural e sua síntese, cabendo a eles o Prêmio Nobel de Medicina de 1977 (Schally et al, 1971; Medvei, 1982).

### *1.1.2 - GnRH e reprodução*

A exploração do papel do GnRH em processos reprodutivos levou à descoberta de mecanismos do sistema nervoso central para controle da função gonadal em primatas. Knobil et al (1988), demonstraram a importância do modo pulsátil da secreção de GnRH, e postularam que um pulso gerador hipotalâmico de GnRH é

indispensável para a iniciação e a manutenção da função normal do eixo pituitário-gonadal.

O GnRH é um peptídeo composto de 10 aminoácidos (Fig 1), secretado pelas células neurais do núcleo arqueado da porção mediobasal do hipotálamo de maneira pulsátil. Os axônios nestes neurônios estão em contato íntimo com os vasos do sistema porta hipotálamo-hipofisário. A liberação pulsátil de GnRH pelos neurônios hipotalâmicos faz com que as células gonadotróficas da pituitária, que representam 10% de sua massa celular, liberem as gonadotrofinas (FSH e LH), também de forma pulsátil, sendo estas as responsáveis pelo controle da maturação folicular e pela biossíntese de esteróides sexuais gonadais. O GnRH circulante tem uma rápida degradação enzimática por peptidases, que preferencialmente interagem com o peptídeo na posição "6" da molécula. Desta forma, possuem uma meia vida curta, de apenas 2 a 5 minutos, fazendo com que os pulsos hipotalâmicos de GnRH sejam reconhecidos como eventos únicos pelos receptores hipofisários. Assim, uma administração contínua de GnRH levaria a uma diminuição dos receptores de GnRH nas células gonadotróficas da glândula pituitária, resultando num decréscimo nos níveis de FSH e LH, seguido por uma interrupção da maturação folicular e da biossíntese de esteróides sexuais.(Knobil et al, 1988; Conn et al, 1991; Waters et al, 1990).

A estimulação da liberação, da transcrição, da translação, da glicosilação e da armazenagem do FSH e do LH em grânulos secretórios no gonadotrofo pituitário é iniciada pela ligação do GnRH a receptores específicos na membrana plasmática

(Clayton et al, 1987; Jennes et al, 1984 e Wise et al, 1984). Esta interação do GnRH com seus receptores é seguida inicialmente por uma rápida estimulação da liberação de gonadotropinas e de internalização do complexo GnRH-receptor (Conn et al, 1985, e Suarez Quian et al, 1986). Este processo de internalização foi também demonstrado com uma grande variedade de análogos, e requer ativação do receptor de GnRH (Braden et al, 1990), que se inicia com a mobilização de íons cálcio, para aumentar a concentração intracelular de cálcio. O papel do cálcio como um segundo mensageiro de GnRH foi estabelecido por vários experimentos do grupo de Conn, (Conn et al, 1987; Conn et al, 1991). Omissão de cálcio ou adição de excesso de quelantes de cálcio em meio de cultura com células gonadotróficas faz com que as células se tornem refratárias ao GnRH (Virmani et al, 1990, Jinnah et al, 1986, Emons , 1989). Efeitos semelhantes são obtidos com bloqueadores de canais de cálcio, como o verapamil (Waters et al, 1990). Aumento no cálcio intracelular induz liberação de gonadotrofina na ausência de GnRH. Cloreto de potássio, ionomicina, ionóforos de cálcio e lipossomos, que despolarizam a célula gonadotrófica e que abrem os canais de cálcio, aumentam a entrada de cálcio e estimulam a secreção de gonadotrofinas. O receptor de GnRH parece estar ligado aos canais de cálcio na membrana plasmática. A ativação do receptor através de microagregação abre estes canais e permite um influxo de cálcio extracelular (Conn et al, 1986). O cálcio, então, se liga à calmodulina, uma proteína intracelular de ligação de cálcio. O complexo cálcio-calmodulina, por sua vez, ativa a proteína C-quinase, que media a expressão gênica da gonadotrofina. Inibidores da calmodulina podem inibir a estimulação de gonadotropina induzida pelo GnRH. O receptor de GnRH também parece estar ligado a uma proteína G,

que ativa a fosfolipase C. Esta é uma proteína chave na via fosfatidil-inositol. A hidrólise do fosfatidil-inositol gera diacilglicerol, que também ativa a Proteína C-quinase. (Conn et al, 1986, Waters et al, 1991).

### *1.1.3 - Desenvolvimento dos análogos do GnRH*

Como o GnRH natural tem uma vida média de apenas dois a cinco minutos, vários compostos análogos foram desenvolvidos, aumentando sua potência biológica em até 200 a 300 vezes, e com meias-vidas de até meses (Conn et al, 1991). Mais ainda, Conn et al, (1991) e Waters et al (1990) demonstraram que, durante sua administração a longo prazo, ao invés de estimular a função gonadal, obteve-se uma inibição da secreção das gonadotrofinas pituitárias, com conseqüente supressão da função ovariana e testicular.

Embora a utilidade terapêutica da característica estimulatória do GnRH seja limitada a certas síndromes hipogonadais, como a amenorréia hipotalâmica, os efeitos inibitórios dos análogos do GnRH são úteis em condições que requeiram a supressão dos hormônios gonadais, como: endometriose, puberdade precoce, miomatose uterina, carcinoma prostático, crescimento excessivo de pêlos em hirsutismo, síndrome pré-menstrual, e indução de ovulação para reprodução assistida (Clayton, 1988).

Tabela 1- Seqüência de aminoácidos dos análogos agonistas do GnRH

<b>SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DOS ANÁLOGOS DO GNRH</b>										
Compostos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>
Buserelin	1	2	3	4	5	D-Ser	7	8	9 ethylamine	
Goserelin	1	2	3	4	5	D-Ser	7	8	9	AzGly
Leuprorelin	1	2	3	4	5	D-Leu	7	8	9 ethylamine	
Triptorelin	1	2	3	4	5	D-Trp	7	8	9	Gly-NH <sub>2</sub>
Nafarelin	1	2	3	4	5	D-Nal	7	8	9	Gly-NH <sub>2</sub>

FONTE: Adaptada de Felberbaum et al, 2001.

#### *1.1.4 – Mecanismo de ação dos análogos do GnRH*

Após a seqüência de aminoácidos do GnRH ter sido isolada e analisada com sucesso, foi possível, através da modificação da estrutura molecular deste decapeptídeo e pela introdução de D-aminoácidos, principalmente na sexta posição, obter compostos análogos com efeitos agonísticos (Knobil, 1980). Estes compostos têm 100 a 200 vezes mais afinidade de ligação aos receptores de GnRH do que a molécula nativa. Os agonistas foram originalmente designados para aumentar sua afinidade aos receptores de GnRH das células gonadotróficas

e sua duração de ação, tornando-os mais resistentes contra a digestão enzimática. Após um curto período de estimulação da secreção de FSH e LH, é observado o chamado efeito “flare-up” (do inglês: chama ou explosão), uma redução de receptores de GnRH na membrana celular das células gonadotróficas (Lemay et al, 1984). Num período de aproximadamente doze horas, este efeito estimulatório leva a um aumento de cinco vezes no nível de FSH, de dez vezes no de LH, e de quatro vezes no de estradiol.

As ações do GnRH são mediadas por receptores de alta afinidade para o GnRH, encontrados nas membranas plasmáticas dos gonadotrofos pituitários. O passo inicial na ação do GnRH é sua ligação com os receptores. A ligação causa uma microagregação de receptores e uma formação de complexo. O complexo formado é então, internalizado e degradado, embora sua internalização não seja necessária para a liberação de gonadotrofinas. Os receptores de GnRH são pareados a proteínas G de ligação, que ativam a fosfolipase C, que, por sua vez, induz a produção de fosfatos de inositol e de diacilglicerol. Este processo leva à mobilização do íon Cálcio e ativação da proteína C-quinase, resultando na liberação de FSH e LH. A secreção normal de GnRH é pulsátil, e a estimulação fisiológica da secreção de gonadotrofinas requer liberação intermitente de GnRH. Uma administração única ou intermitente de agonistas de GnRH, que possuem uma maior afinidade pelos receptores, induz a uma liberação maior e mais sustentada de LH e FSH. Se esta administração for prolongada, irá ocorrer uma inibição do eixo hipofisário-gonadal através de um processo de “down-regulation”, ou seja, uma redução no número de receptores pituitários disponíveis para GnRH.

Como consequência, haverá uma dessensibilização dos gonadotrofos pituitários, e uma supressão dos níveis circulantes de FSH e LH e dos esteróides sexuais (Lunenfeld, 1999).

Este efeito irá ocorrer após um período de aproximadamente 07 a 21 dias de ação constante do agonista do GnRH, quando a glândula pituitária se torna completamente dessensibilizada e refratária ao estímulo pelo GnRH. Níveis baixos de LH e FSH resultam na paralisação do desenvolvimento folicular. Esta queda nas gonadotrofinas é seguida por uma queda dos esteróides sexuais, ao nível de castração. Estes fenômenos representam a base para o uso clínico dos agonistas do GnRH , em que existem indicações clínicas para uma castração iatrogênica, temporária e reversível (Loumaye, 1990; Smitz et al, 1992; Felberbaum et al, 1999; Stanger et al, 1985).

A potência dos agonistas do GnRH como estimuladores ou inibidores da secreção de gonadotrofinas hipofisárias permite a exploração de seu uso como um método de “gonadectomia médica reversível”, aplicável ao tratamento de doenças dependentes de esteróides gonadais. Isto serviu como base para desenvolvimento de quatro tipos de modalidades de tratamentos baseados em fisiopatologias diferentes (Lunenfeld, 1999):

1. Para suprimir os esteróides sexuais em doenças onde seu desenvolvimento ou progressão seja dependente destes esteróides. Por exemplo: câncer de próstata

metastático, câncer de mama ou de endométrio hormônio-dependente, miomatose uterina, endometriose.

2. Para inibir o aparecimento precoce da pulsatilidade de GnRH (puberdade precoce central) ou para atrasar a instalação normal da pulsatilidade puberal de GnRH, a fim de retardar o fechamento epifisário e permitir continuação do crescimento em crianças com crescimento lento.

3. Para controlar a dinâmica de secreção de gonadotrofinas na indução da ovulação ou estimulação ovariana, como tratamento adicional de anovulação, síndrome de ovários policísticos e protocolos de reprodução assistida.

4. Para explorar efeitos locais de agonistas de GnRH em tecidos que tenham receptores de GnRH. Por exemplo: miomatose uterina e alguns tipos de doenças malignas.

#### *1.1.5 – Agonistas do GnRH na hiperestimulação ovariana controlada*

O uso de agonistas de GnRH com o propósito de estimulação ovariana é um exemplo dos métodos contemporâneos para manuseio da indução da ovulação em reprodução assistida. Loumaye, em 1990, demonstrou que os picos prematuros de LH tem sido responsáveis por uma eficácia reduzida da estimulação ovariana por gonadotrofina menopáusica humana (HMG) e/ou hormônio folículo estimulante (FSH) puro ou recombinante, em programas de fertilização *in vitro*. Stanger et al, em 1985, mostraram que estes picos também afetam negativamente a qualidade oocitária e embrionária, e, conseqüentemente,

as taxas de gravidez. Estes estudos foram confirmados por outros autores: Pellicer et al, (1989); Pellicer et al, (1992); Pellicer et al, (1998); Ron El et al, (1992).

A introdução do tratamento com os agonistas do GnRH veio corrigir a maioria dessas dificuldades e fracassos. Smitz et al (1992), demonstraram que a média de ciclos estimulados que eram cancelados devido a má resposta foi diminuída para apenas 2%. Como a estimulação da ovulação passou a ser programável (Dimitri et al, 1989; Valle et al, 2003), o conforto e adequação ao tratamento, tanto para pacientes quanto para médicos, tornou-se maior. Felberbaum et al, (1999), relataram que a supressão da produção de hormônios endógenos pelos análogos de GnRH, seguida pela estimulação com gonadotrofinas, havia se tornado tratamento de primeira escolha na maioria dos centros.

Diferentes protocolos de tratamento podem ser utilizados, incluindo tratamentos de protocolo longo, que objetiva uma supressão pituitária completa, e os protocolos curtos e ultracurtos, onde o efeito inicial de “flare-up” que determina um aumento de gonadotrofinas pode intensificar a estimulação ovariana. Entre estes protocolos, o longo é geralmente o mais efetivo e o mais usado, pois apresenta melhor sincronismo folicular, maior taxa de aspiração oocitária, maior número de embriões disponíveis para transferência e, mais importante, maior taxa de gestação (Geber et al, 2002).

## **1.2 – Protocolos de estimulação ovariana controlada, com uso de agonistas do GnRH**

LONGO: - O uso do análogo pode ser iniciado tanto na fase folicular precoce quanto na fase lútea média (Geber et al, 2001), com objetivo de suprimir a função hipofisária. Uma vez confirmada a supressão, inicia-se a indução da foliculogênese com gonadotrofinas exógenas. A confirmação da supressão da função hipofisária é realizada com os seguintes parâmetros: níveis de E2 compatíveis com castração, ou seja, inferiores a 30 pg/ml, espessura endometrial menor que 5 mm, e ovários livres de cistos funcionais.

CURTO: O GnRH-a é administrado por 2 a 3 dias no começo da fase folicular, e seguido pela administração de gonadotrofinas exógenas. (Pellicer et al, 1989; Ron El et al, 1992).

“FLARE-UP” CONCORRENTE: regime onde o GnRH-a é administrado junto com as gonadotrofinas, no início da fase folicular. (Loumaye et al, 1989; Hughes et al, 1992)

AQUI ENTRA A FIGURA 1

Figura 1- Representação esquemática de três protocolos básicos de hiperestimulação ovariana.

### **1.3 – Vias de administração:**

Os análogos do GnRH podem ser administrados por diferentes vias, sem interferência com sua função. As vias para administração parenteral são: - subcutânea (Lockwood et al, 1995; Wren et al, 1991), subdérmica (Corson et al, 1992), intramuscular (Broekmans et al, 1996) e intranasal (Yuzpe et al, 1995). Segundo estudos de Conn, (1991) e Wren et al, (1991), não há diferença significativa quanto ao grau de bloqueio hipofisário obtido pelas diferentes vias de administração, desde que as doses e o tempo de utilização sejam adequados. Conn (1991) também relata que as vias que necessitam de injeções diárias são mais sujeitas a falhas na dosagem correta, podendo ser necessário um número maior de dias de aplicações para obtenção da supressão pituitária. Este prolongamento do tempo de aplicação pode resultar em maior incidência de efeitos colaterais nos sítios de aplicação, como hematomas, celulite e inflamação ou infecção locais. Por outro lado, o autor não vê necessidade em redução da concentração do medicamento após a obtenção do bloqueio, por se acreditar que haveria melhor resposta folicular com redução da dose do análogo antes do início da administração das gonadotrofinas. Isto reforça uma possível vantagem da administração de dose única da substância, conforme observado por Geber et al, (2002) e Pellicer et al, (1992).

#### **1.4 – Complicações e efeitos colaterais dos análogos do GnRH**

Embora incomum, a anafilaxia foi relatada após a injeção de GnRH de depósito, por Letterie, (1991) e Raj (1996). Erupções cutâneas também foram descritas, apesar de raras, segundo Brodgen, (1990). Um caso de angústia respiratória aguda foi descrito por Gamelin, em 1995, após administração de leuprolide. Por tudo isto, recomenda-se que a administração de análogos do GnRH na forma de depósito seja sempre feita por um profissional de saúde experiente, de preferência em ambiente hospitalar ou de clínica, onde medidas de emergência possam ser administradas, em caso de necessidade.

Com relação aos efeitos locais da injeção, foram descritos: formação de abscessos estéreis em 5% das aplicações; aparecimento de áreas de induração em 10% dos casos, (Neely et al, 1992), sendo mais comuns em crianças do que em adultos. Edema local, urticária e inflamação também foram observados por Manasco et al, em 1993.

Em nível sistêmico, foram descritos efeitos colaterais no sistema nervoso central, com alterações de memória e de cognição, devido ao hipoestrogenismo (Newton, 1996) e efeitos ovarianos, com possível comprometimento da foliculogênese pela inibição do fator de crescimento insulina símile (Fiore et al, 1997) e da progesterona (Parinaud et al, 1988). Estes dados, entretanto, não foram confirmados por outros autores (Ron El, em 1990).

## **1.5 – Avaliação do bloqueio da função hipofisária**

### *1.5.1 - Dosagem dos níveis hormonais:*

A confirmação da supressão da função hipofisária deve ser realizada idealmente através da dosagem dos níveis séricos dos hormônios ali sintetizados. Assim, a dosagem das gonadotrofinas, FSH e LH, encontrar-se-á em níveis reduzidos e compatíveis com o bloqueio da função hipofisária, quando dosadas em mulheres submetidas à administração de GnRH-a. Como a consequência direta da supressão da função hipofisária é a parada da função ovariana, um estado de hipogonadismo induzido e transitório irá acontecer. Desta forma, a medida dos níveis circulatórios dos hormônios ovarianos também servirá como um excelente método para confirmação da hipofisectomia clínica. Assim, a dosagem dos níveis de estradiol circulante tem sido considerada como o padrão ouro para confirmação do fenômeno de “down-regulation” após a administração de GnRH-a. A dosagem é realizada pelo método de radioimunoensaio, sendo considerado o valor de 30 pg/ml ou 100 pmol/mL como o ponto de corte, abaixo do qual considera-se obtido o efeito dos análogos. ( Brzyski et al, 1989; Alvarez et al, 1997; Balen et al, 2001)

### *1.5.2 - Avaliação da espessura endometrial por ultra-sonografia:*

A medida da espessura endometrial, através da ultra-sonografia transvaginal (USTV), tem se consagrado como um exame rotineiro na prática clínica, principalmente durante a monitorização da resposta ovariana, na estimulação ovariana controlada, de acordo com os mais diversos protocolos de indução da ovulação (Fanchin et al, 1999; Hughes et al, 2000). Uma correlação direta entre aumento dos níveis séricos de 17- $\beta$  estradiol e o aumento da espessura endometrial foi demonstrada em diversos estudos, e confirma a existência de receptores endometriais ao estrogênio (Hughes et al, 2000; Fanchin et al, 2000; Child et al, 2002).

Outros estudos avaliaram o efeito da ausência de função ovariana, seja ela espontânea ou induzida pelo uso dos análogos do GnRH, sobre o endométrio (Pellicer et al, 1992; Smitz et al, 1992; Bassil et al, 1997; Turnbull et al, 1995). Estes autores também demonstraram uma forte associação entre a medida da espessura endometrial realizada por via ultra-sonográfica pélvica e/ou endovaginal e o status hormonal.

Assim, como o endométrio responde diretamente à ação estrogênica em seus receptores, sua espessura irá corresponder diretamente ao nível hormonal circulante.

A medida da espessura endometrial representa uma possibilidade de avaliação isolada da supressão hipofisária, tendo como vantagem a sua praticidade e o fato de ser um método não invasivo. Sua associação com a dosagem sérica de estradiol aumenta a sensibilidade de ambos os exames.

BARASH et al (1998), estudaram o valor da medida da espessura endometrial como método diagnóstico para supressão da função hipofisária em 181 pacientes submetidas a tratamento de infertilidade pela técnica de fertilização in-vitro, em 265 ciclos. Os autores encontraram uma sensibilidade de 92,2%, quando usaram a medida da espessura endometrial menor ou igual a 6 mm, como parâmetro, e níveis séricos de estradiol inferiores ou iguais a 55 pg/ml, como padrão ouro.

CHILD et al (2002), demonstraram que a medida da espessura e do volume endometriais, através da ultra-sonografia tridimensional, são bons parâmetros para predição da condição de supressão pituitária. Eles utilizaram 144 mulheres, em 164 ciclos de FIV, administrando doses subcutâneas diárias de buserelin, a partir do início da fase folicular, em protocolo longo. Concluíram que a medida tridimensional do volume endometrial é uma nova ferramenta para avaliar o grau de supressão hipofisária, e que esta medida do volume ou da espessura endometrial através do ultra-som possa substituir medidas rotineiras de estradiol sérico como preditor do estado de supressão hipofisária. Com níveis de estradiol de 100 pmol/ml, comparados ao volume endometrial e à espessura endometrial, a sensibilidade para diagnóstico de bloqueio hipofisário foi de 91,9%; a especificidade foi de 34,1%; o Valor Preditivo Positivo foi de 80,7%, e o Valor

Preditivo Negativo foi de 58,3%. Nestas mesmas condições, o diagnóstico de falha de bloqueio hipofisário teve uma sensibilidade de 80,5%, uma especificidade de 45,5%, com um Valor Preditivo Positivo de 33,0% e um Valor Preditivo Negativo de 87,5%.

SABINO et al. (1999) avaliaram 268 pacientes submetidas a FIV e que utilizaram análogos do GnRH (protocolo longo) para supressão da função hipofisária antes da indução da superovulação. A medida da espessura endometrial foi realizada no mesmo dia em que o Estradiol sérico foi dosado, com o objetivo de avaliar seu valor como método diagnóstico isolado do bloqueio hipofisário realizado pelo uso do GnRHa. Os autores encontraram uma co-positividade de 92,9% entre a espessura endometrial mensurada ao ultra-som e a dosagem sérica de Estradiol, e concluíram que a medida da espessura endometrial apresenta elevada sensibilidade e segurança para ser utilizada como método diagnóstico isolado, ressaltando que, em caso de dúvida, deve-se proceder à dosagem dos níveis séricos de E<sub>2</sub>, para confirmação.

SHULMAN et al, em 1989, estudaram o endométrio, através da ultra-sonografia, como um preditor do estado estrogênico em trinta pacientes amenorréicas. Eles concluíram haver um coeficiente de correlação de 71% ( $p = 0,001$ ) entre os níveis de estradiol e a espessura endometrial. Pacientes com espessura endometrial de 4 mm ou menos não obtiveram sangramento com o teste da progesterona, enquanto que todas as pacientes com espessura maior que 5 mm responderam à administração de progesterona, com sangramento menstrual normal.

MORCOS et al, em 1991, também mediram a espessura endometrial na avaliação da amenorréia, por via ultra-sonográfica transvaginal. Em 70 pacientes, avaliadas com sangramento induzido pela progesterona e com medida da espessura endometrial, observaram que uma espessura endometrial de 1,5mm ou menos prediz ausência de sangramento após o teste da progesterona. Isto resultou numa sensibilidade de 94%, com um intervalo de confiança de 95% de 0,70 até 1,00, e numa especificidade de 93%, com um intervalo de confiança de 95% de 0,82 até 0,98. Os valores preditivos positivo e negativo foram 79% e 98%, respectivamente. Eles concluem que a espessura endometrial avaliada pela ultra-sonografia transvaginal pode prever os resultados do teste da progesterona em pacientes com amenorréia.

NAKAMURA et al, em 1996, estudaram a relação entre a espessura endometrial ultra-sonográfica e o sangramento induzido pela progesterona. Realizaram o teste da progesterona num grupo de 44 pacientes com amenorréia secundária, cuja espessura endometrial e nível de estradiol foram previamente determinados. As relações entre a resposta ao teste da progesterona, espessura endometrial, e nível de estradiol sérico foram estudados, assim como se a presença ou ausência de sangramento poderia ser predita pela espessura endometrial e pelos níveis de estradiol. O endométrio estava significativamente mais espesso em 32 mulheres que tiveram sangramento (10,3 +/- 4,1mm), do que em 12 que não sangraram (5,0 +/- 1,3mm). O nível de estradiol estava também significativamente mais alto no grupo positivo: 45,3 +/- 19,4 versus 18,6 +/- 8,0 pg/ml (  $p < 0,001$  ). A espessura endometrial de 6,0 mm ou mais predisse a ocorrência de sangramento,

com uma acurácia de 95,5%. Espessura endometrial foi superior ao nível de estradiol sérico em prever sangramento.

### *1.5.3 - Avaliação ovariana através da ultra-sonografia endovaginal*

A avaliação ultra-sonográfica dos ovários pode ser utilizada de forma complementar para confirmação do bloqueio hipofisário, através da não visualização de folículos em crescimento, ou de cistos ovarianos. Estes cistos ovarianos podem ser produtores de estrogênio, que, por sua vez, podem mascarar o efeito inibidor do GnRH-a. Sendo realizado no mesmo tempo da avaliação da espessura endometrial, a avaliação ovariana não representa nenhum desconforto extra para a paciente, mas sim, acrescenta uma maior sensibilidade ao exame.

WEISSMAN et al, em 1998, estudaram 22 pacientes submetidas à técnica de reprodução assistida, tratadas inicialmente com GnRH-a, mas sem sucesso na obtenção do bloqueio hipofisário. Estas pacientes apresentaram níveis altos de estradiol, em concordância com maior espessura endometrial, na presença de cistos ovarianos. Estes cistos foram puncionados por via ultra-sonográfica transvaginal, e os níveis de estradiol, assim como a medida da espessura endometrial, foram repetidos após 48 horas. Houve significativa redução na espessura endometrial, concomitante com um grande declínio nos níveis de estradiol sérico.

SAMPAIO et al, em 1991, estudaram a formação de cistos ovarianos durante a estimulação com supressão hipofisária, em 359 pacientes incluídas no programa de fertilização in-vitro. As pacientes foram classificadas de acordo com o tipo de protocolo de dessensibilização hipofisária utilizado, com buserelin administrado por via subcutânea, sendo protocolo longo e protocolo curto. A taxa de aparecimento de cistos ovarianos foliculares simples no primeiro grupo foi de 9,82%, e no segundo grupo foi de 22,97% ( $p$  menor que 0,005). As formações císticas ovarianas foram usualmente assintomáticas e não funcionais, e a presença de cistos não pareceu interferir com a resposta ovariana ao tratamento de estimulação. As taxas de recuperação oocitária e de gravidez foram similares entre as pacientes com formação de cistos e as sem cistos. Os autores concluem que a formação de cistos ovarianos durante o tratamento com GnRH-a são provavelmente consequência do aumento inicial da concentração de gonadotrofinas, e que a presença de cistos ovarianos nestas condições não deve ser considerada como razão para cancelamento de ciclos de fertilização in-vitro.

JENKINS et al, em 1992, revisaram 780 ciclos de fertilização in-vitro, onde se utilizou protocolo longo com buserelin, e gonadotrofina menopáusica humana para estimulação ovariana, a partir do quarto dia de menstruação. Foram identificados cistos em 53 ciclos, com diâmetros de 30 a 50 mm. Destes 53 ciclos, o estradiol sérico do quarto dia estava significativamente mais alto em 22 ciclos cancelados por má resposta folicular, do que em 31 ciclos que chegaram à aspiração folicular ( $p < 0,05$ ). Dos 31 ciclos com aspiração folicular, nove tiveram um nível de estradiol no quarto dia superior a 200 pmol/l (percentil 95 para estradiol de

pacientes sem cistos aparentes), e estes ciclos produziram significativamente menos embriões de grau 1 do que nos ciclos com níveis de estradiol menores ou iguais a 200 pmol/l nas mesmas condições ( $p < 0,05$ ). Seis dos 53 ciclos com cistos resultaram em concepção, e todos eles tinham níveis de estradiol menores que 200 pmol/l. Entre os 53 ciclos com cistos ovarianos, a progesterona sérica no dia de cancelamento em quatro deles, e no dia de administração do HCG em um deles, estava acima da média estabelecida para 104 ciclos sem cistos. Não foi observada diferença significativa nos níveis de androstenediona sérica no quarto dia, e os níveis de progesterona foram inferiores a 5nmol/l em todas as pacientes, com exceção de uma. Os autores concluem que a atividade funcional de cistos ovarianos é associada com influência adversa em ciclos de fertilização in-vitro.

#### *1.5.4 – Utilização da dopplerfluxometria colorida na avaliação da função ovariana*

O Efeito Doppler foi descrito pelo físico austríaco Johann Christian Doppler, em 1842. O princípio do Doppler afirma que, quando a energia é refletida de um objeto em movimento, a frequência da energia refletida varia em relação à velocidade do objeto em movimento. Clinicamente, este princípio é usado para determinar a velocidade do fluxo sanguíneo nos vasos.

O fluxo da artéria uterina se origina da artéria hipogástrica. A artéria uterina principal se divide num ramo ascendente, que cursa ao longo do corpo uterino lateralmente e, após penetrar a serosa uterina, forma uma circulação arqueada,

com ramos radiais cursando até o endométrio, de forma espiralada. As artérias espirais são os ramos arteriais terminais com o endométrio. Um ramo descendente da artéria uterina supre o terço superior da vagina.

A habilidade em determinar a velocidade é dependente tanto da frequência do fluxo, como do ângulo de insonação. Se os vasos têm mais de 3 mm de calibre, eles podem ser visualizados na imagem de escalas de cinza, e o ângulo de insonação pode ser determinado, com a medida do diâmetro do vaso. Isto permite ao examinador quantificar o fluxo, em centímetros cúbicos por segundo.

Desta forma, a onda de velocidade de fluxo mostra a sístole, representação da máxima atividade cardíaca, e a diástole, que assinala a resistência vascular periférica – quanto maior a diástole, menor resistência vascular periférica e melhor fluxo sanguíneo do órgão estudado.

Como o sistema Doppler não mede a quantidade de sangue que circula por um vaso, e sim a onda de velocidade de fluxo, empregam-se, basicamente, dois índices para quantificar o fluxo:

$$1- \text{Índice de Resistência (IR)} = S - D / D$$

$$2- \text{Índice de Pulsatilidade (IP)} = S - D / \text{Média (S/D)}$$

Legenda: S – sístole

D - diástole.

Quanto mais elevados são os índices, menor é o fluxo sanguíneo. Inversamente, quanto mais baixos são os índices, maior é o fluxo sanguíneo.

A partir da conhecida relação que existe entre níveis séricos de  $E_2$  e a resistência vascular arterial, confirmada por diversos estudos (Bassil e cols, 1997; Vrtacnik-Bokal et al, 1997; Vrtacnik-Bokal et al, 1998; Stener-Victorin et al, 1996; Turnbull et al, 1995), passou-se a avaliar o comportamento vascular através de exames Dopplerfluxométricos, com determinação do índice de pulsatilidade (IP). Apesar de tanto o IP quanto o IR refletirem a resistência da parede vascular jusante ao vaso estudado, o IP tem sido mais utilizado por refletir de forma mais acurada as variações da resistência periférica, principalmente quando a variação Doppler, no final da diástole cai abaixo do filtro de frequência (Griffin et al, 1983). Nas situações em que a velocidade mínima for igual a zero, o IR será sempre igual à unidade. Utilizando-se o IP, esta situação não irá ocorrer, uma vez que são utilizadas 3 variáveis para seu cálculo, tornando-o mais acurado para o estudo comparativo.

A vasodilatação arterial, induzida diretamente pelo aumento na concentração de estradiol, permite a avaliação desta correlação através da comparação do grau de dilatação com o nível sérico hormonal. O mecanismo desta relação se deve provavelmente à ação direta do estrogênio sobre os vasos arteriais ou, indiretamente, através da modulação da produção e liberação de substâncias vasoativas (deZiegler et al, 1991; Favre et al, 1993; Tinkanen et al, 1995).

BASSIL et al, em 1997, estudaram a relação entre a vascularização ovariana e a duração da estimulação para Fertilização in-vitro, em 196 ciclos. As variações no fluxo sanguíneo ovariano após a “down-regulation” com GnRH-a e a estimulação com HMG foram determinadas. As informações obtidas mostraram que o fluxo sanguíneo ovariano foi significativamente melhorado pela secreção de estradiol ( $p = 0,05$ ) e pela administração de HCG ( $p = 0,003$ ). A foliculogênese foi afetada pelo suprimento sanguíneo. O valor do Índice de Resistência (IR) foi significativamente diferente ( $p = 0,05$ ), de acordo com a duração da estimulação ovariana. Pacientes com um IR médio  $> 0,56$  tiveram uma estimulação mais longa, com um número médio de oócitos coletados significativamente menor ( $p = 0,01$ ), apesar da administração da dose padrão de HMG. Os autores concluíram que o valor do IR é um bom indicador de modificações na vascularização ovariana durante a estimulação, e que a medida Dopplerfluxométrica pode ser usada para determinar o momento ideal para início da administração de gonadotrofinas exógenas em pacientes submetidas a estimulação ovariana, após “down-regulation” por análogos do GnRH.

ZAIDI et al, em 1996, estudaram o fluxo sanguíneo intraovariano através da ultrasonografia transvaginal, com Dopplerfluxometria, prospectivamente, em seis mulheres, durante o período periovulatório. Todas as pacientes tinham ciclos menstruais ovulatórios regulares, com níveis de progesterona sérica do meio da fase lútea consistentes com ovulação espontânea no ciclo anterior. Cada paciente foi submetida a exames seriados de USTV e Doppler colorido pulsátil do fluxo sanguíneo, no estroma ovariano e na parede do folículo dominante ou do corpo

lúteo. Quando o diâmetro folicular médio foi  $> 16$  mm ou o dia -2 da provável ovulação foi alcançado, as pacientes foram rastreadas em intervalos de seis horas, às 6:00, 12:00, 18:00 e 24:00 horas, até a rotura folicular, para investigar a presença de ritmos circadianos. O Índice de Pulsatilidade (IP) e a velocidade do pico sistólico máximo ( $V_{max}$ ) foram calculados como índices Doppler de impedância a fluxo sanguíneo e velocidade, respectivamente. Uma amostra de sangue venoso foi colhida a cada visita, para análise hormonal subsequente. Não houve flutuação circadiana significativa na  $V_{max}$  folicular média e nem no IP folicular médio, antes ou depois do pico de LH. Da mesma forma, a  $V_{max}$  média e o IP médio no estroma ovariano não dominante não mostraram nenhuma flutuação significativa nos mesmos períodos. O IP médio no estroma ovariano dominante mostrou flutuações diárias, com os maiores valores ocorrendo mais comumente às 6:00 hs, e os mais baixos à tarde e à noite. Esta flutuação foi o reverso da variação circadiana previamente demonstrada nas artérias uterinas. De qualquer forma, em contraste com a artéria uterina, comparação entre os valores de IP médios no estroma do ovário dominante às 6:00 e às 18:00 hs somente apresentou significância após o pico de LH. A  $V_{max}$  do estroma do ovário dominante tendeu a aumentar durante o dia, embora as diferenças entre 6:00 e 18:00 hs também não foram significantes.

Mercede et al, em 2001, avaliaram o fluxo sanguíneo intraovariano arterial e venoso, em estudo prospectivo, em 76 ciclos estimulados com FSH, de 39 pacientes inférteis, incluídas num programa de coito programado ou de inseminação intra-uterina. Medidas Dopplerfluxométricas pulsáteis e coloridas, por via transvaginal,

do Índice de Resistência na fase folicular e na lútea, Índice de Pulsatilidade, pico da velocidade sistólica e velocidade venosa máxima foram obtidos, assim como os níveis de progesterona sérica durante o meio da fase lútea. Parâmetros velocimétricos foram estabelecidos e usados para classificar a função ovariana, como tendo um ciclo ovulatório normal, ou um ciclo onde houve insuficiência da fase lútea, ou folículo luteinizado não roto. Em 52 ciclos ovulatórios normais, as velocidades do pico sistólico da fase lútea e da venosa máxima foram significativamente maiores, e os índices de resistência e de pulsatilidade foram significativamente mais baixos do que os encontrados na fase folicular. Em 15 mulheres com insuficiência da fase lútea, não houve diferenças nos parâmetros velocimétricos arteriais, quando comparados com ciclos ovulatórios normais. Entretanto, as velocidades venosas máximas da fase lútea foram mais baixas nos ciclos de insuficiência lútea, e houve uma correlação significativa entre a velocidade venosa máxima da fase lútea e os níveis de progesterona sérica. Nove ciclos de folículo luteinizado não roto não mostraram mudanças significativas durante o ciclo ovariano e não se identificou “conversão lútea” do sinal Doppler. Os autores concluem que ciclos estimulados com FSH em pacientes inférteis podem apresentar uma alta percentagem de respostas funcionais anormais, que só podem ser diagnosticadas por via ultra-sonográfica, Doppler e follow-up hormonal adequado. O fluxo sanguíneo intraovariano venoso e arterial permanece inalterado em ciclos de folículo luteinizado não roto. Os níveis de progesterona sérica se correlacionaram com a velocidade venosa máxima da fase lútea, o que torna o Doppler um teste não invasivo potencialmente útil para acessar a ovulação e a fase lútea.

## **2 - OBJETIVO**

Avaliar a aplicação do estudo Dopplerfluxométrico das artérias uterinas como um método diagnóstico do bloqueio da função hipofisária, após a administração de análogos do GnRH, em ciclos de reprodução assistida.

### **3 - METODOLOGIA:**

#### **3.1 - Pacientes e métodos**

Um total de 70 pacientes que estavam sendo submetidas a tratamento de infertilidade conjugal por fator masculino grave, pela técnica de reprodução assistida (Fertilização *in vitro* ou Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides) foi incluído neste estudo prospectivo. Todas as pacientes foram submetidas a ultra-sonografia endovaginal para avaliação da espessura endometrial e da morfologia ovariana, assim como tiveram sua dosagem de estradiol sérico realizada de forma rotineira, para confirmação da supressão da função hipofisária, após a administração do análogo do GnRH. As análises dopplerfluxométricas foram realizadas no mesmo momento da avaliação ultra-sonográfica pelo mesmo examinador, não necessitando assim de uma visita extra ou causando um desconforto a mais para cada paciente. Todas as pacientes incluídas neste estudo concordaram com a realização da Dopplerfluxometria das artérias uterinas antes

da avaliação endometrial, e que seus dados fossem utilizados para pesquisa, tendo assinado termo de consentimento.

O estudo foi aprovado pelo Colegiado de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia e pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFMG.

Critérios de exclusão:

- 1- Pacientes que não aceitaram participar do estudo e/ou que não assinaram o Termo de Consentimento.
- 2- Pacientes com alterações vasculares, hipertensão arterial sistêmica ou diabetes mellitus.
- 3- Pacientes com diagnóstico de infertilidade sem causa aparente ou causa hormonal ou ovariana, e na presença de ciclos menstruais irregulares.
- 4- Pacientes com diagnóstico de endometriose grave, ou com malformações ou anormalidades uterinas, congênitas ou adquiridas.
- 5- Pacientes com distúrbios de coagulação sanguínea, em uso de anticoagulantes ou heparina.
- 6- Pacientes em uso de imunossupressores.
- 7- Pacientes portadoras de cardiopatias, como: Síndrome de Eisenmenger, Tetralogia de Fallot, coarctação de aorta, insuficiência mitral, estenose e insuficiência da válvula aórtica, comunicação interventricular e comunicação interatrial.

### 3.2 - Variáveis analisadas:

Foram analisadas as seguintes variáveis: Dopplerfluxometria das artérias uterinas com medida do índice de pulsatilidade (IP), mensuração da espessura endometrial, morfologia ovariana e níveis de estradiol sérico.

Todas as avaliações foram feitas pelo mesmo examinador, na mesma fase do tratamento, isto é, dez dias após a administração do análogo do GnRH, e na mesma hora do dia (entre 9 e 11 horas da manhã). Desta forma, foram evitadas as variações intra-observador, variações da fase do ciclo de tratamento e os efeitos do ciclo circadiano, que pudessem interferir como viés no resultado do estudo (Steer et al, 1995; Battaglia et al, 1994). Ainda para se evitar qualquer influência sobre o examinador, a análise Dopplerfluxométrica foi realizada rotineiramente, antes da avaliação ovariana e da medida da espessura endometrial. Todos os exames foram também realizados no mesmo equipamento, utilizado tanto para a dopplerfluxometria quanto para a avaliação ultra-sonográfica (Toshiba SSA-340A - Japão), evitando-se também, qualquer possível interferência do equipamento.

Com relação à dosagem dos níveis de estradiol, a fim de se evitar variações entre os Kits e possível viés ao estudo, todos os exames foram realizados pelo mesmo laboratório e na mesma série.

Todas as pacientes foram submetidas à Fertilização *in vitro*, seja pela técnica clássica ou pela injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), utilizando

seus próprios oócitos. (Sampaio & Geber, 2001). Em todos os casos, as pacientes iniciaram o tratamento com a dessensibilização hipofisária, utilizando-se para isto, a administração subcutânea de 3,6 mg de Acetato de Goserelina (Zoladex – AstraZeneca - Brasil), no segundo dia do ciclo menstrual.

### **3.3 - Dosagem de Estradiol**

Para a dosagem do estradiol sérico, foram colhidas amostras de sangue venoso na manhã do dia em que se realizou a avaliação Dopplerfluxométrica e ultrassonográfica (10 dias após a administração do GnRH-a). Todas as amostras foram processadas pelo mesmo laboratório e na mesma série, utilizando-se a técnica de Imunofluorimetria, com o aparelho “AUTODELFIA”, modelo 1297 – Finlândia. Esta medida foi considerada como padrão ouro, e o ponto de corte utilizado para confirmação da dessensibilização hipofisária foi de 30 pg/ml ( Alvarez et al, 1997; Balen et al, 2001), sendo que valores iguais ou abaixo deste eram considerados como bloqueio hipofisário.

### **3.4 - Estudo Dopplerfluxométrico**

Todas as pacientes, no momento de se realizar o traçado Doppler, estavam em repouso, em posição ginecológica em semi fowler, e com a bexiga vazia, para se evitar que alterações vagais e fenômenos compressivos pudessem modificar os índices estudados (Battaglia et al, 1994). Os exames foram realizados utilizando-se uma sonda vaginal de 6,5 MHz.

As artérias uterinas foram identificadas através de um corte transversal ao nível do orifício interno do colo. A este nível, as artérias uterinas aparecem lateralmente na parede uterina, onde se encontram numa posição ligeiramente anterior em comparação a uma linha imaginária que corta o útero em duas metades, anterior e posterior. A adição do modo Doppler colorido à sonda vaginal permite obter uma imagem do fluxo sanguíneo colorido arbitrariamente em azul ou vermelho, em função da aproximação ou distanciamento deste fluxo em relação à sonda. O Doppler colorido nos permite um posicionamento mais preciso e judicioso da amostra sanguínea, onde foram realizadas as medidas do sinal Doppler. Este posicionamento se obtém através da visibilização de um ramo principal da artéria uterina, para se fixar uma imagem de maior trajeto deste vaso.

Uma vez encontrado este ramo, próximo de sua reflexão no colo uterino, foi realizada sua insonação, com a obtenção de um traçado Doppler adequado, avaliado pela análise gráfica com um perfil de onda bem definido em todos os

seus pontos, que permitisse um bom estudo do seu padrão velocimétrico (Fig 2). Para cada exame, foram realizadas três medidas e então, calculada uma média (Battaglia et al, 1994). A documentação fotográfica dos traçados obtidos foi realizada pela impressora de vídeo Toshiba TP-8700 - Japão.

Utilizamos o Índice de Pulsatilidade (IP) como índice dopplerfluxométrico, uma vez que este se presta bem à avaliação da impedância vascular em vasos de alta resistência, como é o caso das artérias uterinas, além de poder ser usado quando o final da diástole é ausente ou reverso. Foram avaliadas as artérias uterinas direita e esquerda, com determinação do IP, calculado eletronicamente pela máquina, definido pela fórmula:

$$IP = \frac{\text{pico sistólico (S)} - \text{pico diastólico (D)}}{\text{média}}$$

Não houve diferença estatística entre a avaliação Dopplerfluxométrica das artérias direita e esquerda, mas, mesmo assim, a interpretação de cada artéria foi realizada separadamente (Fig. 3, Fig. 4)

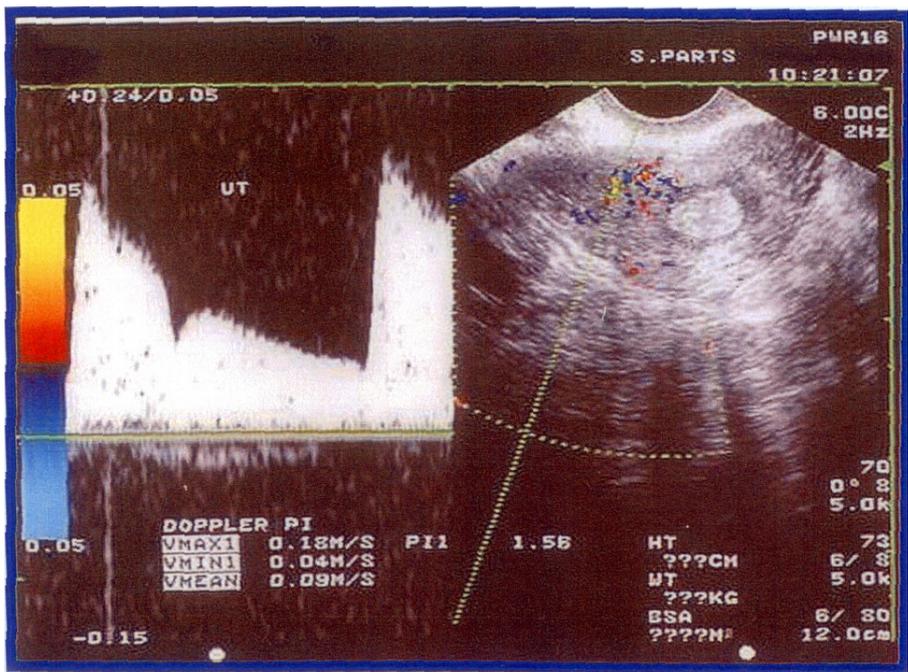


Figura 2- Foto de dopplerfluxometria de artéria uterina e endométrio

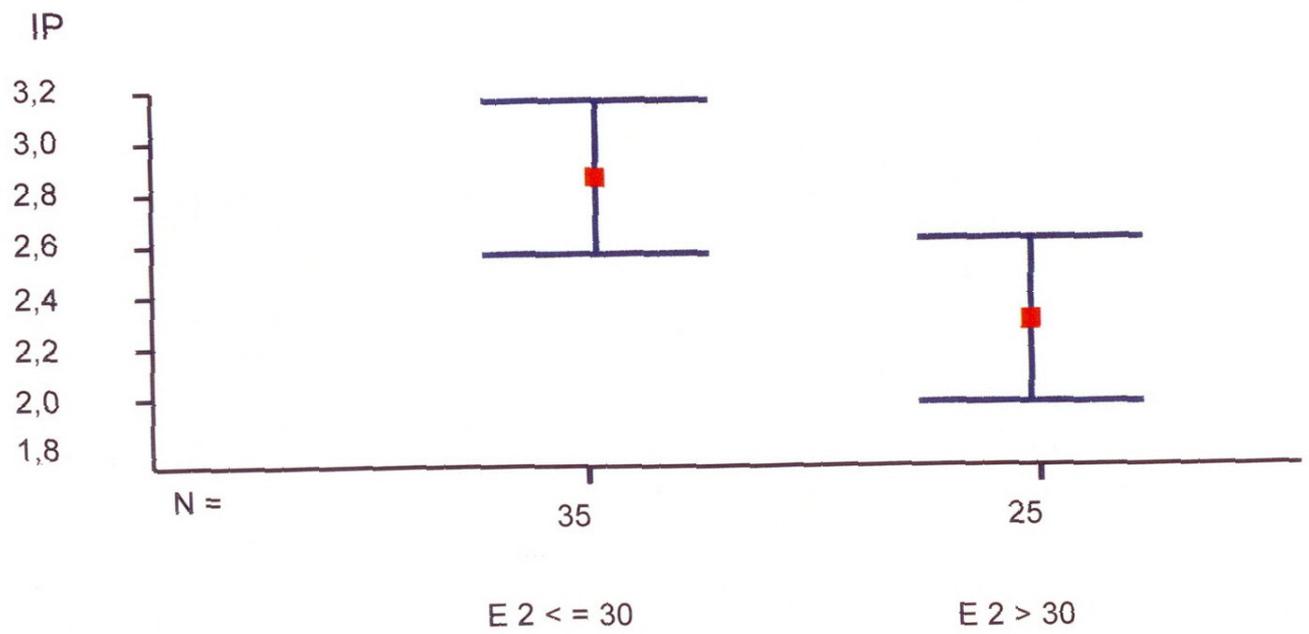


Figura 3 - Intervalos de confiança 90% para a média do IP da Artéria uterina direita, segundo E2.

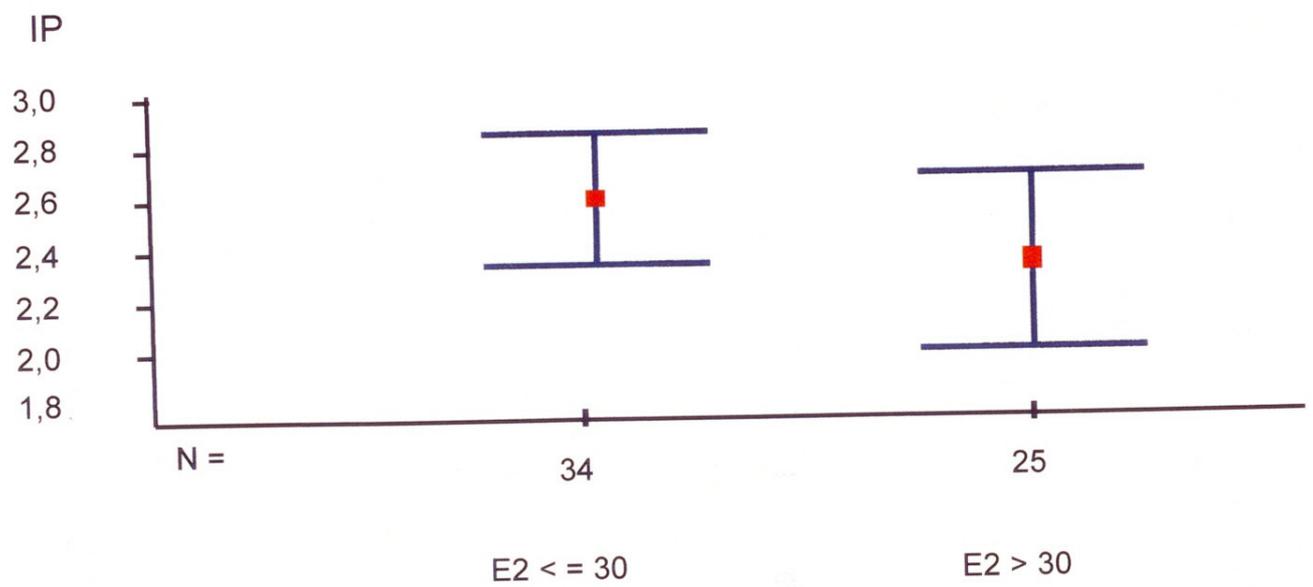


Figura 4- - Intervalos de confiança 90% para a média do IP da Artéria uterina esquerda, segundo E2.

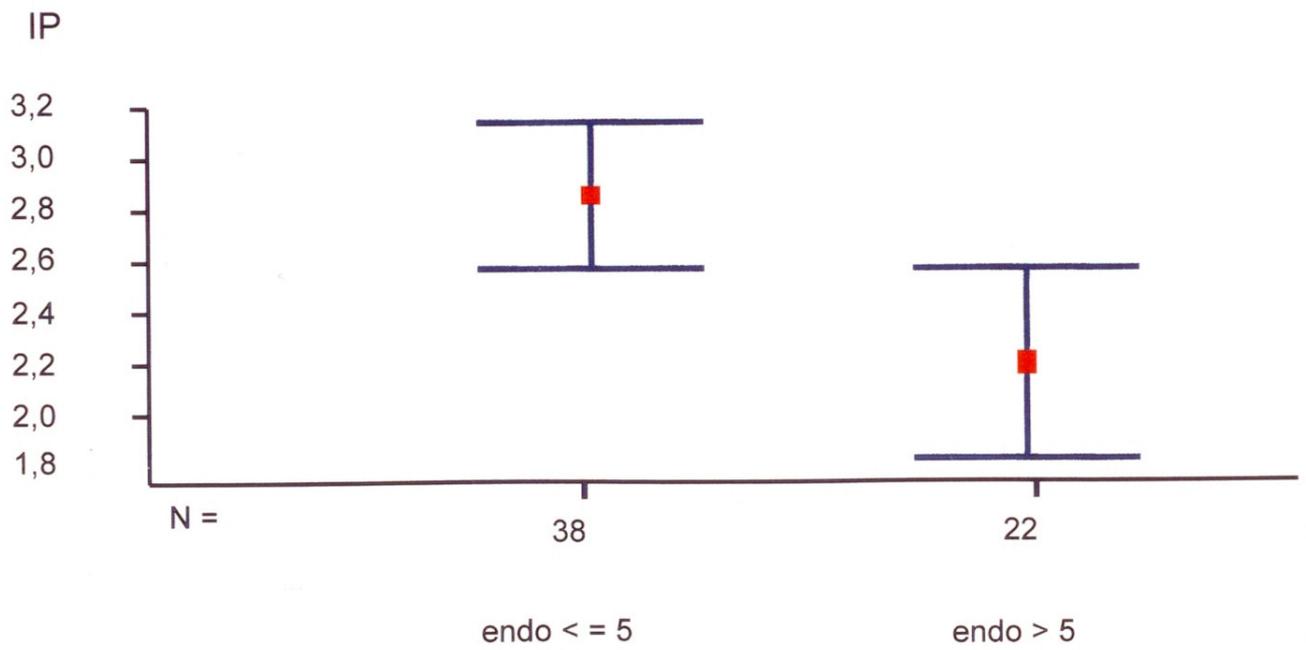


Figura 5 - Intervalos de confiança 90% para a média do IP da Artéria uterina direita, segundo ENDO.

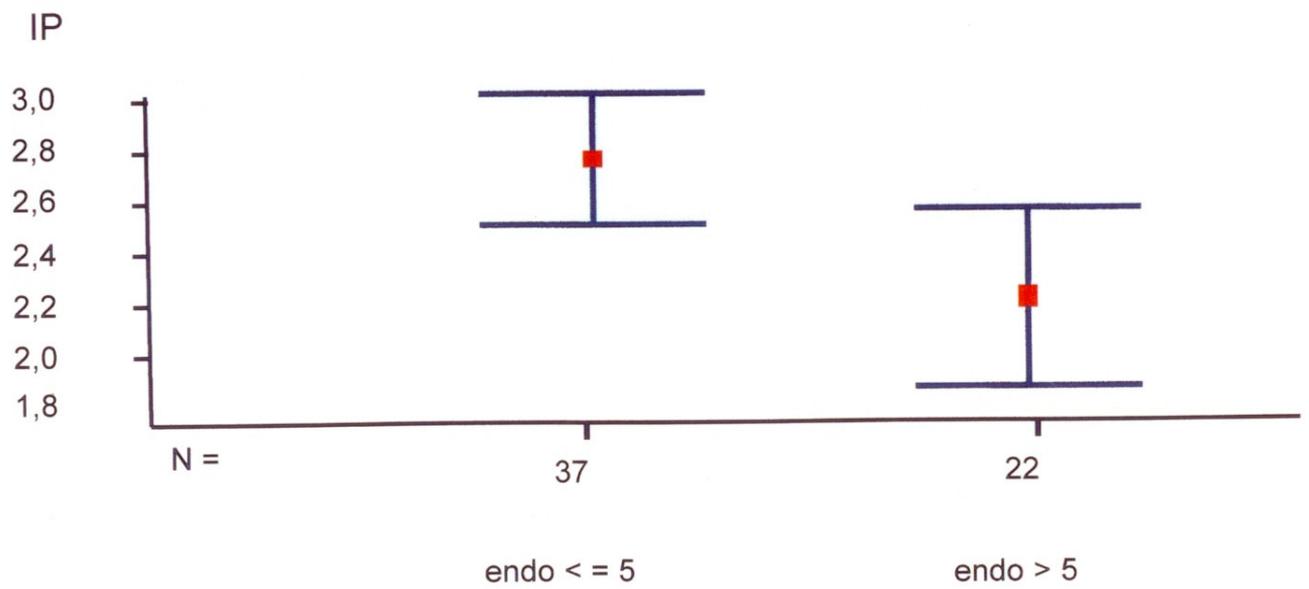


Figura 6 - Intervalos de confiança 90% para a média do IP da Artéria uterina esquerda, segundo ENDO.

### **3.5 - Avaliação ultra-sonográfica**

A avaliação da cavidade endometrial e da morfologia ovariana foi realizada imediatamente após a realização do estudo dopplerfluxométrico das artérias uterinas, através da ultra-sonografia endovaginal, utilizando-se o mesmo equipamento, e sem que a paciente mudasse de posição.

A medida da espessura endometrial foi obtida através da mensuração da distância entre a lâmina endometrial anterior e a posterior, realizada num corte longitudinal perpendicular à linha endometrial no fundo uterino (Fig.5 e Fig.6 e Fig.7). Valores inferiores ou iguais a 5 mm foram considerados como indicativos de supressão estrogênica, secundária à hipofisectomia clínica causada pelo GnRH-a.

Os ovários foram avaliados, com o objetivo de afastar a presença de cistos funcionais, que pudessem ser produtores de estrogênio, e assim, mascarar a função dos análogos do GnRH.

Aqui entra a figura 7



Figura 7 – foto do endométrio fino

### **3.6 - Análise estatística**

A análise estatística foi realizada usando-se o teste t de Student não emparelhado. Para o cálculo utilizando as medianas, foi utilizado o teste não paramétrico de Wald-Wolfowitz (Run test). Para o cálculo da Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN) destes diversos métodos, utilizou-se tabelas 2x2. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

### **3.7 – Método Bibliográfico**

Para a redação desta dissertação e da bibliografia descrita, foram seguidas as orientações presentes no “Manual para Elaboração e Apresentação de Dissertações e Teses no Curso de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia”, da Escola de Medicina da UFMG. Os estudos e autores citados foram obtidos através de pesquisa de artigos médicos e científicos na MEDLINE, e de livros texto citados na bibliografia.

## 4 - RESULTADOS

As 70 pacientes analisadas no estudo foram comparadas com relação aos níveis séricos de  $E_2$  e à espessura endometrial. Para o estudo Dopplerfluxométrico, três pacientes que apresentaram  $IP > 4,50$  não foram consideradas, porque, apesar de terem ocorrido em pequena proporção, mostraram índices muito distantes da média geral, que poderia prejudicar a confiabilidade da análise (“outliers”). A tabela 1 apresenta as pacientes agrupadas de acordo com os níveis de  $E_2$  e espessura endometrial.

Das 36 pacientes com níveis de  $E_2 \leq 30$  pg/ml, 28 apresentaram espessura endometrial  $\leq 5$  mm. Entre as 34 pacientes com  $E_2 > 30$  pg/ml, 21 apresentaram uma espessura endometrial  $> 5$  mm. Essa correlação demonstra uma sensibilidade de 77,8 % e uma especificidade de 61,7%, com valor preditivo positivo de 68,2% e valor preditivo negativo de 72,5 % para a medida da espessura de endométrio (TABELA 2).

A tabela 3 mostra os valores médios, mínimos e máximos, mediana e média aparada do IP das artérias uterinas, classificados de acordo com os níveis de estradiol. Utilizando níveis de estradiol como padrão ouro e valores de 30 pg/ml como ponto de corte, podemos observar um aumento dos índices de pulsatilidade associados com a queda do E<sub>2</sub>.

A Tabela 4 mostra os valores médios, mínimos e máximos, mediana e média aparada do IP das artérias uterinas, classificados de acordo com a medida da espessura endometrial. Observamos, também, haver uma relação indireta entre o IP e a espessura endometrial: quanto maior o aumento no IP, menor a espessura endometrial.

Tabela 2. Distribuição das pacientes de acordo com os níveis séricos de estradiol e espessura endometrial.

Estradiol	Endométrio		Total
	≤ 5 mm	> 5 mm	
≤ 30 pg/ml	28	8	36
> 30 pg/ml	13	21	34
Total	41	29	70

Sensibilidade: 77,8%

Especificidade: 61,7%

VPP: 68,2%

VPN: 72,5%

Tabela 3. Correlação entre o índice de pulsatilidade das artérias uterinas e os níveis de Estradiol sérico.

IP	E <sub>2</sub> ≤ 30 pg/ml	E <sub>2</sub> > 30 pg/ml	P
Média±DP	2,81±0,87	2,22±0,80	0,005 §
Mediana	3,10	2,10	0,014 *
Mínimo	1,00	1,31	
Máximo	3,14	4,05	
Media aparada	2,84	2,16	

§ teste t de student

\* teste Wald-Wolfowitz

Tabela 4. Correlação entre o índice de pulsatilidade das artérias uterinas e a espessura endometrial.

IP	Endo ≤ 5 mm	Endo > 5 mm	P
Média±DP	2,79±0,86	2,17±0,79	0,004 §
Mediana	3,08	2,10	0,003 *
Mínimo	1,30	1,00	
Máximo	4,14	3,59	
Media aparada	2,79	2,15	

§ teste t de student

\* teste Wald-Wolfowitz

Quando comparamos as médias do IP entre as pacientes com  $E_2 \leq 30$  pg/ml e as pacientes com  $E_2 > 30$  pg/ml encontramos uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,005$ ). O mesmo ocorreu quando comparamos as medianas dos IP entre estes dois grupos de pacientes ( $p=0,014$ ).

Com relação à espessura endometrial, quando comparamos as médias do IP entre as pacientes com espessura endometrial  $\leq 5$  mm e as pacientes com espessura endometrial  $> 5$  mm, encontramos uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,004$ ). O mesmo ocorreu quando comparamos as medianas dos IP entre estes dois grupos de pacientes ( $p=0,003$ ).

Definindo um ponto de corte da medida do IP em 2,51, isto é, valores de IP  $> 2,51$  como positivo e valores de IP  $< 2,51$  como negativo, encontramos uma sensibilidade de 72,2% e uma especificidade de 71,0% para este método, utilizando-se como padrão os níveis séricos de  $E_2$ .

Ao combinarmos os dois métodos, Dopplerfluxometria das artérias uterinas e espessura endometrial, em série, encontramos uma sensibilidade de 58,8% e uma especificidade de 83,15%. Quando realizamos os mesmos cálculos, contudo, combinando estes dois testes em paralelo, a sensibilidade encontrada é de 94,1% e a especificidade de 41,9 %.

## 5 – DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta uma nova proposta para avaliação do estado estrogênico em ciclos de reprodução assistida com uso de GnRH-a para bloqueio da função hipofisária, que seria evidenciado pelo aumento da resistência ao fluxo sanguíneo, avaliado pela Dopplerfluxometria das artérias uterinas, utilizando-se o índice de pulsatilidade.

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar este aumento da resistência vascular arterial em estados hipoestrogênicos. O primeiro vem do achado de receptores para estrogênio nos vasos arteriais, sugerindo uma ação direta deste hormônio sobre o tônus vascular (de Ziegler et al, 1991; Battaglia et al, 1995; Bourne et al, 1990; Gangar et al, 1991). Além disso, o estradiol teria uma ação moduladora sobre a produção de substâncias vasoativas, como prostaglandinas e fatores endoteliais, e atuaria em receptores muscarínicos e adrenérgicos (Levin et al, 1995; Stjernquist et al, 1995).

Alguns estudos sugerem que o tromboxano pode estar envolvido na variação do tônus arterial, e que o GnRH-a induziria a uma modificação no balanço entre prostaciclina/tromboxano, semelhante ao encontrado em estados pós-menopáusicos (Stjernquist et al, 1995; Harper et al, 1989).

Nossos resultados sugerem que um aumento dos valores do IP das artérias uterinas acompanha a diminuição dos níveis de estradiol e da espessura endometrial após o uso de GnRH-a. Este método talvez possa também ser utilizado para avaliar pacientes amenorréicas ou na pós-menopausa, a fim de se avaliar níveis de estrogênio ou resposta ao teste de progesterona (Nakamura et al, 1996).

No presente estudo, a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da medida da espessura endometrial como preditor do estado estrogênico se mostraram abaixo do relatado em publicações anteriores, talvez devido ao pequeno tamanho desta amostra.

De fato, um estudo realizado por Sabino et al (1999), em que foram avaliadas retrospectivamente 268 ciclos de FIV que fizeram uso de GnRH-a, a sensibilidade da medida da espessura endometrial em relação aos níveis de estradiol foi de 93%.

Este estudo demonstra, pela primeira vez, que a associação entre os dois métodos, medida da espessura endometrial e Dopplerfluxometria das artérias

uterinas, pode ser utilizada com vantagens no diagnóstico do bloqueio hipofisário após o uso do GnRH-a em ciclos de reprodução assistida. A utilização de um método de elevada sensibilidade, como é a ultra-sonografia para medida da espessura endometrial (93%), seguido do estudo Dopplerfluxométrico das artérias uterinas, demonstrou uma elevação significativa na especificidade (61,7% e 83,15%, respectivamente). Mais ainda, por ser um exame que pode ser realizado no mesmo tempo da ultra-sonografia, e sem caráter invasivo, facilitando ainda mais a monitorização da supressão da função hipofisária, poderia assim substituir a dosagem rotineira do estradiol sérico.

Um ponto importante a ser considerado, seria o fato de se fazer necessário existir na unidade de reprodução assistida, tanto um equipamento ultrassonográfico com recursos para avaliação Dopplerfluxométrica, quanto um profissional devidamente habilitado e capacitado para a realização e interpretação do exame. O custo deste equipamento pode ser um fator limitante para o uso constante e rotineiro desta metodologia para diagnóstico do bloqueio hipofisário após aplicação de GnRH-a. A disponibilidade deste profissional também pode ser outro fator limitante, uma vez que sua presença no serviço seria essencial e constante, para a realização do exame ultrassonográfico e da Dopplerfluxometria. Ou seja, este tipo de procedimento para determinação do bloqueio hipofisário pode ser mais caro do que a dosagem do estradiol sérico. Porém, uma vez disponível, pode significar um recurso a mais para este fim, ou mesmo um recurso substitutivo da dosagem de estradiol.

Outro ponto se baseia na facilidade em obtenção imediata do resultado, logo após a realização do exame ultra-sonográfico, evitando-se a necessidade de punções venosas para coleta de amostras de sangue das pacientes para realização das dosagens hormonais, assim como da espera de várias horas até a obtenção do resultado laboratorial.

Também devemos considerar as dificuldades técnicas na determinação dos níveis de 17- $\beta$  estradiol sérico. A dosagem é feita através de técnica de imunofluorimetria, com necessidade de equipamentos caros, modernos e, principalmente, bem calibrados diariamente, com possibilidade de realização de curvas de diluição, por técnicos capacitados e envolvidos com o procedimento. De outra forma, os valores obtidos podem não corresponder com a realidade, já que estamos lidando com níveis muito baixos deste hormônio. Níveis acima de 30 pg/ml nos farão acreditar que o bloqueio ainda não foi completo, ou que está insuficiente, fazendo com que o início da administração de gonadotrofinas seja adiado por mais alguns dias, até que se realize nova dosagem. Este procedimento é fator gerador de ansiedade, tanto para o casal, como para a equipe médica, devido ao questionamento inicial sobre a qualidade e a eficácia do análogo de GnRH utilizado para o bloqueio hipofisário. Outro problema se refere ao adiamento de datas anteriormente planejadas de forma aproximada, sobre o dia da aspiração folicular e coleta do sêmen, com conseqüente adiamento do dia da transferência embrionária. Muitas vezes são casais provenientes de outras cidades, ou profissionais que necessitam se ausentar constantemente da cidade, ou mesmo, profissionais que tem compromissos já assumidos com o trabalho, surgindo

dificuldades em reescalonarem suas agendas e compromissos. A dosagem hormonal, por si só, é um procedimento normalmente realizado por laboratório de análises clínicas, geralmente com serviços terceirizados para o serviço de reprodução assistida. Devido à necessidade de resultados no mesmo dia da coleta e ao custo dos Kits, nem sempre é possível se ter um controle adequado da qualidade deste serviço.

## **5-CONCLUSÃO**

Podemos concluir que o estudo Dopplerfluxométrico das artérias uterinas pode ser um instrumento importante no diagnóstico do estado hipoestrogênico em ciclos de reprodução assistida após o uso de GnRH-a.

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ C, CREMADES N, BLASCO N, BERNABEU R. Influence of gonadotrophin-releasing hormone agonist total dose in the ovarian stimulation in the long down-regulation protocol for in-vitro fertilization. **Hum Reprod**, v.12, n. 11, p. 2366-9, 1997.

BALEN A. GnRH agonists and superovulation for assisted conception. In: DEVROEY P. *GnRH Analogues*. Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America, Philadelphia. W B Saunders Company, v 12, p. 89-104, Jan., 2001.

BARASH A, WEISSMAN A, MANOR M, MILMAN D, BEN ARIE A, SHORAM Z. Prospective evaluation of endometrial thickness as a predictor of pituitary down regulation after gonadotropin-releasing hormone analogue administration in an *in vitro* fertilization program. **Hum Reprod**, v. 69, p. 496-99, 1998.

BARROSO G, OEHNINGER S, MONZO A, KOLM P, GIBBONS WE, MUASHER SJ. High FSH:LH ratio and low LH levels in basal cycle day 3: impact on follicular development and IVF outcome. **J Assist Reprod Genet**, v.18, n. 9, p. 499-505, 2001.

BASSIL S, WYNS C, TOUSSAINT-DEMYLLE D, NISOLLE M, GORDTS S, DONNEZ J. The relationship between ovarian vascularity and the duration of stimulation in in-vitro fertilization. **Hum Reprod**, v. 12, n. 6, p. 1240-5, 1997.

BASSIL S, WYNS C, DONNEZ J. A randomized prospective cross-over study of highly purified follicle-stimulating hormone and human menopausal gonadotrophin for ovarian hyperstimulation in women aged 37-41 years. **J Assist Reprod Genet**, v. 17, n. 2, p. 197-212, 2000.

BATTAGLIA C, ARTINI PG, D`AMBROGIO G, et al. Uterine and ovarian blood flow measurement. Does the full bladder modify the flow resistance? **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v.73, p. 716-8, 1994.

BATTAGLIA C, SALVATORI M, MAXIA N, PETRAGLIA F, FACCHINETTI F, VOLPE A. Adjuvant L-arginine treatment for in-vitro fertilization in poor responder patients. **Hum Reprod**, v.14, n. 7, p. 1690-7, 1999.

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**, v. 15, n. 1, p. 43-9, 2000.

BLOECHLE M, SCHREINER T, KUCHLER I, SCHURENKAMPER P, LISSE K. Colour Doppler assessment of ascendent uterine artery perfusion in an in-vitro fertilization-embryo transfer programme after pituitary desensitization and ovarian stimulation with human recombinant follicle stimulating hormone. **Hum Reprod**, v. 12, p. 1772-7, 1997.

BRADDEN TD, CONN PM. Altered rate of synthesis of Gonadotropin-releasing Hormone receptors: effects of homologous hormone appear independent of extracellular calcium. **Endocrinology**, v. 126, p. 2577, 1990.

BRODGEN RN. Buserelin: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical profile. **Drugs**, v. 39, p. 399-437, 1990.

BROEKMANS FJ, HOMPES PG, LAMBALK CB, et al. Short-term pituitary desensitization: Effects of different doses of the gonadotrophin-releasing hormone agonist triptorelin. **Hum Reprod**, v. 11, p. 55-60, 1996.

BRZYSKI RG, JONES GS, OEHNINGER S, ACOSTA AA, KRUITHOFF CH, MUASHER SJ. Impact of leuprolide acetate on the response to follicular stimulation for in vitro fertilization in patients with normal basal gonadotropin levels. **J In Vitro Fert Embryo Transf**, v. 6, n. 5, p. 290-3, 1989.

CALHAZ-JORGE C, LEAL F, CORDIERO I, PROENÇA H, BARATA M, PEREIRA-COELHO AM. Pituitary down-regulation in IVF cycles: is it necessary to use strict criteria? **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 12, p. 615-9, 1995.

CHEUNG AP, LU JK, CHANG RJ. Pulsatile gonadotrophin secretion in women with polycystic ovary syndrome after gonadotrophin-releasing hormone agonist treatment. **Hum Reprod**, v. 12, n. 6, p. 1156-64, 1997.

CLAYTON RN. Gonadotrophin Releasing Hormone: from Physiology to Pharmacology. **Clin Endocrinol Oxf**, v. 26, p. 361, 1987.

CLAYTON RN. Mechanism of GnRH Action in Gonadotrophs. **Hum Reprod**, v. 3, p. 479, 1988.

CONN PM, ROGERS DC, SEAY SG, et al. Regulation of Gonadotropin Release, GnRH Receptors, and Gonadotrope Responsiveness: a Role of GnRH Receptor Microaggregation. **J Cel Biochem**, v. 27, p. 13, 1985.

CONN PM, STALEY D, HARRIS C, et al. Mechanism of action of gonadotropin releasing hormone. **Annu Ver Physiol**, v. 48, p. 495, 1986.

CONN PM, HUCKLE WR, ANDREWS WV, et al. The molecular mechanism of action of Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) in the Pituitary. **Recent Prog Horm Res**, v. 43, p. 29, 1987.

CONN PM, CROWLEY WF JR. Gonadotropin-Releasing Hormone and its Analogues. **N Engl J Med**, v. 324, p. 93, 1991.

CORSON SL, BATZER FR, GOCIAL B, et al. Leuprolide acetate-prepared in vitro fertilization-gamete intrafallopian transfer cycles: Efficacy versus controls and costs analysis. **Fertil Steril**, v. 57, p. 601-5, 1992.

DAMARIO MA, BARMAT L, LIU HC, DAVIS OK, ROSENWAKS Z. Dual suppression with oral contraceptives and gonadotrophin releasing-hormone agonists improves in-vitro fertilization outcome in high responder patients. **Hum Reprod**, v.12, n. 11, p. 2359-65, 1997.

DEATON JL, BAUGUESS P, HUFFMAN CS, MILLER KA. Pituitary response to early follicular-phase minidose gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) therapy: evidence for a second flare. **J Assist Reprod Genet**, v. 13, n. 5, p 390-4, 1996.

DEVROEY P, PADOS G. Preparation of endometrium for egg donation. **Hum Reprod Update**, v. 4, n. 6, p. 856-61, 1998.

DE ZIEGLER D, BESSIS R, CAETANO J, FRYDMAN R. Value in gynecology of transvaginal pulsed and color Doppler. Study of ovarian vascularization. **Contracept Fertil Sex**, v.21, n.1, p. 63-70, 1993.

DE ZIEGLER D, BESSIS R, FRYDMAN R. Vascular resistance of uterine arteries: physiological effects of estradiol and progesterone. **Fertil Steril**, v. 55, p. 775-9, 1991.

ELGENDY M, AFNAN M, HOLDER R, LASHEN H, AFIFI Y, LENTON W, SHARIF K. Reducing the dose of gonadotrophin-releasing hormone agonist on starting ovarian stimulation: effect on ovarian response and in-vitro fertilization outcome. **Hum Reprod**, v.13, n.9, p. 2382-5, 1998.

EMONS G, FREVERT EU, ORTMANN O, et al. Studies on the subcellular mechanisms mediating the negative estradiol effect on GnRH-induced LH-release by rat pituitary cells in culture. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v. 121, p. 350, 1989.

FANCHIN R, RIGHINI C, OLIVENNES F, TALEB J, DE ZIEGLER D, FRYDMAN R.. Computerized assessment of endometrial echogenicity: clues to the endometrial effects of premature progesterone elevation. **Fertil Steril**, v. 71, n. 1, p. 174-81, 1999.

FANCHIN R, RIGHINI C, AYOUBI JM, OLIVENNES F, DE ZIEGLER D, FRYDMAN R. New look at endometrial echogenicity: objective computer-assisted measurements predict endometrial receptivity in in vitro fertilization-embryo transfer. **Fertil Steril**, v. 74, n. 2, p. 274-81, 2000.

FAVRE R, BETTAHAR K, GRANGE G, et al. Predictive value of transvaginal uterine Doppler assessment in an *in vitro* fertilization program. **Ultrasound Obstet. Gynecol.**, v. 3, p. 350-3, 1993.

FELBERBAUM RE, LUDWIG M, DIEDRICH K. Agonists and Antagonists. In: DEVROEY P. *GnRH ANALOGUES*. Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America, Philadelphia. W B Saunders Company, v. 12, p. 45-56, jan 2001..

FELBERBAUM RE, DIEDRICH K. Ovarian stimulation for in vitro fertilization / intracytoplasmic sperm injection with gonadotrophins and gonadotrophin-releasing hormone analogues: Agonists and Antagonists. **Hum Reprod**, v. 14 (suppl 1), p. 207-221, 1999.

FIORE CE, DIELI M, CASCHETTO S, et al. Relative deficiency in circulating levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) during long-term treatment with a GnRH agonist. **Horm Metab Res**, v. 29, p. 472-474, 1997.

FRYDMAN R, HOWLES CM, TRUONG F. A double-blind, randomized study to compare recombinant human follicle stimulating hormone (FSH; Gonal-F) with highly purified urinary FSH (Metrodin HP) in women undergoing assisted reproductive techniques including intracytoplasmic sperm injection. The French Multicentre Trialists. **Hum Reprod**, v.15, n. 3, p. 520-5, 2000.

GAETJE R. Influence of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and a GnRH-agonist on granulosa cell steroidogenesis. **Clin Exp Obstet Gynecol**, v. 21, p.164-169, 1994.

GAMELIN L, JEANSON S, CHENUE F, et al. Acute respiratory distress syndrome after injection of leuprolide (letter). **Therapie**, v. 50, p.587-588, 1995.

GANGAR KF, VYAS S, WHITEHEAD MI, et al. Pulsatility index in the internal carotid artery is influenced by transdermal oestradiol and time since menopause. **Lancet**, v. 338, p. 839-42, 1991.

GEBER S, SALES L, SAMPAIO MA. Comparison between a single dose of goserelin (depot) and multiple daily doses of leuprolide acetate for pituitary suppression in IVF treatment: a clinical endocrinological study of the ovarian response. **J Assist Reprod Genet**, v. 19, n. 7, p. 313-8, 2002.

GOLAN A, HERMAN A, SOFFER Y, BUKOVSKY I, RON-EL R. Ultrasonic control without hormone determination for ovulation induction in in-vitro fertilization/embryo transfer with gonadotrophin-releasing hormone analogue and human menopausal gonadotrophin. **Hum Reprod**, v. 9, n. 9, p. 1631-3, 1994.

GOSWAMY RK, STEPTOE PC. Doppler ultrasound studies of the uterine artery in spontaneous ovarian cycles. **Hum Reprod**, v. 3, p. 721-6, 1988.

GRIMBIZIS G, TSALIKIS T, TZIOUFA V, KASAPIS M, MANTALENAKIS S. Regression of endometrial hyperplasia after treatment with the gonadotrophin-releasing hormone analogue triptorelin: a prospective study. **Hum Reprod**, v. 14, n. 2, p. 479-84, 1999.

GRIMBIZIS G, TARLATZIS BC. Dose-finding agonists and antagonists. In: DEVROEY P. *GnRH Analogues*. Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America. n 1, Philadelphia. W B Saunders Company, v 12, p 57-74, jan. 2001.

GROCHOWSKI D, KULIKOWSKI M, WOLCZYNSKI S, KUCZYNSKI W, SZAMATOWICZ M. The outcome of an in vitro fertilization program in women with polycystic ovary syndrome. **Gynaecol Endocrinol**, v. 11, n. 4, p. 259-62, 1997.

HARPER MJK. Platelet activating factor: a paracrine factor in preimplantation stages of reproduction? **Biol. Reprod.**, v.40, p. 907-13, 1989.

HAZOUT A, DE ZIEGLER D, CORNEL C, FERNANDEZ H, LELAIDIER C, FRYDMAN R. Comparison of short 7-day and prolonged treatment with gonadotropin-releasing hormone agonist desensitization for controlled ovarian hyperstimulation. **Fertil Steril**, v. 59, n. 3, p. 596-600, 1993

HEINRICHS WL, MONROE SE. Safety issues related to the use of GnRH agonists in gynecology. In: POLAN ML, HENZL MR. *GnRH Analogues : Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America*, Philadelphia. W B Saunders Company, v 4, p 189-200, Jan. 1993.

HENZL MR, POLAN ML. How GnRH agonists were discovered. In: POLAN ML, HENZL MR. *GnRH Analogues : Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America*, Philadelphia: W B Saunders Company, v 4, p 1-8, Jan., 1993.

HUGHES EG, FEDORKOW DM, DAYA S, SAGLE MA, VAN DE COPPEL P, COLLINS JA. The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to *in vitro* fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Fertil. Steril.**, v. 58, p. 888, 1992.

HUGHES E, COLLINS J, VANDERKERCHKOVE P. Gonadotrophin-releasing hormone analogue as an adjunct to gonadotropin therapy for clomiphene-resistant polycystic ovarian syndrome: **Cochrane Database Syst Rev**, (2): CD000097, 2000.

JANSSENS RM, VERMEIDEN JP, LAMBALK CB, et al. Gonadotrophin-releasing hormone agonist dose-dependency of pituitary desensitization during controlled ovarian hyperstimulation in IVF. **Hum Reprod**, 13:2386-2391, 1998.

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**, v. 15, n. 11, p. 2333-40, 2000.

JENNES L, STUMPF WE, CONN PM. Receptor-mediated Binding and Uptake of GnRH Agonist and Antagonist by Pituitary Cells. **Peptides**, v. 5 (suppl 1), p. 215, 1984.

JINNAH HA, CONN PM. Gonadotropin-releasing hormone-mediated desensitization of cultured rat anterior pituitary cells can be uncoupled from luteinizing hormone release. **Endocrinology**, v.118, p. 2599, 1986.

KNOBIL E, HOTCHKISS J. The Menstrual Cycle and its Neuroendocrine Control. In Knobil E, Neil JD (eds): *The Physiology of Reproduction II*. New York, Raven Press, p 1971, 1988..

KNOBIL E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. **Recent Prog Horm Res**, v. 36, p. 53-88, 1980.

LAM PM, CHEUNG LP, CHOY CM, LAU YP, HAINES C. Effects of the intensity of downregulation on outcome of in vitro fertilization and embryo transfer. **Gynecol Endocrinol**, v. 16, n. 2, p. 143-50, 2002.

LAML T, OBRUCA A, FISCHL F, HUBER JC. Recombinant luteinizing hormone in ovarian hyperstimulation after stimulation failure in normogonadotropic women. **Gynecol Endocrinol**, v. 13, n. 2, p. 98-103, 1999.

LASS A, PEAT D, AVERY S, BRINSDEN P. Histological evaluation of endometrium on the day of oocyte retrieval after gonadotrophin-releasing hormone agonist-follicle stimulating hormone ovulation induction for in-vitro fertilization. **Hum Reprod**, v. 13, n.11, p. 3203-5, 1998.

LAVY G, DECHERNEY A. Indications for In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. In: MARRS RP. *Assisted Reproductive Technologies*. Boston, Blackwell Scientific Publications, p 49-67, 1993.

LEMAY A, MAHEUX R, FAURE N, et al. Reversible hypogonadism induced by a luteinizing hormone-releasing (LHRH) agonist (Buserelin) as a new therapeutic approach for endometriosis. **Fertil Steril**, v. 41, p. 863-871, 1984.

LETTERIE GS, STEVENSON D, SHAH A. Recurrent anaphylaxis to a depot form of GnRH analogue. **Obstet Gynecol**, v. 78, p.943-946, 1991.

LEVIN JH, STANCZYK FZ, LOBO RA. Estradiol stimulates the secretion of prostacyclin and tromboxane from endometrial stromal cells in culture. **Fertil. Steril.**, v. 58, p.530-6, 1992.

LEWINTHAL D, TAYLOR PJ, PATTINSON HA, et al. Induction of ovulation with leuprolide acetate and human menopausal gonadotropin. **Fertil Steril**, v. 49, p. 585-588, 1988.

LOCKWOOD GM, PINKERTON SM, BARLOW DH. A prospective randomized single blind comparative trial of nafarelin acetate with buserelin in long protocol gonadotrophin-releasing hormone analogue controlled in vitro fertilization cycles. **Hum Reprod**, v. 10, p. 293-298, 1995.

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**, v. 5, p. 357-376, 1990.

LOUMAYE E, DE COOMAN S, ANOMA M, et al. Short term utilization of a gonadotropin-releasing hormone agonist (Buserelin) for induction of ovulation in an in vitro fertilization program. **Ann NY Acad Sci**, v. 541, p. 96-102, 1988.

LUNENFELD B. *Preface*. In Lunenfeld B (ed): GnRH Analogues. The state of the Art at the Millenium. Carnforth, UK, Parthenon Publishing, p. 1-6, 1999.

MACDOUGALL MJ, TAN SL, BALEN A, JACOBS HS. A controlled study comparing patients with and without polycystic ovaries undergoing in-vitro fertilization. **Hum Reprod**, v. 8, p. 233-7, 1993.

MANASCO PK, PESCOVITZ OH, BLIZZARD RM. Local reactions to depot leuprolide therapy for central precocious puberty. **J Pediatr**, v.123, p. 334-335, 1993.

MACDOUGALL MJ, TAN SL, JACOBS HS. In-vitro fertilization and the ovarian hyperstimulation syndrome. **Hum Reprod**, v. 7, p. 597-600, 1992.

MEDEN-VRTOVEC H. GnRH analog administration in patients with polycystic ovarian disease. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 50, n. 2, p. 179-83, 1995.

MEDVEI VC. A History of Endocrinology. **Lancaster, MTP Press LTD, 1982.**

MERCE LT, BAU S, BAJO JM. Doppler study of arterial and venous intraovarian blood flow in stimulated cycles. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v18, p 505-10, 2001.

MORCOS RN, LEONARD MD, SMITH M, BOURGUET C, MAKAIL M, KHAWLI O. Vaginosonographic measurement of endometrial thickness in the evaluation of amenorrhea. **Fertil Steril**, v 55, p 543-6, 1991.

MUASHER SJ, OEHNINGER S, SIMONETTI S. The value of basal and/or stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. **Fertil Steril**, v. 50, p.298-307, 1988.

NAKAMURA S, DOUCHI T, OKI T, IJUIN H, YAMAMOTO S, NAGATA Y. Relationship between sonographic endometrial thickness and progestin induced withdrawal bleeding. **Obstet. Gynecol.**, v. 87, p.722-5, 1996.

NEELY EK, HINTZ RL, PARKER B. Two-year results of treatment with depot leuprolide acetate for central precocious puberty. **J Pediatr**, v. 121, p 634-40, 1992.

NEUSPILLER F, LEVY M, REMOHI J, RUIZ A, SIMON C, PELLICER A. The use of long- and short-acting forms of gonadotrophin-releasing hormone analogues in women undergoing oocyte donation. **Hum Reprod**, v.13, p. 1148-51, 1998.

NEWTON C, SLOTA D, YUSPE AA, et al. Memory complaints associated with the use of gonadotropin-releasing hormone agonists: A preliminary study. **Fertil Steril**, v. 65, p. 1253-1255, 1996.

OEHNINGER S, BRZYSKI RG, MUASHER SJ, ACOSTA AA, JONES GS. In-vitro fertilization and embryo transfer in patients with endometriosis: impact of a gonadotrophin releasing hormone agonist. **Hum Reprod**, v. 4, n. 5, p. 541-4, 1989.

OLIVENNES F, RIGHINI C, FANCHIN R, TORRISI C, HAZOUT A, GLISSANT M, FERNANDEZ H, FRYDMAN R. Ovarian stimulation using a protocol of low dose agonist in patients with an elevated basal FSH. **Contracept Fertil Sex**, v. 24, n.12, p. 912-6, 1996.

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 (LH-RH) antagonist (cetorelix) or a depot formula of an LH-RH agonist (triptorelin). **Fertil Steril**, v. 73, n. 2, p. 314-20, 2000.

OLIVENNES F, RIGHINI C, FANCHIN R, et al. A protocol using a long dose of gonadotropin-releasing hormone agonist might be the best protocol for patients

with high follicle stimulating hormone concentrations on day 3. **Hum Reprod**, v. 11, p. 1169-1172, 1996.

PANTOS K, MEIMETH-DAMIANAKI T, VAXEVANOGLU T, et al. Prospective study of a modified gonadotropin-releasing hormone agonist long protocol in an in vitro fertilization program. **Fertil Steril**, v. 61, p. 709-713, 1994.

PARINAUD J, BEAUR BA, BOURREAU E, et al. Effect of a luteinizing releasing hormone agonist (Buserelin) on steroidogenesis of cultured human preovulatory granulosa cells. **Fertil Steril**, v. 50, p. 597-602, 1988.

PAVLOU SN. The mechanism of action of GnRH agonists. In: POLAN ML, HENZL MR. *GnRH Analogues*.: Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America., Philadelphia: W B Saunders Company, v 4, p 9-20, jan., 1993.

PELLICER A, SIMÓN C, MIRÓ F, et al. Ovarian response and in vitro fertilization outcome in patients treated with gonadotropin-releasing hormone analogues in different phases of the menstrual cycle. **Hum Reprod**, v. 4, p. 285-289, 1989.

PELLICER A, TARIN JJ, MIRO F, SAMPAIO M, DE LOS SANTOS MJ, REMOHI J. The use of gonadotrophin-releasing hormone analogues (GnRH<sub>a</sub>), in in-vitro fertilization: some clinical and experimental investigations of a direct effect on the human ovary. **Hum Reprod**, v. 7, Suppl 1, p. 39-47, 1992.

PELLICER A, GAITÁN P, NEUSPILLER F, et al. Ovarian follicular dynamics: from basic science to clinical practice. **J Reprod Immunol**, v. 39, p. 29-41, 1998.

PELLICER A, LANDAZÁBAL A, NAVARRO J, RUIZ A. Short and ultra-short protocols of GnRH agonist administration in assisted reproductive technologies. In:

DEVROEY P. *GnRH Analogues*. Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America., Philadelphia. W B Saunders Company, v 12, p 75-88, jan., 2001.

RAJ SG, KARADSHEH AJ, GUILLOT RJ, et al. Case report: Systemic hypersensitivity reaction to goserelin acetate. **Am J Med Sci**, v. 312, p. 187-190, 1996.

REMOHI J, GUTIERREZ A, VIDAL A, TARIN JJ, PELLICER A. The use of gonadotrophin-releasing hormone analogues in women receiving oocyte donation does not affect implantation rates. **Hum Reprod**, v. 9, n. 9, p. 1761-4, 1994.

REVEL A, CASPER RF. The use of LHRH agonists to induce ovulation. In: DEVROEY P. *GnRH Analogues*. Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America., Philadelphia. W B Saunders Company, v 12, p 105-118, jan., 2001.

RIZK B, SMITZ J. Ovarian hyperstimulation syndrome after superovulation using GnRH agonists for IVF and related procedures. **Hum Reprod**, v. 7, n. 3, p. 320-7, 1992.

RIZK B, TAN SL, KINGSLAND C, et al. Ovarian cyst aspiration and the outcome of in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v.54, p. 661-664, 1990.

RON-EL R, GOLAN A, HERMAN A, et al. Midluteal gonadotropin releasing hormone analog administration in early pregnancy. **Fertil Steril**, v. 53, p. 572-574, 1990.

RON-EL R, HERMAN A, GOLAN A, et al. Gonadotropins and combined GnRH-a – gonadotropin protocols in a randomized prospective study. **Fertil Steril**, v. 55, p. 574-578, 1991.

SAMPAIO M, SERRA V, MIRO F, CALATAYUD C, CASTELLVI RM, PELLICER A. Development of ovarian cysts during gonadotropin-releasing hormone agonists (GnRHa) administration. **Hum. Reprod.**, v. 6, p. 194-7, 1991.

SCHMIDT-SAROSI C. GnRH agonists in In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. In: POLAN ML, HENZL MR. *GnRH Analogues* : Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America., Philadelphia. W B Saunders Company, v. 4, p. 83-98, jan, 1993.

SCHACHTER M, FRIEDLER S, RAZIEL A, RON-EL R. Complications and side effects of GnRH analogues. In: DEVROEY P. *GnRH Analogues*. Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America., Philadelphia. W B Saunders Company, v. 12, p. 215-232, jan., 2001.

SCHALLY AV, ARIMURA A, KASTIN AJ, et al. Gonadotropin-releasing hormone: One polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. **Science**, v. 173, p. 1036-38, 1971.

SCHEELE F, HOMPES PG, VAN DER MEER M, SCHOUTE E, SCHOEMAKER J. The effects of a gonadotrophin-releasing hormone agonist on treatment with low dose follicle stimulating hormone in polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod**, v. 8, p. 699-704, 1993.

SCHOOLCRAFT W, SCHLENKER T, GEE M, et al. Improved controlled ovarian hyperstimulation in poor responder in vitro fertilization patients with a microdose follicle stimulating hormone flare, growth hormone protocol. **Fertil Steril**, v. 67, p. 93-97, 1997.

SCOTT R, NAVOT D. Enhancement of ovarian responsiveness with microdoses of gonadotropin-releasing hormone agonist during ovulation induction for in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 61, p. 880-885, 1994.

SHULMAN A, SHULMAN N, WEISSEGLASS L, BAHARY C. Ultrasonic assessment of the endometrium as a predictor of oestrogen status in amenorrhoeic patients. **Hum. Reprod.**, v. 4, p. 616-9, 1989.

SMITZ J, RON-EL R, TARLATZIS BC. The use of gonadotrophin releasing hormone agonists for in vitro fertilization and other assisted procreation techniques: experience from three centres. **Hum Reprod**, v. 7, Suppl 1, p. 49-66, 1992.

STANGER JD, YOVICH JL. Reduced in vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. **Br J Obstet Gynecol**, v. 92, p. 385-393, 1985.

STEER CV, WILLIAMS J, et al. Intra-observer, interobserver, interultrasound transducer and intercycle variation in collar Doppler assessment of uterine artery impedance. **Hum. Reprod.**, v. 10, p. 479-81, 1995.

STEER CV, CAMPBELL S, PAMPIGLIONE JS. Transvaginal collar flow imaging of the uterine arteries during the ovarian and menstrual cycles. **Hum Reprod**, v. 61, p. 391-5, 1990.

STEER CV, CAMPBELL S, TAN SL. The use of transvaginal collar flow imaging after in vitro fertilization to identify optimum uterine conditions before embryo transfer. **Fertil Steril**, v. 57, p. 372-6, 1992.

STEER CV, TAN SL, DILLON D, MASON BA, CAMPBELL S. Vaginal collar Doppler assessment of uterine artery impedance correlates with immunohistochemical markers of endometrial receptivity required for the implantation of an embryo. **Fertil Steril**, v. 63, p. 101-8, 1995.

STEER CV, TAN SL, MASON BA, CAMPBELL S. Midluteal-phase vaginal color Doppler assessment of uterine artery impedance in a subfertile population. **Fertil Steril**, v. 61, p. 53-8, 1994.

STERZIK K, GRAB D, SASSE V, HUTTER W, ROSENBUSCH B, TERINDE R. Doppler sonographic findings and their correlation with implantation in an in vitro fertilization program. **Fertil Steril**, v. 52, p. 825-8, 1989.

STJERNQUIST M, BODELSSON G, POULSEN H. Vasoactive peptides and uterine vessels. **Gynecol. Endocrinol.**, v. 9, p. 165-76, 1995.

STUDD J, LEATHER AT. The need for add-back with gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. **Br J Obstet Gynecol**, v. 103, p. 1-4, 1996.

SUAREZ QUIAN CA, WYNN PC, CATT KJ. Receptor-mediated endocytosis of GnRH analogs: Differential processing of gold-labeled agonist and antagonist derivatives. **J Steroid Biochem**, v. 24, p. 183, 1986.

SUGANUMA N, TSUKAHARA SI, KITAGAWA T, FURUHASHI M, ASADA Y, KONDO I. A controlled ovarian hyperstimulation regimen involving intermittent gonadotropin administration with a "short" protocol of gonadotropin releasing hormone agonist for in vitro fertilization. **J Assis Reprod Genet**, v. 13, n. 1, p. 43-8, 1996.

SURREY ES, KERIN JF. Controlled ovarian hyperstimulation: physiology, techniques, and controversy. In: MARRS RP. **Assisted Reproductive Technologies**. Boston, Blackwell Scientific Publications, p 1-23, 1993.

SURREY ES: Add-back therapy: Extending safety and efficacy of GnRH analogues in the gynecological patient. **Gynecol Obstet Invest**, v. 45, p. 31-34, 1998.

SYROP CH, WILLHOITE A, VAN VOORHIS BJ. Ovarian volume: a novel outcome predictor for assisted reproduction. **Fertil Steril**, v. 64, p. 1167-71, 1995.

TANOS V, FRIEDLER S, SHUSHAN A, STRAUSS N, HETSRONI I, LEWIN A. Comparison between nafarelin acetate and D-Trp6-LHRH for temporary pituitary suppression in in vitro fertilization (IVF) patients: a prospective crossover study. **J Assist Reprod Genet**, v. 12, n. 10, p. 715-9, 1995.

TAN SL, BALEN A, HUSSEIN E, MILLS C, CAMPBELL S, YOVICH J, et al. A prospective randomized study of optimum timing of human gonadotropin administration after pituitary desensitization in in vitro fertilization. **Fertil. Steril.**, v. 57, p. 1259-64, 1992.

TAN SL. Simplifying in vitro fertilization therapy. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.**,v. 6, p. 111-4, 1994.

TAN SL, ZAIDI J, CAMPBELL S, DOYLE P, COLLINS W. Blood flow changes in the ovarian and uterine arteries during the normal menstrual cycle. **Am J Ob Gyn**, v. 175, p. 625-31, 1996.

TAVMERGEN E, GOKER EN, SENDAG F, SENDAG H, LEVI R. Comparison of short and long ovulation induction protocols used in ART applications according to the ovarian response and outcome of pregnancy. **Arch Gynecol Obstet**, v. 266, n. 1, p. 5-11, 2002.

THORNTON KL. Ovulation induction and assisted reproduction. In: SHAMMA FN. *The art of ovulation induction*. **Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America.**, Philadelphia: W B Saunders Company, v. 11, p. 455-470, jul., 2002..

TINKANEN H, KUJANSUU E, LAIPALLA P. The association between hormone levels and vascular resistance in uterine and ovarian arteries in spontaneous menstrual cycles: Doppler ultrasound study. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 74, p. 297-1, 1995.

TOMAS C, NUOJUA-HUTTUNEN S, MARTIKAINEN H. Pretreatment transvaginal ultrasound examination predicts ovarian responsiveness to gonadotrophins in in-vitro fertilization. **Hum Reprod**, v. 12, p. 220-3, 1997.

TONER JP, HODGEN GD. The future of assisted reproductive technologies. In: MARRS RP. **Assisted Reproductive Technologies**. Boston, Blackwell Scientific Publications, p. 218-257, 1993.

TURNBULL LW, LESNY P, KILLICK SR. Assessment of uterine receptivity prior to embryo transfer: a review of currently available imaging modalities. **Hum Reprod Update**, v. 1, n. 5, p. 505-14, 1995.

VIRMANI MA, STOJILKOVIC SS, CATT KJ. Stimulation of luteinizing hormone release by gamma-aminobutyric acid (GABA) agonists: Mediation by GABA-type receptors and activation of chloride and voltage-sensitive calcium channels. **Endocrinology**, v. 126, p. 2499, 1990.

VRTACNIK-BOKAL E, MEDEN-VRTOVEC H. Short-term GnRH-analogue administration in patients with PCOS and its impact on hemodynamics and hormonal profile. **J Assist Reprod Genet**, v. 14, n. 10, p. 558-61, 1997.

VRTACNIK-BOKAL E, MEDE-VRTOVEC H. Utero-ovarian arterial blood flow and hormonal profile in patients with polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod**, v. 13, n. 4, p. 815-21, 1998.

WATERS SB, HAWES BE, CONN PM. Stimulation of luteinizing hormone release by sodium fluoride is independent of protein Kinase-C activity and unaffected by desensitization to gonadotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, v. 126, p. 2583, 1990.

WINSLOW KL, TONER JP, BRZYSKI RG, OEHNNGER SC, ACOSTA AA, MUASHER SJ. The gonadotropin-releasing hormone agonist stimulation test – a sensitive predictor of performance in the flare-up in vitro fertilization cycle. **Fertil Steril**, v. 56, n. 4, p. 711-7, 1991.

WIKLAND M, BORG J, HAMBERGER L, SVALANDER P. Simplification of IVF: minimal monitoring and the use of subcutaneous highly purified FSH administration for ovulation induction. **Hum. Reprod**, v.9, p. 1430-6, 1994.

WISE ME, NIEMAN D, STEWART J, et al. Effect of number of receptors for Gonadotropin-releasing Hormone on the release of Luteinizing Hormone. **Biol Reprod**, v. 31, p.1007, 1984.

WREN M, TAN SL, WATERSTONE J, et al. The optimum dose and mode of administration of luteinizing hormone analogue in in vitro fertilization: A comparison of three regimens. **Hum Reprod**, v. 6, p. 1370-1372, 1991.

YANG TS, TSAN SH, WANG BC, CHANG SP, NG HT. The evaluation of a new 7-day gonadotrophin-releasing hormone agonist protocol in the controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 22, n. 2, p 133-7, 1996.

YANO T, HAKUNO N, TSUSUMI O, et al. Potential role of GnRH in ovarian follicle growth and atresia (abstract 80). Presented at the Fourth International Symposium on GnRH Analogues in Cancer and Human Reproduction, Geneva, February, 1996.

YUZPE AA, NISKER JA, KAPLAN BR, et al. Nafarelin acetate for pituitary down regulation in in vitro fertilization: Comparison of two dosages. **J Reprod Med**, v. 40, p. 83-88, 1995.

ZAIDI J, BARBER J, KYEI-MENSAH A, BEKIR J, CAMPBELL S, TAN SL. Relationship of ovarian stromal blood flow at the baseline ultrasound scan to subsequent follicular response in an in vitro fertilization program. **Ob Gyn**, v. 88, p. 779-84, 1996.

ZAIDI J, CAMPBELL S, PITTROF R. Ovarian stromal blood flow in women with polycystic ovaries – a possible new marker for diagnosis? **Hum Reprod**, v. 10, p. 1992-6, 1995.

ZAIDI J, JURKOVIC D, CAMPBELL S, PITTROF R, MCGREGOR A, TAN SL. Description of circadian rhythm in uterine artery blood flow during the peri-ovulatory period. **Hum Reprod**, v. 10, p. 1642-6, 1995.