UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MAURÍLIO BATISTA PALHARES JÚNIOR

Fórmula combinando idade, contagem de folículos antrais, hormônio antimulleriano e hormônio folículo estimulante é mais acurada em predizer má resposta à estimulação ovariana controlada do que os marcadores isoladamente em pacientes de bom prognóstico

RIBEIRÃO PRETO
2015

MAURÍLIO BATISTA PALHARES JÚNIOR

Fórmula combinando idade, contagem de folículos antrais, hormônio antimulleriano e hormônio folículo estimulante é mais acurada em predizer má resposta à estimulação ovariana controlada do que os marcadores isoladamente em pacientes de bom prognóstico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.
Área de Concentração: **Ginecologia e Obstetrícia.**

Orientadora: Profa. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

RIBEIRÃO PRETO

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Palhares Júnior, Maurílio Batista

Fórmula combinando idade, contagem de folículos antrais, hormônio antimulleriano e hormônio folículo estimulante é mais acurada em predizer má resposta à estimulação ovariana controlada do que os marcadores isoladamente em pacientes de bom prognóstico. / Maurílio Batista Palhares Júnior / Orientadora: Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro. Ribeirão Preto, 2015.

51p.: 2il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

1. Má resposta ovariana; 2. Contagem de folículos antrais; 3. Hormônio antimulleriano; 4. Hormônio folículo estimulante; 5. Reprodução assistida.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Maurílio Batista Palhares Júnior

Título: Fórmula combinando idade, contagem de folículos antrais, hormônio antimulleriano e hormônio folículo estimulante é mais acurada em predizer má resposta à estimulação ovariana controlada do que os marcadores isoladamente em pacientes de bom prognóstico.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.
Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura:_____

RESUMO

PALHARES JÚNIOR, M.B. **Fórmula combinando idade, contagem de folículos antrais, hormônio antimulleriano e hormônio folículo estimulante é mais acurada em predizer má resposta à estimulação ovariana controlada do que os marcadores isoladamente em pacientes de bom prognóstico.** 51f. 2015. Dissertação (Mestrado) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto-SP. 2015.

Apesar da acumulada experiência e tecnologia da reprodução assistida, ainda é comum a ocorrência de má resposta (MR) à estimulação ovariana (EOC). Alguns dos mecanismos que prejudicam a resposta ovariana são conhecidos, como a obesidade e a redução de reserva funcional ovariana com o avançar da idade. No entanto, também se observa má resposta à estimulação ovariana controlada em pacientes jovens e sem comprometimento dessa reserva ovariana. Apesar do desenvolvimento de marcadores para predizer a má resposta, como o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio antimulleriano (AMH) ou a contagem de folículos antrais (CFA), ainda não há disponibilidade de mecanismos amplamente confiáveis para este fim. Há controvérsias quanto a qual destes preditores apresenta maior acurácia. Esta incerteza é ainda maior quando se analisa a população infértil de aparente bom prognóstico, ou seja, jovens, não obesas e com boa reserva ovariana. Predizer a má resposta neste grupo permitiria importante incremento na qualidade do tratamento destas pacientes. O objetivo deste estudo foi avaliar a acurácia dos marcadores de resposta ovariana como idade, FSH, AMH e CFA e comparar a acurácia destes entre si e combinados em uma fórmula para predizer má resposta à estimulação ovariana controlada em pacientes de bom prognóstico. Foram avaliadas 141 mulheres com idade <40 anos, FSH <10 mUI/ml e índice de massa corpórea (IMC) <30 $Kg/m^{2,}$, consecutivamente submetidas à injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), a partir de espermatozoides obtidos através de ejaculado. Destas, 45 (32%) obtiveram <3 oócitos e, portanto, tiveram má resposta ovariana. Avaliou-se a acurácia dos marcadores citados em predizer a má resposta através da área sob a curva ROC (AUC). A fórmula obteve AUC = 0.82, valor significativamente superior aos marcadores isolados (idade=0.67, CFA=0.74, AMH=0.75 e FSH=0,61). Também foram definidos os valores de corte para se obter a taxa de detecção de 50% e 80% e analisadas as taxas de verossimilhança dos marcadores. Concluiu-se que a fórmula é mais acurada em predizer má resposta ovariana à EOC do que qualquer dos marcadores isoladamente.

Palavras-chave: Má resposta ovariana; Contagem de folículos antrais; Hormônio antimulleriano; Hormônio folículo estimulante; Reprodução assistida.

ABSTRACT

PALHARES JÚNIOR, M.B. **A formula combining age, antral follicle count, antimullerian hormone, and follicle stimulating hormone is more accurate than individual markers in predicting poor response to controlled ovarian stimulation in good prognosis patients.** 51f. 2015. Dissertation (Master) Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. Ribeirão Preto-SP. 2015.

Age, antral follicle count (AFC), antimullerian hormone (AMH) and follicle stimulating hormone (FSH) are frequently used for the prediction of the ovarian response to controlled ovarian stimulation (COS). The objective of this study is to assess the accuracy of a formula combining all these parameters in predicting poor ovarian response (POR) to COS in good prognosis women. We included all good prognosis women submitted to COS for intracitoplasmatic sperm injection (ICSI) between n Feb-2008 and Jan-2009 who accepted to participate. We defined good prognosis as: age <40 years, basal FSH <10 mIU/ml, and body mass index (BMI) <30 Kg/m^2; in which the ICSI was performed with sperm obtained by ejaculation. POR was defined as ≤ 3 oocytes retrieved or cycle cancelation before oocyte retrieval due to a poor ovarian response. We performed a linear regression to determine a formula to predict POR using age and the logarithm regression of AFC, AMH and FSH. We assessed the predictive accuracy by the area under ROC curve (AUC). Additionally, we determined the cut-off values and false positive rate (FPR) for predicting POR with a detection rate of 50% and 80%. We evaluated 141 women who were submitted to COS and oocyte retrieval; 45 (32%) had POR. The formula to predict poor ovarian response was 0.024 + 0.017*Age - 0.403*LogAFC - 0.339*LogAMH + 0.204*LogFSH. The AUC observed for the formula (0.82) was significantly higher than for the isolated markers (age = 0.67, AFC = 0.74, AMH = 0.75, FSH = 0.61). We also determined the cut-off values and false positive rates for obtaining detection rates of 50% and 80%. We conclude that the formula combining age, FSH, AMH, and AFC is more accurate in predicting POR than individual markers.

Key words: Poor ovarian response; Antral follicle count; Antimullerian hormone; Follicle stimulating hormone; Assisted reproduction techniques.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma do estudo 33

Figura 2: Curvas ROC para a predição de má resposta à estimulação ovariana controlada, dos marcadores de resposta ovariana analisados isoladamente (idade, AMH, CFA e FSH) ou agrupados em uma fórmula 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Interpretação das razões de verossimilhança.....31

Tabela 2: Dados populacionais descritivos.....34

Tabela 3: Áreas sob a curva dos marcadores de resposta ovariana analisados isoladamente (idade, AMH, CFA e FSH) ou agrupados em uma fórmula para a predição de má resposta à estimulação ovariana controlada 36

Tabela 4: Comparação das áreas sob a curva dos marcadores de resposta ovariana analisados isoladamente (idade, AMH, CFA e FSH) ou agrupados em uma fórmula para a predição de má resposta à estimulação ovariana controlada 37

Tabela 5: Valores das razões de verossimilhança positiva e negativa para taxas de detecção de 50 % e 80 %, aproximadamente.....38

LISTA DE ABREVIATURAS

AMH- Hormônio antimulleriano

AOC- Anticoncepcional oral combinado

AUC- Área sob a curva ROC

CFA- Contagem de folículos antrais

COC- Complexo oócito-cumulus

EOC- Estimulação ovariana controlada

HCFMRP- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FPR- Taxa de falso positivo

FSH- Hormônio folículo estimulante

GnRHa- Análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG- Gonadotrofina coriônica humana

HTF- *Human Tubal Fluid-Hepes*

IC- Intervalo de confiança a 95%

ICSI- Injeção intracitoplasmática de espermatozoides

IMC- Índice de massa corpórea

IQR- Intervalo interquartil

LR- Razão de verossimilhança

LR-- Razão de verossimilhança negativa

LR+- Razão de verossimilhança positiva

MR- Má resposta

p- Significância estatística

pmol/l- Picomoles por litro

RA- Reprodução assistida

SE- Erro padrão

SMR- Grupo sem má resposta

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido

USTV- Ultrassonografia transvaginal

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO 15
1.1 Má resposta à estimulação ovariana controlada 16
1.2 Hormônio folículo estimulante 17
1.3 Hormônio antimulleriano 18
1.4 Contagem de folículos antrais 19
1.5 Fórmula para predizer má resposta 0

2- OBJETIVOS 21
2.1. Objetivos primários 22
2.2. Objetivos secundários 22

3- CAUSÍSTICA E MÉTODOS 23
3.1. Desenho do estudo 24
3.2. Contexto 24
3.2.1. Participantes 24
3.3. Metodologias de Reprodução Assistida 25
3.3.1. Protocolo de estimulação ovariana controlada 25
3.3.2. Critérios de cancelamento do ciclo por má resposta à EOC e definição de má resposta 25
3.3.3. Captação oocitária, ICSI, cultivo e avaliação embrionária 26
3.4. Variáveis e fonte de dados 27
3.5. Amostras obtidas, processamento e metodologias 28
3.5.1. Sangue 28
3.5.2. Determinação da concentração sérica de hormônio antimulleriano (AMH) 28
3.5.3. Determinação da concentração sérica de FSH 29
3.5.4. Contagem de Folículos Antrais (CFA) 29
3.5.5. Controle de viés 29
3.5.6. Tamanho amostral 30
3.6. Análise estatística 30

4- RESULTADOS 32
4.1. Fluxograma 33
4.2. Dados descritivos 34
4.3. Resultados Principais 35
4.4 Outras análises 37

5- DISCUSSÃO 39

6- CONCLUSÃO 42

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 44

ANEXO DE PUBLICAÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 Má resposta à estimulação ovariana controlada

A primeira criança nascida de um procedimento de fertilização *in vitro* em 1978 foi oriunda de um ciclo natural, a partir da obtenção de um único oócito (STEPTOE; EDWARDS, 1978). Mas, logo após esse marco, introduziu-se a estimulação ovariana controlada (EOC), que visa promover o desenvolvimento de múltiplos folículos, permitindo captar mais óvulos e, consequentemente, aumentar o número de embriões produzidos e a probabilidade de concepção (HEALY et al., 1987; JENNINGS; MORELAND; PETERSON, 1996). No entanto, após mais de 40 anos de experiência ainda há mulheres que respondem mal à EOC (denominadas más respondedoras), apresentando poucos oócitos captados, pequeno número de embriões disponíveis para transferência e baixas taxas de gravidez. A prevalência de má resposta (MR) pode variar entre 5,6 e 35,1% (BILJAN et al., 2000; DE SUTTER; DHONT, 2003; HENDRIKS et al., 2008; ORVIETO et al., 2009; VELEVA et al., 2005), dependendo, entre outros fatores, das diferenças na definição de MR utilizadas pelos autores. A chance de gravidez por ciclo iniciado em mulheres normo respondedoras usando protocolos padrão de EOC é de aproximadamente 30% (GNOTH et al., 2011). Todavia, em más respondedoras a chance é reduzida, girando em torno de 6% por ciclo iniciado (MAMAN et al., 2012; SOMIGLIANA et al., 2013).

Questiona-se qual a etiopatogênese da MR à EOC, sendo que vários fatores podem promover essa condição. A presença de reduzido número de folículos responsivos ao hormônio folículo estimulante (FSH), mais frequentemente relacionada à condição conhecida como reserva ovariana funcional diminuída, parece ser o fator mais prevalente (BILJAN et al., 2000). Em alguns casos, no entanto, a MR pode ser associada à exposição sub-ótima às gonadotrofinas, por exemplo, em mulheres obesas (MAHESHWARI; STOFBERG; BHATTACHARYA, 2007), ou a presença de subtipos do receptor de FSH, que tornam os folículos menos sensíveis às gonadotrofinas exógenas (SIMONI; NIESCHLAG; GROMOLL, 2002). Dessa forma, pode-se assumir que nem todas as más respondedoras tenham o mesmo prognóstico reprodutivo e fatores como a idade, obesidade e o número de oócitos obtidos são importantes fatores

prognósticos (OUDENDIJK et al., 2012). Entretanto, apesar da baixa resposta ser esperada em pacientes acima de 40 anos ou obesas (KILIC et al., 2010), também se observa nas pacientes jovens e sem obesidade, já no primeiro ciclo (MOOLENAAR et al., 2013; TUTUNCU; DUNDAR, 2012). Identificar preditores de resposta à EOC nessas mulheres de aparente bom prognóstico é importante para se definir melhor o protocolo de EOC, adequar as expectativas do casal e prover adequado aconselhamento sobre se vale a pena iniciar ou continuar com o tratamento de fertilização *in vitro*.

1.2 Hormônio folículo estimulante

O FSH foi o primeiro marcador de resposta ovariana largamente utilizado para predizer sucesso ou insucesso à EOC (FERTE-DELBENDE et al., 2010; FRAZIER et al., 2004; NELSON; YATES; FLEMING, 2007). A familiaridade com o papel biológico do FSH e a relativa facilidade e baixo preço para sua dosagem contribuíram para seu amplo uso em medicina reprodutiva. É reconhecida a correlação entre a elevação dos níveis séricos de FSH e a menopausa (SOWERS et al., 2008), porém a sua correlação com o número de folículos antrais e a resposta à EOC é marcadamente menor (BARAD, 2005; KLINKERT et al., 2005). Uma importante limitação do uso do FSH é a sua alta variabilidade entre os ciclos menstruais e dentro de um mesmo ciclo (BROWN et al., 1995; HERSHLAG et al., 1992; SCOTT et al., 1990). Agregados a isso, há relatos de incoerências no seu desempenho como preditor de resposta ovariana à EOC, como a ocorrência de boa resposta em pacientes com elevados níveis de FSH e vice-versa (MOOLENAAR et al., 2013). Um estudo de meta-análise indicou que o FSH basal é um preditor ruim de MR (BANCSI et al., 2003). Estudos recentes avaliando preditores de resposta à EOC têm abandonado o seu uso isoladamente nesse contexto (NELSON; KLEIN; ARCE, 2015). Porém, devido ao seu baixo custo e à sua disponibilidade quase universal, o FSH permanece como marcador utilizado em diversos centros de reprodução assistida (RA) e continua sendo um marcador

relacionado à falência ovariana, permanecendo, portanto, informativo e relevante (HARLOW et al., 2012).

1.3 Hormônio antimulleriano

Recentemente, o hormônio antimulleriano (AMH) emergiu como um novo marcador de reserva ovariana (ALMOG et al., 2011; BARAD; WEGHOFER; GLEICHER 2011; LA MARCA et al., 2010). O AMH é uma glicoproteína homodimérica de 140 kDa, membro da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF-β), expresso nos folículos pré-antrais e antrais pequenos de até 8 mm (WEENEN et al., 2004). Um estudo recente confirmou esse achado, demonstrando que a expressão do gene do AMH e da proteína AMH no fluido folicular aumentou até o diâmetro folicular de 8 mm, após o qual houve um rápido declínio. (JEPPESEN et al., 2013). Foi demonstrado que os folículos de 5 a 8 mm contribuem com 60% do AMH circulante (JEPPESEN et al., 2013). De maneira oposta, as células da granulosa dos folículos pré-ovulatórios maiores que 10 mm não produzem AMH. Assim, o AMH da circulação periférica é derivado, principalmente, dos folículos antrais, e como seu número é relacionado proporcionalmente à quantidade de folículos primordiais (FANCHIN et al., 2007), o AMH pode indiretamente representar a reserva ovariana.

As concentrações séricas de AMH diminuem consistentemente com o avançar da idade e são indetectáveis após a menopausa (VAN ROOIJ et al., 2002; YOO et al., 2011). Nos ciclos de RA, as concentrações séricas de AMH, antes do início da EOC, parecem refletir a coorte de folículos passíveis de responder ao estímulo gonadotrófico e, consequentemente, podem predizer a resposta à EOC (CHOI et al., 2011; LEKAMGE et al., 2007; NELSON et al., 2009). Todavia, questiona-se a sua real utilidade na prática clínica na atualidade, em virtude da falta de padronização dos ensaios e limitações técnicas relativas à coleta e ao processamento do sangue coletado, de modo que a definição de um padrão internacional para AMH é fundamental (NELSON, 2013). Com o desenvolvimento de técnicas padronizadas automatizadas para dosagem do

AMH, com adequada acurácia e pequena variabilidade intra e interensaio, e o barateamento do seu custo, espera-se que esse promissor marcador se torne mais amplamente utilizado e validado para a predição da resposta à EOC em ciclos de RA (NELSON, 2013; NELSON et al., 2015).

1.4 Contagem de folículos antrais

Outro método utilizado para a predição da resposta ovariana à EOC é a contagem de folículos antrais (CFA). Para a obtenção da CFA, cada ovário é identificado por ultrassonografia bi ou tridimensional, e os folículos entre 2 a 10 mm são contados, preferencialmente, entre o segundo e quarto dias do ciclo menstrual (BROEKMANS et al., 2010). A CFA tem sido usada como preditora, tanto para baixa resposta quanto para resposta excessiva à EOC (BROER et al., 2011; JAYAPRAKASAN et al., 2010b; MELO et al., 2009; VRONTIKIS et al., 2010). De acordo com alguns autores (JAYAPRAKASAN et al., 2007), As medidas de AFC mostram suficiente reprodutibilidade interobservador, permitindo avaliar cada ovário separadamente (LIMA et al., 2014). Entretando, a principal limitação da CFA está relacionada à resolução dos equipamentos e qualidade das imagens, utilização de equipamentos bidimensionais ou tridimensionais, assim como da experiência do ultrassonografista (JAYAPRAKASAN et al., 2010a), que podem interferir na variabilidade intra e interobservador. Associado a isto, estudos recentemente publicados pelo nosso grupo evidenciaram que em ovários com endometrioma, a CFA pode ser subestimada; situação na qual o AMH poderia ser mais acurado na predição da resposta à EOC (LIMA et al., 2014, 2015). Dessa forma, questionou-se a acurácia da CFA na predição da resposta à EOC em ovários com endometriomas e outras massas anexiais. Na literatura há dados conflitantes, com estudos apontando a CFA como melhor preditora de resposta ovariana à EOC (ELDAR-GEVA et al., 2005; KWEE et al., 2008; MUTLU et al., 2013), enquanto outros mostram o AMH como mais acurado (BROER et al., 2014; FICICIOGLU et al., 2006; McILVEEN; SKULL; LEDGER, 2007; NELSON; KLEIN; ARCE, 2015).

1.5 Fórmula para predizer má resposta

Em vista das limitações e controvérsias acerca dos marcadores de predição de resposta à EOC, tem sido aventada a utilização de combinações desses marcadores em diversas fórmulas para aumentar a acurácia na predição de MR à EOC (AL-AZEMI et al., 2011; HUBER et al., 2013). De acordo com Broer et al. (2013), ao combinar idade, AMH e AFC pode-se otimizar a predição de resposta ovariana, com aumento estatisticamente significativo na AUC de 0,81 para até 0,85, se todas as três variáveis forem usadas, comparado ao uso de apenas duas variáveis.

Todavia, ainda não se tem uma definição quanto à acurácia dos marcadores em predizer ou excluir a MR, principalmente nos grupos de aparente bom prognóstico, em que esse padrão de resposta, via de regra, não é esperado e cuja identificação poderia ser útil para definir melhor o protocolo de EOC, adequar as expectativas do casal e prover adequado aconselhamento sobre se vale a pena iniciar ou continuar com o tratamento de fertilização *in vitro*; motivando, assim, a realização do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos primários

- Comparar a acurácia dos marcadores de resposta ovariana à EOC (idade, FSH, AMH e CFA) na predição de MR à EOC nas pacientes de aparente bom prognóstico (idade <40 anos, FSH basal <10 mUI/mL, índice de massa corporal (IMC) <30 kg/m^2 e cuja injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) seria realizada com espermatozoides obtidos do ejaculado);

- Avaliar se a combinação dos métodos em uma fórmula a ser proposta pelos autores é melhor do que cada marcador isoladamente na predição de MR à EOC nas pacientes de aparente bom prognóstico.

2.2 Objetivos secundários

- Calcular os pontos de corte de todos os marcadores analisados isoladamente e agrupados na fórmula para sensibilidade de 50% e 80% na predição de MR à EOC, e determinar as razões de verosimilhança positiva (LR+) e negativa (LR-) correspondentes a estes pontos de corte.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo de coorte prospectivo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) (Processo HCRP nº 10187/2007).

3.2 Contexto

O estudo foi realizado junto ao Laboratório de Reprodução Assistida do HCFMRP-USP, entre fevereiro de 2008 e janeiro de 2009. As pacientes foram analisadas quanto à elegibilidade na consulta realizada de rotina no serviço, no segundo ao quinto dias do ciclo menstrual natural do ciclo prévio ao da EOC para ICSI. As pacientes elegíveis que aceitaram participar do estudo, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), doaram sangue para dosagem de FSH e AMH nessa consulta. Apenas os dados do primeiro ciclo de EOC para ICSI no período do estudo de cada participante foram incluídos na análise.

3.2.1 Participantes

Foram consideradas elegíveis todas as mulheres submetidas à EOC para ICSI de fevereiro de 2008 a janeiro de 2009, com idade <40 anos, com concentrações séricas basais de FSH (segundo ou terceiro dia do ciclo menstrual natural) <10 mUI/mL (em exame realizado há menos de 6 meses) e IMC <30 kg/m^2, e cuja ICSI seria realizada com espermatozoides obtidos do ejaculado.

3.3 Metodologias de reprodução assistida

3.3.1 Protocolo de estimulação ovariana controlada

Com o objetivo de sincronizar e programar o início do ciclo de EOC utilizou-se a programação da menstruação, por meio da administração diária de anticoncepcional oral combinado (AOC), interrompido cinco dias antes do início da EOC. O bloqueio hipofisário com análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa) foi iniciado 10 dias antes do dia de se submeter à ultrassonografia transvaginal (USTV) basal (protocolo longo), no período vespertino, por meio da administração de acetato de leuprolide (Lupron®, Abott, Brasil) na dose de 0,5 mg/dia (10 UI), por via subcutânea, mantida durante todo o período de EOC até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Ovidrel®, Serono, Brasil).

As pacientes receberam 200 a 225 UI por dia de FSH recombinante (Gonal-F®, Serono, Brasil; Puregon®, Organon, Brasil) nos primeiros seis dias de indução. A partir do sétimo dia de EOC, a dose foi ajustada de acordo com o crescimento folicular e a espessura endometrial, monitorados com USTV diariamente ou em dias alternados. Quando três folículos atingiram o diâmetro de ≥17 mm, foram administrados 250 µg de hCG recombinante (Ovidrel®, Serono, Brasil) às 22:00hs. A captação dos oócitos foi realizada 34 a 36 horas após a aplicação da hCG recombinante. A transferência de embriões ocorreu dois a três dias após a ICSI. As pacientes receberam progesterona micronizada na dose de 600 mg/dia para suporte da fase lútea.

3.3.2 Critérios de cancelamento do ciclo por má resposta à EOC e definição de má resposta

Foram considerados critérios indicativos ao cancelamento dos ciclos de EOC a ausência de qualquer folículo ≥10 mm após 10 dias de EOC (cancelamento precoce), ou para indicação da hCG (ausência de pelo menos um folículo ≥18 mm após mais 4 a 5 dias de EOC na presença de folículo >10 mm;

cancelamento tardio) (PENARRUBIA et al., 2005). Tanto o cancelamento do ciclo por MR como a obtenção de ≤3 oócitos foram classificados como MR.

3.3.3 Captação Oocitária, ICSI, cultivo e avaliação embrionária

A captação dos oócitos foi realizada mediante prévia anestesia geral endovenosa com propofol (Diprivan®, Astra-Zeneca, Brasil), associado ao citrato de fentanil (Fentanil®, Janssen-Cilag, Brasil). A aspiração dos folículos por via endovaginal guiada por transdutor ultrassonográfico transvaginal, foi realizada utilizando-se uma agulha de lúmen simples padrão, com 300 mm de comprimento, 1,1 mm de diâmetro interno, duplo bisel cortante, ranhurado nos dois centímetros terminais para maior ecogenicidade (Laboratório CCD, França), com pressão aspirativa artificial constante de 100 mmHg, por meio de bomba de sucção com controle eletrônico (Craft® Suction Pump, Rocket Medical, Inglaterra).

Todo o manuseio dos oócitos foi realizado sob capela de fluxo laminar (Veco Modelo HLFS 12), com a finalidade de manter o meio estéril. Para a identificação e o isolamento dos complexos oócito-cumulus (COC), o material aspirado foi transferido para placas de Petri com 10 cm de diâmetro, previamente aquecidas em platina térmica a 37°C. Depois de identificados, os COCs foram isolados do fluido folicular e colocados em placa separada. Os COCs foram lavados cuidadosamente em meio de cultura Human Tubal Fluid-HEPES (HTF, Irvine Scientific), para a remoção de sangue e debris. A seguir, foram colocados em placas NUNC (Multidish 4 wells Nuclon, Delta SI), preenchidas com o meio de cultura HTF e cobertas com óleo mineral, e levados à incubadora em mistura gasosa de CO_2 a 5%, sob condições ideais de temperatura (37ºC) e umidade (95%) por um período de 2 a 3 horas. Após esse período, para a remoção do cumulus oophorus e da corona radiata, os COCs foram colocados em microgotas de 25 µL de hialuronidase (H4272 tipo IV-S, Sigma), na diluição de 80 UI/mL de HTF/HEPES (Irvine Scientific), por no máximo 30 segundos e, então, lavados duas ou três vezes com o meio HTF modificado (HTF/HEPES, Irvine Scientific) suplementado com Soro Sintético Substituto a 10%. A remoção mecânica dos

restos celulares foi feita com o auxílio de uma pipeta de desnudação (stripper pipette 130 µm denuding pipette, Cook, Melbourne, Australia)

Após o desnudamento oocitário (remoção do *cumulus oophorus*), identificou-se o grau de maturidade dos oócitos, sob visualização ao estereomicroscópio invertido. Os oócitos imaturos (em estágio de vesícula germinativa ou metáfase I) foram descartados e os maduros (caracterizados morfologicamente pela presença de um corpúsculo polar extruso) foram submetidos à ICSI 3 a 4 horas após a captação oocitária e, após injetados, foram cultivados em gotas separadas. Cerca de 16 a 18 horas após a ICSI foi avaliada a fertilização, caracterizada pela presença de dois pró-núcleos e dois corpúsculos polares (a taxa de fertilização corresponde ao número de oócitos fertilizados, divididos pelo número de oócitos injetados X 100). Cerca de 43 a 45 horas após a ICSI (segundo dia de desenvolvimento embrionário - D2) avaliou-se a morfologia embrionária (quanto ao número e simetria de blastômeros, percentagem de fragmentação e presença ou não de multinucleação). Para os casos em que a transferência embrionária não ocorreu no D2, cerca de 67 a 69 horas após a ICSI (D3) analisou-se novamente a morfologia embrionária (ALPHA SCIENTISTS IN REPRODUCTIVE; EMBRYOLOGY, 2011).

3.4 Variáveis e fonte de dados

Para todos os parâmetros avaliados, a unidade de análise foi o número de mulheres. O desfecho primário avaliado foi o número de oócitos captados. Também foram analisados: idade, peso, altura, IMC, AMH, CFA, FSH e espessura endometrial no dia da administração do hCG. Nos casos em que a mulher não se submeteu à captação de oócitos ou transferência de embriões, considerou-se que o número de oócitos captados e embriões transferidos foi zero. Todas as mulheres foram incluídas nas análises.

O AMH e FSH foram dosados no sangue coletado na fase folicular precoce do ciclo menstrual que antecedeu a EOC para ICSI no dia da consulta em que foi avaliada a elegibilidade das mulheres e assinado o TCLE. A CFA foi avaliada por

USTV realizado no primeiro dia da EOC, utilizando o equipamento Voluson E8 Expert (GE Healthcare Austria GmbH & Co OG, Zipf, Áustria), por um dos quatro ultrasonografistas treinados do serviço de RA. Todas as demais variáveis foram obtidas a partir dos registros médicos.

Com a finalidade de dividir as mulheres nos grupos de comparação (presença ou ausência de MR à EOC), considerou-se MR à EOC o cancelamento do ciclo por MR (PENARRUBIA et al., 2005) ou a obtenção de três ou menos oócitos captados (FERRARETTI et al., 2011).

3.5 Amostras obtidas, processamento e metodologias

3.5.1 Sangue

Foram utilizados tubos estéreis a vácuo com EDTA para a coleta de 20 mL de sangue venoso das pacientes, no dia da realização da consulta pré-basal, ou seja, do terceiro ao quinto dias do ciclo menstrual, no mês anterior ao que estava programada a EOC para a realização da ICSI. Nesse dia, as pacientes não estavam utilizando nenhuma medicação, hormonal ou não hormonal. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1900 x g por 10 minutos e o soro armazenado a -80°C, dividido em duas alíquotas, para posterior análise. O tempo máximo de estocagem previsto foi de dois anos. As amostras de soros armazenadas foram dosadas na mesma ocasião, por um único técnico treinado nas metodologias, que não tinha acesso ao grupo ao qual as mulheres pertenciam.

3.5.2 Determinação da concentração sérica de hormônio antimulleriano (AMH)

As dosagens séricas de AMH foram obtidas pelo método de ELISA, utilizando-se o *kit* comercial específico *HZ* AMH EIA KIT RUO (Ref: A16507) da Beckman Coulter. Esse *kit* possui variabilidade intraensaio de 2,4% e interensaio de 4,8%, segundo a sua bula. Os valores de AMH obtidos foram expressos em

picomoles por litro (pmol/l), utilizando-se o AMH humano recombinante como padrão. O limite de detecção utilizando-se este protocolo ultrassensível é de 0.7 pmol/l.

3.5.3 Determinação da concentração sérica de FSH

A dosagem do FSH foi realizada de acordo com os procedimentos internacionalmente padronizados, pelo método de quimioluminescência, utilizando-se o equipamento Immulite 2000 (DPC MED LAB, Los Angeles, USA) com *kits* específicos fornecidos pela SIEMENS. O coeficiente de variabilidade para o FSH foi de 0.1 mIU/ml para sensibilidade funcional e de 2.9% para variabilidade intraensaio. Como foi utilizado apenas um *kit* por dosagem hormonal, não foi estimado o coeficiente de variabilidade interensaio.

3.5.4 Contagem de folículos antrais (CFA)

Para a CFA foram avaliados os folículos entre 2 a 10 milímetros de diâmetro transversal médio (LIMA et al., 2014) em USTV realizado no primeiro dia da EOC (cinco dias após a interrupção do ACO usado para a programação do ciclo) utilizando um Voluson E8 Expert (GE Healthcare Austria GmbH & Co OG, Zipf, Áustria) realizado por um dos quatro ultrasonografistas treinados do serviço de RA.

3.5.5 Controle de viés

Para se evitar viés de seleção foram incluídos no estudo apenas o primeiro ciclo de EOC para ICSI de todas as mulheres elegíveis que procuraram o serviço no período analisado. Para controle de viés de desempenho, o atendimento clínico dos sujeitos da pesquisa foi realizado seguindo o protocolo padrão do serviço por médicos que não participaram do estudo. Com o objetivo de não incorrer em viés de aferição as amostras foram armazenadas sob os mais

rigorosos padrões de segurança vigentes e todas as dosagens utilizaram equipamentos e técnicas padronizadas, e foram realizadas por profissional único, capacitado, com experiência comprovada e cego aos dados clínicos das pacientes. Todas as amostras obtidas foram analisadas e os resultados apresentados, evitou-se, assim, viés de publicação.

3.5.6 Tamanho amostral

O tamanho amostral foi definido pelo total de pacientes elegíveis que aceitaram participar do estudo de fevereiro de 2008 a janeiro de 2009.

3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se os programas de computador SPSS (Version 18.0, SPSS Inc. Chigaco, IL) e MedCalc (versão 12,7 - MedCalc Software bvba, Ostend, Bélgica). Como os parâmetros não tiveram distribuição normal, os dados foram expressos em Mediana e Intervalo Interquartil (IQR), e a comparação entre os grupos com e sem MR foi realizada com o teste de Mann-Whitney. A partir da regressão linear usando-se a idade, e a regressão logarítmica de CFA, AMH e FSH, chegou-se à seguinte fórmula para predição de MR ovariana à EOC:

Fórmula = 0.024+0.017*Age-0.403*LogCFA-0.339*LogAMH+0.204*LogFSH

Foi avaliada a área sob a curva ROC (AUC) para cada marcador de resposta à EOC isoladamente (idade, AMH, FSH e CFA) e agrupados na fórmula acima descrita. Também foram determinados os valores de corte para obtenção da taxa de detecção de 50% e de 80% para MR à EOC, definindo-se, assim, a taxa de falso positivo (FPR), as LR+ e LR-. As LR maiores que 10 ou menores que 0,1 geram mudanças conclusivas na probabilidade pós-teste em relação ao

pré-teste. As LR entre 5 a 10 ou entre 0,1 a 0,2 geram mudanças moderadas nas probabilidades pré e pós-teste. Quando as LRs ficam entre 2 e 5, ou entre 0,2 e 0,5, a mudança na probabilidade pré e pós-teste é apenas discreta, mas algumas vezes importante clinicamente. As LRs entre 0,5 a 2 não alteram significativamente as probabilidades pré e pós-teste (RIDDLE; STRATFORD, 1999) (Tabela 1).

Tabela 1 - Interpretação das razões de verosimilhança (LR)

LR	Interpretação
>10	Grande e conclusivo aumento na probabilidade da doença
5 - 10	Moderado aumento na probabilidade da doença
2 - 5	Pequeno aumento na probabilidade da doença
1 - 2	Mínimo aumento na probabilidade da doença
0.5 - 1.0	Mínimo decréscimo na probabilidade da doença
0.2 - 0.5	Pequeno decréscimo na probabilidade da doença
0.1 - 0.2	Moderado decréscimo na probabilidade da doença
<0.1	Grande e conclusivo decréscimo na probabilidade da doença

4. RESULTADOS

4.1 Fluxograma

De fevereiro de 2008 a janeiro de 2009, 289 pacientes participaram do Programa Público de Reprodução Assistida do HCFMRP-USP, e foram submetidas à EOC para ICSI. Destas, 139 não foram elegíveis para o estudo (86 pacientes com idade ≥40 anos e/ou FSH basal (colhido até 6 meses antes do ciclo) ≥10 mIU/mL, 40 pacientes com IMC ≥30 kg/m^2 e 13 casos em que a ICSI foi programada com espermatozoides obtidos por procedimentos invasivos). As 150 pacientes elegíveis foram entrevistadas e 141 aceitaram participar do estudo e tiveram sangue coletado no dia da consulta de elegibilidade. Destas, 45 apresentaram MR à EOC e 96 não demonstraram MR. Todas as 141 tiveram suas amostras sanguíneas analisadas (Figura 1).

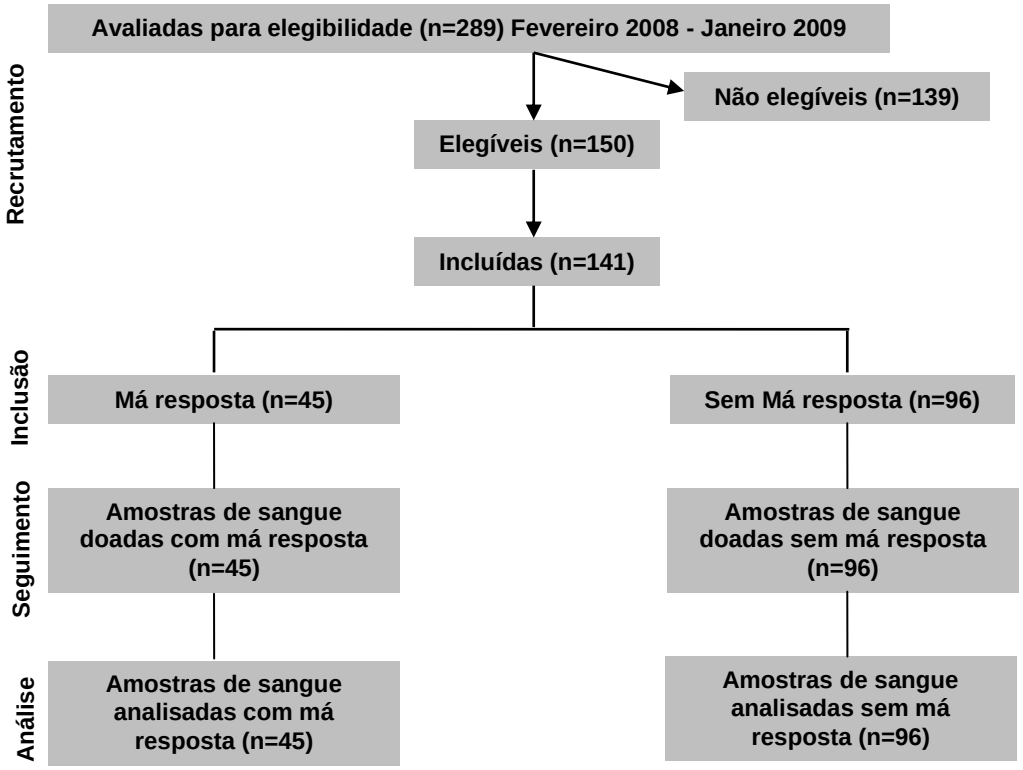

Figura 1 - Fluxograma do estudo.

4.2 Dados descritivos

Foram avaliadas 141 pacientes sendo que 45 (32%) apresentaram MR (grupo MR) e 96 (68%) não evidenciaram MR (grupo sem má resposta - SMR). Os grupos não diferiram significativamente quanto ao peso, à estatura, ao IMC e à espessura endometrial no dia da administração da hCG. A mediana de idade e as concentrações séricas de FSH foram significativamente maiores no grupo com MR comparado ao SMR (p=0,001). Já as concentrações séricas de AMH, a CFA, o número de oócitos captados e de embriões formados foram significativamente menores no grupo com MR comparado ao SMR (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados populacionais descritivos.

	MR (N=45)		**SMR (N=96)**		
	Mediana	**IQR**	**Mediana**	**IQR**	**p**
Idade (anos)	36.0	33.0 - 37.0	33.0	30.0 -35.0	0.001
Peso (kg)	61.1	53.7 - 72.1	60.0	55.1 - 67.0	0.760
Altura (m)	1.62	1.57 - 1.65	1.60	1.58 -1.66	0.883
IMC (kg/m^2)	22.9	20.9 - 26.5	23.0	21.2 - 25.2	0.803
AMH (ng/ml)	1.0	0.6 - 1.4	1.8	1.2 - 3.3	<0.001
CFA	5.0	3.0 - 8.0	10.0	6.0 -13.8	<0.001
FSH (mUI/ml)	6.9	4.6 - 9.1	5.9	4.1 - 6.9	0.036
Espessura Endometrial (mm)	10.0	8.9 - 11.9	11.0	9.2 -12.0	0.059
Oócitos Obtidos	2.0	1.0 - 3.0	7.0	5.0 - 11.0	<0.001
Embriões formados	1.0	0.0 - 2,0	3.0	2.3 - 5.0	<0.001

MR= má resposta; **SMR=** sem má resposta; **IQR=** intervalo interquartil 25% a 75%

4.3 Resultados principais

Foram construídas curvas ROC e calculada a área sob a curva (AUC) para todos os marcadores de resposta ovariana, analisados isoladamente (idade, CFA, AMH e FSH), ou agrupados em uma fórmula para a predição de MR à EOC (Figura 2 e Tabela 3). As AUC foram de 0,672 (IC 95% 0,588 a 0,749), 0,742 (IC 95% 0,662 a 0,812), 0,747 (IC 95% 0,667 a 0,816), 0,609 (IC 95% 0,524 a 0,690) e 0,824 (IC 95% 0,751 a 0,883), respectivamente, para idade, CFA, AMH, FSH e fórmula.

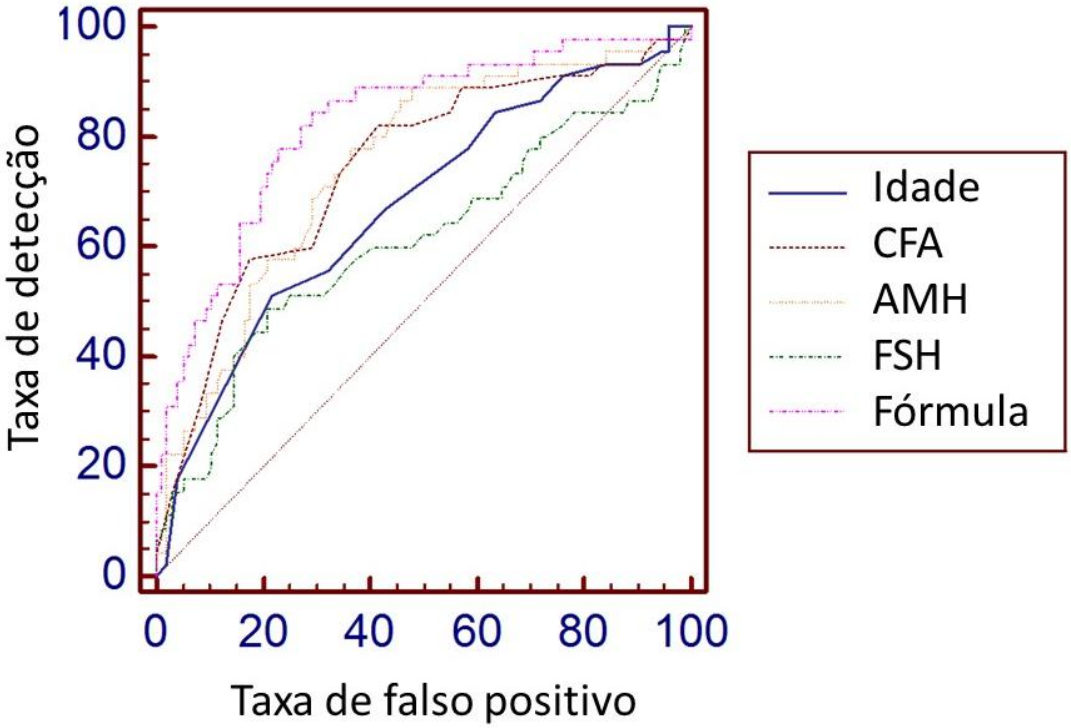

Figura 2 - Curvas ROC para a predição de má resposta à estimulação ovariana controlada dos marcadores de resposta ovariana analisados isoladamente (idade, AMH, CFA e FSH) ou agrupados em uma fórmula .
Fórmula: 0.024+0.017*Age-0.403*LogCFA-0.339*LogAMH+0.204*LogFSH.
CFA: contagem de folículos antrais; **AMH:** hormônio antimulleriano; **FSH:** hormônio folículo-estimulante.

Tabela 3 - Áreas sob a curva dos marcadores de resposta ovariana analisados isoladamente (idade, AMH, CFA, FSH) ou agrupados em uma fórmula para a predição de má resposta à estimulação ovariana controlada.

	AUC	**SE**	**95% CI**
Idade	0.672	0.0497	0.588 a 0.749
CFA	0.742	0.0465	0.662 a 0.812
AMH	0.747	0.0449	0.667 a 0.816
FSH	0.609	0.0554	0.524 a 0.690
Fórmula	0.824	0.0390	0.751 a 0.883

AUC= área sob a curva; **SE=** erro padrão; **95% IC=** intervalo de confiança a 95%.

Comparando-se as AUC entre os marcadores isoladamente (idade vs. CFA, idade vs. CFA, idade vs. FSH, CFA vs. AMH, CFA vs. FSH e AMH vs. FSH) não se observou diferença estatisticamente significativa entre nenhuma das comparações (Tabela 4). Comparando-se a AUC da fórmula com a dos marcadores isolados (idade, CFA, AMH e FSH) obteve-se diferença estatisticamente significativa entre todas as comparações (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação das áreas sob a curva dos marcadores de resposta ovariana analisados isoladamente (idade, AMH, CFA e FSH) ou agrupados em uma fórmula para a predição de má resposta à estimulação ovariana controlada.

Marcador de Má Resposta	Diferença entre as AUC	p
Idade x CFA	0.0696	0.2700
Idade x AMH	0.0743	0.2223
Idade x FSH	0.0630	0.4176
CFA x AMH	0.00475	0.9300
CFA X FSH	0.137	0.0625
AMH x FSH	0.824	0.0573
Idade x Fórmula	0.151	0.0029
CFA x Fórmula	0.0816	0.0025
AMH x Fórmula	0.0769	0.0317
FSH x Fórmula	0.214	0.0005

AUC= diferença das áreas sob a curva; **p=** significância estatística.

4.4 Outras análises

Foram calculados os pontos de corte de todos os marcadores analisados isoladamente e agrupados na fórmula para a taxa de detecção de aproximadamente 50% e 80% na predição de MR, e apresentadas as LR+ e LR- correspondentes a esses pontos de corte (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de corte para a predição de má resposta à estimulação ovariana controlada, com taxas de detectção de 50% e 80 %, para: idade, CFA, AMH, FSH e fórmula combinando estes parâmetros.

	Taxa de detecção = 50%				**Taxa de detecção = 80%**			
	Corte	**FPR**	**LR+**	**LR-**	**Corte**	**FPR**	**LR+**	**LR-**
Idade	≥ 35	22%	2.3	0.6	≥33	57%	1.3	0.5
CFA	≤ 4	13%	3.7	0.6	≤8	42%	1.9	0.3
AMH	≤1.0	18%	2.7	0.6	≤1.5	43%	1.8	0.3
FSH	≥7.0	24%	2.0	0.6	≥4.3	72%	1.1	0.7
Fórmula	≥0.50	10%	4.7	0.5	≥0.37	27%	3.0	0.2

FPR= taxa de falso positivo; **LR+=** razão de verossimilhança positiva; **LR-=** razão de verossimilhança negativa.

As FPRs e as LRs foram significativamente melhores para a fórmula, em comparação aos outros parâmetros. Para uma taxa de detecção de 50% de MR à EOC, valores de corte ≥0.50 para a fórmula apresentaram FPR relativamente baixa (10%), com LR+ de quase 5, o que pode gerar mudanças moderadas nas probabilidades pré e pós-teste. Para a taxa de detecção de 80% de MR à EOC, valores de corte ≥0.37 para a fórmula apresentaram FPR moderada (aproximadamente 30%), com LR- de 0,2, o que pode gerar mudanças moderadas nas probabilidades pré e pós-teste.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo analisou uma população de casais inférteis submetidos a técnicas de RA, com idade até 39 anos e IMC até 30, nos quais os espermatozoides puderam ser colhidos sem a necessidade de procedimentos invasivos. Mesmo nesta população de aparente bom prognóstico observou-se ocorrência de MR ovariana em 45 das 141 participantes, uma parcela expressiva. Este achado é comparável ao encontrado na literatura internacional atual (ALMOG et al., 2014).

O estudo demonstrou que nesta população os marcadores idade, CFA, AMH e FSH foram preditores de MR ovariana, conforme evidenciado pela área sob a curva. Porém, a fórmula que combinou estes marcadores foi superior a cada um deles isoladamente. Estes dados corroboram os achados do estudo de Oliveira et al. (2012), que avaliaram a combinação de marcadores ovarianos como superior. Outro estudo (JAYAPRAKASAN et al., 2010a) utilizou uma população semelhante quanto à idade e ao peso e protocolo de estimulação com achados de equivalência entre AMH e CFA ou sua combinação, porém diferentemente do presente estudo, não incluiu idade e FSH combinadamente ao AMH e CFA. Outro estudo, ainda, (CHEN et al., 2011) identificou associação entre CFA combinado à idade e MR ovariana com predição superior aos fatores isolados, contudo o AMH e FSH não foram incluídos na análise.

Apesar de os marcadores se associarem à baixa resposta à estimulação, estes fornecem apenas pequeno aumento nas probabilidades pré-teste quando alterados. Analizando-se as LRs, este aumento de probabilidade de MR tende a ser clinicamente mais relevante para a fórmula do que para os marcadores isolados, principalmente quando se consideram pontos de corte mais específicos (LR+ = 4,7), mas também com os pontos de corte mais sensíveis (LR+ = 3,0).

Ao contrário, na tentativa de usar os marcadores para excluir MR obtém-se mínimo decréscimo nesta probabilidade com os pontos de corte mais específicos. Para este mesmo fim, ao se utilizarem pontos de corte mais específicos o CFA e AMH têm desempenho melhor que a idade e FSH, e semelhante à formula. Neste cenário tem-se um pequeno decréscimo da probabilidade de MR, mas que pode ser clinicamente relevante.

Uma característica deste estudo foi o uso de população de aparente bom prognóstico e submetida a protocolo agonista longo. Isto traz maior uniformidade e melhora a capacidade preditiva neste cenário, porém estudos adicionais serão necessários para a extrapolação destes dados para pacientes obesas e/ou acima de 40 anos, ou submetidas a outros protocolos, como antagonista ou protocolo curto.

Estes achados apontam para a possibilidade de se prever a MR à EOC já no primeiro ciclo de RA, mesmo nos grupos em que não se espera resultado desfavorável. No entanto, ainda serão necessários estudos adicionais, com maior tamanho amostral e populações diversas para se validarem estes achados definitivamente.

Ao se iniciar um tratamento de EOC, há que se levar em conta diversos fatores para se poder individualizar a dose e também se adequar às expectativas do casal. A predição de MR, com certeza, é um destes fatores e a fórmula aqui demostrada representa um provável acréscimo no custo-benefício para predizer um resultado insatisfatório. Porém, até o presente momento os mesmos marcadores apresentam menor valor para se excluir tal resultado negativo, mas ainda são úteis clinicamente.

6. CONCLUSÕES

Não se observou diferença estatisticamente significativa entre a acurácia dos marcadores isolados (idade, CFA, AMH e FSH) na predição de MR à EOC em mulheres de aparente bom prognóstico.

Notou-se que a acurácia da fórmula foi significativamente maior do que cada marcador isolado (idade, CFA, AMH e FSH) na predição de MR à EOC em mulheres de aparente bom prognóstico.

Para a taxa de detecção de 50% e 80%, foram encontrados significativamente menos falsos positivos para a fórmula do que para os outros parâmetros, com melhores valores das LRs. Estes achados sugerem que a aplicação da fórmula pode apresentar utilidade moderada na prática clínica na predição de MR à EOC em mulheres de aparente bom prognóstico.

Desta forma, o presente estudo demonstrou que uma fórmula combinando os já conhecidos marcadores de resposta ovariana (idade, CFA, AMH e FSH) apresenta precisão preditiva superior à dos marcadores isolados na predição de MR à EOC em mulheres de aparente bom prognóstico. Foi questionado se esta fórmula poderá ser usada pra melhorar o custo-benefício na escolha de doses das gonadotrofinas para a EOC, bem como para adequar as expectativas do casal, já no primeiro ciclo de tratamento, o que precisa ser esclarecido mediante estudos com maiores casuísticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[1]

[1]De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

AL-AZEMI, M. et al. Multi-marker assessment of ovarian reserve predicts oocyte yield after ovulation induction. **Hum Reprod,** v. 26, n. 2, p. 414-22, Feb 2011.

ALMOG, B. et al. Age-related normograms of serum antimullerian hormone levels in a population of infertile women: a multicenter study. **Fertil Steril,** v. 95, n. 7, p. 2359-63, 2363 e1, Jun 2011.

ALMOG, B. et al. Embryo quality in controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization in young poor responders. **Gynecol Endocrinol,** v. 30, n. 9, p. 657-9, Sep 2014.

ALPHA SCIENTISTS IN REPRODUCTIVE, M.; EMBRYOLOGY, E. S. I. G. O. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. **Hum Reprod,** v. 26, n. 6, p. 1270-83, Jun 2011.

BANCSI, L. F. et al. Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis. **Fertil Steril,** v. 79, n. 5, p. 1091-100, May 2003.

BARAD, D. H. Use of follicle-stimulating hormone test to predict poor response in in vitro fertilization. **Obstet Gynecol,** v. 106, n. 1, p. 196-7; author reply 197, Jul 2005.

BARAD, D. H.; WEGHOFER, A.; GLEICHER, N. Utility of age-specific serum anti-Mullerian hormone concentrations. **Reprod Biomed Online,** v. 22, n. 3, p. 284-91, Mar 2011.

BILJAN, M. M. et al. The outcome of IVF-embryo transfer treatment in patients who develop three follicles or less. **Hum Reprod,** v. 15, n. 10, p. 2140-4, Oct 2000.

BROEKMANS, F. J. et al. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. **Fertil Steril,** v. 94, n. 3, p. 1044-51, Aug 2010.

BROER, S. L. et al. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. **Hum Reprod Update,** v. 17, n. 1, p. 46-54, Jan-Feb 2011.

BROER, S. L. et al. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. **Hum Reprod Update,** v. 19, n. 1, p. 26-36, Jan-Feb 2013.

BROER, S. L. et al. Anti-Mullerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. **Hum Reprod Update,** v. 20, n. 5, p. 688-701, Sep-Oct 2014.

BROWN, J. R. et al. Variability of day 3 follicle-stimulating hormone levels in eumenorrheic women. **J Reprod Med,** v. 40, n. 9, p. 620-4, Sep 1995.

CHEN, S. L. et al. [Prediction of ovarian reserve, poor response and pregnancy outcome based on basal antral follicle count and age in patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer]. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao,** v. 31, n. 4, p. 572-7, Apr 2011.

CHOI, M. H. et al. Serum anti-Mullerian hormone levels as a predictor of the ovarian response and IVF outcomes. **Clin Exp Reprod Med,** v. 38, n. 3, p. 153-8, Sep 2011.

DE SUTTER, P.; DHONT, M. Poor response after hormonal stimulation for in vitro fertilization is not related to ovarian aging. **Fertil Steril,** v. 79, n. 6, p. 1294-8, Jun 2003.

ELDAR-GEVA, T. et al. Dynamic assays of inhibin B, anti-Mullerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. **Hum Reprod,** v. 20, n. 11, p. 3178-83, Nov 2005.

FANCHIN, R. et al. Anti-Mullerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 5, p. 1796-802, May 2007.

FERRARETTI, A. P. et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. **Hum Reprod,** v. 26, n. 7, p. 1616-24, Jul 2011.

FERTE-DELBENDE, C. et al. [Evaluation of the ovarian reserve]. **J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris),** v. 39, n. 8 Suppl 2, p. S27-33, Dec 2010.

FICICIOGLU, C. et al. Early follicular antimullerian hormone as an indicator of ovarian reserve. **Fertil Steril,** v. 85, n. 3, p. 592-6, Mar 2006.

FRAZIER, L. M. et al. Follicle-stimulating hormone and estradiol levels independently predict the success of assisted reproductive technology treatment. **Fertil Steril,** v. 82, n. 4, p. 834-40, Oct 2004.

GNOTH, C. et al. Final ART success rates: a 10 years survey. **Hum Reprod,** v. 26, n. 8, p. 2239-46, Aug 2011.

HARLOW, S. D. et al. Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 97, n. 4, p. 1159-68, Apr 2012.

HEALY, D. L. et al. Contributions of in vitro fertilization to knowledge of the reproductive endocrinology of the menstrual cycle. **Baillieres Clin Endocrinol Metab,** v. 1, n. 1, p. 133-52, Feb 1987.

HENDRIKS, D. J. et al. Expected poor ovarian response in predicting cumulative pregnancy rates: a powerful tool. **Reprod Biomed Online,** v. 17, n. 5, p. 727-36, Nov 2008.

HERSHLAG, A. et al. Interinstitutional variability of follicle-stimulating hormone and estradiol levels. **Fertil Steril,** v. 58, n. 6, p. 1123-6, Dec 1992.

HUBER, M. et al. Using the ovarian sensitivity index to define poor, normal, and high response after controlled ovarian hyperstimulation in the long gonadotropin-releasing hormone-agonist protocol: suggestions for a new principle to solve an old problem. **Fertil Steril,** v. 100, n. 5, p. 1270-6, Nov 2013.

JAYAPRAKASAN, K. et al. The interobserver reliability of off-line antral follicle counts made from stored three-dimensional ultrasound data: a comparative study of different measurement techniques. **Ultrasound Obstet Gynecol,** v. 29, n. 3, p. 335-41, Mar 2007.

JAYAPRAKASAN, K. et al. A prospective, comparative analysis of anti-Mullerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. **Fertil Steril,** v. 93, n. 3, p. 855-64, Feb 2010a.

JAYAPRAKASAN, K. et al. The cohort of antral follicles measuring 2-6 mm reflects the quantitative status of ovarian reserve as assessed by serum levels of anti-Mullerian hormone and response to controlled ovarian stimulation. **Fertil Steril,** v. 94, n. 5, p. 1775-81, Oct 2010b.

JEPPESEN, J. V. et al. Which follicles make the most anti-Mullerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. **Mol Hum Reprod,** v. 19, n.8, p. 519-27, Aug 2013.

JENNINGS, J. C.; MORELAND, K.; PETERSON, C. M. In vitro fertilisation. A review of drug therapy and clinical management. **Drugs,** v. 52, n. 3, p. 313-43, Sep 1996.

KILIC, S. et al. Obesity alters retrieved oocyte count and clinical pregnancy rates in high and poor responder women after in vitro fertilization. **Arch Gynecol Obstet,** v. 282, n. 1, p. 89-96, Jul 2010.

KLINKERT, E. R. et al. The antral follicle count is a better marker than basal follicle-stimulating hormone for the selection of older patients with acceptable pregnancy prospects after in vitro fertilization. **Fertil Steril,** v. 83, n. 3, p. 811-4, Mar 2005.

KWEE, J. et al. Evaluation of anti-Mullerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve. **Fertil Steril,** v. 90, n. 3, p. 737-43, Sep 2008.

LA MARCA, A. et al. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). **Hum Reprod Update,** v. 16, n. 2, p. 113-30, Mar-Apr 2010.

LEKAMGE, D. N. et al. Anti-Mullerian hormone as a predictor of IVF outcome. **Reprod Biomed Online,** v. 14, n. 5, p. 602-10, May 2007.

LIMA, M. L. et al. The assessment of ovarian reserve by antral follicle count in ovaries with endometrioma. **Ultrasound Obstet Gynecol**, Dec 2014.

LIMA, M. L. et al. Antral follicle count might be underestimated in the presence of an ovarian endometrioma. **Hum Reprod,** v. 30, n. 1, p. 250, Jan 2015.

MAHESHWARI, A.; STOFBERG, L.; BHATTACHARYA, S. Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology--a systematic review. **Hum Reprod Update,** v. 13, n. 5, p. 433-44, Sep-Oct 2007.

MAMAN, E. et al. ICSI increases ongoing pregnancy rates in patients with poor response cycle: multivariate analysis of 2819 cycles. **Reprod Biomed Online,** v. 25, n. 6, p. 635-41, Dec 2012.

McILVEEN, M.; SKULL, J. D.; LEDGER, W. L. Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. **Hum Reprod,** v. 22, n. 3, p. 778-85, Mar 2007.

MELO, M. A. et al. Antral follicle count (AFC) can be used in the prediction of ovarian response but cannot predict the oocyte/embryo quality or the in vitro fertilization outcome in an egg donation program. **Fertil Steril,** v. 91, n. 1, p. 148-56, Jan 2009.

MOOLENAAR, L. M. et al. High live birth rate in the subsequent IVF cycle after first-cycle poor response among women with mean age 35 and normal FSH. **Reprod Biomed Online,** v. 27, n. 4, p. 362-6, Oct 2013.

MUTLU, M. F. et al. Antral follicle count determines poor ovarian response better than anti-Mullerian hormone but age is the only predictor for live birth in in vitro fertilization cycles. **J Assist Reprod Genet,** v. 30, n. 5, p. 657-65, Jun 2013.

NELSON, S. M.; YATES, R. W.; FLEMING, R. Serum anti-Mullerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles--implications for individualization of therapy. **Hum Reprod,** v. 22, n. 9, p. 2414-21, Sep 2007.

NELSON, S. M. et al. Anti-Mullerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. **Hum Reprod,** v. 24, n. 4, p. 867-75, Apr 2009.

NELSON, S. M. Biomarkers of ovarian response: current and future applications. **Fertil Steril,** v. 99, n. 4, p. 963-9, Mar 2013.

NELSON, S. M.; KLEIN, B. M.; ARCE, J. C. Comparison of antimullerian hormone levels and antral follicle count as predictor of ovarian response to controlled ovarian stimulation in good-prognosis patients at individual fertility clinics in two multicenter trials. **Fertil Steril,** v. 103, n. 4, p. 923-930 e1, Apr 2015.

OLIVEIRA, J. B. et al. A new ovarian response prediction index (ORPI): implications for individualised controlled ovarian stimulation. **Reprod Biol Endocrinol,** v. 10, p. 94, Nov 2012.

ORVIETO, R. et al. GnRH agonist versus GnRH antagonist in controlled ovarian hyperstimulation: their role in patients with an unfavorable prognosis a priori. **Fertil Steril,** v. 91, n. 4 Suppl, p. 1378-80, Apr 2009.

OUDENDIJK, J. F. et al. The poor responder in IVF: is the prognosis always poor?: a systematic review. **Hum Reprod Update,** v. 18, n. 1, p. 1-11, Jan-Feb 2012.

PENARRUBIA, J. et al. Previous cycle cancellation due to poor follicular development as a predictor of ovarian response in cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment. **Hum Reprod,** v. 20, n. 3, p. 622-8, Mar 2005.

RIDDLE, D. L.; STRATFORD, P. W. Interpreting validity indexes for diagnostic tests: an illustration using the Berg balance test. **Phys Ther,** v. 79, n. 10, p. 939-48, Oct 1999.

SCOTT, R. T., JR. et al. Intercycle variability of day 3 follicle-stimulating hormone levels and its effect on stimulation quality in in vitro fertilization. **Fertil Steril,** v. 54, n. 2, p. 297-302, Aug 1990.

SIMONI, M.; NIESCHLAG, E.; GROMOLL, J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. **Hum Reprod Update,** v. 8, n. 5, p. 413-21, Sep-Oct 2002.

SOMIGLIANA, E. et al. IVF outcome in poor responders failing to produce viable embryos in the preceding cycle. **Reprod Biomed Online,** v. 26, n. 6, p. 569-76, Jun 2013.

SOWERS, M. R. et al. Follicle stimulating hormone and its rate of change in defining menopause transition stages. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 93, n. 10, p. 3958-64, Oct 2008.

STEPTOE, P. C.; EDWARDS, R. G. Birth after the reimplantation of a human embryo. **Lancet,** v. 2, n. 8085, p. 366, Aug 1978.

TUTUNCU, L.; DUNDAR, O. Increasing the stimulation dose of rFHS in unexpected poor responders is not associated with better IVF outcome. **Ginekol Pol,** v. 83, n. 2, p. 111-5, Feb 2012.

VAN ROOIJ, I. A. et al. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. **Hum Reprod,** v. 17, n. 12, p. 3065-71, Dec 2002.

VELEVA, Z. et al. An initial low response predicts poor outcome in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection despite improved ovarian response in consecutive cycles. **Fertil Steril,** v. 83, n. 5, p. 1384-90, May 2005.

VRONTIKIS, A. et al. Antral follice counts (AFC) predict ovarian response and pregnancy outcomes in oocyte donation cycles. **J Assist Reprod Genet,** v. 27, n. 7, p. 383-9, Jul 2010.

WEENEN, C. et al. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. **Mol Hum Reprod,** v. 10, n. 2, p. 77-83, Feb 2004.

YOO, J. H. et al. Age specific serum anti-Mullerian hormone levels in 1,298 Korean women with regular menstruation. **Clin Exp Reprod Med,** v. 38, n. 2, p. 93-7, Jun 2011.

ANEXO DE PUBLICAÇÃO

A formula combining age, AMH, AFC, and FSH is more accurate than the individual parameters to predict poor ovarian response in good prognosis women

Running title: Prediction of poor ovarian response

Maurilio B. Palhares JR, Wellington P. Martins, Gustavo S. Romão, Rui A. Ferriani, Paula A. Navarro

Department of Obstetrics and Gynecology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo (FMRP-USP), Ribeirao Preto, Brazil.

Correspondent author: Paula A Navarro. Av. Bandeirantes, 3900 - 8 andar - Campus Universitário; Ribeirao Preto; Sao Paulo; Brazil. 14048-900; Phone: +55(16)3602-2583; Fax:+55(16)3633-0946; e-mail: pnavarro@fmrp.usp.br

Capsule

A formula combining age, AMH, AFC, and FSH is more accurate than the individual parameters to predict poor ovarian response in good prognosis women.

Abstract

Objective: To compare the accuracy of age, antimullerian hormone (AMH), antral follicle count (AFC) and follicle stimulating hormone (FSH) to predict poor ovarian response (POR) to controlled ovarian stimulation (COS) in good prognosis women. **Design:** Prospective cohort. **Patients:** Good prognosis women, defined as those with age <40 years, basal FSH < 10 mIU/mL, and body mass index (BMI) <30 Kg/m² undergoing their first COS for oocyte retrieval. **Main outcome measures:** POR, defined as ≤3 oocytes retrieved or cycle cancelation before oocyte retrieval due to a poor ovarian response. We performed a linear regression to determine a formula to predict POR using age and the logarithm regression of AFC, AMH and FSH. We assessed the predictive accuracy by the area under ROC curve (AUROC) for each isolated marker or combined in a formula. Additionally, we examined the cut-off values and false positive rates for predicting POR with a detection rate of 50% and 80%. **Results:** We evaluated 141 women who were submitted to COS and oocyte retrieval; 45 (32%) had POR. The formula to predict poor ovarian response was 0.024 + 0.017*Age - 0.403*LogAFC - 0.339*LogAMH + 0.204*LogFSH. The AUROC of the formula (0.82) was significantly higher than the observed for the isolated parameters (age = 0.67, AFC = 0.74, AMH = 0.75, FSH = 0.61). **Conclusions:** A formula combining age, AMH, AFC, and FSH is more accurate than the individual parameters to predict POR in good prognosis women.

Keywords: Poor ovarian response; Antimullerian hormone; Antral follicle count; Follicle stimulating hormone; Assisted reproductive techniques.

Introduction

The controlled ovarian stimulation (COS) allows the growing of multiple follicles, increasing the number of oocyte retrieved and available embryos, improving the reproductive outcomes of women undergoing IVF/ICSI (1,2). Poor ovarian response (POR) to COS is currently considered the most important factor that negatively affects the chance of achieving pregnancy, reducing the chance of getting pregnant by approximately 2/3 (3,4). The prevalence of POR is widely variable, being higly dependent on the characteristic of the women, particularly their age (5-9). Anticipating POR is important for clinical practice, permitting individualization of COS (10-12), using interventions - as testosterone pre-treatment - that might be useful for these women (13,14), and also for adjusting their expectation of achieving a pregnancy by IVF/ICSI.

The main causes of POR is a reduced ovarian reserve (5), sub-optimal exposure to gonadotropins due to obesity (15), or because the follicle stimulating hormone (FSH) receptor are less responsive (16). However, we frequently observe POR in young non-obese women (17,18), and predict these cases is still a clinical challenge. The mostly used markers to predict POR are age, antimullerian hormone (AMH) (19-22), antral follicle count (AFC) (23-29), and FSH (30). However, none of these parameters yields a very good predictive accuracy; and combining them might be able to provide better tools for this purpose (31)

The objective of this study is to compare the accuracy of these biomarkers (age AMH, AFC, FSH) isolated or combined in a formula, to predict POR to COS in women with good reproductive prognosis.

Methods

Study design

Prospective cohort.

Setting

The study was conducted as the University Fertility Center from FMRP-USP, Brazil. The study was approved in our institutional review board; all eligible women agreed to participate and provided written consent.

Participants

The study included all subsequent women treated in our center from Feb-2008 to Jan-2009 that met the following criteria: age <40 years, first cycle of COS for oocyte retrieval, FSH <10 IU/L (obtained at third to fifth day of natural cycle in the last 6 months), and body mass index (BMI) <30 Kg/m².

Blood sampling and dosage

The blood sample was collected in EDTA tubes, in the third to fifth day of natural cycle of patients using currently no medications (hormonal or not), and stored at -80^{0}C for no more than 2 years. All dosages were performed for one single experienced technician with no access to the participant's clinical data.

Stimulation protocol

Patients had their cycles synchronized with combined oral contraceptives, began at the follicular phase of the natural cycle previous the COS, which were suspended five days before the beginning of controlled ovarian stimulation. We performed pituitary down-regulation with Leuprolide 0,5 mg/day subcutaneously, initiated 10 days before starting the COS, and maintained throughout the cycle until the trigger. Women also used 200-225 international units (IU) per day of recombinant FSH on the first 6 days of COS. From the seventh day forth, the gonadotropin dose was adjusted following the service protocol, depending on follicular growth. The triggering was performed with 250µg of recombinant human chorionic gonadotropin (hCG) when there were at least 3 follicles ≥17mm and oocyte retrieval was performed after 34-36 h. Embryo grading was recorded according to published criteria (32) Cleavage stage embryos were transferred 2-3 days after ICSI. The luteal phase was supported with vaginal micronized progesterone 600 mg/day.

Poor ovarian response (POR) criteria for cycle cancelation

The cycle was cancelled when there was no follicle with diameter ≥10 mm after 10 days of COS or after 4 to 5 additional treatment days without any follicle ≥18 mm (33)

Variables and data sources

For all evaluated parameters the unit of analysis was the number of women. Primary outcome was the number of retrieved oocytes. We also evaluated age, height, weight, BMI, AMH, ACF, FSH and endometrial thickness on the day of the hCG administration. When cases were cancelled prior to oocyte retrieval or embryo transfer we considered no oocytes was retrieved. All women were included in the data analysis.

AMH and FSH were assessed during the early follicular phase of the cycle preceding the stimulation. Serum FSH was determined by chemoluminescence immunoassay (IMMMULITE 2000, DPC MED LAB, Los Angeles, USA) with specific kits provided by SIEMENS and serum AMH was determined by ELISA with specific kits (Immunotech, Beckman-Coulter, Pasadena, USA). The coefficients of variability for FSH was 0.1 mIU/ml for functional sensitivity and 2.9% for intra-assay coefficient of variability. For AMH, the functional sensitivity was 0.7 pmol/l and intra-assay variability was 2,4%. Since only one kit was used per hormonal dosage, no interassay coefficient of variability was estimated. AFC was measured with transvaginal ultrasound, performed by one of four trained specialists, using GE's Volusson equipment. The exam took place at first day of COS (5 days after stopping combined oral contraceptive pills) and antral follicles with average transverse diameter of 2 to 10 mm were counted, in consonance to international standardized recommendations (34)

POR was defined as cycle cancelation due to poor response (33), or ≤ 3 oocytes retrieved (35)

Bias

To avoid selection bias, we analyzed the first COS cycle of all subsequent eligible women treated at our center during the study period. To avoid performance bias, the clinical decisions for the study subjects were made following the institution standard protocol, by physicians that did not participate in the study. To avoid detection bias, all samples were stored accordingly to the highest current safety standards, and a single capacitated and experienced professional, blind to the clinical data, performed all the dosages using standardized equipment and techniques.

Study size

The study size was determined by the total of eligible women treated at our center between February 2008 and January 2009.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by one of the authors (WPM) using SPSS (Version 18.0, SPSS Inc. Chigaco, IL) and MedCalc (Version 12.7, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium). Since most of the parameters didn't have a normal distribution, data were presented as median and interquartile range (IQR) and comparison between women with and without POR were performed by using Mann-Whitney test. Additionally we performed a linear regression to determine a formula to predict POR using age and the logarithm regression of AFC, AMH and FSH. We assessed the area under ROC curve of age, AFC, AMH, FSH, and the formula for predicting POR. Additionally we assessed the cut-off values for all these parameters in order to have a detection rate (DR) of approximately 50% and 80%, determining the false positive rate (FPR), the positive likelihood ratio (DR/FPR) and the negative likelihood ratio (FPR/DR). For the interpretation, we considered that likelihood ratios greater than 10 or less than 0.1 generate large and often conclusive changes from pretest to posttest probability. Likelihood ratios between 5 and 10 or between 0.2 and 0.1 generate moderate changes from pretest to posttest probability. Likelihood ratios from 2 to 5 and from 0.5 to 0.2 result in small (but sometimes important) shifts in probability, and likelihood ratios from 0.5 to 2 result in small and rarely important changes in probability (36).

Results

Participants

From February 2008 to January 2009, 289 patients participated in the public assisted reproduction program at our service and were submitted to COS for ICSI. 139 were not eligible: 86 women were above 40 years and/or had basal FSH ≥10 mIU/mL; 40 women had BMI ≥30 Kg/m^2; 13 cases in which the ICSI used invasive procedure to obtain sperm. The 150 eligible cases were interviewed; 141 accepted to participate in the study: we assessed the AMH, FSH and AFC from all these 141 women (Figure 1).

Descriptive data and outcome data

From the 141 analyzed women, 45 (32%) had POR. The groups were not statistically different regarding weight, height, BMI and endometrial thickness at the day of HCG administration (Table 1). However, age, AMF, AFC and FSH were significantly different between groups as well as the number of oocytes retrieved and available embryos after ICSI (Table 1).

Main results

Area under the ROC curve (AUROC) was calculated for each of the variables isolated (age, AMH, AFC, AFC) or combined in a formula for prediction of POR to COS are presented in Figure 1 and Table 2. There was no statistically significant difference in AUROC when comparing individual parameters; however, we observed significant differences in all comparisons between the formula and the individual parameters (Table 2).

Other analyses

We analyzed the cut-off values and false positive rates for obtaining detection rates of 50% and 80% for prediction of POR to COS for each of the variables isolated (age, AMH, AFC, AFC) or combined in a formula, and also the respective positive and negative likelihood ratios (LR+ and LR-) (Table 3).

Discussion

Key Results

Of 141 good prognosis patients submitted do ICSI, 45 (32%) presented POR to COS, and 96 (68%) did not. The two groups were statistically similar in weight, height, BMI and endometrial thickness at the day of HCG administration. The POR group had higher age an FSH, and lower AMH and AFC than the NPOR group. Also there were proportionally less oocytes retrieved and fewer embryos formed in the POR group. The AUROC observed for the formula was significantly higher than for the isolated markers (age, AFC, AMH, and FSH) that had similar $_{\text{AUROC}}$, suggesting that it is more accurate than individual markers in predicting POR to COS in good prognosis patients.

Limitations

This study is limited by the its sample size. Additional studies with greater and different populations are needed to validate these findings.

Interpretation

Comparing AUROC, all parameters (age FSH, AMH and AFC) were individually

similar in predicting POR to COS in good prognosis patients. However, the formula had statistically superior AUROC and thus higher detection rates, to predict POR to COS than each of the analyzed markers alone. In Addiction to this, the formula achieved better likelihood ratios than each of the separated markers, meaning that the information provided with the formula is more clinically relevant, and alters the pretest probability in a higher rate than the markers alone, in both situations: normal or altered results.

Generalizability

Our study corroborates and expands previous findings. A study proposed an index to predict ovarian response (31), in a similar young and not obese population, but included up to 40% of male factor etiology. Also the cited group did not evaluate FSH, which remains an important and ubiquitous marker in many fertility services. By focusing our study in a population composed of young, non obese women, with normal FSH, and no severe male factor, submitted to its first treatment, we believe our findings are more adequate to face the clinical challenge which is to predict POR when it is least expected.

Another study compared AMH and AFC as predictors of POR (37). It adopted less strict criteria, including patients up to 41 years and with basal FSH of up to 12 mIU/mL, including patients who would have expected poor prognosis even at first ART treatment. Also, it found no difference between AMH and AFC and suggested that AMH could be abandoned. We found that combining all the parameters in a POR prediction formula provides more valid clinical information, improving decision-making and patient care. Besides, any improvement in identifying the POR candidates among the otherwise good prognosis patients, already in theirs first cycle, will lead to better adjustment of stimulation protocols and may prove cost-beneficial.

A more recent review of two multicenter trials (22) found AMH to be a better predictor than AFC in good prognosis patients, and AFC provided no additional predictive value to AMH. Our findings demonstrated that both markers had the same accuracy for predicting POR in good prognosis patients. Considering that AFC is performed before beginning COS with no additional cost, it is questionable the utility of measuring AMH in these women. Moreover, our findings demonstrate that joining these two predictors with FSH and age in a formula provides additional predictive value to each of the isolated markers.

Conclusions

The formula combining age, AMH, AFC and FSH is more accurate to predict POR to COS than each marker isolated in good prognosis infertile patients.

Footnotes

Authorship: Conception and design (PAN, WPM); data collection (MBPJ, PAN); data analysis and interpretation (WPM, PAN); writing the article (MBPJ, WPM, PAN); revising it for important intellectual content (MBPJ, WPM, GSR, RAF, PAN,). All authors had full access to all the data in the study and approved the final manuscript.

Funding: During this study, the authors received financial support from National Institute of Hormones and Woman's Health, CNPq, Brazil. This institution had no influence on the study design, interpretation of data, or the decision to publish the results.

Competing interests: All authors declare no relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

Ethical approval: Our department's research committee approved this study.

References

1. Martins WP et al. Ultrasound for monitoring controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Ultrasound Obstet Gynecol 2014;43:25-33.
2. Nastri CO et al. Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology, staging, prediction and prevention. Ultrasound Obstet Gynecol 2015;45:377-93.
3. Stern JE et al. Live birth rates and birth outcomes by diagnosis using linked cycles from the SART CORS database. J Assist Reprod Genet 2013;30:1445-50.
4. Coelho Neto MA et al. Ovarian response rather than thin endometrium or the presence of an endometrioma is a better predictor of clinical pregnancy rates following embryo transfer. Ultrasound Obstet Gynecol, Apr 23 2015. [Epub ahead of print].
5. Biljan MM et al. The outcome of IVF-embryo transfer treatment in patients who develop three follicles or less. Hum Reprod 2000;15:2140-4.
6. De Sutter P Dhont M. Poor response after hormonal stimulation for in vitro fertilization is not related to ovarian aging. Fertil Steril 2003;79:294-8.
7. Veleva Z et al. An initial low response predicts poor outcome in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection despite improved ovarian response in consecutive cycles. Fertil Steril 2005;83:384-90.
8. Hendriks DJ et al. Expected poor ovarian response in predicting cumulative pregnancy rates: a powerful tool. Reprod Biomed Online 2008;17:727-36.
9. Orvieto R et al. GnRH agonist versus GnRH antagonist in controlled ovarian hyperstimulation: their role in patients with an unfavorable prognosis a priori. Fertil Steril 2009;91:1378-80.

10. Figueiredo JB et al. Clomiphene combined with gonadotropins and GnRH antagonist versus conventional controlled ovarian hyperstimulation without clomiphene in women undergoing assisted reproductive techniques: systematic review and meta-analysis. Arch Gynecol Obstet 2013;287:779-90.
11. La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. Hum Reprod Update 2014;20:124-40.
12. Teixeira DM, Martins WP. The two sides of the individualization of controlled ovarian stimulation. Hum Reprod Update 2014;20:614.
13. Gonzalez-Comadran M et al. Effects of transdermal testosterone in poor responders undergoing IVF: systematic review and meta-analysis. Reprod Biomed Online 2012;25:450-9.
14. Kim CH et al. Ovarian Features after 2 Weeks, 3 Weeks and 4 Weeks Transdermal Testosterone Gel Treatment and Their Associated Effect on IVF Outcomes in Poor Responders. Balsaenggwa Saengsig 2014;18:145-52.
15. Maheshwari A, Stofberg L, Bhattacharya S. Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology--a systematic review. Hum Reprod Update 2007;13:433-44.
16. Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. Hum Reprod Update 2002;8:413-21.
17. Tutuncu L, Dundar O. Increasing the stimulation dose of rFHS in unexpected poor responders is not associated with better IVF outcome. Ginekol Pol 2012;83:111-5.

18. Moolenaar LM et al. High live birth rate in the subsequent IVF cycle after first-cycle poor response among women with mean age 35 and normal FSH. Reprod Biomed Online 2013;27:362-6.
19. Ficicioglu C et al. Early follicular antimullerian hormone as an indicator of ovarian reserve. Fertil Steril 2006;85:592-6.
20. McIlveen M, Skull JD, Ledger WL. Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. Hum Reprod 2007;22:78-85.
21. Polyzos NP et al. Predictors of ovarian response in women treated with corifollitropin alfa for in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2013;100:430-7.
22. Nelson SM, Klein BM, Arce JC. Comparison of antimullerian hormone levels and antral follicle count as predictor of ovarian response to controlled ovarian stimulation in good-prognosis patients at individual fertility clinics in two multicenter trials. Fertil Steril 2015;103:923-930 e1.
23. Eldar-Geva T et al. Dynamic assays of inhibin B, anti-Mullerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. Hum Reprod 2005;20:3178-83.
24. Kwee J et al. Evaluation of anti-Mullerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve. Fertil Steril 2008;90:37-43.
25. Melo MA et al. Antral follicle count (AFC) can be used in the prediction of ovarian response but cannot predict the oocyte/embryo quality or the in vitro fertilization outcome in an egg donation program. Fertil Steril 2009;91:148-56.

26. Jayaprakasan K et al. A prospective, comparative analysis of anti-Mullerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. Fertil Steril 2010;93:855-64.
27. Vrontikis A et al. Antral follice counts (AFC) predict ovarian response and pregnancy outcomes in oocyte donation cycles. J Assist Reprod Genet 2010;27:83-9.
28. Broer SL et al. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. Hum Reprod Update 2011;17:46-54.
29. Mutlu MF et al. Antral follicle count determines poor ovarian response better than anti-Mullerian hormone but age is the only predictor for live birth in in vitro fertilization cycles. J Assist Reprod Genet 2013;30:657-65.
30. Frazier LM et al. Follicle-stimulating hormone and estradiol levels independently predict the success of assisted reproductive technology treatment. Fertil Steril 2004;82:834-40.
31. Oliveira JB et al. A new ovarian response prediction index (ORPI): implications for individualised controlled ovarian stimulation. Reprod Biol Endocrinol 2012;10:94.
32. Alpha Scientists in Reproductive M, Embryology ESIGO. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Hum Reprod 2011;26:1270-83.
33. Penarrubia J et al. Previous cycle cancellation due to poor follicular development as a predictor of ovarian response in cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment. Hum Reprod 2005;20:622-8.
34. Broekmans FJ et al. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. Fertil Steril 2010;94:1044-51.

35. Ferraretti AP et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. Hum Reprod 2011;26:1616-24.
36. Riddle DL, Stratford PW. Interpreting validity indexes for diagnostic tests: an illustration using the Berg balance test. Phys Ther 1999;79:939-48.
37. Jayaprakasan K et al. The cohort of antral follicles measuring 2-6 mm reflects the quantitative status of ovarian reserve as assessed by serum levels of anti-Mullerian hormone and response to controlled ovarian stimulation. Fertil Steril 2010;94:1775-81.

Figures Legend

Figure 1: ROC curves for predicting poor ovarian response for age, antral follicle count (AFC), antimullerian hormone (AMH), follicle stimulating hormone (FSH) and a formula combining all these four parameters.

Figure 1

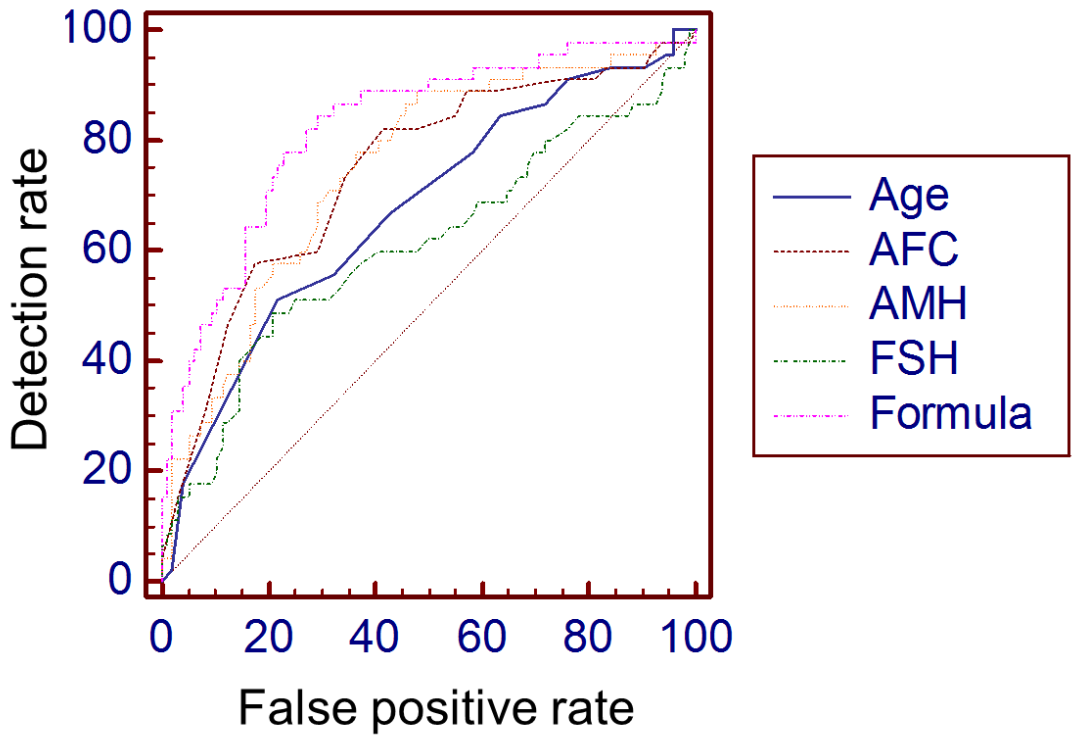
100
80
60
40
20
0
Detection rate
0
20
40
60
80
100
False positive rate
Age
AFC
AMH
FSH
Formula

Table 1 - Characteristics of the included women.

	POR (N=45)		Other women (N=96)		
	Median	**IQR**	**Median**	**IQR**	**P**
Age (years)	36	33.0 - 37.0	33	30.0 -35.0	0.001
Weight (kg)	61.1	53.7 - 72.1	60	55.1 - 67.0	0.76
Height (m)	1.62	1.57 - 1.65	1.6	1.58 -1.66	0.88
BMI (kg/m2)	22.9	20.9 - 26.5	23	21.2 - 25.2	0.8
AMH (ng/ml)	1	0.6 - 1.4	1.8	1.2 - 3.3	<0.001
AFC	5	3.0 - 8.0	10	6.0 -13.8	<0.001
FSH (mUI/ml)	6.9	4.6 - 9.1	5.9	4.1 - 6.9	0.04
Endometrial Thickness (mm)	10	8.9 - 11.9	11	9.2 -12.0	0.06
Oocytes Retrieved	2	1.0 - 3.0	7	5.0 - 11.0	<0.001
Embryos	1	0.0 – 2.0	3	2.3 - 5.0	<0.001

POR= poor ovarian response; **N0-POR=** no poor ovarian response; **IQR=** interquartile range 25% to 75%; **BMI=** body mass index; **AMH=** antimullerian hormone; **AFC=** antral follicle count; **FSH=** follicle stimulating hormone.

Table 2 - Area under the receiver operating characteristic curve for age, AMH, AFC and FSH isolated or combined in a formula, to predict poor ovarian response to controlled ovarian stimulation.

	AUROC	**95% CI**
Age	0.67	0.59 to 0.75
AFC	0.74	0.66 to 0.81
AMH	0.75	0.67 to 0.82
FSH	0.61	0.52 to 0.69
Formula	0.82	0.75 to 0.88
Pairwise comparison	**p**	
Age vs. AFC	0.27	
Age vs. AMH	0.22	
Age vs. FSH	0.42	
AFC vs. AMH	0.93	
AFC vs. FSH	0.06	
AMH vs. FSH	0.06	
Formula vs. Age	<0.01	
Formula vs. AFC	<0.01	
Formula vs. AMH	0.03	
Formula vs. FSH	<0.01	

AMH= antimullerian hormone; **AFC=** antral follicle count; **FSH=** follicle stimulating hormone; **AUROC=** area under the receiver operating characteristic curve;
Formula= 0.024+0.017*Age-0.403*LogAFC-0.339*LogAMH+0.204*LogFSH.

Table 3 - Cut-off values for predicting poor ovarian response with a detection rate of 50% and 80% for age, antral follicle count (AFC), anti-mullerian hormone (AMH), follicle stimulating hormone (FSH), and a formula combining all these for parameters.

	Detection rate = 50%				**Detection rate = 80%**			
	Cut-off	**FPR**	**LR+**	**LR-**	**Cut-off**	**FPR**	**LR+**	**LR-**
Age	≥35	22%	2.3	0.6	≥33	57%	1.3	0.5
AFC	≤4	13%	3.7	0.6	≤8	42%	1.9	0.3
AMH	≤1.0	18%	2.7	0.6	≤1.5	43%	1.8	0.3
FSH	≥7.0	24%	2	0.6	≥4.3	72%	1.1	0.7
Formula	≥0.50	10%	4.7	0.5	≥0.37	27%	3	0.2

FPR= false positive rate; **LR+ =** positive likelihood ratio; **LR- =** negative likelihood ratio**.**