**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia**

Bruno Ramalho de Carvalho

**Influência da endometriose sobre a resposta ovariana em ciclos de
reprodução assistida: provável associação com prejuízo do
desenvolvimento folicular, mas não do *pool* de reserva**

**Ribeirão Preto
2008**

Bruno Ramalho de Carvalho

Influência da endometriose sobre a resposta ovariana em ciclos de reprodução assistida: provável associação com prejuízo do desenvolvimento folicular, mas não do *pool* de reserva

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Tocoginecologia.

Área de concentração: Tocoginecologia

Orientador: Professora Doutora Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

**Ribeirão Preto
2008**

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.

Carvalho, Bruno Ramalho de.

Influência da endometriose sobre a resposta ovariana em ciclos de reprodução assistida: provável associação com prejuízo do desenvolvimento folicular, mas não do *pool* de reserva / Bruno Ramalho de Carvalho; orientador Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva.
-- Ribeirão Preto, 2008.

93p. il. 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Tocoginecologia.

1. Endometriose. 2. Reserva Ovariana. 3. Reprodução Assistida.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruno Ramalho de Carvalho

Influência da endometriose sobre a resposta ovariana em ciclos de reprodução assistida: provável associação com prejuízo do desenvolvimento folicular, mas não do *pool* de reserva

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Tocoginecologia.
Área de concentração: Tocoginecologia

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Professor Doutor _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Professor Doutor _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Professor Doutor _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha esposa, Ana Cyntia, amiga e companheira de todas as horas, que em tantos momentos abdicou da minha presença de fato e da minha atenção, e, nas dificuldades, fez do seu amor meu verdadeiro alicerce. Você também é protagonista desta história e sem sua força não teria concretizado este projeto.

A minha filha, Ana Clara, que me mostra a cada dia a tradução fiel da mais pura forma de amor. Você é a verdadeira razão para que o melhor de mim seja dado em de tudo o que faço e farei; e na sua existência está o sentido para apostar em novos sonhos.

A minha mãe, Lêda, referência maior de devoção, ética e perseverança, de quem há tanto me separei em busca de sonhos, mas a quem sempre recorro nos momentos de fraqueza e angústia. Sua orientação sempre será o norte para os meus atos e seu amor, suporte para os meus medos.

A minha irmã, Amanda, a “metade afastada de mim”, que, apesar da distância, é a parceira leal de uma vida inteira. Em você, me espelho em busca da perspicácia, da espontaneidade e da irreverência necessárias nos meus momentos freqüentes de extrema sistematicidade.

A minha grande família em toda a sua extensão, de onde emana a energia que me faz querer ser um homem cada vez melhor.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Doutora Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, por ter depositado em mim tamanha confiança, dividindo seus projetos, recebendo minhas idéias e me trilhando caminhos sempre novos para o conhecimento. A admiração e a amizade que vinham desde a residência médica encontraram no convívio quase diário subsídio para multiplicação imensurável.

Aos Professores Doutores Marcos Felipe Silva de Sá e Rui Alberto Ferriani, pelo apoio fundamental desde o início desta caminhada e a didática com que me fizeram refletir os preceitos metodológicos que guiaram esta e outras pesquisas.

Ao Professor Doutor Geraldo Duarte, pela insistência na fusão dos conhecimentos tácitos e explícitos, e o pulso firme em conduzir os primeiros passos dados como ginecologista e obstetra. Seu investimento na excelência dos residentes que forma é um motivo de inspiração.

Ao Professor Doutor Augusto Diogo Filho, primeira referência em pesquisa clínica, que me apresentou a ciência de fato durante o curso de Medicina na Universidade Federal de Uberlândia. Sem sua ajuda, amizade e dedicação de outrora, este mestrado não estaria acontecendo.

Às Professoras Doutoras Rosana Maria dos Reis, Maristela Carbol Patta e Silvana Maria Quintana, pelas tantas orientações e projetos, dando vazão a minha curiosidade e cedendo oportunidades a minha incansável vontade de sorver e transmitir conhecimentos.

Ao Doutor Júlio César Rosa e Silva, pela autenticidade com que opinou em diversos momentos deste estudo e a disponibilidade de ajudar nas análises estatísticas dos dados coletados; também, por dividir seu conhecimento nos trabalhos paralelos sobre a endometriose, uma paixão comum.

Aos médicos e professores ligados ao Setor de Reprodução Humana do HCFMRP-USP, pela convivência harmoniosa e as oportunidades de crescimento acadêmico e profissional, em especial às Professoras Doutoras Paula Andréia Navarro, Marta Edna Yazzle e Carolina Sales Vieira, e aos médicos Rodrigo Alves Ferreira, Hermes de Freitas Barbosa, Luiz Alberto Manetta e Stael Porto Leite.

Aos colegas Jacira Campos, Luciana Rezende, Lauriane Abreu, Lúcia Lara, Gustavo Mafaldo, Rodolpho Vieira, Ionara Barcelos, Tânia Borges, Sany Ferrarese, Emília Jalil, Wellington Martins, Milena Brito, Luiz Guilherme Nicolau, Mayra Andozia, Alessandra Vireque e Elisa Melo, pelo aprendizado conjunto e solidário, a convivência alegre, a amizade, a troca de conhecimentos e os favores prestados durante esse período de pós-graduação.

Às amigas Maria Albina e Maria Cristina Araújo, pela amizade e presteza em vários momentos desta pesquisa.

Às técnicas do Laboratório de Imunologia, Muriel e Juliana, sem cuja ajuda não teria sido possível realizar esta pesquisa.

À equipe de enfermagem do Setor de Reprodução Humana do HCFMRP-USP, nas pessoas de Sandra Viana, Maria Auxiliadora e Marisa Blanco, pela ajuda na coleta dos dados.

Aos amigos André Alfredo, Eduardo Zanin, Julyce Basílio, Vinícius Bertarini, Glauco Silveira, Daniel Diógenes, Paulus Ramos e Viviane Schiavon, Rodrigo Arantes e Sandro Martins, por tantos ensinamentos na ciência da amizade.

A Taísa Abade, Suellen Soares, Ilza Mazzocato, Reinaldo Tavares, Ricardo e Rosane Casula, pela disponibilidade em garantir ajuda sempre que necessário.

Às participantes voluntárias desse estudo, a quem, por motivos éticos, não posso agradecer nominalmente, pela inestimável colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FAEPA, pelo apoio financeiro imprescindível na confecção desta pesquisa.

CERTEZAS

todo mundo tem certas.

exatas e equivocadas,
temporárias e insistentes,
inertes e rebeldes...

certas podem ser sãs e doentes.

as certas, geralmente,
são meninas de boa aparência
e, ainda, convenientes...

certas-mecanismo-de-defesa são freqüentes,
certas-mentira são ferramentas cotidianas,
certas-fé são para sobrevivência
e as certas de certeza, levianas...

certas, enfim, são o que lhes convém.

deve-se cuidar pra não ferir, contudo,
com novas certas as que já se tem...

acertar nas certas
pode ser errar nas possibilidades...

pois, se no dicionário,
certeza é a qualidade do certo,
fica a pergunta em aberto:

certo pra quem?

Bruno Ramalho de Carvalho, maio de 2005.

RESUMO

CARVALHO, B.R. **Influência da endometriose sobre a resposta ovariana em ciclos de reprodução assistida: provável associação com prejuízo do desenvolvimento folicular, mas não do *pool* de reserva.** 2008. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Introdução: A avaliação da reserva ovariana em reprodução assistida (RA) busca identificar mulheres em que a exaustão folicular determine as dificuldades reprodutivas. Além da idade, a presença de causas outras de subfertilidade, como a endometriose (EDT), implica interferências negativas potenciais sobre a resposta ovariana. **Objetivo:** Avaliar a reserva folicular ovariana de mulheres subférteis portadoras de endometriose e determinar o melhor preditor de má resposta em RA. **Métodos:** Foram analisados 87 ciclos de RA em mulheres com idade inferior a 40 anos, ciclos menstruais regulares, sem patologias endócrinas e com ambos os ovários, sendo 30 ciclos em portadoras de EDT (casos) e 57 ciclos em mulheres subférteis por fator masculino exclusivo (controles). A reserva ovariana foi inferida pelas dosagens basais dos hormônios anti-mülleriano (AMH) e folículo estimulante (FSH), a contagem de folículos antrais pequenos (CFA) e a medida do volume ovariano médio (VOM). Curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC – AUC) foram traçadas para avaliação da capacidade discriminatória de cada teste em identificar má resposta. **Resultados:** Pacientes com EDT apresentaram FSH basal significativamente maior em relação aos controles ($9,13 \pm 5,09$ mUI/mL vs. $6,28 \pm 2,45$ mUI/mL; $p < 0,05$), sem diferenças para AMH, CFA e VOM. O número total de oócitos aspirados foi menor na EDT em relação aos controles ($5,33 \pm 3,43$ vs. $8,28 \pm 5,8$; $p < 0,05$) e correlacionou-se significativamente com o AMH em ambos os grupos (EDT: $r = 0,61$; Controles: $r = 0,58$; $p < 0,0001$). O FSH basal apresentou correlação significativa com o total de oócitos aspirados apenas na EDT ($r = -0,48$; $p < 0,01$); também na EDT, o AMH basal foi o marcador individual com melhor potencial discriminatório para má resposta (AUC = 0,875), seguido de FSH basal (AUC = 0,682) e VOM (AUC = 0,665),

enquanto no grupo controle, o AMH foi o melhor marcador ($AUC = 0,8372$), seguido do VOM ($AUC = 0,709$) e da CFA ($AUC = 0,686$). **Conclusões:** O FSH basal está significativamente maior nas pacientes subférteis com EDT e correlaciona-se com a resposta em RA apenas nas portadoras da doença. Já o AMH basal, é o marcador com o melhor potencial discriminatório de má resposta, independentemente da presença da endometriose. CFA e VOM não se apresentaram como bons preditores de má resposta. Sendo assim, a associação entre endometriose e subfertilidade deve estar vinculada a alterações do crescimento/desenvolvimento do folículo ovariano e não a prejuízos sobre a reserva folicular gonadal propriamente dita.

DESCRITORES

Endometriose. Reserva Ovariana. Reprodução Assistida.

ABSTRACT

CARVALHO, B.R. **Endometriosis influence on ovarian response in assisted reproduction cycles: probable association with damage to follicular development, but not to follicular reserve.** 2008. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Introduction: Ovarian reserve evaluation in assisted reproduction (AR) aims to identify women in whom follicular exhaustion determines reproductive difficulties. More than age, the presence of other subfertility factors, such as endometriosis (EDT), implies potential negative interference on ovarian response. **Objective:** To evaluate follicular ovarian reserve in subfertile patients with endometriosis and determine the best predictor of poor response in AR. **Methods:** We evaluated 87 AR cycles of women presenting with less than 40 years of age, regular menses, no endocrine diseases and with both ovaries, divided in 30 EDT cycles (cases) and 57 cycles in women with subfertility associated to male factor (controls). Ovarian reserve was determined based on basal levels of anti-müllerian hormone (AMH) and follicle-stimulating hormone (FSH), small antral follicle count (AFC) and medium ovarian volume (MOV). Receiver Operating Characteristic curves (ROC – AUC) were obtained for evaluation of discriminatory capacity of each test in identifying poor response. **Results:** EDT patients presented significantly higher basal FSH levels when compared to controls ($9,13 \pm 5,09$ mUI/mL vs. $6,28 \pm 2,45$ mUI/mL; $p < 0,05$) and there were no differences in AMH, AFC and MOV between groups. The total number of oocytes retrieved was lower in endometriosis when compared to controls ($5,33 \pm 3,43$ vs. $8,28 \pm 5,8$; $p < 0,05$) and significantly correlated with AMH in both groups (EDT: $r = 0,61$; Control: $r = 0,58$; $p < 0,0001$). Basal FSH presented significant correlation with the number of oocytes retrieved only among EDT patients ($r = -0,48$; $p < 0,01$); in EDT patients, either, basal AMH was the individual marker with the best discriminatory potential for poor responders identification (AUC = 0,875), followed by basal FSH (AUC = 0,682) and MOV (AUC = 0,665), whereas among controls, AMH was the best

marker (AUC = 0,8372), followed by MOV (AUC = 0,709) and AFC (AUC = 0,686).

Conclusions: Basal FSH is significantly higher in subfertile patients with endometriosis and correlates with ovarian response in AR among these patients. Basal AMH, by the way, is the individual marker with the best discriminatory potential in determining poor response, which is not dependent on endometriosis presence. AFC and MOV did not presented as good predictors of poor response. The association between endometriosis and subfertility, therefore, may be linked to prejudice to growth/development of the ovarian follicle, but not to damage to the real ovarian follicular reserve.

KEYWORDS

Endometriosis. Ovarian Reserve. Assisted Reproduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modulação do recrutamento e do desenvolvimento folicular pelo hormônio anti-mülleriano.	24
Figura 2. Perfil metodológico do estudo.	37
Figura 3. Marcadores basais de reserva ovariana em pacientes subfêrteis portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo)	42
Figura 4. Correlações (r) entre os marcadores de reserva ovariana e o número de folículos com diâmetro médio ≥ 18 mm no dia de administração da hCG, em portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo)	45
Figura 5. Correlações (r) entre os marcadores de reserva ovariana e o número total de oócitos aspirados, em portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo).	46
Figura 6. Curvas <i>Receiver Operator Characteristic</i> (ROC) para Idade, Hormônio Folículo-Estimulante e (FSH) e Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) como preditores de má resposta, em portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e dose de gonadotrofina utilizada para o estímulo ovariano em pacientes subférteis portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo).....	40
Tabela 2. Marcadores basais de reserva ovariana em pacientes subférteis portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo).....	41
Tabela 3. Variáveis de resposta ovariana ao estímulo gonadotrófico exógeno em pacientes subférteis portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo).....	41
Tabela 4. Correlações entre os marcadores de reserva ovariana e a resposta ao estímulo em ciclos de reprodução assistida, em portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo).....	44
Tabela 5. Marcadores de reserva ovariana em pacientes subférteis portadoras de endometriose e controles, de acordo com o número total de oócitos aspirados	49

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Contexto	18
1.2. Avaliação de reserva e resposta ovariana	20
1.2.1. Estradiol e inibina-B basais	21
1.2.2. Hormônio folículo-estimulante basal	22
1.2.3. Testes dinâmicos de estimulação ovariana	23
1.2.4. Hormônio anti-mülleriano basal	23
1.2.5. Contagem de folículos antrais	25
1.2.6. Volume ovariano	26
1.3. Endometriose e subfertilidade	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. CASUÍSTICA E METODOLOGIA	32
3.1. Casuística	32
3.2. Estimativa da amostra	33
3.3. Métodos	33
3.3.1. Avaliação ovariana basal	33
3.3.2. Metodologia das dosagens	34
3.3.3. Protocolo de indução	35
3.3.4. Avaliação da resposta ovariana	35
3.4. Análises estatísticas	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Reserva ovariana: endometriose <i>versus</i> controles (fator masculino exclusivo)	40
4.2. Correlações: marcadores de reserva <i>versus</i> a resposta ao estímulo	42
4.3. Marcadores de reserva ovariana e predição de má resposta ao estímulo	47

5. DISCUSSÃO	51
5.1. Reserva e resposta ovariana em mulheres subférteis portadoras de endometriose	51
5.2. Marcadores de reserva ovariana: correlações com a resposta a RA na endometriose ..	54
5.3. Marcadores de reserva ovariana e predição de má resposta ao estímulo	57
6. CONCLUSÕES.....	63
7. REFERÊNCIAS	65
8. APÊNDICES.....	77
APÊNDICE A – Carvalho BR et al. Ovarian Reserve Evaluation: State of the art. J Assist Reprod Gen 2008;25:311-322.....	77
APÊNDICE B – Termo de consentimento de guarda de material	89
APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido	91

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONTEXTO

A dissipação dos movimentos feministas e a crescente inserção da mulher no mercado profissional ao longo da segunda metade do século XX foram fatores determinantes da remodelação de seu papel social e resultaram em nítida tendência de se postergar a maternidade (LERIDON, 1998). Estudos demonstram a expressiva multiplicação na proporção de nascimentos em mulheres com idade igual ou superior a 35 anos entre as décadas de 1970 e 1990, especialmente nos países desenvolvidos, onde se estima que tais eventos possam corresponder a mais de 25% dos nascimentos até o fim da década atual (TE VELDE & PEARSON, 2002).

Conquanto seja um reflexo de um processo que vislumbra a equidade sócio-econômica entre os gêneros, a pressão da sociedade moderna pelo adiamento da maternidade desconsidera inadvertidamente a finitude da função reprodutiva feminina e implica um aumento na prevalência da subfertilidade (TE VELDE & PEARSON, 2002), tornando-se cada vez maior a procura por serviços de reprodução assistida (RA).

Como resultado desse aumento, especial atenção tem sido dada à avaliação do potencial reprodutivo frente ao esperado envelhecimento ovariano. A perda progressiva da população folicular ovariana é demonstrada desde meados do século XX, estimada como sendo da ordem de 75% entre 30 e 40 anos de idade (BLOCK, 1951; RICHARDSON et al., 1987; GOUGEON, 1996), e acompanhada paralelamente de perdas significativas também na qualidade dos oócitos (TE VELDE & PEARSON, 2002). Entretanto, as alterações ocorrem eminentemente em ambiente gonadal e grande parcela das mulheres nessa faixa etária permanece com ciclos menstruais aparentemente normais (TE VELDE & PEARSON, 2002),

constituindo sua identificação um grande desafio à medicina reprodutiva.

No contexto, a avaliação da reserva funcional da gônada feminina surge como tentativa de identificar mulheres em que a exaustão folicular determine as dificuldades em se obter uma gestação, ainda que espontânea. No caso específico da assistência em RA, almeja-se melhor aconselhar os casais e nortear protocolos de estimulação, amenizando encargos emocionais e financeiros de um processo terapêutico cujos resultados ainda se encontram aquém do desejado. Além disso, temos que considerar que à idade associam-se fatores outros de subfertilidade, que exigem ainda mais rigor na individualização dos esquemas de indução. A presença de entidades nosológicas como a endometriose e a síndrome dos ovários policísticos, por exemplo, implica interferências negativas marcantes sobre a fertilidade e, possivelmente, a resposta ovariana, o que é comumente desconsiderado pela comunidade científica, que analisa uniformemente todos os grupos de pacientes, independentemente dos fatores de subfertilidade presentes.

Infelizmente, segundo revisão recente realizada (APÊNDICE A), ainda não se conseguiu determinar um marcador ou esquema propedêutico suficientemente acurado para o uso protocolar em serviços de RA (CARVALHO et al., 2008), mas são incontáveis as lacunas restantes, o que instiga a pesquisa e permite que novos dados surjam a cada dia. A proposta de uma avaliação individualizada baseada nas características clínicas e nos fatores de infertilidade de cada paciente abre uma possibilidade de eleger marcadores mais ou menos eficazes para determinada população e talvez permita melhores valores prognósticos dos exames atualmente disponíveis.

1.2. AVALIAÇÃO DE RESERVA E RESPOSTA OVARIANA

Com grande entusiasmo, marcadores séricos e ultrassonográficos têm sido testados, com objetivo de avaliar quantitativamente e qualitativamente a reserva funcional ovariana, buscando a identificação de mulheres com menor chance de obter uma gestação, principalmente as candidatas a ciclos de RA, mesmo depois de repetidas tentativas. Apesar da vasta literatura acerca do tema, o conhecimento até pouco tempo garantia apenas modestas propriedades preditivas quanto aos resultados de RA (BROEKMANS et al., 2006), ficando sua utilização deveras aquém do suficiente à necessidade clínica.

Acreditamos que um teste de avaliação da reserva ovariana seria ideal se permitisse inferir a quantidade e a qualidade dos folículos primordiais restantes nos ovários após um ciclo menstrual normal, bem como da capacidade dos folículos recrutados no ciclo vigente de se desenvolverem adequadamente, garantindo processos saudáveis de ovulação, fertilização, embriogênese e implantação. Em outras palavras, o teste ideal seria aquele capaz de determinar as chances de gestação no ciclo atual, espontâneo ou induzido, assim como de respaldar a sucessividade dos ciclos ovulatórios e, assim, estimar o potencial reprodutivo da mulher em longo prazo.

São comumente utilizados com tal finalidade marcadores séricos e ultrassonográficos aferidos na fase folicular precoce (basais), além de testes dinâmicos de estimulação ovariana. Entre os marcadores classicamente utilizados estão o estradiol (E2), a inibina-B e o hormônio folículo-estimulante (FSH) basais, e os testes de estimulação com o citrato de clomifeno, o FSH exógeno e os análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (aGnRH). Modernamente, assumem destaque na literatura a dosagem do hormônio anti-Mülleriano basal (AMH) e a ultrassonografia para a realização das medidas ovarianas e da contagem de folículos antrais (CFA).

1.2.1. Estradiol e inibina-B basais

Estudos avaliando o E2 basal na predição da reserva e da resposta ovariana em RA, mesmo os favoráveis ao uso, não têm sido capazes de demonstrar correlação com o desenvolvimento folicular observado (FRATARELLI et al., 2000), reproduzir diferenças significativas entre pacientes más e boas respondedoras (FIÇICIOGLU et al., 2006) ou prever a ocorrência de gestação (SCOTT et al., 1989; LICCIARDI et al., 1995; SMOTRICH et al., 1995).

Estudos avaliando a inibina-B geraram boas perspectivas quanto ao seu uso na predição da elevação estrogênica, do número de oócitos obtidos e das taxas de cancelamento em ciclos de RA (SEIFER et al., 1997); ainda, correlações significativas ao FSH basal e à CFA têm sido demonstradas (TINKANEN et al., 2001). Outros estudos, entretanto, não foram capazes de reiterar os resultados favoráveis ao uso da inibina-B como marcador da reserva ovariana (HALL et al., 1999; CORSON et al., 1999; SCHEFFER et al., 2007), faltando na literatura dados que confirmem sua associação com maturação folicular e a qualidade oocitária (FRANCHIMONT et al., 1990; FOWLER et al., 1995).

Sendo assim, as controvérsias existentes, a baixa acurácia preditiva e a falta de padronização de *cut offs* com sensibilidade e especificidade atrativas sugerem que se evite o uso rotineiro do E2 e da inibina-B basais enquanto determinantes da inclusão de casais em programas de RA (BROEKMANS et al., 2006), devendo-se dispor de suas dosagens apenas em casos individualizados eventuais.

1.2.2. Hormônio folículo-estimulante basal

O FSH basal, sem dúvida, ainda é o mais estudado dentre os marcadores da reserva ovariana em todo o mundo (SILBERSTEIN et al., 2006) e inúmeros estudos têm revelado seu potencial como preditor da resposta folicular (FRANCO et al., 2002), do número de oócitos aspirados, das taxas de cancelamento (ASHRAFI et al., 2005) e de gestação (WATT et al., 2000; KLINKERT et al., 2005; VAN DER STEEG et al., 2007) em ciclos de RA.

No entanto, relata-se a ocorrência de gestação em aproximadamente metade das mulheres com seus valores séricos basais elevados (VAN MONTFRANS et al., 2000). As controvérsias permanecem ao se demonstrarem taxas de gravidez em mulheres com menos de 35 anos e FSH basal elevado superiores às de mulheres mais velhas e com níveis normais da gonadotrofina (LUNA et al., 2007).

Dessa forma, sugere-se que a acurácia do FSH basal na predição de má resposta somente se faça adequada quando considerados limiares excessivamente altos (BROEKMANS et al., 2006), o que, pela ocorrência efêmera, reduz seu valor na prática clínica e impede que seja usado como um critério estrito de exclusão de casais candidatos a ciclos de RA; pode-se, contudo, associar a outros marcadores disponíveis ou utilizá-lo de forma individualizada, como *screening* inicial a nortear o aconselhamento. Como sugerido previamente, o FSH basal elevado subsidiaria o aconselhamento mais cuidadoso de pacientes com mais de 35 anos, principalmente no que concerne ao maior número de ciclos cancelados e à menor resposta ovariana ao estímulo (LUNA et al., 2007).

1.2.3. Testes dinâmicos de estimulação ovariana

Os testes de estímulo com aGnRH (GAST) e FSH (EFORT) assumem alguma importância na predição da resposta a ciclos de RA (KWEE et al., 2003; KWEE et al., 2006), mas não parecem ser superiores a marcadores estáticos, nem mesmo quando se realizam testes subseqüentes, o que se aplica principalmente ao GAST (HENDRIKS et al., 2005; BROEKMANS et al., 2006).

Para o clássico teste do citrato de clomifeno, conquanto ainda assuma algum valor prognóstico na avaliação de mulheres com mais de 35 anos ou com história prévia de má resposta (CORSON et al., 1999), estudos têm demonstrado sensibilidades mais expressivas para os marcadores basais na predição do desenvolvimento folicular (WATT et al., 2000; FRANCO et al., 2002; KWEE et al., 2003; JAIN et al., 2004; HENDRIKS et al., 2005; HAADSMA et al., 2007).

Ao se programar o uso de teste dinâmico para predição da resposta em ciclos de RA, há de se considerar o acréscimo aos já elevados custos do tratamento em RA e os efeitos adversos potenciais, em que se pesem os riscos de hiperestimulação ovariana inadvertida, ainda que mínimos, sem relação direta com tentativa real de se obter uma gestação. Assim, tem-se dado preferência aos marcadores basais de reserva e resposta ovariana, reservando os testes de estímulo para casos específicos.

1.2.4. Hormônio anti-mülleriano basal

O AMH é expresso nos folículos ovarianos desde a 36^a semana de vida intra-uterina (RAJPERT-DE MEYTS et al., 1999) e com maiores concentrações a partir da puberdade (FANCHIN et al., 2003). Seu papel biológico na mulher ainda é pouco esclarecido, mas sua

PEARSON, 2002; GRUIJTERS et al., 2003; FANCHIN et al., 2003; VISSER & THEMMEN, 2005; MUTTUKRISHNA et al., 2005; SCHEFFER et al., 2007). Ainda, suas concentrações plasmáticas pouco variáveis ao longo do ciclo menstrual (HEHENKAMP et al., 2006; LA MARCA et al., 2006; ELGINDY et al., 2008; TSEPELIDIS et al., 2007) e mesmo entre os ciclos consecutivos (FANCHIN et al., 2005) conferem uniformidade na interpretação e maleabilidade quanto ao momento de coleta, o que o torna mais atrativo que os marcadores clássicos como E2, inibina-B e FSH.

Por ser um teste relativamente novo, a escassez de estudos ainda impede que se deduza a real importância do AMH na avaliação da função ovariana. Entretanto, tomando por base os resultados favoráveis e as correlações significativas com a CFA e diferentes variáveis de resposta em ciclos de RA (FIÇICIOGLU et al., 2006; LA MARCA et al., 2007), acreditamos no futuro promissor desse marcador e já se pode inferir que tenha valor no mínimo semelhante ao atribuído à CFA na predição de má resposta ovariana (BROER et al., 2008).

1.2.5. Contagem de folículos antrais

É prevalente na literatura que a CFA seja um bom marcador da reserva ovariana e um preditor adequado da resposta em ciclos de RA. A revisão sistemática de Broekmans et al., conquanto não tenha determinado valor da CFA na predição de má resposta ovariana, admitiu sua importância como teste de *screening* de casais candidatos a ciclos de RA (BROEKMANS et al., 2006).

Estudos recentes têm mostrado correlações significativas com as concentrações dos marcadores séricos classicamente utilizados (HAADSMA et al., 2007) e o AMH (FANCHIN et al., 2003; VISSER & THEMMEN, 2005), assim como diferenças significativas entre as

mulheres normo e más respondedoras ao estímulo em RA (ELGINDY et al., 2008), chegando a CFA a ser apontada como o melhor dentre todos os marcadores disponíveis de reserva e resposta ovariana (BANCSI et al., 2002; SCHEFFER et al., 2003).

Especial atenção tem sido dada aos folículos antrais pequenos, tendo-se observado associação significativa entre a resposta normal em RA e a CFA de folículos com diâmetros $\leq$ 5-6 mm (KLINKERT et al., 2005; HAADSMA et al., 2007), bem como correlações significativas com todos os testes endócrinos de reserva ovariana disponíveis, diferentemente do observado com folículos maiores, condizentes apenas com o volume ovariano e os níveis de inibina-B (HAADSMA et al., 2007).

Em síntese, os resultados da literatura parecem confluir para a consagração da CFA como um bom marcador da reserva e preditor da resposta ovariana, além de se destacar pela praticidade de sua execução, até mesmo como parte do exame ultrassonográfico rotineiro na avaliação ginecológica de mulheres candidatas a ciclos de RA.

1.2.6. Volume Ovariano

Assim como a CFA, tem-se tentado associar o volume ovariano (VO) aferido pela ultrassonografia ao patrimônio funcional da gônada e ao sucesso em ciclos de RA. Apesar de estudos terem demonstrado nítida relação direta entre o número de oócitos em ciclos de RA e VO (SYROP et al., 1999), e correlações significativas entre diminuição das medidas ovarianas, aumento da idade e níveis elevados de FSH basal (BOWEN et al., 2007), a análise minuciosa dos dados disponíveis não permite encontrar ainda aplicabilidade clínica na predição de má reposta ou gestação (BROEKMANS et al., 2006). Dados recentes demonstram não haver diferenças entre as médias de VO de mulheres normo e má respondedoras em ciclos de RA (ELGINDY et al., 2008).

1.3. ENDOMETRIOSE E SUBFERTILIDADE

Estima-se que as queixas de subfertilidade estejam presentes em aproximadamente 60% dos casos de endometriose (MOURA et al., 1999; LITTMAN et al., 2005) e que mais da metade das mulheres subfêrteis sem causa aparente venham a receber o diagnóstico da doença em exame laparoscópico investigativo (HILL, 1992). Em outras palavras, estima-se que as chances de se diagnosticar endometriose sejam seis a oito vezes maiores em mulheres com dificuldades reprodutivas submetidas a exame laparoscópico (VERKAUF, 1987).

A despeito da habitual associação entre endometriose e subfertilidade, ainda não se conseguiu determinar um mecanismo etiopatogênico único que a explique. Na ausência de distorções anatômicas e da barreira mecânica ao funcionamento normal das tubas uterinas (SCHENKEN et al., 1984), é possível que o elo fisiopatológico envolva alterações moleculares do microambiente pélvico-peritônioal e ovariano, com influência negativa sobre o desenvolvimento folicular (SCHENKEN et al., 1984; TUMMON et al., 1991; TOYA et al., 2000), o processo ovulatório (SUGINAMI & YANO, 1988), a qualidade do oócito e o processos de fertilização, embriogênese (SIMÓN et al., 1994; PELLICER et al., 1995; GARRIDO et al., 2000; LEBOVIC et al., 2001) e implantação embrionária (LESSEY et al., 1994; ARICI et al., 1996; KAO et al., 2003).

Embora o advento das técnicas de RA de alta complexidade (Fertilização *in vitro* – FIV – e Injeção intracitoplasmática de espermatozóides – ICSI) tenha trazido algum alento à população de mulheres subfêrteis portadoras da endometriose (TUMMON et al., 1991; SOLIMAN et al., 1993; KODAMA et al., 1996), a tendência moderna de se esperar piores resultados reprodutivos entre as portadoras da doença parece preponderar; são apontadas diferenças significativas entre o número de oócitos aspirados, as taxas de fertilização,

implantação e gestação das mulheres subférteis portadoras e não portadoras (BARNHART et al., 2002).

Com base em estudos recentes, entretanto, o comprometimento dos resultados dos procedimentos de RA em pacientes com endometriose ainda permanece uma controvérsia da medicina reprodutiva. Trabalhos recentes têm ora confirmado alguma interferência (TRINDER & CAHILL, 2002; REIS et al., 2004; SUZUKI et al., 2005; GUPTA et al., 2006; KUMBAK et al., 2008), ora afirmado que os resultados de RA são, ao menos, semelhantes aos encontrados em não portadoras da doença (MATSON & YOVICH, 1986; DMOWSKI et al., 1995; GEBER et al., 1995; OLIVENNES et al., 1995; ISAACS et al., 1997; HICKMAN, 2002; AL-FADHLI et al., 2006).

Considerando-se a grande quantidade de estudos e especulações acerca da subfertilidade associada à endometriose, surpreende a escassez na literatura de artigos relacionando a doença à avaliação dos marcadores de reserva e resposta ovariana em RA. Os escassos estudos sugerem que tais marcadores podem apresentar comportamentos distintos entre portadoras e não portadoras da endometriose (PAL et al. 1998; HOCK et al., 2001; BARNHART et al., 2002; LEMOS et al., 2008), sendo, assim, possível antever algum valor na predição da resposta gonadal ao estímulo exógeno controlado, seja referente ao desenvolvimento folicular, ao número de oócitos obtidos ou à ocorrência de gestação.

Até a presente data, não encontramos estudos correlacionando os níveis sanguíneos de marcadores de reserva ovariana com resposta a ciclos de RA ou determinando a capacidade discriminatória desses marcadores na predição de má resposta entre as portadoras da endometriose.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a reserva folicular e a resposta ovariana em ciclos de reprodução assistida de mulheres subférteis portadoras de endometriose.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a reserva folicular de mulheres subférteis portadoras de endometriose, pelas dosagens basais dos hormônios anti-mülleriano (AMH) e folículo estimulante (FSH), a contagem de folículos antrais pequenos (CFA) e a medida do volume ovariano médio (VOM), estes dois últimos parâmetros avaliados através da ultrassonografia.
- Identificar marcadores individuais que possam se destacar na inferência da reserva ovariana e predição da resposta em ciclos de RA, em mulheres inférteis portadoras de endometriose.
- Avaliar a capacidade discriminatória dos marcadores da reserva folicular ovariana na predição da má resposta a ciclos de reprodução assistida (RA) em mulheres subférteis portadoras de endometriose.

3. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

3. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

3.1. CASUÍSTICA

Foi realizada avaliação prospectiva de 278 ciclos em 227 pacientes subfêrteis submetidas a procedimentos de Reprodução Assistida (RA) no serviço de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), da Universidade de São Paulo, entre junho de 2006 e fevereiro de 2008. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, que foi favorável a sua execução e todas as pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B).

Os critérios de inclusão no estudo foram: (1) infertilidade primária ou secundária, com pelo menos dois anos de evolução, associada à endometriose ou a fator masculino; (2) idade inferior ou igual a 40 anos; (3) ciclos menstruais regulares; (4) ausência de patologias endócrinas com possível efeito deletério sobre o potencial reprodutivo (disfunções tireoidianas, hiperprolactinemia, anovulação hiperandrogênica, alterações do metabolismo glicídico); (5) presença de ambos os ovários. Todas as pacientes haviam sido submetidas previamente a videolaparoscopia para confirmação de presença da endometriose.

Foram critérios de exclusão do estudo: (1) identificação ultrassonográfica de cistos ovarianos endometrióticos ou foliculares; (2) antecedente cirúrgico com abordagem ovariana potencialmente deletéria à população folicular (ooforoplastia); (3) uso de hormônios nos três meses antecedentes à coleta do sangue.

Para a composição do estudo, preencheram os critérios de inclusão 78 pacientes (95 ciclos), tendo sido posteriormente excluídas 6 pacientes (8 ciclos): duas pacientes (2 ciclos) pela presença de cistos foliculares; duas (3 ciclos) por endometriomas ovarianos; e duas (3

ciclos) por ooforoplastia prévia. As pacientes incluídas foram divididas em dois grupos: o grupo I incluiu 30 ciclos de reprodução assistida, realizados em 24 mulheres subférteis portadoras de endometriose; o grupo II (grupo controle) incluiu 57 ciclos, em 48 pacientes cuja subfertilidade foi atribuída exclusivamente a fator masculino.

3.2. ESTIMATIVA DE AMOSTRA

Com a média de $9,5 \pm 4,8$ oócitos captados em pacientes normais (Bancsi, 2002), considerando como alteração significativa a queda de 40% no número de oócitos captados em pacientes com endometriose, usando teste bicaudal com poder de 80% e nível de significância de 5%, foi estimado o mínimo de 30 ciclos para o grupo de casos de endometriose e 30 ciclos para grupo controle.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Avaliação ovariana basal

As coletas das amostras de sangue de pacientes candidatas a ciclos de reprodução assistida (RA) foi realizada durante o início da fase folicular precoce (entre o 3º e o 5º dia) de ciclo menstrual prévio, preferencialmente no ciclo imediatamente antecedente ao início do tratamento para indução de ovulação, como se faz rotineiramente em nosso serviço. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm e os respectivos soros armazenados em temperatura de -70°C para análise posterior conjunta e as alíquotas do soro armazenado foram separadas para dosagem em único momento dos hormônios anti-mülleriano (AMH) e folículo estimulante (FSH), e estradiol (E2).

No mesmo dia da coleta, todas as pacientes foram submetidas a exame ultrassonográfico bidimensional, pela via transvaginal, para contagem de folículos antrais com diâmetro médio de até 6 mm e medida dos volumes de ambos os ovários, tendo-se utilizado aparelho ATL HDI 3000 (ATL Ultrasound, Bothel, WA, USA), com sonda endovaginal na frequência de 4,0 a 9,0 MHz. O cálculo do volume ovariano foi feito a partir da fórmula: Volume ovariano = medida 1 X medida 2 X medida 3 X $\pi/6$, derivada da forma clássica para cálculo do volume de estruturas esféricas (YAMAN et al., 2003), em que as medidas 1, 2 e 3 corresponderam aos máximos diâmetros perpendiculares para cada ovário.

3.3.2. Metodologia das dosagens

A dosagem do AMH foi realizada no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por teste imunoenzimático ultrasensível – ELISA (Immunotech Inc, France), com respectivos coeficientes de variabilidade inter e intra-ensaios de 14,2% e 12,3%. Para o FSH, a determinação foi feita no Laboratório de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por quimioluminescência (Immulite 2000, DPC, USA), com coeficientes de variação interensaios de 2,9% a 4,2% e intra-ensaio de 4,2%. O E2 também foi dosado no Laboratório de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por quimioluminescência (Immulite 2000, DPC, USA), com coeficientes de variação intra-ensaio de 2,95%.

3.3.3. Protocolo de indução

Os ciclos de RA iniciaram-se no máximo 3 meses após a coleta das amostras de sangue e avaliação ultrassonográfica. Resumidamente, a inibição hipofisária foi realizada pela administração subcutânea diária do acetato de leuprolida (Lupron® - Abbott), iniciada na fase médio-luteal do ciclo imediatamente antecedente ao programado para início do tratamento. Após o fluxo menstrual, a estimulação ovariana foi iniciada com doses diárias de folitrofina recombinante (Gonal-F® - Serono) ou de gonadotrofina pós-menopausal (Menopur® - Ferring Pharmaceuticals), tendo-se realizado a monitoração via ultrassonografia endovaginal e reajustado as doses de maneira individualizada a partir do sétimo dia de tratamento.

A administração da gonadotrofina coriônica recombinante (hCG) (Ovidrel® - Serono) foi realizada quando um mínimo de três folículos ovarianos dominantes atingiram diâmetro médio maior ou igual a 18 mm; a aspiração folicular para captação oocitária foi realizada 34-36 horas após a administração da hCG.

3.3.4. Avaliação da resposta ovariana

De acordo com Bancsi et al., do ponto de vista prático, seriam necessários ao menos quatro oócitos para a obtenção de dois embriões transferíveis ao final de um ciclo de RA, se consideradas taxas de fertilização entre 50% e 60% (BANCSI et al., 2002); porém, a má resposta ovariana ao estímulo em RA não encontra na literatura definição consensual, podendo ser analisada não apenas pelo número de oócitos aspirados (BANCSI et al., 2002; ELGINDY et al., 2008; KLINKERT et al., 2005; LA MARCA et al., 2007; LUNA et al., 2008), mas, também, pela contagem de folículos dominantes com diâmetro médio ≥ 18 mm no dia de administração da hCG (JENKINS et al., 1991; EVERS et al., 1998). Dessa forma,

optamos por inicialmente classificar as pacientes em dois grupos, considerando os dois critérios separadamente (folículos dominantes e oócitos aspirados). Para o critério “folículos dominantes”, foi considerada má resposta o desenvolvimento de menos de quatro unidades. Para o critério “oócitos aspirados”, foi considerada má resposta a obtenção de menos de quatro unidades aspiradas.

As etapas do estudo encontram-se resumidas na Figura 2.

Figura 2. Perfil metodológico do estudo.

3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos a partir das dosagens hormonais e medidas ultrassonográficas foram cruzados com características dos grupos e os resultados da indução de ovulação em ciclo de reprodução assistida. Com isso foram analisadas as associações com a resposta ovariana, pela contagem do número de folículos com diâmetro médio ≥ 18 mm no dia de administração da gonadotrofina coriônica recombinante, o número total de oócitos aspirados e o número de oócitos em metáfase II.

Utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.00 (GraphPad Software, Inc, 2007), todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, tendo sido aplicados testes t de Student para amostras com distribuição normal e teste de Mann-Whitney para amostras sem padrão de normalidade; as correlações foram obtidas a partir do cálculo dos coeficientes de Pearson. Além disso, foram traçadas as curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC) e obtidas as áreas sob as curvas (AUC), sensibilidade, especificidade e valores preditivos utilizando-se o programa MedCalc versão 9.3.7.0 (2007). Para interpretação de curvas ROC, AUC = 1,0 significam perfeita discriminação e AUC = 0,5 implica ausência completa de poder discriminatório do teste (BROEKMANS et al., 2006).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. RESERVA OVARIANA: ENDOMETRIOSE *VERSUS* CONTROLES (FATOR MASCULINO EXCLUSIVO)

Entre as pacientes com endometriose e o grupo controle, não houve diferenças significativas quanto a idade, índice de massa corporal (IMC) e dose de gonadotrofina recombinante utilizada (Tabela 1).

Tabela 1. Características clínicas e dose de gonadotrofina utilizada para o estímulo ovariano em pacientes subférteis portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo).

	Endometriose	Controle	<i>p</i>
Idade em anos (<i>range</i>)	35 (28 - 39)	33 (24 - 40)	0,2373
IMC (kg/m ²)	23,65 ± 3,67	24,11 ± 3,73	0,6849
Dose FSH exógeno (UI)	2198 ± 1094	2015 ± 710	0,8532

Nota: idade expressa como mediana; demais valores expressos como média ± desvio padrão. IMC = índice de Massa Corporal; FSH = Hormônio Folículo-estimulante.

Houve diferença significativa entre os níveis séricos do FSH basal de pacientes subférteis portadoras de endometriose e pacientes controles. Já os níveis séricos basais do AMH, a contagem de folículos antrais (CFA) e o volume ovariano médio (VOM), não se apresentaram significativamente distintos entre os grupos (Tabela 2; Figura 3). Entre as variáveis da resposta ovariana, o número de oócitos aspirados foi o único a apresentar diferença significativa entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 2. Marcadores basais de reserva ovariana em pacientes subférteis portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo).

	Endometriose	Controles	<i>p</i>
FSH basal (mUI/mL)	9,13 ± 5,09	6,28 ± 2,45	0,0109
AMH basal (pmol/L)	12,04 ± 8,73	13,71 ± 11,71	0,872
CFA basal	8,0 ± 5,38	9,87 ± 4,62	0,0625
VOM (cm³)	5,64 ± 2,2	5,74 ± 1,78	0,8125

Nota: valores expressos como média ± desvio padrão. Legenda: FSH = Hormônio Folículo-estimulante; AMH = Hormônio Anti-mülleriano; E2 = Estradiol; CFA = Contagem de Folículos Antrais; VOM = Volume Ovariano médio.

Tabela 3. Variáveis de resposta ovariana ao estímulo gonadotrófico exógeno em pacientes subférteis portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo).

	Endometriose	Controles	<i>p</i>
Folículos ≥ 18 mm	3,63 ± 2,67	3,83 ± 2,52	0,6612
Oócitos aspirados	5,33 ± 3,43	8,28 ± 5,8	0,0372
Oócitos em MII aspirados	3,93 ± 3,00	5,05 ± 3,17	0,1191

Nota: valores expressos como média ± desvio padrão. Legenda: MII = Metáfase II.

Figura 3. Marcadores basais de reserva ovariana em pacientes subférteis portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo). Legenda: EDT = Endometriose; FSH = Hormônio Folículo-estimulante; AMH = Hormônio Anti-mülleriano; CFA = Contagem de Foliculos Antrais. * $p < 0,05$.

4.2. Correlações: marcadores de reserva *versus* a resposta ao estímulo

A Tabela 4 apresenta os coeficientes de correlação de Pearson entre os marcadores de reserva ovariana e a resposta ao estímulo em ciclos de reprodução assistida, em portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo).

O número de foliculos com diâmetro médio ≥ 18 mm no dia de administração da hCG correlacionou-se significativamente com o AMH tanto no grupo com endometriose ($r = 0,54$; $p < 0,01$) quanto nos controles ($r = 0,39$; $p < 0,01$). Também no grupo com endometriose, o número de foliculos ≥ 18 mm no dia da hCG se correlacionou significativamente com FSH ($r = -0,47$; $p < 0,01$) e VOM ($r = 0,42$; $p < 0,05$), enquanto que estas variáveis não estiveram

correlacionadas no grupo controle. Neste último obteve-se correlação significativa somente com a idade ($r = -0,40$; $p < 0,01$) (Figura 4).

O número total de oócitos aspirados correlacionou-se significativamente com o AMH tanto no grupo com endometriose ($r = 0,61$; $p < 0,001$) quanto nos controles ($r = 0,58$; $p < 0,0001$), de forma bastante similar. No grupo com endometriose, o número total de oócitos aspirados também se correlacionou significativamente com o FSH ($r = -0,48$; $p < 0,01$); enquanto que no grupo controle obteve-se correlação significativa com a CFA ($r = 0,59$; $p < 0,0001$) e com a idade ($r = -0,35$; $p < 0,01$) (Figura 5).

O número de oócitos aspirados em metáfase II (MII) correlacionou-se significativamente com o AMH tanto no grupo com endometriose ($r = 0,54$; $p < 0,01$) quanto nos controles ($r = 0,51$; $p < 0,0001$). No grupo com endometriose, o número de oócitos em MII também se correlacionou significativamente com o FSH ($r = -0,55$; $p < 0,01$). No grupo controle, obteve-se correlação significativa com a CFA ($r = 0,66$; $p < 0,0001$) e a idade ($r = -0,29$; $p < 0,05$).

Quando cruzados os níveis de AMH e FSH basais, foi encontrada correlação negativa significativa entre o AMH e o FSH ($r = -0,51$; $p < 0,01$) nas portadoras da endometriose, mas não nas pacientes do grupo controle ($r = -0,23$; $p > 0,05$).

Tabela 4. Correlações entre os marcadores de reserva ovariana e a resposta ao estímulo em ciclos de reprodução assistida, em portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo).

	Controles						Endometriose					
	Folículos ≥ 18 mm		Oócitos		Oócitos MII		Folículos ≥ 18 mm		Oócitos		Oócitos MII	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Idade	-0,4	0,0024	-0,35	0,0083	-0,29	0,0259	-0,19	0,3191	-0,17	0,3658	-0,21	0,255
IMC (kg/m²)	0,18	0,1978	-0,044	0,75	-0,044	0,7546	-0,25	0,2363	-0,18	0,3875	-0,24	0,2518
FSH (mUI/mL)	-0,018	0,8952	-0,12	0,3652	-0,072	0,5953	-0,47	0,0093	-0,48	0,0073	-0,55	0,0015
AMH (pmol/L)	0,39	0,0036	0,58	< 0,0001	0,51	< 0,0001	0,54	0,0022	0,61	0,0003	0,54	0,0019
CFA basal	0,14	0,3876	0,59	< 0,0001	0,66	< 0,0001	0,18	0,4347	0,27	0,2248	0,27	0,2318
VOM (cm³)	0,22	0,1177	0,07	0,6051	0,11	0,43	0,42	0,0201	0,18	0,3472	0,24	0,2018

Legenda: r = coeficiente *r* de Spearman; IMC = Índice de Massa Corporal; FSH = Hormônio Folículo-estimulante; AMH = Hormônio Anti-mülleriano; CFA = Contagem de Folículos Antrais; VOM = Volume Ovariano Médio.

Figura 4. Correlações (r) entre os marcadores de reserva ovariana e o número de folículos com diâmetro médio ≥ 18 mm no dia de administração da hCG, em portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo). As correlações significativas estão expressas em seus respectivos gráficos. As linhas tracejadas indicam os intervalos de confiança de 95%. Legenda: FSH = Hormônio Folículo-estimulante; AMH = Hormônio Anti-mülleriano; VOM = Volume Ovariano Médio; NS = não significativo.

Figura 5. Correlações entre os marcadores de reserva ovariana e o número total de oócitos aspirados, em portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo). As correlações significativas estão expressas em seus respectivos gráficos. As linhas tracejadas indicam os intervalos de confiança de 95%. Legenda: FSH = Hormônio Folículo-estimulante; AMH = Hormônio Anti-mülleriano; CFA = Contagem de Folículos Antrais; NS = não significativo.

4.3. MARCADORES DE RESERVA OVARIANA E PREDIÇÃO DE MÁ RESPOSTA AO ESTÍMULO

Embora acreditemos no desenvolvimento folicular como a principal manifestação da resposta ovariana ao estímulo gonadotrófico exógeno e, assim, que a má resposta deva ser caracterizada pela presença de menos de quatro folículos com diâmetro médio ≥ 18 mm no dia de administração da hCG (JENKINS et al., 1991; EVERS et al., 1998), as correlações entre os vários marcadores estudados e os diferentes critérios de resposta ovariana em nosso estudo demonstraram comportamentos próximos (número de folículos e número de oócitos aspirados). Sendo assim e considerando a notória tendência atualmente vista na literatura, adotamos como critério de má resposta ovariana a obtenção de número total de oócitos aspirados inferior a quatro (BANCSI et al., 2002; ELGINDY et al., 2008; KLINKERT et al., 2005; LA MARCA et al., 2007; LUNA et al., 2008), ainda que elementos externos relacionados ao processo de captação possam influenciar negativamente sobre o esse resultado.

A Tabela 5 apresenta as análises estatísticas e as áreas sob as curvas (AUC) para os marcadores clínicos (idade e IMC), séricos (FSH e AMH basais) e ultrassonográficos (CFA e VOM), em portadoras de endometriose e controles, considerando como má resposta a obtenção de número inferior a 4 oócitos aspirados.

Entre pacientes portadoras de endometriose, as más respondedoras apresentaram níveis significativamente inferiores de AMH em relação às normorespondedoras ($3,51 \pm 5,81$ pmol/L vs. $15,15 \pm 7,48$ pmol/L, respectivamente). O AMH basal foi o marcador individual com melhor potencial discriminatório para má resposta (AUC = 0,875), seguido de FSH basal (AUC = 0,682) e VOM (AUC = 0,665).

Entre as pacientes sem endometriose, as más respondedoras apresentaram níveis significativamente inferiores do AMH em relação às normorespondedoras ($4,22 \pm 4,64$ pmol/L vs. $15,74 \pm 11,78$ pmol/L, respectivamente). O AMH foi o marcador individual com melhor potencial discriminatório para má resposta (AUC = 0,8372), seguido do VOM (AUC = 0,709) e da CFA (AUC = 0,686).

As áreas sob as curvas encontradas para os três marcadores vs. má resposta pelo número de oócitos aspirados estão representadas graficamente na Figura 6.

Figura 6. Curvas *Receiver Operator Characteristic* (ROC) para Idade, Hormônio Folículo-Estimulante e (FSH) e Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) como preditores de má resposta (menos de 4 oócitos aspirados, em portadoras de endometriose e controles (fator masculino exclusivo). As linhas tracejadas indicam os intervalos de confiança de 95%.

Tabela 5. Marcadores de reserva ovariana em pacientes subférteis portadoras de endometriose e controles, de acordo com o número total de oócitos aspirados.

	< 4 oócitos	≥ 4 oócitos	<i>p</i>	AUC	<i>Cut off</i>	Sensibilidade	Especificidade
<i>Endometriose</i>							
Idade	34,88 ± 3,04	34,32 ± 3,33	0,6823	0,534	> 33	75	45,45
IMC (kg/m²)	25,28 ± 3,43	23,24 ± 3,87	0,2945	0,643	> 22,6	85,71	52,94
FSH basal (mUI/mL)	13,39 ± 8,06	7,585 ± 3,93	0,1395	0,682	> 8,08	62,5	83,36
AMH basal (pmol/L)	3,51 ± 5,81	15,15 ± 7,48	0,0005	0,875	≤ 2,71	75	90,91
CFA basal	9,0 ± 8,2	7,625 ± 4,19	0,9703	0,51	≤ 6,0	66,67	50
VOM (cm³)	4,91 ± 2,93	5,905 ± 1,88	0,2819	0,665	≤ 2,7	37,5	100
<i>Controles (Fator masculino)</i>							
Idade	34,4 ± 4,624	33,11 ± 4,37	0,3884	0,5888	> 33	70	53,19
IMC (kg/m²)	22,8 ± 3,18	24,38 ± 3,8	0,2319	0,628	≤ 21,4	55,56	82,22
FSH basal (mUI/mL)	6,25 ± 1,331	6,29 ± 2,64	0,7057	0,539	> 5,65	80	42,55
AMH basal (pmol/L)	4,22 ± 4,643	15,74 ± 11,78	0,0009	0,837	≤ 9,15	90	76,6
CFA basal	7,29 ± 3,352	10,34 ± 4,7	0,1235	0,686	≤ 7,0	71,43	73,68
VOM (cm³)	4,63 ± 1,217	5,98 ± 1,8	0,0285	0,709	≤ 5,05	70	65,96

Nota: números de oócitos expressos como média ± desvio padrão; sensibilidade e especificidade expressas em porcentagem. Legenda: IMC = Índice de Massa Corporal; FSH = Hormônio Folículo-estimulante; AMH = Hormônio Anti-mülleriano; CFA = Contagem de Folículos Antrais; VOM = Volume Ovariano médio.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. RESERVA E RESPOSTA OVARIANA EM MULHERES SUBFÉRTEIS PORTADORAS DE ENDOMETRIOSE

Embora estejam disponíveis na literatura inúmeros estudos sobre a avaliação da reserva ovariana a partir de marcadores séricos e ultrassonográficos, são escassos os dados abordando especificamente a endometriose. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que pacientes subférteis portadoras de endometriose, independentemente do estágio da doença (classificação da *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM, 1985)), apresentam níveis basais significativamente mais elevados do FSH quando comparadas às não portadoras, ainda que os valores permaneçam dentro da faixa de normalidade. Já os níveis basais de AMH, a CFA e o VOM não se apresentaram com diferenças significativas entre os grupos.

Os poucos estudos que avaliaram a reserva ovariana especificamente em portadoras de endometriose apresentam controvérsias quanto à interferência da doença sobre o aparato funcional da gônada, mas os resultados tendem a sugerir a existência de algum prejuízo do comportamento biológico de folículos e oócitos no processo reprodutivo destas pacientes (PAL et al. 1998; HOCK et al., 2001; BARNHART et al., 2002; LEMOS et al., 2008).

Enquanto o estudo de Hock et al. demonstrou elevação significativa do FSH basal apenas na doença avançada, defendendo a perda progressiva do aparato funcional ovariano na medida do avanço da endometriose (HOCK et al., 2001), outros não demonstraram diferenças nos níveis basais do FSH entre portadoras de endometriose e aquelas com fator tubário, ou entre as portadoras da doença em graus diferentes (LIMA et al., 2006).

Um estudo brasileiro recente avaliou mulheres subférteis com endometriose mínima/leve e apontou para a existência de decréscimo significativo dos níveis basais do

AMH quando comparadas àquelas com fator tubário ($1,26 \pm 0,7$ ng/mL e $2,02 \pm 0,72$ ng/mL, respectivamente; $p = 0,004$), enquanto as diferenças nos níveis basais de FSH ($5,2 \pm 1,8$ mUI/mL e $4,9 \pm 1,0$ mUI/mL, respectivamente; $p > 0,05$) e na CFA ($12 \pm 1,3$ e $11 \pm 1,6$, respectivamente; $p = 0,732$) não atingiram significância (LEMOS et al., 2008).

No contexto, apesar de os resultados encontrados neste estudo contrariarem os poucos dados da literatura atual sobre o comportamento de marcadores da reserva frente à resposta ovariana, concordamos que exista algum comprometimento na resposta folicular ovariana em pacientes com endometriose. A diminuição do número de oócitos captados confirma de forma quantitativa e objetiva o prejuízo na resposta à estimulação ovariana. Já os marcadores séricos e ultrassonográficos sugerem um potencial mecanismo de influência da endometriose sobre esta capacidade de resposta, a partir da elevação dos níveis de FSH, com manutenção dos valores do AMH, do VOM e da CFA, permitindo-nos a associação a eventos da fisiologia reprodutiva.

Com o respaldo de preceitos clássicos acerca do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, o papel do FSH basal na avaliação da reserva ovariana já foi bastante estudado e a elevação deste marcador parece estar relacionada à resposta disfuncional dos folículos pré-antrais e antrais, exigindo da hipófise estimulação compensatória à falta da retroalimentação negativa (EVERS et al., 1998). Em sendo assim, supõe-se que a resposta ovariana com desenvolvimento folicular inadequado possa ser a tradução do comprometimento da qualidade dos oócitos ou dos folículos recrutados, o que manteria níveis precocemente elevados de FSH, sem a obrigatoriedade do esgotamento da reserva de folículos primordiais recrutáveis.

O AMH tem sido apontado como sendo o marcador da população folicular propriamente dita, uma vez que é secretado por folículos em estágios mais precoces do desenvolvimento (primário, secundário e pré-antral inicial) (WEENEN et al., 2004) e, assim,

representa o *pool* de folículos primordiais recrutáveis existentes na gônada. Apesar de ser o papel biológico do hormônio na mulher ainda pouco esclarecido, estudos recentes levam a crer que atue como um modulador do recrutamento folicular, limitando a transição do folículo primordial para o primário (DURLINGER et al., 1999; RAJPERT-DE MEYTS et al., 1999; NILSSON & SKINNER 2001; FANCHIN et al., 2003; VISSER & THEMME 2005; CARLSSON et al., 2006; VISSER et al., 2007), assim como determinante na permissividade à ação do FSH (DURLINGER et al., 1999; DURLINGER et al., 2001) e do LH (DI CLEMENTE et al., 1994) nos folículos ovarianos. Para Nilsson et al., o AMH interferiria na foliculogênese reduzindo a expressão de fatores estimulatórios, aumentando a expressão de fatores inibitórios e regulando vias intrínsecas celulares de sinalização que resultariam em inibição do desenvolvimento dos folículos primordiais (NILSSON et al., 2007).

Dessa forma, é possível dissociar os conceitos de reserva e resposta ovariana, que se expressariam, respectivamente, pelos níveis séricos do AMH (produzido por folículos primários, secundários e pré-antrais iniciais) e do FSH (em resposta ao desenvolvimento adequado de folículos pré-antrais tardios, antrais e dominante pré-ovulatório).

No presente estudo, a verificação de um aumento dos valores basais do FSH em portadoras de endometriose, sem elevação dos níveis basais do AMH, permite postularmos que a interferência da doença não ocorra sobre a reserva funcional ovariana propriamente dita, mas sobre a progressão folicular, mais especificamente em eventos da transição entre as fases moduladas por AMH e FSH. O suposto comprometimento da qualidade oocitária secundário à presença da endometriose responde por certa refratariedade dos folículos selecionados, que demandam maior estímulo hipofisário e terminam por responder ao comando, explicando assim a equivalência encontrada no número de folículos $\geq 18\text{mm}$ no dia do hCG entre os dois grupos. Ainda, a manutenção de valores similares no VOM e na CFA confirma a falta de interferência da doença sobre o *pool* de folículos primordiais.

Não podemos, contudo, detalhar o processo pelo qual a endometriose compromete a qualidade folicular. A nosso ver isso demandaria um estudo de desenho distinto do atual, visando desvendar mecanismos celulares e moleculares interessando células da granulosa e oócito, e as modificações pelas quais estes passam desde a fase folicular primária até o momento pré-ovulatório.

A redução do número de oócitos captados com mesmo número de folículos recrutados no dia do hCG também sugere o comprometimento na qualidade da resposta, se considerarmos que, do ponto de vista técnico, ambos os grupos foram submetidos à punção pela mesma equipe de profissionais, sob as mesmas condições e critérios de indicação; chama a atenção, no entanto, a similaridade entre os grupos com relação ao número de oócitos maduros, que sugere, por fim, a dissociação dos conceitos de maturidade e qualidade oocitária. Cabe aqui ressaltar os resultados obtidos por Pellicer et al., que demonstraram elevação dos níveis de progesterona no fluido folicular das portadoras de endometriose, indicando maturidade oocitária adequada (PELLICER et al., 1998), enquanto a qualidade de embriões provenientes dessa população se apresenta reduzida (PELLICER et al., 1995).

Em concordância com nossos resultados estão os dados de Mínguez et al., que demonstraram haver diferenças significativas na média de oócitos aspirados entre portadoras e não portadoras de endometriose ($11,3 \pm 6,4$ e $14,2 \pm 8,3$, respectivamente; $p = 0,004$), sem, entretanto, serem distintas as médias de gametas maduros (MÍNGUEZ et al., 1997).

5.2. MARCADORES DE RESERVA OVARIANA: CORRELAÇÕES COM A RESPOSTA A RA NA ENDOMETRIOSE

A literatura atual é bastante rica em artigos que buscam o melhor marcador de reserva na avaliação de pacientes subférteis de modo geral. Entretanto a individualização de grupos

específicos de pacientes, pode eventualmente apontar marcadores mais ou menos eficazes como preditores de reserva ovariana. Não encontramos na literatura estudos estabelecendo as correlações dos marcadores de reserva com a resposta ovariana exclusivamente em portadoras de endometriose, mas dados referentes a outras causas de subfertilidade (ELGINDY et al., 2008) ou incluindo as portadoras da doença em grupos genéricos de mulheres subfêrteis (MUTTUKRISHNA et al., 2005). Por isso, avaliamos os diferentes marcadores considerando separadamente as pacientes portadoras de endometriose daquelas subfêrteis por fator masculino exclusivamente.

A resposta ovariana ao estímulo para RA é caracterizada por critérios diversos na literatura, mais freqüentemente associados ao desenvolvimento folicular e ao número total de oócitos aspirados. Em nosso estudo, o AMH basal apresentou correlação positiva significativa com a resposta ovariana em RA, independentemente da presença da endometriose. O FSH basal, contudo, apenas apresentou correlação significativa negativa com a resposta entre as portadoras da doença. Essas correlações foram observadas para o número de folículos com diâmetro médio ≥ 18 mm no dia de administração da hCG, o número total de oócitos aspirados e os gametas no estágio II da metáfase (MII). No grupo sem endometriose, correlacionaram-se significativamente com a resposta a CFA (total de oócitos e oócitos em MII) e a idade (folículos ≥ 18 mm), o que não foi observado nas portadoras da doença.

Corroborando nossos achados, ao estudarem a subfertilidade restrita ao fator masculino, Elgindy et al. demonstraram haver correlações significativas de AMH basal e CFA ($r = 0,88$; $p < 0,001$) com o número de oócitos aspirados. Entretanto, para estes autores os valores de FSH também foram significativamente correlacionados à resposta, embora de forma menos intensa que a ocorrida para as duas primeiras variáveis ($r = -0,41$; $p < 0,05$) (ELGINDY et al. 2008).

Excluindo as causas endócrinas, mas não a endometriose, Wunder et al. confirmaram a forte correlação do AMH com o número de oócitos aspirados, total ($r = 0,357$; $p < 0,0001$) ou em MII ($r = 0,32$; $p < 0,0001$), e a ocorrência de gestação. No mesmo estudo, apontaram correlações fortemente negativas do marcador com a idade e o FSH basal, mas não fizeram as correlações destes com o número de oócitos obtidos (WUNDER et al., 2008).

A partir da inclusão, num mesmo grupo, de mulheres subférteis sem causa aparente, com síndrome dos ovários policísticos, fator tubário, endometriose e fator idade, e não deixando claro se doenças endócrinas foram critérios de exclusão, Muttukrishna et al. também correlacionaram significativamente o AMH ($r = 0,509$; $p < 0,001$) e o FSH ($r = 0,318$; $p < 0,001$) basais com o número de oócitos aspirados (MUTTUKRISHNA et al., 2005).

Sendo assim, é notória a falta de um elo entre a reserva folicular ovariana e a resposta em ciclos de RA de portadoras da endometriose. A lacuna do conhecimento resulta de um cenário que ora ignora interferências já descritas da endometriose sobre o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano (SCHENKEN et al., 1984) e ora traduz a subfertilidade como doença uniforme e não um sintoma de doenças distintas que repercutem efemeramente sobre o perfil hormonal.

Um resultado curioso deste estudo foi a obtenção de correlação negativa significativa entre AMH e FSH apenas nas pacientes subférteis portadoras da endometriose, mas não nas pacientes do grupo controle. Forte correlação negativa entre tais marcadores foi apontada em estudos prévios, que, entretanto, não excluíram das amostras os casos de endometriose (SINGER et al., 2008), o que suporta a afirmativa de que a doença interfere sobre a resposta da gônada feminina ao estímulo gonadotrófico exógeno e o FSH basal funciona como bom preditor da resposta nessa população específica.

Nossos resultados, assim, oferecem solução aos vieses atuais em alguns aspectos: (a) ratificam o elo entre reserva e resposta ovariana ao estabelecerem correlações significativas

entre os níveis de AMH e as diferentes variáveis de resposta, ratificando o uso desse marcador na propedêutica da mulher candidata a RA; (b) reforçam as suspeitas que a endometriose interfere, ao menos indiretamente, sobre o funcionamento adequado do eixo HHO e a fisiologia dos folículos a partir da seleção para dominância, na medida em que apontam para o FSH basal como um preditor de resposta potencialmente interessante na população subfértil portadora da doença; e (c) restringem o uso da CFA às não portadoras.

5.3. MARCADORES DE RESERVA OVARIANA E PREDIÇÃO DE MÁ RESPOSTA AO ESTÍMULO

Considerando-se a sugestiva interferência da endometriose sobre a fertilidade natural ou em ciclos de RA e a necessidade de melhor aconselhar as portadoras da doença em serviços de medicina reprodutiva, torna-se extremamente atrativa a idéia de se determinar não apenas os marcadores que se correlacionam adequadamente à resposta, mas aquele com a maior capacidade de prever as más respondedoras. O traçado de curvas do tipo *Receiver Operating Characteristic* (ROC) e o cálculo das áreas sob as curvas (AUC) para cada marcador frente à resposta prestam-se a esse fim.

Por sua associação mais fidedigna à reserva ovariana propriamente dita, estudos recentes têm buscado no AMH basal melhor capacidade preditiva da resposta folicular. Novamente, contudo, não dispomos de estudos direcionados para a endometriose como fator de subfertilidade. Nossos resultados demonstraram nítida e significativa redução do AMH basal mulheres em más respondedoras independentemente da presença da endometriose, sendo ele o marcador com melhor potencial discriminatório de má resposta em ambos os grupos. Alguma capacidade de prever má resposta também foi demonstrada para FSH e VOM entre as portadoras da doença, e para VOM e CFA entre os controles.

No estudo de Muttukrishna et al., em que se avaliaram mulheres previamente más respondedoras, o AMH foi considerado o melhor marcador isolado de resposta ovariana ao estímulo exógeno ($AUC = 0,798$) (MUTTUKRISHNA et al., 2004). O mesmo grupo viria a declarar que o AMH basal identifica corretamente 87% das más respondedoras (sensibilidade) e 64% das normorespondedoras (especificidade), quando considerado *cut off* aproximado de 1,43 pmol/L (MUTTUKRISHNA et al., 2005). Neste estudo encontramos uma sensibilidade e especificidade de 90% e 76,6%, respectivamente, entre os controles, considerando níveis $\leq 9,15$ pmol/L. Entre as portadoras de endometriose apontamos sensibilidade de 75% e especificidade de 90,91% para níveis $\leq 2,71$ pmol/L.

É interessante constatar a controvérsia gerada em torno do valor de corte do AMH basal na discriminação da má resposta (CARVALHO et al., 2008; BROER et al., 2008). Apesar de termos encontrado valores distantes quando comparados os grupos com e sem endometriose, acreditamos que o nível de corte apontado por Muttukrishna et al. (MUTTUKRISHNA et al., 2005) não seja condizente com a realidade da população que procura serviços de RA, já que apenas cerca de 17% das pacientes em nossa casuística apresentaram níveis de AMH basal $< 1,43$ pmol/L. O uso de níveis muito reduzidos também marcou o estudo de Fiçicioglu et al., em que o AMH basal apresentou a maior área sob a curva ($AUC = 0,92$) na predição de má resposta, com sensibilidade e especificidade de 90,9 para *cut off* de aproximadamente 0,18 pmol/L (FIÇICIOGLÜ et al., 2006), nível possivelmente indetectável a depender do kit utilizado.

Os números que encontramos para os controles aproximam-se dos encontrados no estudo de Tremellen et al., que apontaram boa capacidade na predição de má resposta para o AMH basal $< 8,1$ pmol/L, com sensibilidade de 80% e especificidade de 85% (TREMELLEN et al., 2005), e o estudo de La Marca et al., com sensibilidade de 80% e especificidade de 93% para limiar aproximado de 5,35 pmol/L (LA MARCA et al., 2007).

Com relação ao FSH basal, Ashrafi et al. constataram que mulheres sem endometriose (critério de exclusão daquele estudo) apresentando níveis de FSH ≥ 15 UI/mL tiveram menos oócitos aspirados e maior número de ciclos de RA cancelados em comparação àquelas com níveis inferiores, sem ter havido diferença significativa nas doses de gonadotrofinas administradas (ASHRAFI et al., 2005). Da mesma forma, um estudo prévio desenvolvido em nosso serviço avaliou mulheres sem endometriose com idade maior de 30 anos e constatou ser o FSH basal > 10 mUI/mL um bom preditor para determinar a dominância de menos de 4 folículos ao final de ciclos induzidos (FRANCO et al., 2002).

A questão da falta de um consenso para os níveis de corte se repete para o FSH basal. Um aspecto interessante a se observar na literatura é a tendência de se considerar valores plasmáticos muito elevados para o FSH basal na predição da má resposta ovariana em RA. Considerando-se que em geral a elevação do FSH costuma ser discreta antes dos 42 anos de idade (TREMELLEN et al., 2005) e julgando serem mulheres mais jovens a grande maioria das pacientes que buscam assistência em RA, pode-se afirmar que o embasamento de conclusões a partir de níveis elevados implica importante e limitador viés. Nossos dados são concordantes com isso ao evidenciarem níveis basais do FSH > 10 mUI/mL somente em 20% dos ciclos com endometriose e 5,26% dos ciclos sem a doença, e níveis ≥ 15 mUI/mL em apenas 13,3% das portadoras da doença e 1,75% dos controles. Pelo cálculo das curvas ROC, sugerimos que níveis basais de FSH $> 8,08$ mUI/mL apresentam sensibilidade de 62,5% e especificidade de 83,36% na determinação da má resposta em portadoras da endometriose, enquanto que nas não portadoras, esses valores foram de 80% e 42,55%, respectivamente, para níveis $> 5,65$ mUI/mL. Certamente, considerar um *cut-off* tão baixo implica redução da especificidade do teste, ou seja, que muitas pacientes poderão ser consideradas como potenciais más respondedoras sem o serem. Por isso, julgamos que o FSH basal não seja um

bom preditor de má resposta e, assim, não se justifica contra-indicar uma tentativa de indução da ovulação supondo má resposta baseada somente nesse marcador.

A CFA também é considerada na literatura um bom preditor de má resposta ovariana, embora não se encontrem, novamente, estudos direcionados às portadoras da endometriose. Em nosso estudo, a CFA considerou apenas folículos com até 6 mm de diâmetro, buscando eliminar a modulação pelo FSH e estabelecer o verdadeiro nexos entre reserva e resposta ovariana. Entre os controles apontou sensibilidade de 71,43% e especificidade de 73,68% para $cut\ off \leq 7,0$, mas não demonstrou capacidade discriminatória da má resposta em portadoras da endometriose.

Klinkert et al. demonstraram que a frequência de resposta normal à estimulação foi significativamente mais elevada em pacientes que apresentaram CFA de cinco ou mais unidades ≤ 5 mm (KLINKERT et al., 2005) e Haadsma et al., em consonância, apontaram correlação significativa dos folículos ≤ 6 mm com todos os testes endócrinos de reserva ovariana disponíveis, diferentemente do observado para folículos ovarianos maiores, condizentes apenas com o volume ovariano e os níveis de inibina-B (HAADSMA et al., 2007).

Considerando folículos com até 10 mm de diâmetro, Muttukrishna et al. demonstraram que a CFA é capaz de apontar 89% das pacientes más respondedoras a ciclos de RA, mas com reduzida especificidade de 39% (MUTTUKRISHNA et al., 2005). Fiçicioğlu et al., ainda, encontraram boa capacidade discriminatória deste marcador ($AUC = 0,78$) na determinação de má resposta (FIÇICIOĞLÜ et al., 2006), aproximando-se dos nossos achados para as não portadoras de endometriose.

Elgindy et al. encontraram diferenças de volume ovariano entre mulheres de até 37 anos com resposta normal e má resposta ao estímulo ($4,1 \pm 0,66\text{ cm}^3$ e $3,36 \pm 0,71\text{ cm}^3$, respectivamente; $p = 0,007$) (ELGINDY et al., 2008), à semelhança do encontrado neste

estudo entre os controles, mas não na endometriose. Nossos dados sobre o VOM demonstraram sua razoável capacidade preditora de má resposta entre as não portadoras de endometriose, com sensibilidade de 70% e especificidade de 65,96% para $cut\ off \leq 5,05\text{ cm}^3$. Na endometriose, contudo, com sensibilidade de 58,82% e especificidade 92,31%, a CFA não se mostrou tão interessante.

Uma limitação deste estudo foi não termos avaliado o comportamento dos diversos marcadores como preditores de gestação, uma vez que esta é o principal objetivo a se atingir em ciclos de RA. Essa avaliação não fez parte dos objetivos, entretanto, por não se terem descartado o fator masculino de infertilidade entre os grupos. A nosso ver, avaliar os marcadores frente à ocorrência de gestação vincularia eventuais conclusões a viés inquestionável, mesmo sabendo que todos os casais submeteram-se a ICSI e que esta técnica supostamente reduz significativamente a interferência do fator masculino sobre os resultados finais. Outro ponto a ser considerado está na amostra limitada de pacientes, podendo se tornar mais claro o papel dos preditores de resposta ovariana ao estímulo quando estudado em populações maiores.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. Os níveis séricos basais do hormônio folículo-estimulante (FSH) estão significativamente elevados entre as pacientes subférteis portadoras de endometriose, independentemente do estágio da doença, quando comparados a às mulheres não portadoras da doença. Sabendo que as concentrações desta gonadotrofina na circulação são moduladas pela população de folículos antrais maiores, a associação entre endometriose e subfertilidade deve estar vinculada a alterações do crescimento/desenvolvimento do folículo ovariano e não a prejuízos sobre a reserva folicular gonadal propriamente dita.
2. Os níveis basais do hormônio anti-Mülleriano (AMH) apresentam correlações positivas expressivas com a resposta ovariana ao estímulo gonadotrófico exógeno em ciclos de reprodução assistida (RA), independentemente da presença da endometriose. O FSH basal, por sua vez, apenas o faz entre as portadoras da doença, não havendo correlação expressiva com a resposta entre as não portadoras.
3. Entre as mulheres subférteis não portadoras de endometriose, a contagem de folículos antrais pequenos (CFA) correlaciona-se positivamente à resposta ovariana em ciclos de RA.
4. O AMH basal é o marcador com o melhor potencial discriminatório de má resposta ovariana ao estímulo gonadotrófico exógeno em ciclos de RA, independentemente da presença da endometriose. Entre as portadoras da doença, contudo, pode-se somar a ele o FSH basal, que também é bom predito de má resposta nesta população. A CFA, por sua vez, não apresenta bom potencial discriminatório para má resposta em RA.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Al-Fadhli R, Kelly SM, Tulandi T, Tanr SL. Effects of different stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization. *J Obstet Gynaecol Can* 2006;28(10):888-91.

American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997, 67: 817-21.

Arici A, Oral E, Bukulmez O, Duleba A, Olive DL, Jones EE. The effect of endometriosis on implantation: results from the Yale University in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 1996;65(3):603-7.

Ashrafi M, Madani T, Tehranian AS, Malekzadeh F. Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Int. J Gynaecol Obstet* 2005;91(1):53-7.

Bancsi LFJMM, Broekmans FJM, Eijkemans MJC, de Jong FH, Habbema JDF, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002;77(2):328-36.

Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002;77(6): 1148-1155.

Bergendal A, Naffah S, Nagy C, Bergqvist A, Sjöblom P, Hillensjö T. Outcome of IVF in Patients with Endometriosis in Comparison with Tubal-Factor Infertility. *J Assist Reprod Gen* 1998;15(9):530-534.

Block E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations in the different phases of the sexual cycle. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1951;8(1):33-54.

Bowen S, Norian J, Santoro N, Pal L. Simple tools for assesment of ovarian reserve (OR): individual ovarian dimensions are reliabel predictors of OR. *Fertil Steril* 2007;88(2):390-395.

Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006; 12(6): 685-718.

Broer SL, Mol BWJ, Hendriks D, Broekmans FJM. The role of antimüllerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril* 2008; [Epub ahead of print].

Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen AP, Hovatta O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod* 2006;21(9):2223-2227.

Carvalho BR, Rosa e Silva ACJS, Rosa e Silva JC, Reis RM, Ferriani RA, Silva de Sá MF. Ovarian Reserve Evaluation: State of the art. *J Assist Reprod Gen* 2008; 25:311-322.

Corson SL, Gutmann J, Batzer FR, Wallace H, Klein N, Soules MR. Inhibin-B as a test of ovarian reserve for infertile women. *Hum Reprod* 1999;14(11):2818-2821.

di Clemente N, Goxe B, R'emy JJ, Cate RL, Josso N, Vigier B, Salesse R. Inhibitory effect of AMH upon aromatase activity and LH receptors of granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine* 1994;2(15):553-558.

Dmowski WP, Rana N, Michalowska J, Friberg J, Papierniak C, el-Roeiy A. The effect of endometriosis, its stage and activity, and of autoantibodies on in vitro fertilization and embryo transfer success rates. *Fertil Steril* 1995;63(3):555-562.

Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001;142(11):4891-4899.

Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de long EH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999;140(12):5789-5796.

Elgindy EA, El-Haieg DO, El-Sebaey A. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril* 2008;89(6):1670-1676.

Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA. Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;69(6):1010-1014.

Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003; 18(2): 323-327.

Fanchin R, Taieb J, Lozano DHM, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproductibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strenghtens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod* 2005;20(4): 923-927.

Fişicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2006;85(3):592-596.

Fowler PA, Fahy U, Culler MD, Knight PG, Wardle PG, McLaughlin EA, Cunningham P, Fraser M, Hull MG, Templeton A. Gonadotrophin surge-attenuating factor bioactivity is present in follicular fluid from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1995;10(1):68-74.

Franchimont P, Hazeé-Hagelstein MT, Charlet-Renard C, Jaspard JM, Hazout A, Salat-Baroux J, Schatz B, Demerlé F. Correlation between follicular fluid content and the results of in vitro fertilization and embryo transfer. II. Inhibin and aromatase inhibitor activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71(3):748-754.

Franco RC, Ferriani RA, Moura MD, Reis RM, Ferreira RA, de Sala MM. Evaluation of Ovarian Reserve: Comparison Between Basal FSH Level and Clomiphene Test. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2007;24(5):323-327.

Frattarelli JL, Bergh PA, Drews MR, Sharara FI, Scott RT. Evaluation of basal estradiol levels in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2000;74(3):518-524.

Gao X, Outley J, Botteman M, Spalding J, Simon JA, Pashos CL. Economic burden of endometriosis. *Fertil Steril* 2006;86(6):1561-1572.

Garrido N, Navarro J, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update* 2000;6(1):67-74.

Geber S, Paraschos T, Atkinson G, Margara R, Winston RM. Results of IVF in patients with endometriosis: the severity of the disease does not affect outcome, or the incidence of miscarriage. *Hum Reprod* 1995;10(6):1507-1511.

Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;17(2):121-155.

Gruijters M, Visser J, Durlinger A, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cel Endocrinol* 2003;211(1-2):85-90.

Gupta S, Agarwal A, Sekhon L, Krajcir N, Cocuzza M, Falcone T. Serum and peritoneal abnormalities in endometriosis: potential use as diagnostic markers. *Minerva Ginecol*. 2006;58(6):527-551.

Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EMA, Groenewoud ER, Heineman MJ, Hoek A. The number of small antral follicles (2-6mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum Reprod* 2007;22(7):1925-1931.

Hall JE, Welt CK, Cramer DW. Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod* 1999;4(2):409-415.

Hehenkamp WJK, Looman CWN, Themmen APN, de Jong FH, te Velde ER, Broekmans JM. Anti-Müllerian Hormone Levels in the Spontaneous Menstrual Cycle Do Not Show Substantial Fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(10):4057-4063.

Hendriks DJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, de Jong FH, Looman CW, Te Velde ER. Repeated clomiphene citrate challenge testing in the prediction of outcome in IVF: a comparison with basal markers for ovarian reserve. *Hum Reprod* 2005;20(1):163-169.

Hickman TN. Impact of endometriosis on implantation. Data from the Wilford Hall Medical Center IVF-ET Program. *J Reprod Med* 2002;47(10):801-808.

Hill JA. Immunology and endometriosis. *Fertil Steril* 1992;58(2):262-264.

Hock DL, Sharafi K, Dagostino L, Kemmann E, Seifer DB. Contribution of diminished ovarian reserve to hypofertility associated with endometriosis. *J Reprod Med* 2001;46(1):7-10.

Hoffman GE, Danforth DR, Seifer DB. Inhibin-B: the physiologic basis of the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril* 1998;69(3):474-477.

Isaacs JD Jr, Hines RS, Sopelak VM, Cowan BD. Ovarian endometriomas do not adversely affect pregnancy success following treatment with in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 1997;14(10):551-553.

Jain T, Soules MR, Collins JA. Comparison of basal follicle-stimulating hormone versus the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril* 2004; 82(1):180-185.

Jenkins JM, Davies DW, Devonport H, Anthony FW, Gadd SC, Watson RH, Masson GM. Comparison of 'poor' responders with 'good' responders using a standard buserelin/human menopausal gonadotrophin regime for in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1991;6(7):918-921.

Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, Giudice LC. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003;144(7):2870-2881.

Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. 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* 2005;83(3):811-814.

Kodama H, Fukuda J, Karube H, Matsui T, Shimizu Y, Tanaka T. Benefit of in vitro fertilization treatment for endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 1996;66(6):974-979.

Kumbak B, Kahraman S, Karlikaya G, Lacin S, Guney A. In vitro fertilization in normoresponder patients with endometriomas: comparison with basal simple ovarian cysts. *Gynecol Obstet Invest* 2008;65(3):212-216.

Kwee J, Elting MW, Schats R, Bezemer PD, Lambalk CB, Schoemaker J. Comparison of endocrine tests with respect to their predictive value on the outcome of ovarian hyperstimulation in IVF treatment: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2003;18(7):1422-1427.

Kwee J, Schats R, McDonnell J, Schoemaker J, Lambalk CB. The clomiphene citrate challenge test versus the exogenous follicle-stimulating hormone ovarian reserve test as a single test for identification of low responders and hyperresponders to in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;85(6):1714-1722.

La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, Volpe A. Anti-Mullerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2007; 22(3): 766-771.

La Marca A, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2006; 21(12): 3103-3107.

Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001;75(1):1-10.

Lemos NA, Arbo E, Scalco R, Weiler E, Rosa V, Cunha-Filho JS. Decreased anti-Müllerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril* 2008;89(5):1064-1068.

Leridon H. [30 years of contraception in France]. *Contracep Fertil Sex* 1998;26(6):435-438.

Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Buck CA, Schinnar R, Bilker W, Strom BL. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79(2):643-649.

Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995;64(5):991-994.

Lima AP, Silva AMR, Moura MD. Concentrações de FSH, LH, estradiol e histamina no soro, no fluido peritoneal e no fluido folicular de mulheres com e sem endometriose. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2006;28(11):643-651.

Littman E, Giudice L, Lathi R, Berker B, Milki A, Nezhat C. Role of laparoscopic treatment of endometriosis in patients with failed in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2005; 84(6):1574-1578.

Luna M, Grunfeld L, Mukherjee T, Sandler B, Copperman AB. Moderately elevated levels of basal follicle-stimulating hormone in young patients predict low ovarian response, but should not be used to disqualify patients from attempting in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007;87(4):782-787.

Matson PL, Yovich JL. The treatment of infertility associated with endometriosis by in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986;46(3):432-434.

Mínguez Y, Rubio C, Bernal A, Gaitán P, Remohí J, Simón C, Pellicer A. The impact of endometriosis in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection because of male infertility. *Hum Reprod* 1997;12(10):2282-2285.

Moura MD, Pereira TN, Nogueira AA, Ferriani RA, de Sala MM, Reis RM. Avaliação do Tratamento Clínico da Endometriose. *Rev Bras Ginecol Obstet* 1999;21(2):85-90.

Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG* 2005; 112(10): 1384-1390.

Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan N. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG* 2004;111(11):1248-1253.

Nilsson E, Rogers N, Skinner MK. Actions of anti-Müllerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reproduction* 2007;134(2):209–221.

Nilsson E, Skinner MK. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J Soc Gynecol Investig* 2001;8(1 Suppl Proceedings):S17-20.

Olivennes F, Feldberg D, Liu HC, Cohen J, Moy F, Rosenwaks Z. Endometriosis: a stage by stage analysis--the role of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995;64(2):392-398.

Pal L, Shifren JL, Isaacson KB, Chang Y, Leykin L, Toth TL. Impact of Caring Stages of Endometriosis on the Outcome of In Vitro Fertilization-Embryo Transfer. *J Assist Reprod Gen* 1998;15(1):27-31.

Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohí J, Simón C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995;10(Suppl 2):91-97.

Pellicer A, Valbuena D, Bauset C, Albert C, Bonilla-Musoles F, Remohí J, Simón C. The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality. *Fertil Steril* 1998;69(6):1135-1141.

Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association

with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(10):3836-3844.

Reis RM, Corrêa ILA, De Ângelo AG, Manetta LA, Moura MD, Ferriani RA. In vitro fertilization in patients with ovarian endometrioma. *J Assist Reprod Gen* 2004;21(8):311-314.

Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65(6):1231-1237.

Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril* 1999;72(5):845-851.

Scheffer GJ, Broekmans FJM, Looman CWN, Blankenstein M, Fauser BCJM, de Jong FH, te Velde ER. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod* 2003;18(4):700-706.

Scheffer JB, Lozano DM, Frydman R, Fanchin R. Relationship of serum anti-Müllerian hormone, inhibin B, estradiol and FSH on day 3 with ovarian follicular status. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2007;29(4):186-191.

Schenken RS, Asch RH, Williams RF, Hodgen GD. Etiology of infertility in monkeys with endometriosis: luteinized unruptured follicles, luteal phase defects, pelvic adhesions, and spontaneous abortions. *Fertil Steril* 1984;41(1):122-130.

Scott RT, Toner JP, Muasher SJ, Oehninger S, Robinson S, Rosenwaks Z. Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1989;51(4):651-654.

Seifer DB, Lambert Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 2007;67(1):110-114.

Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, Keefe DL, Blazar AS. Müllerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo quality. *Hum Reprod* 2006;21(1):159-163.

Simón C, Gutiérrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarín JJ, Remohí J, Pellicer A. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod* 1994;9(4):725-729.

Singer T, Barad DH, Weghofer A, Gleicher N. Correlation of antimüllerian hormone and baseline follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril* 2008; [Epub ahead of print].

Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1995;64(6):1136-1140.

Soliman S, Daya S, Collins J, Jarrell J. A randomized trial of in vitro fertilization versus conventional treatment for infertility. *Fertil Steril* 1993;59(6):1239-44.

Suginami H, Yano K. An ovum capture inhibitor (OCI) in endometriosis peritoneal fluid: an OCI-related membrane responsible for fimbrial failure of ovum capture. *Fertil Steril* 1988;50(4):648-653.

Suzuki T, Izumi S, Matsubayashi H, Awaji H, Yoshikata K, Makino T. Impact of ovarian endometrioma on oocytes and pregnancy outcome in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2005;83(4):908-913.

Syrop CH, Dawson JD, Husman K, Sparks AET, Van Voorhis BJ. Ovarian volume may predict assisted reproductive outcomes better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. *Hum Reprod* 1999;14(7):1752-1756.

te Velde E, Pearson P. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 2002; 8(2):141-154.

Tinkanen H, Bläuer M, Laippala P, Tuohimaa P, Kujansuu E. Correlation between serum inhibin B and other indicators of the ovarian function. *Eur. J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;94(1):109-113.

Toya M, Saito H, Ohta N, Saito T, Kaneko T, Hiroi M. Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 2000;73(2):344-350.

Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005;45(1): 20-24.

Trinder J, Cahill DJ. Endometriosis and infertility: the debate continues. *Hum Fertil (Camb)* 2002;5(1 Suppl):S21-7.

Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy Ch, Englert Y. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 2007;22(7):1837-1840.

Tummon IS, Colwell KA, Mackinnon CJ, Nisker JA, Yuzpe AA. Abbreviated endometriosis-associated infertility correlates with in vitro fertilization success. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1991;8(3):149-153.

van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Broekmans FJ, Bouckaert PXJM, Bossuyt PMM, van der Veen F, Mol BWJ. Predictive Value and Clinical Impact of Basal Follicle-Stimulating Hormone in Subfertile, Ovulatory Women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(6):2163-2168.

van Montfrans JM, Hoek A, van Hooff MH, de Koning CH, Tonch N, Lambalk CB. Predictive value of basal follicle-stimulating hormone concentrations in a general subfertility population. *Fertil Steril* 2000;74(1):97-103.

van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, Themmen AP. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002;17(12):3065-3071.

Verkauf BS. The incidence, symptoms, and signs of endometriosis in fertile and infertile women. *J Fla Med Assoc* 1987;74(9):671-675.

Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, de Jong FH, Themmen AP. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice. *Endocrinology* 2007;148(5):2301-2308.

Visser JA, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2005;234(1-2):81-86.

Watt AH, Legedza ATR, Ginsburg ES, Barbieri RL, Clarke RN, Hornstein MD. The prognostic value of age and follicle-stimulating hormone levels in women over forty years of age undergoing in vitro fertilization. *J Assist Reprod Gen* 2000;17(5):264-268.

Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10(2):77-83.

Wunder DM, Guibourdenche J, Birkhäuser MH, Bersinger NA. Anti-Müllerian hormone and inhibin-B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008; [Epub ahead of print].

8. APÊNDICES

8. APÊNDICES

APÊNDICE A

J Assist Reprod Genet (2008) 25:311–322
DOI 10.1007/s10815-008-9241-2

ASSISTED REPRODUCTION

Ovarian reserve evaluation: state of the art

Bruno Ramalho de Carvalho ·
Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva ·
Júlio César Rosa e Silva · Rosana Maria dos Reis ·
Rui Alberto Ferriani · Marcos Felipe Silva de Sá

Received: 20 May 2008 / Accepted: 8 July 2008 / Published online: 5 August 2008
© Springer Science + Business Media, LLC 2008

Abstract

Purpose Revise role of hormonal basal and dynamic tests, as well as ultrasonographic measures as ovarian reserve markers, in order to provide better counseling to subfertile couples.

Methods Review of publications on the topic, with an emphasis on recent well designed articles.

Results Currently available ovarian reserve tests do not provide sufficient evidence to be solely considered ideal, even for premature ovarian senescence patients who do not present subfertility complaints. However, these markers occupy important place in initial approach to treatment of subfertile couples, predicting unsatisfactory results that could be improved by differentiated induction schemes and reducing excessive psychological and financial burdens, and adverse effects.

Conclusions In order to remedy the limitations due to the scarcity of strong evidence about this topic, future studies should try to clarify predictive value of markers in groups of specific diseases-related subfertility and pay special attention to propaedeutic multivariate models including anti-Müllerian hormone and antral follicle count.

Keywords Infertility · IVF/ICSI outcome · Ovarian reserve · Reproductive aging · Reproductive potential · Ovarian senescence

Introduction

Since the mid-twentieth century, when the progressive loss of follicular population between 30 and 40 years of age was estimated to be of approximately 75% [1], more attention has been devoted to the reproductive potential of women in the presence of ovarian ageing. Considering modern trends of maternity postponement [2] and the increasing demand for assisted reproduction techniques (ART), the evaluation of functional ovarian reserve has arisen in an attempt to better counsel interested couples and guide the elaboration of stimulation protocols, with a reduction of emotional and financial burdens of a hard and stressful process.

Although follicular exhaustion is considered to be a concrete fact starting in the fourth decade of life, the changes mainly occur in the gonadal environment and many women in this age range continue to have apparently normal menstrual cycles, with a consequent great challenge for the identification of those with a lower reproductive potential [3]. Thus, a test for the evaluation of ovarian reserve would be ideal if it permitted to infer the size and quality of the follicle pool remaining in the ovaries after a normal menstrual cycle and therefore to identify candidates

Capsule The key to better counseling subfertile couples may reside in joint analysis of distinct ovarian reserve markers, providing information needed to formulate adequate stimulation protocols.

B. R. de Carvalho · A. C. J. S. Rosa e Silva · J. C. Rosa e Silva ·
R. M. dos Reis · R. A. Ferriani · M. F. Silva de Sá
Sector of Human Reproduction,
Department of Gynecology and Obstetrics,
Faculty of Medicine of Ribeirão Preto,
University of São Paulo, São Paulo, Brazil
e-mail: bramalho@usp.br

A. C. J. S. Rosa e Silva (✉)
Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital das Clínicas da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Campus da Universidade de São Paulo,
1 andar, Av. Bandeirantes, 3900, Bairro Monte Alegre,
Ribeirão Preto, São Paulo CEP 14.048-900, Brazil
e-mail: anasars@fmrp.usp.br

for ART with a lower chance of obtaining a pregnancy, even after repeated attempts.

Within this context, serum and ultrasonographic markers have been enthusiastically tested to infer the gonadal reserve of women, but without a consensus about their relevance for use in the evaluation of ART candidates. Although the low invasiveness of these tests renders them reasonably attractive, they may not always reflect the complex follicular dynamics and none of them has been shown to be strongly correlated with the population of primordial follicles remaining in the gonads. In other words, these tests may not reveal the pool of still inactive follicles responsible for the continuity of ovulatory cycles and therefore for the long-term reproductive potential [4–6].

Broekmans et al. recently published a systematic review of the literature demonstrating that the predictive properties of the tests available for the evaluation of ovarian reserve were modest and that their use was still insufficient for clinical needs [7]. In the present report we shall deal with the tests commonly used for the evaluation of ovarian reserve in patients who are candidates for assisted reproduction cycles, dividing them into static markers—measured during the early follicular phase (estradiol, follicle-stimulating hormone, inhibin-B, and anti-Müllerian hormone), dynamic markers (tests of stimulation with clomiphene citrate, gonadotropins and gonadotropin-releasing hormone analogues) and ultrasonographic markers (antral follicle count and ovarian volume).

Static markers

Basal estradiol

Determination of basal serum estradiol (E2) has been proposed as a predictor of the ovarian response in assisted reproduction (AR) cycles, and therefore as an indirect determinant of functional gonadal reserve. This hypothesis was supported by the study of Evers et al., in which hormonal levels >60 pg/mL were found to be able to predict a higher cancellation rate and a smaller number of aspirated oocytes compared to lower levels, leading to the conclusion about the potential of basal E2 as an important prognostic determinant [8]. Fratarelli et al. supported this hypothesis by demonstrating a higher rate of cycle cancellation among patients with basal levels <20 or ≥ 80 pg/mL [9].

Many other studies, however, have failed to support the clinical applicability of basal serum E2 for the prediction of ovarian reserve, and even studies favorable to its use for this purpose were unable to demonstrate a significant correlation with follicular development [9] or to predict the occurrence of pregnancy [10–12]. It has also been

recently demonstrated that basal E2 levels did not differ significantly between patients who were poor and good responders to AR cycles [13]. This had already been proposed two decades ago by Lee et al., who showed no significant differences between women aged 24 to 52 years in relation to hormone levels [14].

In view of the low predictive accuracy and the lack of standardization of a cut-off with high sensitivity and specificity, the use of basal E2 should be avoided as a determinant of the inclusion of patients in AR programs [7]. Thus, the role of this marker is limited to that of a modest prognosticator of response to exogenous gonadotropin stimulation and it should be used strictly for purposes of initial counseling of subfertile couples who are candidates for ART, specially when follicular growth is observed before stimulation start.

Follicle-stimulating hormone

Basal follicle-stimulating hormone (FSH) appears to be the test most frequently used to determine ovarian reserve, being contemplated in the broadest collection of well-designed studies published in the literature on this topic [7].

Watt et al. evaluated basal FSH as a predictor of success in cycles of in vitro fertilization (IVF) for women older than 40 years and determined a basal cut-off of 11.1 mIU/mL for the non-occurrence of pregnancy. However, they did not evaluate the follicular response properly, with possible interference of male factor as determinants of treatment success [15]. In our service, after assessing the response of women older than 30 years to AR cycles, we observed that basal serum FSH (with a cut-off of 10 IU/mL) had sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of 87%, 100%, 100% and 94.7%, respectively, regarding the growth of at least four follicles, what means indication of a good response [16].

In a study on 212 patients submitted to IVF cycles, Ashrafi et al. observed that women with FSH levels ≥ 15 IU/mL had fewer aspirated oocytes and a larger number of canceled cycles than women with lower levels, with no significant difference in gonadotropin doses administered [17]. In partial agreement, Klinkert et al. associated even lower pregnancy rates with high basal FSH levels, although they did not detect the same cut-off value [18].

Although day 3 FSH is widely used as an ovarian reserve test, its accuracy in predicting a poor response is adequate only when very high thresholds are used. Clinically, we observe a low frequency of such thresholds, as the value of FSH usually maintains within normal ranges and tend to rise only when ovarian function is deeply compromised, so its level cannot be used as a criterion of couple exclusion from AR cycles [7]. In a previous study, van Montfrans et al. had already suggested that determina-

tion of basal FSH should not be added to the initial management of subfertile women with clinically normal cycles, with pregnancy occurring in about half the women with elevated serum levels [19].

The few studies published over recent years were unable to validate basal FSH as a marker of ovarian reserve, but opened some new perspectives. The study by Letterie et al., for example, pointed out the different molecular isoforms of FSH secreted as the result of variants in the process of glycosylation influenced by hormonal variations depending on cyclicity and age of the patient. After chromatographic separation of the FSH isoforms, the authors detected a significant difference in the pH range from 5.1 to 5.0 between poor and good responders to previous gonadotropin stimulation. On this basis, they raised the hypothesis that concentrations of certain FSH isoforms may interfere differently with follicular dynamics and reduce oocyte quality, suggesting new possibilities about the follicular response to an exogenous stimulus [20].

van der Steeg et al. studied predictive value of basal FSH for spontaneous pregnancy occurrence in ovulatory subfertile women younger than 40 years and observed reduced chances when the levels exceeded 8 IU/L, whereas no association could be determined for lower levels [21]. The controversy continued with the study by Luna et al., in which pregnancy rates for women younger than 35 years and with high FSH levels were better than those for older women with normal levels of this gonadotropin. The authors recommended a more careful counseling for patients aged 35 to 40 years, especially regarding the larger number of canceled cycles and the lower ovarian response to the stimulus, but did not consider a high FSH level to be an obstacle in AR programs [22].

Thus, even though basal FSH still is the most frequently used marker of ovarian reserve in AR services all over the world [23], a search for more representative results has shifted the emphasis to other markers such as inhibin-B, anti-Müllerian hormone (AMH), initial antral follicle count (AFC) [5, 7, 24], and ovarian volume [3].

Inhibin-B

The inhibins are glycoprotein hormones of the superfamily of transforming growth factors β (TGF- β) [25] secreted by granulosa and theca cells [26], which are selectively responsible for pituitary inhibition of FSH secretion [27]. Inhibin-B is particularly outstanding in the execution of this function and in its paracrine action on developing follicles, stimulated by the association of FSH itself with insulin-like growth factor I (IGF-I) [28, 29].

In normal ovulatory cycles, the serum concentration of inhibin-B is inversely correlated with FSH concentration and increases insidiously up to the mid-point of the

follicular phase, when it reaches a maximum peak together with the mass of granulosa cells. A progressive decrease occurs thereafter to low concentrations that persist in the luteal phase, except for a brief new elevation after the LH surge [30]. This behavior along the cycle permits us to assume that inhibin-B plays a role in follicular development, reflecting ovarian function and follicular reserve, thus acting as a marker of the functional reserve of the gonad.

Studies by Seifer et al. and Hofmann et al. generated good perspectives regarding the use of inhibin-B for the prediction of ovarian reserve. The first authors demonstrated greater estrogen responses and number of oocytes obtained after stimulation among women with serum inhibin-B levels ≥ 45 pg/mL, whereas cancellations were three times more frequent among patients with lower levels [31]. The second group comprised women with a supposedly adequate ovarian reserve based on the test of stimulation with clomiphene citrate and demonstrated that inhibin-B levels were more elevated among women with a normal response [32]. Tinkanen et al. investigated infertile women aged 24 to 40 years and detected a significant negative correlation between serum inhibin-B levels and FSH, as well as a significant positive correlation between inhibin-B and initial antral follicles counted by ultrasound [33].

Other studies, however, have not reproduced the results favorable to the use of inhibin-B as a marker of ovarian reserve [34–36], which remains a subject to be studied further. No studies have confirmed what was postulated more than one decade ago by Franchimont et al. and Fowler et al., who proposed a possible association of inhibin-B concentrations with oocyte quality in AR cycles [37, 38].

Regarding supposed potential in prediction of ovarian response, it has been categorically stated that the high rate of false-positive results in the determination of basal inhibin-B would lead to the unnecessary exclusion of women from IVF programs. It has been also pointed out that, even using very low levels, the accuracy in the prediction of poor response would be only modest, with inhibin-B being inferior to other markers currently used, even though it can be used as a tool for counseling [7].

Anti-Müllerian hormone

Anti-Müllerian hormone (AMH) is also a glycoprotein hormone of the TGF- β superfamily, known to be produced by testicular Sertoli cells and to be responsible for the regression of the paramesonephric ducts during the sexual differentiation of male human embryos [39]. Absent during female differentiation, AMH is expressed in granulosa cells as soon as the first primordial follicles are recruited, at about the 36th week of intrauterine life [40], and at higher concentrations starting at puberty [24]. After activation of the hypothalamus–pituitary–ovarian axis, its expression is

maintained until the follicles reach about 6 mm in diameter, when the differentiation into antral follicles itself is enough for dominance [41] and follicular growth follows controlled by FSH action [42].

The biological role of AMH in women is still unclear but recent data suggest that it may act as a modulator of follicle recruitment and a regulator of ovarian steroidogenesis [24, 43]. AMH is known to have an inhibitory effect on the population of primordial follicles, acting on pre-granulosa cells in order to limit the number of recruitable follicular units [42]. The greater sensitivity of follicular cells to the action of FSH in the absence of AMH, demonstrated both in vitro and in vivo, supports the hypothesis that this hormone acts as a decisive factor in permitting the FSH-dependent growth of ovarian follicles [43, 44]. di Clemente et al. supported this hypothesis by demonstrating reduced expression of aromatase and LH receptors in granulosa cells cultured in the presence of exogenous AMH [45].

The inhibitory function of AMH was also demonstrated in animal studies comparing wild to AMH-knock-out mice, demonstrating that the latter species presents three times greater quantities of growing ovarian follicles as well as an early depletion of the follicular population [43, 46]. Thus, it has been postulated that inhibition of sensitivity to FSH by AMH may be an important factor in follicular selection and that progression to antral follicle may occur due to the variable expression of AMH receptors among recruited units, with the persistence of those having a greater sensitivity to FSH (lower AMH expression), until reaching single dominance [44].

AMH determination has been proposed in clinical practice for the prediction of ovarian reserve because it signals pool of inactive and initially growing follicles, it means, the stock of primordial follicles [4, 47]. In other words, AMH is considered to be a marker that can estimate the quantity and activity of retrievable follicle units in early stages of maturation, thus being more reliable for the prediction of ovarian reserve [24, 36, 42, 48–51].

Compared to FSH, inhibin-B and E2, AMH has the advantage of reduced variability of its serum concentrations along the menstrual cycle [3, 6, 52], with consequent credibility, uniformity of evaluation and malleability regarding the time of determination. Using an enzyme immunoassay (ELISA), Elgindy et al. detected mean values of 1.4 ± 1.1 ng/mL, 1.43 ± 1.08 ng/mL and 1.35 ± 1.02 ng/mL in follicular, ovulatory and midluteal phases, respectively [3], corroborating results of previous studies and confirming the absence of an effect of FSH or LH on AMH production [52, 53]. Similarly, Tsepelidis et al. obtained a mean of 2.4 ± 1.1 ng/mL along the menstrual cycle in normo-ovulatory [54].

The reproducibility of AMH between cycles was demonstrated by Fanchin et al., who studied its behavior

in subfertile women aged 20 to 40 years and detected lower variations in serum levels between consecutive cycles than those detected for FSH, inhibin-B and estradiol, in addition to antral follicle count (AFC). In that study, there was a positive correlation of the response to ovulation induction with initial AFC, but this marker was found to be more susceptible to variations between cycles on a short-term basis [6].

In addition to the studies cited above, other investigations have provided evidence indicating that AMH really is a good serum marker of gonadal reserve. de Vet et al. demonstrated a decline in AMH levels after menopause in women with previously regular menstrual cycles and also detected a significant correlation between serum AMH levels and ultrasound AFC [55]. In AR cycles, van Rooij et al. detected reduced pre-induction AMH levels and number of antral follicles in poor responders (women with canceled cycles or from whom fewer than four oocytes were aspirated) compared to women with a good response to the exogenous stimulus. There was also a strong correlation between the two markers, who were found to be important predictors of the response [48].

Muttukrishna et al. prospectively evaluated women older than 38 years with a basal FSH >10 UI/L, who were previously poor responders (fewer than four follicles with a diameter >15 mm). When comparing women with complete and incomplete AR cycles, they detected significantly elevated FSH levels and reduced AMH and inhibin-B levels in the second group. AMH was considered to be the best single marker of the ovarian response to the exogenous stimulus [56]. One year later, the same group restated that AMH is the biochemical marker that best predicts the response in high complexity AR cycles and the cancellation of ovulation induction, with 87% sensitivity and 64% specificity, for a cut-off of 0.2 ng/mL [51].

Tremellen et al. constructed a curve for AMH and demonstrated that the hormone decreases after 30 years of age, a fact not observed at the same intensity for FSH, which increases in an insidious manner. They also detected a significant difference in mean AMH levels between poor and good responders (≤ 4 and ≥ 8 aspirated oocytes, respectively). Evaluating poor response prediction potential, they detected 80% sensitivity and 85% specificity, with positive and negative predictive values of 67% and 92%, respectively, for the cut-off point of 8.1 pmol/L, and concluded that AMH is more sensitive than habitual markers [5].

Despite these data, a systematic review by Broekmans et al. identified only two well-designed studies involving AMH and the prediction of the ovarian response, a fact that did not permit to consider AMH to be superior to other tests [7]. Since then, many other studies have been conducted on the role of the hormone in the evaluation of ovarian reserve.

In a study by Fişcioglu et al., serum AMH levels were significantly higher in women with good ovarian response to induction (0.67 ± 0.41 pg/mL) compared to poor responders (0.15 ± 0.11 pg/mL) [13], supporting the results of previous studies [3, 48]. In the prediction of low number of oocytes aspirated, basal AMH presented the largest area under the curve (AUC=0.92) among all variables tested, followed by AFC (AUC=0.78) and age (AUC=0.63). Considering the cut-off value of 0.25 pg/mL, the sensitivity of AMH was 90.9% and its specificity 90.9%, with positive and negative predictive values of 96.8% and 76.9%, respectively [13]. La Marca et al. ratified the use of AMH for the prediction of a poor response by demonstrating 80% sensitivity and 93% specificity in AR cycles when a threshold of 0.75 ng/mL was considered [57]. The same conclusion was reached with higher thresholds [58], with the lack of a cut-off combining satisfactory sensitivity and specificity for routine use continuing to represent a considerable drawback.

Attempts have also been made to correlate serum AMH levels with the occurrence of pregnancy in AR cycles. Values higher than 2.7 ng/mL were associated with higher rates of implantation and pregnancy (although not significantly so) and the levels measured on the day of human chorionic gonadotropin (hCG) administration were superior (AUC=0.647) to those of basal FSH regarding the prediction of embryo quality [23]. Recent studies carried out to determine the value of AMH as a marker of the response to the stimulus were unable to establish its value as a predictor of pregnancy [58].

In view of the scarcity of studies and of the lack of standardization of a cut-off with high sensitivity and specificity, it is still too early to determine the real importance of AMH in the prediction of a response and of ovarian reserve. However, based on the favorable results reported and on the proven significant correlation with important variables such as AFC and the quantity of matured or aspirated oocytes [13, 57], we believe in a promising future for this marker.

Dynamic markers

Clomiphene citrate challenge test

The clomiphene citrate challenge test (CCCT) was first described by Navot et al. more than two decades ago [59] and, together with the determination of basal FSH, is one of the tests most extensively used to predict the ovarian response [60]. The physiological explanation of the test is based on the property of clomiphene to antagonize estrogen in its pituitary receptors, simulating temporary estrogen deprivation, with a compensatory increase in FSH and in

follicle retrieval. In patients with a good ovarian reserve, this recruitment would be successful, producing E2 and again reducing FSH levels, whereas in patients with a compromised reserve, follicle recruitment would fail despite the elevation in FSH, with a lower E2 production and a slow reduction of FSH levels. In addition, despite regular cycles, in women with a reduced ovarian reserve the production of inhibin-B by granulosa cells would be lower, a fact that, due to the absence of a negative pituitary feedback, would lead to excessive elevation of circulating FSH levels after administration of the drug [32, 59].

In the original study by Navot et al., clomiphene citrate was administered to women aged 35 years or older at the oral dose of 100 mg between days 5 and 9 of the menstrual cycle. Basal FSH, LH and E2 levels were determined on days 2 and 3 of the menstrual cycle and the response was determined on days 9 to 11 of the cycle. The prediction of a poor ovarian response was considered to occur in women whose sum of basal and post stimulation with clomiphene FSH levels corresponded was higher than 26 mIU/mL, as confirmed by the significantly lower pregnancy rates in relation to patients considered to have an adequate gonadal reserve [59]. A few years later, Loumaye et al. supported previous results, but suggested that a poor response would occur when the sum of basal and post-stimulus levels was higher than 22.5 IU/mL [61].

The CCCT has been accepted as a prognostic indicator of reproductive performance in assisted cycles, with a higher negative than positive predictive value. However, as is the case for other markers of ovarian reserve and follicular response to the exogenous stimulus, at present the opinions about its use are controversial.

Kwee et al. evaluated CCCT in the prediction of a poor ovarian response to stimulation (<6 aspirated oocytes) and detected an AUC=0.88 in a population aged 18 to 39 years, with no influence of age on the response to the test [62]. However, a study carried out in our service by Franco et al. had already demonstrated that sensitivity of basal FSH alone was higher than that of CCCT for prediction of follicular development regarding the values suggested by both Navot et al. and Loumaye et al. [16].

Corson et al. detected some prognostic value of the test in women older than 35 and in women with a history of poor response, but correlation with the other hormonal markers was low both for basal levels and levels on the tenth day of the menstrual cycle [35]. Thus, many recent reports have demonstrated that CCCT has no advantage over basal measurement of FSH [60, 63, 64], especially for younger women.

Regarding the prediction of pregnancy, Watt et al. observed that the CCCT is not superior to the evaluation of basal FSH, even in women older than 40 [15]. On this basis, its value is reduced when questions such as costs and

potential adverse effects of ovarian stimulation are considered, with its indication being reserved for specific cases.

Gonadotropin analogue stimulation test

The gonadotropin analogue stimulation test (GAST) is based on the induction of the FSH, LH and E2 peaks (flare up response) that occur within 24 h of its administration, followed by prolonged pituitary inhibition. The levels of E2 and inhibin-B appear to reflect ovarian follicle integrity, as is also the case for FSH levels, as interpreted after the administration of clomiphene [65].

Although this was not the main objective of their study, Scheffer et al. demonstrated that 24 h after the administration of the GnRH agonist, the production of estradiol and inhibin-B was significantly elevated [66], supporting data obtained in other studies over the last decade [65, 67] and the impression that they were superior to basal levels when the objective is to determine the ovarian follicle reserve. Ravhon et al. detected a significant positive correlation between the ovarian response and variables such as the sum of basal and post-stimulus inhibin-B levels, and the increase in E2 after the stimulus [67].

However, the value of GAST as a test of ovarian reserve is not consensual. Hendriks et al. evaluated 57 women candidates for IVF and, although they recognized some value of the test for this purpose or as a predictor of pregnancy, they reported that it did not show a better clinical performance than the determination of basal inhibin-B or AFC, even when subsequent tests were performed [63]. Similarly, McIlven et al. also detected a predictive value of elevated E2 levels after GAST for the cancellation of AR cycles in women older than 39, with a previous poor response or a basal FSH known to be elevated [68]. This, however, cannot be extrapolated to the general population of subfertile women.

GAST accuracy in predicting follicular response is similar to that obtained with AFC, opening perspectives for further research [7]. However, its use is questioned in view of the high financial cost and the risks of exogenous stimulation involved, without a direct relation to a real attempt to obtain a pregnancy.

Exogenous FSH ovarian reserve test

Like a-GnRH, exogenous FSH has also been administered in order to assess ovarian reserve. The exogenous FSH ovarian reserve test (EFFORT) is applied after the subcutaneous administration of 300 IU of recombinant FSH (rFSH) on cycle day 3. After the evaluation of E2 and inhibin-B in a previously collected blood sample, the increase in these hormones is evaluated 24 h after the administration of rFSH in order to determine the functional condition of the ovarian apparatus [62].

In a first study, Kwee et al. stated that increased levels of E2 and inhibin-B after EFORT had the best predictive value for the number of follicles obtained after stimulation, whereas CCCT was not superior to basal hormone levels [69]. Furthermore, the same group later evaluated EFORT for prediction of a poor ovarian response, when sensitivity was found to be good, with an AUC=0.86 for the increase in basal inhibin-B levels in the age range of 18 to 39 years. When basal FSH was associated with this increase, the AUC=0.87 [62].

It is probable that the test of stimulation with exogenous FSH will improve the prediction of ovarian response compared to basal markers [7]. However, its routine use involves elevated costs and the potential adverse effects of exogenous stimulation without a direct relation with a real attempt to obtain a pregnancy. Thus this test should be reserved for exceptional cases in which the estimated risks of hyperstimulation are carefully considered.

Ultrasonographic markers

Antral follicle count

Ultrasound antral follicle count (AFC) before the exogenous gonadotropin stimulus has been considered to be a good predictor of the response in AR cycles, thus reflecting ovarian follicular patrimony. A prospective study evaluating 120 women candidates for the first in vitro fertilization (IVF) cycle concluded that AFC is the most reliable basal marker of ovarian reserve in the prediction of a poor response [70].

Scheffer et al. experimentally evaluated predictors of ovarian aging and detected superiority of AFC (diameter 2 to 10 mm) both compared to biochemical markers such as E2, inhibin-B and FSH, and to ovarian volume, although a strong correlation was established between all of them [66]. According to Muttukrishna et al., AFC can identify 89% of patients who are poor responders before induction of ovulation with exogenous gonadotropins and, despite a reduced specificity of 39%, these investigators detected a significant association with the number of oocytes obtained and the probability of chemical pregnancy [51].

Although in their systematic review Broekmans et al. did not determine the value of AFC for the prediction of poor ovarian response, they admitted its importance as a screening test for couples who are candidates for AR [7], encouraging researchers to test it and permitting its gradual incorporation into protocols of pre-induction evaluation. Although its value is not yet universally recognized, recent studies have shown significant correlations with classically used serum markers [64] and with AMH [24, 42], as well as significant differences between women with a normal

response and with a poor response to gonadotropic stimulus [7]. In a recent study, Elgindy et al. evaluated AFC up to 10 mm in diameter and detected significant different amounts of 10.1 ± 3.0 and 5.7 ± 1.0 follicles for the two groups, respectively [7].

Special attention has been paid to small antral follicles which, like total AFC, have been shown to decrease significantly in number with age, whereas the pool of larger follicles may remain practically unchanged until about 45 years of age [64]. Klinkert et al. demonstrated that frequency of a normal response to stimulation was significantly higher in patients with $\text{AFC} \geq 5$ U with a diameter of 5 mm or less, and was accompanied by higher pregnancy rates [18]. In agreement, Haadsma et al. pointed out a significant correlation of follicles up to 6 mm in diameter with all the endocrine tests of ovarian reserve, in contrast to what is observed with larger follicles, which correlate only with ovarian volume and inhibin-B [64].

In summary, literature data seem to agree about the value of AFC as a predictor of ovarian response. On this basis and considering that AFC can be performed during ultrasound exams normally requested for routine gynecological evaluation, we believe that its inclusion as a marker of gonadal reserve in the management of all candidates to AR cycle is promising, with the count of at least five follicles measuring up to 6 mm predicting an adequate response to the stimulus.

Ovarian volume

As was the case for AFC, an attempt was made to associate ovarian volume (OV) determined by ultrasound with the functional patrimony of the gonad and with successful AR cycles. In a study conducted on 261 women aged 23 to 46 years, Syrop et al. demonstrated a clear reduction of E2 peaks, number of oocytes obtained and pregnancy rates with decreasing volume of the smaller ovary of patients submitted to AR cycles [71]. However, in a recent review of ten studies of ovarian volume as a marker of ovarian reserve, Broekmans et al. concluded that this marker has little clinical applicability for the prediction of a poor pregnancy response [7].

Other studies followed that systematic review, but controversy persists. While Bowen et al. demonstrated a significant correlation between reduction of ovarian measurements, increased age and elevated circulating FSH levels [72], Elgindy et al. did not detect significant differences in mean OV between women up to 37 years old with a normal or poor response to the stimulus (mean values of 4.1 ± 0.66 and 3.36 ± 0.71 cm³, respectively) [3]. McIlven et al. reached similar conclusion when evaluating women at high risk for the cancellation of AR procedures [68].

Thus, no predictive value should be attributed to the measurement of OV, although we believe that, because of

its easy execution, this measurement could be included in the preparatory protocols, adding information to the patient's medical records and providing data for the continuity of research.

Combined markers

Since no study succeeded in selecting a single marker of ovarian reserve of satisfactory sensitivity and specificity, the combination of markers has been proposed for a better estimate of functional gonadal capacity. However, a recent meta-analysis of 11 studies reporting various models of evaluation concluded that these combinations were similar to AFC alone to predict a poor response to IVF stimulation [73].

As a matter of fact, multivariate models evaluated were not sufficiently varied for the quantity of individual exams available, with few studies including AMH and with no study considering the combination of AMH and AFC, which are currently being extensively investigated in the evaluation of ovarian reserve. More studies evaluating this combination and others will be necessary to rule out the use of multivariate propaedeutic models which still seem to be the best strategies for the management of subfertile couples.

Role of ovarian reserve markers in the diagnosis of premature ovarian senescence

Premature ovarian ageing (POA) and premature ovarian failure (POF) compound a spectrum of ovarian dysfunction causing not just damage on fertility potential, but all clinical consequences of hypoestrogenism. POF is clinically defined as the complete absence of menstrual cycles before the age of 40 [74], whereas POA represent a milder degree of gonadal dysfunction in patients who still demonstrate some chance of pregnancy with autologous gametes up to menopausal FSH levels [75].

In spite of being associated to a vast spectrum of conditions, from gonadal dysgenesis to gonadotropin resistance [76], the etiology of premature ovarian senescence processes remains unknown in the majority of cases, mainly those with normal karyotypes [77]. Recent researches on POF diagnose has focused on mutations of the FSH receptor (FSHR) gene [78, 79], other genetic diseases which involves intermediate stages on mutation expansion of X-linked genes [80], autoimmune function [81] and abnormal AMH expression in granulosa cells, leading to impaired follicular development [77]. Yet, special attention is being modernly given to cancer survivors, who normally present with ovarian reserve damage associated to chemotherapy and/or radiotherapy repeated cycles.

In regard of an accurate clinical investigation in such cases, several ovarian reserve markers have been tested, but no confident conclusions have been achieved until now. Although currently used in secondary amenorrhea investigation, diagnostic criteria for the establishment of ovarian senescence stages have not been definitively delineated. According to Conway, POF is considered in women with at least 4 months of amenorrhea associated with elevated FSH serum levels in two occasions [82], but it has been demonstrated that plasma levels of FSH have been considered of limited value in POF patients ovarian reserve prediction, which means it is not solely accurate to make a diagnosis of irreversible ovarian failure, even for amenorrheic women or those presenting menopausal symptoms [83–86].

Even E2 and inhibin-B, which should directly reflect granulosa cells function, do not supply clinical needs for the estimation of the gonadal functional patrimony [86]. Actually, the mentioned markers seem to be altered only in late stages of the ovarian aging process. A recent study of Tsigkou et al. suggested inhibin-B should sign an autoimmune etiology for ovarian insufficiency as a result of precocious thecal destruction with preservation of granulosa cells [87].

Low consistent results in literature lead to researches on new markers, like AMH. Massin et al. considered its serum levels, histological analysis of ovarian follicles and AMH immunoexpression in POF women granulosa cells; the authors found out low or under detection threshold serum levels of the hormone in patients with diminished follicular population and observed that antral follicle AMH immunostaining in POF gonads was dissimilar from the diffuse labeling observed in healthy granulosa cells. However, in spite of these promising results, positive and negative predictive values of 66,7% and 60% were not sufficient for sustaining this marker as a sole predictor of early ovarian decline in POF patients [77]. Sonographic evaluation was either performed in the study of Massin et al., but the authors assumed that it is not of predictive value in determining the presence of follicles within the gonad, once histological analysis could not display follicles in almost half of patients whose ultrasound scan had suggested their existence [77].

Considering current knowledge, it is not possible to determine an efficient combination of tests with sufficient accuracy to premature ovarian decline diagnosis and/or prognosis establishment. But, looking for accuracy in these patients' evaluation, AMH levels could be associated with that of FSH, especially in differential diagnosis for women presenting controversial clinical signs, which occur, for example, in cases of hypothalamic dysfunction causing secondary amenorrhea. In fact, recent studies have suggested that AMH does not offer a relevant advantage over commonly used markers [77], but it has been shown it is almost undetectable in women with POF [88]. Also it

presents significant variability between ages [89] and, as shown previously in this text, is strongly correlated to ovarian function in regard to assisted reproduction outcomes, corroborating theoretical hypothesis on hormone's physiology.

Final considerations and conclusions

The search for biochemical or ultrasonographic markers that can predict response to AR cycles can reduce the costs and potential side effects of excessive administration of exogenous gonadotropins. For young women, such markers should represent the opportunity of individualized planning by predicting the doses and results based on the estimated cohort of follicles available for retrieval. For older candidates, it would permit to determine the chances of success in the treatment of infertility, as suggested in the literature.

There is general agreement about the idea that the best marker of ovarian reserve should be able to identify women whose chances of pregnancy in AR cycles would be so close to zero that it would not be justified to submit them to the potential adverse effects of exogenous stimulation. Unfortunately, currently available tests do not provide sufficient evidence to be considered ideal and, until new studies will provide more consistent results, directly submitting women to a highly complex technique has been questioned to be an appropriate strategy in order to determine the follicular status.

However, we have no doubt that the markers of ovarian reserve occupy an important place in the initial approach to the treatment of subfertile couples, predicting the possibility of unsatisfactory results that could be improved by differentiated induction schemes, reducing excessive psychological and financial burdens and the occurrence of heterogeneous events. It should be remembered that the ability of a test to predict the gonadal response (follicular development and number of oocytes) usually exceeds the ability to predict pregnancy since the this last one depends on variables such as the characteristics and conservation of the gametes, the fertilization technique used, seminal quality, embryo conservation and evolution, the characteristics of the endometrial cavity and of the pelvic-peritoneal microenvironment. On this basis, and since it is not possible to guarantee the accuracy of a single test for the prediction of ovarian reserve, the key to better counseling may reside in the joint analysis of distinct markers of ovarian reserve that will provide the necessary information for the formulation of appropriate stimulation protocols for each couple.

Although basal FSH, E2 and inhibin-B are being classically used to infer gonadal function, the search for a marker that better reflects the quantity and quality of primordial follicles, and therefore the functional ovarian

reserve, has led to scientific emphasis on AMH. In addition to being present in stable serum levels along the menstrual cycle, its main advantage over other markers, AMH may possibly be the only marker that can potentially assess the follicular population as a whole, including still inactive follicles, since it reflects the transition of follicles from primordial to early antral follicles.

When compared to dynamic markers, basal markers (endocrine or ultrasonographic) have definite advantages regarding practicality, lower costs and harmlessness, so that the use of dynamic tests as markers of ovarian reserve for women candidates to AR is much more an exception than a rule. We believe, however, that the CCCT is still of some value in the prediction of a poor response, involving fewer risks than the GAST and EFORT.

A lower probability of adverse effects confers a role to ultrasound markers in the prediction of ovarian reserve, but their routine use is limited by the subjectivity of examiner-dependent measures and by the possible variability between cycles, which may lead to excessively discrepant results.

Finally, it is important to point out that in the present report we did not consider specific groups of the population of subfertile women, such as women with endometriosis, hyperandrogenic anovulation or other endocrine-metabolic disorders. Thus, the behavior of ovarian reserve markers may differ in these populations and become of higher value in the prediction of success in AR cycles.

In order to remedy the limitations due to the scarcity of strong evidence about the topic, future studies should try to clarify the predictive value of ovarian reserve/response markers, with special attention to specific subfertility-related diseases and propaedeutic multivariate models combining more than one marker, including AMH and AFC in the list, with should be extended to premature ovarian senescence cases, independently from subfertility complaints.

Acknowledgement

Conflict of interest statement The authors of the present study declare that they are not involved in any organization or entity of financial interest and that they have no conflict of interest regarding the topic in question or the materials discussed in the text. This includes work relations, consultancies, honoraria and authors' rights. There was no assistance in the writing of the paper in addition to that of the authors themselves. However, the authors wish to thank Mrs. Elettra Greene for translating the Portuguese original.

References

- Block E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages. *Acta Anat (Basel)* 1952;14:108–23. doi:10.1159/000140595.
- Leridon H. 30 years of contraception in France. *Contracept Fertil Sex* 1998;26:435–8.
- Elgindy EA, El-Haieg DO, El-Sebaey A. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril* 2007;89:1670–6.
- Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;17:121–55. doi:10.1210/er.17.2.121.
- Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005;45:20–4. doi:10.1111/j.1479-828X.2005.00332.x.
- Fanchin R, Taieb J, Lozano DHM, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod* 2005;20:923–7. doi:10.1093/humrep/deh688.
- Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Updat* 2006;12:685–718. doi:10.1093/humupd/dml034.
- Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA. Elevated levels of basal estradiol-17 β predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;69:1010–4. doi:10.1016/S0015-0282(98)00080-6.
- Frattarelli JL, Bergh PA, Drews MR, Sharara FI, Scott RT. Evaluation of basal estradiol levels in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2000;74:518–24. doi:10.1016/S0015-0282(00)00693-2.
- Scott RT, Toner JP, Muasher SJ, Oehninger S, Robinson S, Rosenwaks Z. Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1989;51:651–4.
- Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995;64:991–4.
- Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1995;64:1136–40.
- Fiçicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular anti-Müllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2006;85:592–6. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.09.019.
- Lee SJ, Lenton EA, Sexton L, Cooke ID. The effect of age on the cyclical patterns of plasma LH, FSH, oestradiol and progesterone in women with regular menstrual cycles. *Hum Reprod* 1988;3:851–5.
- Watt AH, Legedza ATR, Ginsburg ES, Barbieri RL, Clarke RN, Hornstein MD. The prognostic value of age and follicle-stimulating hormone levels in women over forty years of age undergoing in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:264–8. doi:10.1023/A:1009458332567.
- Franco RC, Ferriani RA, Moura MD, Reis RM, Ferreira RA, de Sala MM. Evaluation of ovarian reserve: comparison between basal FSH level and clomiphene test. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2002;24:323–7.
- Ashrafi M, Madani T, Tehranian AS, Malekzadeh F. Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Int J Gynaecol Obstet* 2005;91:53–7. doi:10.1016/j.ijgo.2005.06.017.
- Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. 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* 2005;83:811–4. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.11.005.
- van Montfrans JM, Hoek A, van Hooff MH, de Koning CH, Tonch N, Lambalk CB. Predictive value of basal follicle-

- stimulating hormone concentrations in a general subfertility population. *Fertil Steril* 2000;74:97–103. doi:10.1016/S0015-0282(00)00560-4.
20. Letterie GS, Lee JS, Padmanabhan V. Assessment of ovarian reserve by using the follicle-stimulating hormone isoform distribution pattern to predict the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;86:1547–9. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.03.060.
 21. van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Broekmans FJ, et al. Predictive value and clinical impact of basal follicle-stimulating hormone in subfertile, ovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2163–8. doi:10.1210/jc.2006-2399.
 22. Luna M, Grunfeld L, Mukherjee T, Sandler B, Copperman AB. Moderately elevated levels of basal follicle-stimulating hormone in young patients predict low ovarian response, but should not be used to disqualify patients from attempting in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007;87:782–7. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.08.094.
 23. Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, et al. Müllerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo quality. *Hum Reprod* 2006;21:159–63. doi:10.1093/humrep/dei270.
 24. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003;18:323–7. doi:10.1093/humrep/deg042.
 25. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8:133–46. doi:10.1101/gad.8.2.133.
 26. Hayes FJ, Hall JE, Boepple PA, Crowley WF. Clinical review 96: differential control of gonadotropin secretion in the human: endocrine role of inhibin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1835–41. doi:10.1210/jc.83.6.1835.
 27. Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, McNeilly AS, Battaglia DE, Soules MR. Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2742–5. doi:10.1210/jc.81.7.2742.
 28. Magoffin DA, Jakimiuk AJ. Inhibin A, inhibin B and activin A in the follicular fluid of regularly cycling women. *Hum Reprod* 1997;12:1714–9. doi:10.1093/humrep/12.8.1714.
 29. Welt CK, Schneyer AL. Differential regulation of inhibin B and inhibin a by follicle-stimulating hormone and local growth factors in human granulosa cells from small antral follicles. *Clin Endocrinol Metab* 2001;86:330–6. doi:10.1210/jc.86.1.330.
 30. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, et al. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1401–5. doi:10.1210/jc.81.4.1401.
 31. Seifer DB, Lambert Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 1997;67:110–4. doi:10.1016/S0015-0282(97)81865-1.
 32. Hoffman GE, Danforth DR, Seifer DB. Inhibin-B: the physiologic basis of the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril* 1998;69:474–7. doi:10.1016/S0015-0282(97)00531-1.
 33. Tinkanen H, Bläuer M, Laippala P, Tuohimaa P, Kujansuu E. Correlation between serum inhibin B and other indicators of the ovarian function. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;94:109–13. doi:10.1016/S0301-2115(00)00319-5.
 34. Hall JE, Welt CK, Cramer DW. Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod* 1999;4:409–15. doi:10.1093/humrep/14.2.409.
 35. Corson SL, Gutmann J, Batzer FR, Wallace H, Klein N, Soules MR. Inhibin-B as a test of ovarian reserve for infertile women. *Hum Reprod* 1999;14:2818–21. doi:10.1093/humrep/14.11.2818.
 36. Scheffer JB, Lozano DM, Frydman R, Fanchin R. Relationship of serum anti-Müllerian hormone, inhibin B, estradiol and FSH on day 3 with ovarian follicular status. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2007;29:186–91. doi:10.1590/S0100-72032007000400004.
 37. Franchimont P, Hazeé-Hagelstein MT, Charlet-Renard C, Jaspard JM, Hazout A, Salat-Baroux J, et al. Correlation between follicular fluid content and the results of in vitro fertilization and embryo transfer. II. Inhibin and aromatase inhibitor activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:748–54.
 38. Fowler PA, Fahy U, Culler MD, Knight PG, Wardle PG, McLaughlin EA, et al. Gonadotrophin surge-attenuating factor bioactivity is present in follicular fluid from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1995;10:68–74.
 39. Josso N. Anti-Müllerian hormone and Sertoli cell function. *Horm Res* 1992;38(Suppl 2):72–6.
 40. Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3836–44. doi:10.1210/jc.84.10.3836.
 41. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10:77–83. doi:10.1093/molehr/gah015.
 42. Visser JA, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2005;234:81–6. doi:10.1016/j.mce.2004.09.008.
 43. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong EH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999;140:5789–96. doi:10.1210/en.140.12.5789.
 44. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001;142:4891–9. doi:10.1210/en.142.11.4891.
 45. di Clemente N, Goxe B, R'emy JJ, Cate RL, Josso N, Vigier B, Salesse R. Inhibitory effect of AMH upon aromatase activity and LH receptors of granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine* 1994;2:553–8.
 46. Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, et al. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice. *Endocrinology* 2007;148:2301–8. doi:10.1210/en.2006-1265.
 47. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril* 1999;72:845–51. doi:10.1016/S0015-0282(99)00396-9.
 48. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, et al. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002;17:3065–71. doi:10.1093/humrep/17.12.3065.
 49. te Velde E, Pearson P. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Updat* 2002;8:141–54. doi:10.1093/humupd/8.2.141.
 50. Gruijters M, Visser J, Durlinger A, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2003;211:85–90. doi:10.1016/j.mce.2003.09.024.

51. Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-Müllerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG* 2005;112:1384–90. doi:10.1111/j.1471-0528.2005.00670.x.
52. La Marca A, Stabile G, Arsenio AC, Volpe A. Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2006;21:3103–7. doi:10.1093/humrep/del291.
53. Hehenkamp WJK, Looman CWN, Themmen APN, de Jong FH, te Velde ER, Broekmans JM. Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4057–63. doi:10.1210/jc.2006-0331.
54. Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy C, Englert Y. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 2007;22:1837–40. doi:10.1093/humrep/dem101.
55. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002;77:357–62. doi:10.1016/S0015-0282(01)02993-4.
56. Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan N. Inhibin B and anti-Müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG* 2004;111:1248–53. doi:10.1111/j.1471-0528.2004.00452.x.
57. La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, et al. Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2007;22:766–71. doi:10.1093/humrep/del421.
58. Gnath C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod* 2008;23:1359–65.
59. Navot D, Rosenwaks Z, Margalioth EJ. Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet* 1987;2:645–7. doi:10.1016/S0140-6736(87)92439-1.
60. Jain T, Soules MR, Collins JA. Comparison of basal follicle-stimulating hormone versus the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril* 2004;82:180–5. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.11.045.
61. Loumaye E, Billion JM, Mine JM, Psalti I, Pensis M, Thomas K. Prediction of individual response to controlled ovarian hyperstimulation by means of a clomiphene citrate challenge test. *Fertil Steril* 1990;53:295–301.
62. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Schoemaker J, Lambalk CB. The clomiphene citrate challenge test versus the exogenous follicle-stimulating hormone ovarian reserve test as a single test for identification of low responders and hyperresponders to in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;85:1714–22. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.11.053.
63. Hendriks DJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, de Jong FH, Looman CW, te Velde ER. Repeated clomiphene citrate challenge testing in the prediction of outcome in IVF: a comparison with basal markers for ovarian reserve. *Hum Reprod* 2005;20:163–9. doi:10.1093/humrep/deh553.
64. Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EMA, Groenewoud ER, Heineman MJ, et al. The number of small antral follicles (2–6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum Reprod* 2007;22:1925–31. doi:10.1093/humrep/dem081.
65. Ranieri DM, Quinn F, Makhlof A, Khadum I, Ghutmi W, McGarrigle H, et al. Simultaneous evaluation of basal follicle-stimulating hormone and 17 beta-estradiol response to gonadotropin-releasing hormone analogue stimulation: an improved predictor of ovarian reserve. *Fertil Steril* 1998;70:227–33. doi:10.1016/S0015-0282(98)00159-9.
66. Scheffer GJ, Broekmans FJM, Looman CWN, Blankenstein M, Fauser BCJM, de Jong FH, et al. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod* 2003;18:700–6. doi:10.1093/humrep/deg135.
67. Ravhon A, Lavery S, Michael S, Donaldson M, Margara R, Trew G, et al. Dynamic assays of inhibin B and oestradiol following buserelin acetate administration as predictors of ovarian response in IVF. *Hum Reprod* 2000;15:2297–301. doi:10.1093/humrep/15.11.2297.
68. McIlven 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;22:778–85. doi:10.1093/humrep/del435.
69. Kwee J, Elting MW, Schats R, Bezemer R, Lambalk CB, Schoemaker J. Comparison of endocrine tests with respect to their predictive value on the outcome of ovarian hyperstimulation in IVF treatment: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2003;18:1422–7. doi:10.1093/humrep/deg205.
70. Bancsi LFJMM, Broekmans FJM, Eijkemans MJC, de Jong FH, Habbema JDF, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002;77:328–36. doi:10.1016/S0015-0282(01)02983-1.
71. Syrop CH, Dawson JD, Husman K, Sparks AET, Van Voorhis BJ. Ovarian volume may predict assisted reproductive outcomes better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. *Hum Reprod* 1999;14:1752–6. doi:10.1093/humrep/14.7.1752.
72. Bowen S, Norian J, Santoro N, Pal L. Simple tools for assessment of ovarian reserve (OR): individual ovarian dimensions are reliable predictors of OR. *Fertil Steril* 2007;88:390–5. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.11.175.
73. Verhagen TEM, Hendriks DJ, Bancsi LFJMM, Mol BWJ, Broekmans FJM. The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Hum Reprod Updat* 2008;14:95–100. doi:10.1093/humupd/dmn001.
74. Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986;67:604–6.
75. Gleicher N, Barad D. “Ovarian age-based” stimulation of young women with diminished ovarian reserve results in excellent pregnancy rates with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;86:1621–5. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.04.046.
76. Anasti JN. Premature ovarian failure: an update. *Fertil Steril* 1998;70:1–15. doi:10.1016/S0015-0282(98)00099-5.
77. Massin N, Méduri G, Bachelot A, Mishrafi M, Kuttann F, Touraine P. Evaluation of different markers of the ovarian reserve in patients presenting with premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol* 2008;282:95–100. doi:10.1016/j.mce.2007.11.017.
78. Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S, et al. A novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1151–5. doi:10.1210/jc.87.3.1151.
79. Méduri G, Touraine P, Beau I, Lahuna O, Desroches A, Vacher-Lavenu MC, et al. Delayed puberty and primary amenorrhea associated with a novel mutation of the human follicle stimulating hormone receptor: clinical, histological and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3491–8. doi:10.1210/jc.2003-030217.
80. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. A pilot study of premature ovarian senescence: I. Correlation of triple CGG repeats on the FMR1 gene to ovarian reserve parameters FSH and anti-Müllerian hormone. *Fertil Steril* 2008;in press.

81. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. A pilot study of premature ovarian senescence: II. Different genotype and phenotype for genetic and autoimmune etiologies. *Fertil Steril* 2008;in press.
82. Conway GS. Premature ovarian failure. *Br Med Bull* 2000;3:643–9. doi:10.1258/0007142001903445.
83. Rebar RW, Connolly HV. Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil Steril* 1990;53:804–10.
84. Nelson LM, Kimzey LM, White BJ, Merriam GR. Gonadotropin suppression for the treatment of karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure: a controlled trial. *Fertil Steril* 1992;57:50–5.
85. Nelson LM, Anasti JN, Kimzey LM, Defensor RA, Lipetz KJ, White BJ, et al. Development of luteinized Graafian follicles in patients with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1470–5. doi:10.1210/jc.79.5.1470.
86. Massin N, Gougeon A, Meduri G, Thibaud E, Laborde K, Matuchansky C, et al. Significance of ovarian histology in the management of patients presenting a premature ovarian failure. *Hum Reprod* 2004;19:2555–60. doi:10.1093/humrep/deh461.
87. Tsigkou A, Marzotti S, Borges L, Brozzetti A, Reis F, Candeloro P, et al. High serum inhibin concentration discriminates autoimmune oophoritis from other forms of primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(4):1263–9. doi:10.1210/jc.2007-1675.
88. La Marca A, Pati M, Orvieto R, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A. Serum anti-Müllerian hormone levels in women with secondary amenorrhea. *Fertil Steril* 2006;85:1547–9. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.10.057.
89. van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, et al. Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril* 2005;83:979–87. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.11.029.

APÊNDICE B

Termo de consentimento de guarda de material 2006

O preenchimento e assinatura deste termo de consentimento têm como objetivo a autorização para guardar uma amostra de sangue coletado do (a) Sr (a).

Este material será guardado em um freezer no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, identificado por um número, de forma a garantir o sigilo de sua identidade. Este sangue guardado poderá ser utilizado para novos exames ou para pesquisa, e o(a) Sr(a) será informado(a) de possíveis informações adquiridas a partir deste material e poderá se beneficiar das descobertas que ocorrerem em estudos com o seu material.

Este banco de amostras chama-se “Banco de Amostras Sangüíneas de Pacientes com Infertilidade Conjugal” do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP” e seu responsável é o Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani (tel.: 3602-2815 ou 3602-2816).

Para a utilização do seu material guardado, será solicitada novamente a sua autorização. Todas as pesquisas serão autorizadas por um Comitê de Ética em Pesquisa e o(a) Sr(a) será comunicado(a) e poderá concordar ou não com o uso do material neste estudo.

Autorizo coletar e guardar uma amostra do meu sangue para uso futuro em pesquisas, com meu consentimento.

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente

Data

Eu conversei sobre a guarda de material em banco de amostra com o paciente utilizando uma linguagem adequada e apropriada. Acredito que o informei o suficiente para tomada de decisão de maneira livre e esclarecida.

Assinatura do médico

Data

Nome, endereço e telefone do responsável pelo banco de amostras:

Prof Dr. Rui Alberto Ferriani

Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP

Tel: 3602-2815 ou 3602-2816

APÊNDICE C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa:

HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO, HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE, CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS E MEDIDA DO VOLUME OVARIANO COMO MARCADORES DA RESERVA FOLICULAR E PREDITORES DA RESPOSTA À HIPERESTIMULAÇÃO GONADOTRÓFICA EM CICLOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA, EM MULHERES PORTADORAS DE ENDOMETRIOSE

Pesquisadores envolvidos:

Orientadora: Professora Doutora Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Pesquisadores: Bruno Ramalho de Carvalho; Dr Júlio César Rosa e Silva; Professor Doutor Rui Alberto Ferriani; Professora Doutora Rosana Maria dos Reis; Professor Doutor Marcos Felipe Silva de Sá

1. CONTEXTO

Este texto é direcionado às mulheres atendidas no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, com diagnóstico de infertilidade conjugal e encaminhadas para tratamento no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia com técnica de reprodução assistida, podendo ser ou não portadoras de endometriose.

2. Justificativa e objetivo da pesquisa:

Essa é uma pesquisa que vai estudar as consequências da endometriose sobre a reserva ovariana, ou seja, sobre as chances de os ovários responderem ao estímulo feito durante o tratamento com reprodução assistida.

Para isso, serão realizadas dosagens hormonais no sangue colhido e armazenado antes do seu ciclo de reprodução assistida, inclusive de um hormônio que ainda está sendo pesquisado, o hormônio anti-mülleriano.

A idéia de avaliar o hormônio anti-mulleriano, além do hormônio FSH (classicamente dosado) e das medidas dos seus ovários já feitas por ultra-som é tentar encontrar marcadores para fazermos a previsão de que pacientes terão melhor resposta e, conseqüentemente, maiores chances de uma gravidez.

3. Os procedimentos que serão utilizados:

Para este estudo, você não precisará colher mais amostras de sangue ou ser submetida a qualquer novo exame. Será utilizado o sangue que já foi colhido, durante a sua avaliação pré-basal, antes do seu ciclo de reprodução assistida. Esse sangue será armazenado em três recipientes e apenas utilizaremos um deles para realização desta pesquisa, permanecendo os demais congelados, para possíveis novas pesquisas com vistas a melhorar os resultados de reprodução assistida.

4. Os riscos esperados:

Não há riscos esperados. Não serão feitas pesquisas de doenças ou qualquer outras avaliações nesta pesquisa, que não as dosagens hormonais já mencionadas, além da utilização dos dados constantes do seu prontuário médico.

Tendo lido todo o texto e recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos, abaixo relacionados, eu, _____

_____, RG _____, Registro no HCFMRP

_____, concordo e aceito o convite para participar como **VOLUNTÁRIA** da pesquisa em questão.

Declaro, assim, que:

Autorizo a utilização do sangue armazenado apenas para esta pesquisa.

Autorizo a utilização do sangue armazenado para esta pesquisa e outras pesquisas que venham a acontecer, que envolvam reprodução assistida.

São meus direitos:

1. Possuir uma cópia deste documento, ficando outra igual com o pesquisador responsável;
2. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa para a qual sou voluntária;
3. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, em qualquer fase dele, sem penalização alguma e sem que isso traga prejuízo ao meu cuidado;
4. A segurança de que não serei identificada e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
5. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando.

Ribeirão Preto (SP), ____ de _____ de 2006.

VOLUNTÁRIA

Dra Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Pesquisadora responsável