

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

MARIA LUCIA DOS SANTOS LIMA

**Relação do peso ao nascer com a concentração
sérica de hormônio antimülleriano: Estudo
transversal aninhado a uma coorte de mulheres na
menacme**

**RIBEIRÃO PRETO
2016**

MARIA LUCIA DOS SANTOS LIMA

**Relação do peso ao nascer com a concentração
sérica de hormônio antimülleriano: Estudo
transversal aninhado a uma coorte de mulheres na
menacme**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Médicas.

Área de Concentração: **Ginecologia e
Obstetrícia.**

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

RIBEIRÃO PRETO

2016

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Maria Lucia dos Santos

Relação do peso ao nascer com a concentração sérica de hormônio antimülleriano: Estudo transversal aninhado a uma coorte de mulheres na menacme. / Maria Lucia dos Santos Lima / Orientadora: Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro. Ribeirão Preto, 2016.

73p.:2il.; 30 cm

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

1. Peso ao nascer; 2. Reserva ovariana 3. Hormônio antimülleriano (AMH)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluna: Maria Lucia dos Santos Lima

Título: Relação do peso ao nascer com a concentração sérica de hormônio antimülleriano: Estudo transversal aninhado a uma coorte de mulheres na menacme.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar a força, disciplina e a coragem que preciso para seguir no dia a dia e por ter colocado em minha vida, os anjos abaixo, que tornam esta minha caminhada muito mais feliz:

Minha mãe, agradeço por ser uma pessoa pura, fonte de perdão e bondade, que sempre abriu mão da sua vida pessoal pelo meu bem estar. Por ser a razão de eu ser o que sou hoje, por ser o pai que eu nunca tive e por ter feito de tudo para que recebesse a educação que ela mesma nunca teve. Por todos os finais de semana que veio para Ribeirão, simplesmente para que eu não ficasse triste, ou me fazer companhia nos momentos de solidão. Por todas as horas que ficou no telefone comigo, enquanto eu me deslocava para plantões e tinha medo das estradas. Se eu conseguir ser metade da mãe que você é, sei que meu filho será muito feliz!

Meu marido, que até hoje me faz descobrir diariamente o que é o amor. Esteve ao meu lado em todas as fases desta minha jornada. Sem suas palavras de conforto toda noite, eu teria desistido na primeira semana. Agradeço, não só pela paciência com a distância, mas por revisar todos os meus textos, fazer as críticas necessárias para o meu crescimento acadêmico e por ter se tornado o engenheiro que mais sabe sobre reprodução humana que eu conheço. Sem você, nada disso seria possível!

Minha orientadora, Profa. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro, que é meu maior exemplo de competência e inteligência, uma das pessoas que mais admiro e me espelho no tipo de profissional que quero ser. Obrigada, não apenas pela brilhante orientação, mas por ouvir todas as minhas lamentações de vida profissional e sempre acreditar em mim, me acolhendo com palavras de compreensão e carinho.

Agradeço ao Prof. Dr. Wellington de Paula Martins, por ter me apresentado ao mundo dos artigos e por ter me proporcionado minha primeira publicação. Obrigada pela atenção e por ter me impulsionado nesses primeiros passos da vida acadêmica.

Agradeço ao Prof. Dr. Gustavo Salata Romão, pelas contribuições ao texto e pelo estímulo acadêmico.

Agradeço à Silvy e D. Jurema, pelas orações e torcida em todas etapas deste processo, fazendo com que sua religiosidade e o Espírito Santo sempre acalmasse meu coração.

Agradeço a toda equipe USP, especialmente à Océlia, Maria Cristina, Albina e Tatiana, que me ajudaram não só com captação das pacientes, coleta de dados e realização de exames, mas por sempre o fazerem com um sorriso no rosto!

E por último, não menos importante agradeço ao pequeno Thomas, que carrego em meu ventre, que a doçura do seu nascimento reascenda o verdadeiro significado da vida, pois sem família para dividir as conquistas e as vitórias acadêmicas, nada disso faz sentido.

Apoio Financeiro



Este estudo recebeu o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

Resumo

LIMA, M. L. S. **Relação do peso ao nascer com a concentração sérica de hormônio antimülleriano: Estudo transversal aninhado a uma coorte de mulheres na menacme.** 73f. 2016. Dissertação (Mestrado) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto-SP. 2016.

Introdução: O processo de envelhecimento reprodutivo ocorre em virtude do declínio progressivo na quantidade e qualidade de óvulos que se inicia após a puberdade, se mantém ao longo da menacme, com redução gradual da fertilidade, e termina na menopausa, caracterizada pelo esgotamento do número de folículos e, conseqüentemente, da reserva ovariana funcional (ROF). A vida pré-natal constitui um importante período para o desenvolvimento dos órgãos genitais internos femininos e mudanças nessa fase podem ter repercussões futuras: quando o feto é submetido a condições adversas intrauterinas, mecanismos metabólicos e endócrinos de adaptação podem mudar o eixo metabólico pós-natal predispondo a certas doenças na vida adulta. Com base nesses dados, postulou-se que condições desfavoráveis de vida intrauterina que poderiam se refletir com alterações do peso ao nascer (PN) poderiam levar à reprogramação de genes envolvidos no controle da ROF e que talvez nascer pequeno para idade gestacional (PIG) ou grande (GIG) possibilitaria a interferência com a ROF estimada por meio das concentrações séricas do hormônio antimülleriano (AMH). **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar a relação do PN com a ROF, estimada por meio da concentração sérica do AMH em mulheres na menacme com 34 a 35 anos de idade. **Pacientes e Métodos:** Trata-se de um estudo transversal aninhado a uma coorte de mulheres que nasceram no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), no período de 01 de junho de 1978 e 31 de maio de 1979. O desfecho primário avaliado foi a concentração sérica de AMH, um marcador da ROF, e sua correlação com o PN, divididos em três grupos: PIG, adequado para a idade gestacional (AIG) e GIG. **Resultados:** Das 274 pacientes incluídas no estudo, 19 foram classificadas como PIG, 238 como AIG e 17 como GIG. As concentrações médias de AMH não foram significativamente diferentes ($p=0,11$) entre mulheres na menacme nascidas PIG, AIG e GIG (2,14 ng/mL, 2,13 ng/mL e 2,57 ng/mL, respectivamente). **Conclusão:** Não se observou diferença nas concentrações séricas de AMH entre mulheres nascidas PIG, AIG e GIG avaliadas entre 34 e 35 anos de idade. A casuística avaliada permitiu detectar ou descartar uma grande diferença entre os grupos (*effectsize* de 0,7). Dessa forma, evidenciou-se que o PN não apresenta grande influência sobre a ROF, estimada pelas concentrações séricas do AMH, em mulheres na menacme, entre 34 e 35 anos de idade. Caso novos estudos evidenciem que diferenças pequenas ou moderadas nas concentrações séricas do AMH possam apresentar relevantes repercussões clínicas em mulheres nesta faixa etária, outras pesquisas serão necessárias, sendo os dados do presente estudo úteis para o cálculo amostral.

Palavras-chave: Peso ao nascer, Reserva ovariana, Hormônio antimülleriano (AMH).

Abstract

LIMA, M. L. S. **Association between birth weight and functional ovarian reserve estimated through seric concentration of AMH: A nested cohort study of menacme women.** 73f. 2016. Dissertation (Master) Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. Ribeirão Preto-SP. 2016.

Background: The reproductive aging process occurs by a progressive decline in the quantity and quality of oocyte, starting after pubertal onset, remaining through menacme with gradual reduction of fertility and ends with menopause, which is the depletion of ovarian follicles and hence the depletion of functional ovarian reserve (FOR). Prenatal life corresponds to a critical window for the development of female internal genitalia and changes at this stage may have future repercussions: when the fetus is submitted to intra uterine adverse conditions, adaptive metabolic and endocrine mechanisms will change the metabolic axis in the postnatal period thereafter predisposing to several diseases in adulthood. Based on this correlation, we postulate that unfavorable conditions of intrauterine life that could reflect on birth weight (BW) could lead to the reprogramming of genes involved in the control of FOR and that maybe being born small for gestational age (SGA) or large for gestational age (LGA) could interfere with the FOR estimated through serum concentrations of Anti-Müllerian hormone (AMH). **Objective:** To investigate the relationship between BW and ROF estimated through AMH serum concentration in menacme women with 34-35 years old. **Patients and Methods:** This is a prospective birth cohort assessing all women who were born in Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) between June 1, 1978 and May 31, 1979. The primary endpoint was to evaluate serum AMH concentration, a marker of FOR and its correlation with BW divided into three groups: SGA, adequate for gestational age (AGA) and LGA. **Results:** Out of the 274 patients included in the study: 19 were classified as SGA, 238 as AGA, and 17 as LGA. The average of AMH concentration was not significantly different ($p=0.11$) among women in reproductive age born SGA, AGA and LGA (2.14 ng/mL, 2.13 ng/mL, and 2.57 ng/mL respectively). A variance analysis between the three groups and OR did not find a significant different between them ($p=0.11$). **Conclusion:** There was no difference in serum AMH concentration in women born SGA, AGA and LGA with 34 to 35 years old. This sample also allowed to detect or rule out a major difference between the groups (effect size of 0.7). In conclusion, BW does not have a great influence on FOR, estimated through serum AMH concentration in menacmewomen, between 34 and 35 years old. If new studies show clearly that small or moderate differences in serum AMH concentration could impact clinical outcomes in women at this age, further studies will be needed, and the data of this study could be useful for sample size calculation.

Keywords: Birth weight; Ovarian reserve; Anti-Müllerian Hormone (AMH).

Lista de Figuras

Figura 1: Fluxograma completo do estudo	46
Figura 2: <i>Boxplot</i> de AMH em relação aos grupos PIG, AIG e GIG	50

Lista de Quadros

Quadro 1: Fases de busca para recrutamento de pacientes	39
Quadro 2: Classificação do peso ao nascimento em relação à IG	44
Quadro 3: Percentual de PIG, AIG e GIG na coorte original e na atual	47

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características clínicas das pacientes incluídas no estudo.	48
Tabela 2: Pós-teste grupo a grupo em relação ao PN e peso atingido na vida adulta	48
Tabela 3: Medidas de resumo da variável AMH nos grupos PIG, AIG e GIG.....	49
Tabela 4: Medidas de resumo da variável log AMH nos grupos PIG, AIG e GIG	49
Tabela 5: Relação entre AMH e peso.....	51

Lista de Abreviaturas

ACOG-	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
AIG-	Adequado para a idade gestacional
AMH-	Hormônio antimülleriano
AMHR2-	Receptor do AMH tipo II
ASRM-	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
BPN-	Baixo peso ao nascimento
CFA-	Contagem de folículos antrais
DP-	Desvio padrão
EOC-	Estimulação ovariana controlada
FIV-	Fertilização <i>in vitro</i>
FMRP-USP-	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FSH-	Hormônio folículo estimulante
FOP-	Falência ovariana prematura
GIG-	Grande para a idade gestacional
HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
ICSI-	Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides
IG-	Idade gestacional
IMC-	Índice de massa corporal
Kg-	Quilogramas
PA-	Pressão arterial
PIG-	Pequeno para a idade gestacional
PN-	Peso ao nascimento
RA-	Reprodução assistida

Lista de Abreviaturas

RN-	Recém-nascido
RO-	Reserva ovariana
ROF-	Reserva ovariana funcional
SOP-	Síndrome do ovário policístico
TRA-	Tratamento de reprodução assistida
U-	Unidades

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1. O processo de redução da ROF.....	27
2.2. Importância da ROF no sucesso nos tratamentos de RA e gestação natural	27
2.3. Fatores de risco para redução precoce da ROF e antecipação da idade da menopausa	28
2.4. Alterações na vida pré-natal com repercussões na vida adulta	30
2.5. Exames utilizados para acessar a ROF	31
2.5.1. Hormônio antimülleriano.....	32
3. OBJETIVO	35
4. PACIENTES E MÉTODOS	37
4.1. Desenho do estudo	38
4.2. Contexto, população de estudo e aspectos éticos	38
4.3. Participantes - critérios de elegibilidade.....	39
4.4. Variáveis.....	40
4.4.1. Variáveis dependentes	40
4.4.2. Variáveis de caracterização da amostra	41
4.5. Tamanho do estudo.....	42
4.6. Análise estatística.....	43
5. RESULTADOS	44
5.1. Participantes do estudo.....	45
5.2. Variáveis clínicas	47
5.3. Resultado principal	49
5.4. Outras análises.....	49
6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSÃO	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
9. ANEXO	70

1- *Introdução*

A reserva ovariana funcional (ROF) reflete o número e a qualidade de folículos encontrados no ovário em determinado momento da vida (BROEKMANS et al. 2004) e está intimamente relacionada ao potencial reprodutivo feminino. A diminuição da ROF ocorre em virtude da redução da quantidade e qualidade oocitária (te VELDE; PEARSON, 2002), sucedendo-se concomitante ao avanço da idade da mulher. É um processo gradativo que se inicia no quarto mês da vida fetal feminina (FADDY et al. 1992; HANSEN et al., 2008; LEIDY; GODFREY; SUTHERLAND, 1998), período em que a mulher apresenta sua quantidade folicular máxima correspondente a 6-7 milhões, dos quais apenas 400-600 mil folículos permanecerão até a menarca (BLOCK, 1953, te VELDE; PEARSON, 2002).

Desse modo, ao longo da vida da mulher, uma parte desses folículos deixa o estado de repouso e inicia o processo de desenvolvimento folicular enquanto outra parte entra em atresia (LEIDY; GODFREY; SUTHERLAND, 1998). Com a chegada da puberdade, fatores endócrinos e parácrinos atuam em sinergismo no recrutamento de, geralmente, um único folículo da coorte dos folículos ativados, resultando na ovulação de um oócito e atresia dos demais folículos que haviam iniciado o seu desenvolvimento, enquanto que o restante desses folículos permanece em repouso por um período indeterminado (te VELDE; PEARSON, 2002). Quando o número de folículos remanescentes diminui para menos de 1.000 (FADDY; GOSDEN, 1996) acompanhado por um quadro de irregularidade menstrual, considera-se o início da transição menopáusica (SOULES et al., 2001). Tal evento se inicia por volta dos 46 anos, oscilando de 34 a 54 anos, em torno de cinco anos antes da menopausa (WEINSTEIN et al., 2003). Anos antes do estabelecimento dessa transição menopáusica, a diminuição da coorte folicular começa a apresentar impactos na vida reprodutiva da mulher, como diminuição expressiva de sua fertilidade (SOULES et al., 2001). Esta sequência temporal de eventos reprodutivos possui grande variação interindividual (te VELDE; PEARSON, 2002), porém alguns autores sugerem que a redução mais expressiva da fertilidade feminina ocorra cerca de 10 a 13 anos antes da idade da menopausa (FADDY; GOSDEN, 1996; PELOSI et al., 2015; THILAGAM, 2016). Dessa forma, a predição acurada da menopausa poderia auxiliar na determinação

da extensão do futuro reprodutivo das mulheres, essencial para o planejamento familiar.

A redução da ROF, que ocorre em paralelo à progressão da idade feminina, é um fator que se relaciona, tanto com o aumento da dificuldade de engravidar, contribuindo para o quadro de redução da fertilidade natural, quanto com a piora expressiva dos resultados dos procedimentos de reprodução assistida (RA) (HOURVITZ et al., 2009). Estudos mostram que as mulheres vivenciam redução mais expressiva da ROF após os 35 anos e mais acentuadamente, após os 40 anos. Nas mulheres com faixa etária entre 31 e 35 anos, há diminuição da taxa de gravidez cumulativa espontânea, e por volta dos 35-39 anos, um terço das mulheres experimenta dificuldade em conceber (MENKEN; TRUSSELL; LARSEN, 1986). Dos 40 aos 44 anos de idade, mais da metade de todas as mulheres terá sua capacidade reprodutiva consideravelmente prejudicada (MENKEN; TRUSSELL; LARSEN, 1986)

Com a crescente participação da mulher no mercado de trabalho e consequente adiamento da maternidade, tem aumentado o número de casos de infertilidade relacionada à idade feminina avançada (LAMPIC et al., 2006, MAHESHWARI; HAMILTON; BATTACHARYA, 2008) e a procura por tratamentos de reprodução assistida (TRA). Consequentemente, parte substancial dessas mulheres terá dificuldade de conceber naturalmente devido ao efeito corrosivo de idade na qualidade e quantidade oocitária. A probabilidade de não conceber o primeiro filho dentro de 12 meses é menor que 5% para as mulheres na faixa etária de 20 anos de idade, mas esse número aumenta para quase 30% quando se atinge a faixa etária de 35 anos (CHANDRA et al., 2005). Além disso, alguns autores confirmaram que a probabilidade de obtenção de um nascido vivo por meio de técnicas de RA reduz significativamente a partir dos 35 anos (TEMPLETON; MORRIS; PARSLOW, 1996) em função da diminuição da ROF, sendo pior para as mulheres de 40 anos ou mais (HOURVITZ et al., 2009).

Se por um lado, o avanço da idade feminina está relacionado à redução da fertilidade natural e piora dos resultados reprodutivos dos TRA, por outro a ROF também se relaciona com o sucesso reprodutivo desses tratamentos. Segundo dados da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva de 2012, dos 145.660

ciclos de RA analisados, cerca de 16% apresentavam ROF baixa como fator causal identificado, sendo que as taxas de nascidos vivos após TRA foram significativamente menores nas mulheres com baixa ROF comparadas às outras etiologias de infertilidade (fator masculino, endometriose, disfunção ovulatória e idiopática) (STERN et al., 2013). Cabe ressaltar que cerca de 41% das mulheres com ROF baixa tinham menos de 35 anos (STERN et al., 2013). Identificar fatores de risco para a redução precoce da ROF seria crucial para o aconselhamento populacional.

A única maneira de se obter uma estimativa real da ROF seria por meio da contagem de todos os folículos em repouso de ambos os ovários, realizado apenas em estudos *post-mortem* (BLOCK, 1952). Por isso, o desafio consiste em identificar e padronizar testes de reserva ovariana (RO) capazes de estimar de forma não invasiva a ROF. Atualmente, vários testes com esse objetivo estão disponíveis para avaliar a idade biológica do ovário e o seu potencial reprodutivo que, coincidentemente, são os mesmos desenvolvidos para predição dos resultados dos TRA como a fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (COMITTEE OPINION, 2015). Dentre eles, destacam-se a contagem de folículos antrais (CFA), o hormônio folículo estimulante (FSH) sérico e o hormônio antimülleriano (AMH) (LA MARCA; SUNKARA, 2014). Entretanto, a CFA necessita da disponibilidade de um aparelho de ultrassom, um profissional capacitado para realizar o exame, além de a paciente estar na fase folicular inicial do ciclo menstrual (SCHEFFER et al., 2003). O FSH apresenta baixa correlação com o número de folículos primordiais e a taxa de recrutamento folicular, além de capacidade limitada para diagnosticar disfunções ovarianas como a síndrome do ovário policístico (SOP) (NELSON, 2013). O AMH suplanta essas deficiências pela praticidade de realização em qualquer dia do ciclo menstrual e boa acurácia e, uma vez que se alcance o barateamento do seu custo e a padronização da melhor metodologia de dosagem e dos valores de normalidade ao longo da vida da mulher, provavelmente ele assumirá a posição de marcador isolado com maior potencialidade na predição da ROF.

Por último, questiona-se se a ROF apresenta relação com a reprogramação de genes que afetam órgãos e sistemas, incluindo o sistema

reprodutivo. Essa reprogramação seria ativada por determinadas condições da vida intrauterina. A hipótese de Barker, que discorre sobre a origem do desenvolvimento de uma doença no indivíduo adulto, afirma que características no início desse desenvolvimento, em particular durante a vida intrauterina, resultariam em mudanças permanentes na fisiologia e no metabolismo, aumentando o risco de certos acontecimentos adversos na idade adulta (de BOO; HARDING, 2006). A hipótese também postula que o peso ao nascer (PN) não é apenas influenciado pela carga genética e pelo peso do pai e da mãe, mas teria também interferência de condições perinatais, que, quando adversas, atuam sobre os genes que controlam a função de órgãos e tecidos, permitindo mecanismos adaptativos que possibilitam a sobrevivência a essa adversidade. Após o nascimento, esses novos mecanismos adaptativos se integram à fisiologia normal do organismo, criando predisposição a certas condições patológicas na vida adulta (de BOO; HARDING, 2006). Alguns estudos evidenciam que condições desfavoráveis de vida intrauterina que predispõem à PIG podem favorecer a reprogramação fetal de órgãos e tecidos por mecanismos epigenéticos, proporcionando comorbidades durante a infância (BARKER, 1995). Por exemplo, meninas que nasceram PIG apresentam maior tendência à hiperinsulinemia, aumento da adiposidade central (IBANEZ et al., 2006), redução da taxa de ovulação na adolescência (IBANEZ et al., 2002b), maior risco de SOP (MELO et al., 2010), síndrome metabólica (JAQUET; CZERNICHOW, 2003), hipertensão arterial e diabetes mellitus tipo 2 na vida adulta (TIAN et al., 2006). Até o presente, não se sabe se existe associação do PN com genes que regulam a ROF e acredita-se que a variabilidade da idade da menopausa é um fenótipo complexo que sofre influências de uma série de mecanismos genéticos.

Com base nesses dados, postula-se que condições desfavoráveis de vida intrauterina, que podem se refletir com alterações do PN, poderiam levar à reprogramação de genes envolvidos no controle da ROF e que talvez nascer PIG ou GIG poderia interferir com a ROF estimada por meio das concentrações séricas de AMH.

2. Revisão de Literatura

2.1 O processo de redução da ROF

Como citado anteriormente, a diminuição da ROF em virtude da diminuição da quantidade e qualidade oocitária (te VELDE; PEARSON, 2002), sendo um processo gradativo que se inicia no quarto mês da vida fetal feminina (FADDY et al., 1992; HANSEN et al., 2008) e finaliza quando o número de folículos remanescentes fôr reduzido para menos de 1.000 (FADDY; GOSDEN, 1996). Quando o esgotamento da ROF ocorre depois dos 40 anos de idade denomina-se menopausa (SOULES et al., 2001) e nos casos em que o período de 12 meses de amenorreia acontece antes dos 40 anos de idade, acompanhado de níveis elevados de FSH, geralmente acima de 40IU/l, detectado em pelo menos duas ocasiões (CONWAY, 2000), tem-se o diagnóstico de falência ovariana prematura (FOP) ou insuficiência ovariana primária (WELT, 2008). A detecção dessa condição tem se mostrado traumática e emocionalmente estressante para as pacientes, não só em função da escassez de informações e orientações sobre como lidar com as mudanças de uma vida hipoestrogênica mas também pela inabilidade médica de fornecer conforto emocional (GROFF et al., 2005).

Apesar de a menopausa significar, para algumas mulheres, alívio e transição para uma nova fase da vida, para a maioria ela se apresenta associada a sintomas físicos e psicossociais que se traduzem em importante queda da qualidade de vida (BLUMEL et al., 2000) e infertilidade. Esse último fator, somado à conjuntura de mudança da dinâmica social ditada pelo adiamento da maternidade, gera muito sofrimento pela redução do potencial reprodutivo e posterior dificuldade de concepção, tanto espontânea quanto artificial por meio dos TRA.

2.2 Importância da ROF no sucesso nos tratamentos de RA e gestação natural

A ROF interfere na resposta à estimulação ovariana controlada com gonadotrofinas (EOC) para os TRA (NELSON; KLEIN; ARCE, 2015). Atualmente, considera-se má resposta à EOC a suspensão do ciclo por ausência de resposta

folicular ou a obtenção de menos de quatro óocitos (FERRARETTI et al., 2011), que está relacionada à piora expressiva dos resultados reprodutivos (STERN et al., 2013). Alguns estudos evidenciam que a probabilidade de obtenção de um nascido vivo por meio de técnicas de reprodução assistida pode reduzir significativamente a partir dos 35 anos (TEMPLETON; MORRIS; PARSLOW, 1996) em função da diminuição da ROF. Um estudo realizado com dados da SART (do inglês, *Society of Assisted Reproduction Technology*) referiu que 16% de suas pacientes tiveram como único fator que poderia justificar a infertilidade, a baixa ROF antes dos 40 anos de idade (STERN et al., 2013). Nesse estudo foram analisados ciclos de 145.660 pacientes apresentando apenas um diagnóstico, estratificando por faixa etária, a chance de sucesso no tratamento. As pacientes com redução da ROF necessitaram de doses maiores de gonadotrofinas, tiveram menor quantidade de óvulos captados, menor quantidade de embriões congelados e menor taxa de nascido vivo por ciclo para cada faixa etária analisada, além de menor taxa de nascido vivo em relação a todos os outros diagnósticos.

2.3 Fatores de risco para redução precoce da ROF e antecipação da idade da menopausa

Alguns fatores de risco para a redução precoce da ROF têm sido extensivamente estudados. A ROF reduzida pode estar associada a uma série de condições, além da idade avançada, como o baixo nível de escolaridade, baixo índice de massa corporal (IMC), tabagismo, menarca precoce e nuliparidade, segundo dados de um estudo com 31.000 mulheres na Itália, em que foi demonstrada a influência desses fatores na diminuição da idade da menopausa natural (PARAZZINI; PROGETTO MENOPAUSA ITALIA STUDY GROUP, 2007).

Um estudo comprovou que mulheres tabagistas apresentam níveis mais baixos de AMH do que as não fumantes (PLANTE et al., 2010), e já é comprovado que o fumo provoca a liberação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que são capazes de causar destruição dos óocitos afetando o funcionamento dos ovários (MATIKAINEN et al., 2001).

Também mulheres com história familiar de menopausa precoce consistem grupo de alto risco para menopausa precoce (de BRUIN et al., 2001). Recentemente, foi descrita alta prevalência de FOP entre gêmeas monozigóticas e dizigóticas (GOSDEN et al., 2007). Uma possível explicação para o fato seria a menopausa precoce das mães de gêmeas dizigóticas, relacionadas a níveis mais elevados de FSH como consequência de múltiplos crescimentos foliculares e ovulações. Por herança genética, as filhas também experimentaríamos a menopausa precoce. Para gêmeas monozigóticas é mais difícil encontrar uma explicação plausível para esse evento. Algumas teorias propõem maior incidência de variações dos genes GDF9 e BMP15 que codificam proteínas relacionadas ao crescimento folicular e maturação oocitária entre os gemelares monozigóticos; levando, assim, à maior incidência de FOP nesses casos (DI PASQUALE et al., 2006; LAISSUE et al., 2006).

Proteínas de ligação do DNA e fatores de transcrição como NOBOX e LHX8 e proteínas de ligação do RNA como NANOS (KOK et al., 2005) são expressos durante a oogênese e suas mutações podem acarretar diversos graus de bloqueio na formação das células germinativas. Pequenas variações nesses genes poderiam determinar a variabilidade do *pool* folicular e assim responder pela variabilidade da idade da menopausa (KOK et al., 2005), que pode ser antecipada. Mutações no gene FMR1 (fragile X mental retardation 1) também têm sido relacionadas à FOP (GLEICHER et al., 2013; GUO et al., 2014).

Outros fatores, igualmente bem estabelecidos, são os agressores biológicos, a exemplo da radiação pélvica e quimioterapia que também podem promover dano ovariano, favorendo a subfertilidade e FOP (KRAWCZUK-RYBAK et al., 2013). O esgotamento precoce das células germinativas nas gônadas é causado por insultos tóxicos direto no folículo primordial, sendo esse o principal mecanismo de falência ovariana (FAMILIARI et al., 1993; OKTEM; OKTAY, 2007). Já foi comprovado que a injeção de uma única dose de ciclofosfamida pode causar redução de 93% na densidade de folículos primordiais em 48 horas, confirmando a gonadotoxicidade dessa droga *in vivo* (OKTEM; OKTAY, 2007). Himelstein-Braw, Peters e Faber (1978) obtiveram, por autópsia, ovários de 31 crianças com leucemia tratadas com fármacos citotóxicos e comparados com 28

ovários de crianças da mesma idade que faleceram por outros motivos. Os ovários das crianças normais mostraram crescimento folicular e presença de folículos antrais, já o desenvolvimento folicular foi inibido nos ovários das crianças leucêmicas; e nos ovários em que houve o desenvolvimento folicular, o número e a dimensão dos folículos antrais foram significativamente menores do que no controle. Além disso, danos ao estroma ovariano e à arquitetura microvascular ajudam a intensificar esse evento (SOLEIMANI et al., 2011). Também já foi demonstrada correlação entre ROF reduzida e cirurgias pélvicas como ooforectomia unilateral, repetidas incisões cesarianas e embolização de miomas (HEHENKAMP et al., 2007), infecções pélvicas ou doença tubária (KEAY et al. 1998a,b) e endometriose severa (BARNHART; DUNSMOOR-SU; COUTIFARIS, 2002). Identificar grupos de risco e os momentos em que ocorreria a redução da ROF pode ter ampla utilidade para orientar o planejamento familiar dessas pacientes. Da mesma forma, uma vez identificados os fatores que estimulam ou restringem a velocidade de declínio da população folicular, será compreendida uma série de informações sobre o potencial reprodutivo da mulher.

2.4 Alterações na vida pré-natal com repercussões na vida adulta

Os processos biológicos que comandam o momento exato do início e término da vida reprodutiva ainda não são bem compreendidos. Diversos estudos demonstram a influência de fatores genéticos na idade da menarca e da menopausa e, conseqüentemente, na taxa de envelhecimento ovariano; sendo responsável por 50% da variabilidade interindividual na idade da menopausa (CRAMER; XU; HARLOW, 1995; de BRUIN et al., 2001; MURABITO et al., 2005; van ASSELT et al., 2004).

A vida pré-natal corresponde a uma janela crítica para o desenvolvimento dos órgãos genitais internos femininos (MACKLON; FAUSER, 1999) e alterações nessa fase podem trazer repercussões futuras. Quando o feto é submetido a condições adversas intrauterinas, mecanismos metabólicos e endócrinos adaptativos alteram o eixo metabólico normal da criança no período pós-natal (BARKER, 1995), predispondo a determinadas condições e doenças na vida

adulta. Por exemplo, adultos que nasceram PIG possuem maior chance de apresentar síndrome metabólica, caracterizada pelo aumento da pressão arterial (PA) (DALLA POZZA et al., 2006), do IMC e das concentrações séricas de insulina, hiperlipidemia e diabetes tipo 2 (JAQUET; CZERNICHOW, 2003). Com base nessa correlação, muito tem sido discutido na literatura (de BOO; HARDING, 2006) sobre essas condições de vida intraterina e perinatal, que poderiam impactar o futuro reprodutivo por meio desses ajustes metabólicos.

Foram comparadas meninas nascidas PIG com meninas AIG com meses e anos de intervalo e notou-se aumento de FSH e redução do volume ovariano no grupo PIG, hipotetizando-se que adolescentes que nasceram PIG possuem células da granulosa com baixa responsividade ao FSH, reproduzindo um quadro de "pseudo-menopausa" com hipogonadismo hipergonafotrófico e redução do tamanho uterino e ovariano (IBANEZ et al., 2003). Também corroborando com esses dados, estudos comparando adolescentes PIG com AIG, demonstraram que os PIG apresentaram taxa reduzida de ovulação (IBANEZ et al., 2002b) e risco aumentado de desenvolvimento de características clínicas e bioquímicas da SOP (PANDOLFI et al. 2008) em comparação com as AIG. Esse fato sugere que novas vias metabólicas dependentes do PN podem prejudicar a dinâmica de recrutamento e atresia folicular.

2.5 Exames utilizados para acessar a ROF

Na sociedade moderna, a predição do momento em que a mulher irá vivenciar a redução pronunciada da fertilidade natural por meio de testes não invasivos da ROF, assim como da idade da menopausa, seria de grande utilidade no planejamento reprodutivo. O desafio consiste em determinar testes de RO capazes de identificar o segmento de mulheres com expectativa reprodutiva mais curta.

Atualmente, vários testes com esse objetivo estão disponíveis para avaliar a idade biológica do ovário e o seu potencial reprodutivo que, coincidentemente, são os mesmos desenvolvidos para a predição dos resultados das técnicas de RA como a FIV e ICSI (NELSON, 2013). Dentre eles, destacam-se a CFA, o FSH

sérico e o AMH. Esses testes são respectivos aos aspectos quantitativos da ROF; sendo, portanto, candidatos a preditores da idade menopausal. Como o Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia (ACOG) e a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ROTTERDAM, 2004) publicaram um parecer ratificando a boa confiabilidade de AMH, esse foi o exame escolhido para ser utilizado no presente estudo.

2.5.1 Hormônio Antimülleriano

O AMH é uma glicoproteína de 140 kDa, membro da superfamília de fatores de crescimento transformadores (TGF- β), produzida durante a embriogênese pelas células de sertoli, atuando na regressão dos ductos de Müller (VIGIER et al., 1984).

A plausibilidade biológica do AMH como preditor da ROF baseia-se em dois aspectos: primeiramente, na vida pós-natal feminina, o AMH produzido pelas células da granulosa regula o crescimento e desenvolvimento dos folículos ovarianos e em mulheres adultas tem grande expressão nos folículos primários e antrais, cujos números estão relacionados ao tamanho do *pool* de folículos primordiais. Além disso, nos folículos antrais maiores, sua expressão desaparece gradualmente, sugerindo importante participação na foliculogênese (WEENEN et al., 2004). O segundo aspecto, refere-se à forte correlação do AMH com a CFA e o número de folículos recrutados e oócitos obtidos em ciclos de EOC para FIV (FICICIOGLU et al., 2006; SEIFER et al., 2002). Estudos longitudinais demonstraram que à medida que os folículos antrais diminuem, também ocorre redução do AMH sérico (van ROOIJ et al., 2005). Em virtude do seu maior valor prognóstico reprodutivo em relação a outros marcadores de ROF, como o FSH, a Inibina B e o Estradiol o AMH tem sido utilizado na predição do número de oócito captados em ciclos de estimulação ovariana (LA MARCA et al., 2010).

Alguns estudos têm investigado o papel do AMH na predição da vida reprodutiva (NELSON, 2013; YOSHIDA et al., 2014). Um estudo comprovou a redução em escala logarítmica do AMH, com seus valores tornando-se muito baixos ou não detectáveis cinco anos antes da menopausa (SOWERS et al.,

2008). Entretanto, não se sabe se essa possibilidade de prever o aparecimento da menopausa (NAIR et al., 2015; TEHRANI; SOLAYMANI-DODARAN; AZIZI, 2009; van ROOIJ et al., 2004) se aplica também à prevenção do término da fertilidade, permitindo melhor planejamento reprodutivo. te Velde e Pearson (2002) sugeriram que se o envelhecimento reprodutivo é determinado pelo declínio gradual na qualidade e quantidade de oócitos que constituem a ROF, então todos os eventos reprodutivos que antecedem esse esgotamento final, que é a menopausa, vão apresentar o mesmo padrão cronológico. Ou seja, mulheres com menopausa precoce, também apresentarão precocemente os períodos de subfertilidade, esterilidade e a transição para irregularidade menstrual (te VELDE; PEARSON, 2002). Entretanto, esse conceito, sugerido por esses autores, segundo o qual uma década de infertilidade e esterilidade precede a menopausa, foi embasado por apenas um único estudo que referiu que mulheres com baixo AMH apresentariam redução da fecundidade (STEINER et al., 2011). No entanto, outra casuística que acompanhou um grupo de mulheres jovens por seis meses demonstrou que baixa concentração sérica de AMH não é preditiva de fecundabilidade (HAGEN et al., 2012). Estudos com grandes casuísticas e longo período de acompanhamento se fazem necessários para confirmar o efeito independente, além da idade, especialmente no que diz respeito ao tempo para alcançar a gravidez natural. Como ainda não existem marcadores que identifiquem o exato momento dessa transição entre fertilidade normal e subfertilidade, mas se sabe que há certa correlação com o número de folículos residuais na ROF e a transição para a menopausa, investir em marcadores indiretos da ROF como o AMH, traz grande inovação para esse campo.

Seifer, Baker e Leader (2011) investigaram 17.120 mulheres na faixa etária de 24 a 50 anos, que procuraram clínicas de fertilidade nos Estados Unidos com o objetivo de definir valores de AMH sérico específicos para cada idade e observaram que os valores da mediana e da média do AMH diminuíram de forma constante em paralelo ao aumento da idade. Segundo os autores, a diminuição média anual do AMH foi de 0,2 ng/mL/ano até 35 anos de idade; 0,1 ng/mL/ano dos 35 aos 40 anos; 0,2 ng/mL/ano, durante os 40 anos de idade e 0,1 ng/mL/ano após essa idade. Lee et al. (2012) realizaram estudo semelhante ao de Seifer,

Baker e Leader (2011) e corroboraram essa relação inversamente proporcional de idade e AMH, avaliando 16.972 mulheres coreanas, de 25 a 45 anos visando determinar um modelo ideal de alteração cronológica do AMH de acordo com a faixa etária da mulher para facilitar a investigação de infertilidade. Dentre os modelos de regressão validados nesse estudo destacou-se o $\log \text{AMH} = 0.205 \times \text{age} - 0.005 \times \text{age}^2 - 0.047$ como mais apropriado e a média do AMH foi de $4,09 \pm 3,71$ ng/mL (mediana: 3,13 ng/mL). Apesar da consistência nas características do declínio do AMH em relação à idade nos dois estudos supracitados (LEE et al., 2012; SEIFER et al., 2011) existem diferenças nos níveis quantitativos de AMH, possivelmente decorrentes de variações genéticas ligadas à raça e etnia (GLEICHER et al. 2012), ou outras diferenças de base cultural. Os dados disponíveis sobre as dosagens de AMH são geralmente baseados nos ensaios da *Diagnostic Systems Lab* (DSL) ou no *Immunotech* (MATALLIOTAKIS et al., 2007), cada um apresentando diferentes anticorpos primários contra AMH (NELSON; LA MARCA, 2011). Desse modo, os valores medidos de AMH dependem do tipo de ensaio utilizado, já que o de IOT produz valores mais elevados para o AMH. O ensaio de AMH Gen II é mais uniforme em relação a esse aspecto (NELSON; LA MARCA, 2011). Informações sobre o desenvolvimento do ensaio e dos fatores de conversão utilizados devem ser levadas em consideração para uma análise mais precisa do declínio do AMH com base nesses dois estudos.

Quando o melhor tipo de ensaio para dosagem do AMH fôr estabelecido, assim como os valores de normalidade para cada população específica, é possível que o mesmo possa ser utilizado com a finalidade de aconselhamento reprodutivo feminino. Coletivamente, a possibilidade de diagnosticar a mulher que terá uma vida reprodutiva mais curta permitirá a redefinição do planejamento familiar. Esse deixará de ser associado apenas com contracepção e permitirá melhor planejamento feminino de quando formar uma família no contexto de uma vida profissional atribulada.

3. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação do PN com a ROF, estimada por meio da concentração sérica do AMH, em mulheres na menacme com 34 a 35 anos de idade.

4. Pacientes e Métodos

4.1 Desenho do estudo

Caso-controle aninhado à coorte do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), no período de 1978 a 1979.

4.2 Contexto, população de estudo e aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) (Protocolo nº 5746/2012).

O recrutamento das pacientes foi realizado por duas pesquisadoras (MLSL e OV) por meio de contato telefônico (inicialmente, de acordo com os dados do arquivo do Departamento de Puericultura e Pediatria e Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP e após por meio de busca via lista telefônica), sistema *Hygia* (Sistema de Cadastro da Rede de Saúde Municipal de Ribeirão Preto-SP) e divulgação em mídia virtual (www.ribeirao.usp.br), rádio (rádio USP) e televisão (EPTV) (Quadro 1).

As entrevistas e a coleta de amostras ocorreram no período de 07/11/2012 a 29/04/2014. A entrevista foi realizada por uma de três pesquisadoras (MLSL, OV e MCB) no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP, em visita única, após um período de jejum de 10 a 12 horas. Após a entrevista eram aferidos o peso e a estatura, calculado o IMC, aferida a PA sistêmica e a circunferência abdominal (considerada a menor medida entre a crista ilíaca e a margem inferior da última costela). Dos arquivos da Pediatria foram obtidos os dados relativos à idade gestacional (IG), a via de parto e o PN. A determinação dos dados antropométricos e a coleta de sangue foram realizadas por uma auxiliar de enfermagem (OV). Após repouso de quinze minutos, todas as mulheres foram submetidas à coleta de cinco tubos de 10 mL sem EDTA de sangue venoso, que foram, imediatamente após a coleta, centrifugados a 2500 rotações por minuto (temperatura ambiente) durante dez minutos e armazenados a -70°C para que a dosagem hormonal fosse realizada em momento único. Para

este estudo, apenas uma das alíquotas foi utilizada e as restantes permaneceram armazenadas para uso em pesquisas futuras. Após o término do recrutamento e a coleta de amostras, estas foram descongeladas e analisadas.

- Contato telefônico, de acordo com os dados do arquivo dos Departamentos de Puericultura e Pediatria e Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP.
- Busca pelo sistema de *Hygia* (Sistema de Cadastro da Rede de Saúde Municipal de Ribeirão Preto-SP).
- Localização do número de telefone atual por meio da lista telefônica. Para isso, foi utilizado o endereço das pacientes arquivado pelo Departamento de Puericultura de Pediatria da FMRP-USP.
- Divulgação em mídia virtual (www.ribeirao.usp.br), rádio (rádio USP) e televisão (EPTV).

Quadro 1: Fases de busca para recrutamento de pacientes.

4.3 Participantes - critérios de elegibilidade

Foram considerados critérios de inclusão: mulheres na menacme, em boas condições de saúde física e mental, capazes de responder ao questionário do estudo, que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo) e que nasceram no HCFMRP-USP (KAHAPOLA ARACHCHIGE et al., 2012), no período de 31/05/1978 a 01/06/1979. Este último critério foi de extrema importância, pois reforçou a confiabilidade das informações sobre o peso e a idade ao nascimento, já que essas pacientes fazem parte de uma coorte previamente iniciada pelo Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP, cujos dados encontram-se registrados nos prontuários do HCFMRP-USP. As pacientes foram classificadas pelo critério do PN em relação à IG, sendo divididas em três grupos: AIG, PIG e GIG (Quadro 2).

Como critérios de exclusão foram considerados a presença de gestação,

puerpério, amamentação ou amenorreia primária.

PIG	Peso ao nascimento entre P10 e P90 para IG
AIG	Peso ao nascimento abaixo do P10
GIG	Peso ao nascimento acima do P90 para IG

PIG: Pequeno para a idade gestacional; **AIG:** Adequado para a idade gestacional; **GIG:** Grande para a idade gestacional; **P10:** percentil 10; **P90:** percentil 90.

Quadro 2: Classificação do peso ao nascimento em relação à IG.

4.4 Variáveis

4.4.1. Variáveis dependentes

- **AMH:** Variável quantitativa contínua, que em segundo momento foi categorizada. Esse processo de categorização foi baseado em estudos prévios que se utilizaram do ponto de corte 1 ng/mL ou de valores aproximados para classificação de mulheres subférteis (SHEBL et al., 2011), aumento da chance de apresentar má resposta em ciclos de estimulação ovariana (AMH <0,99 ng/mL) (JAYAPRAKASAN et al., 2010) ou redução da chance de nascido vivo (AMH <1,05 ng/mL) (GLEICHER; WEGHOFER; BARAD, 2010). Esse valor de 1 ng/mL foi elegido para categorização do AMH, sendo abaixo de 1 ng/mL considerado ROF baixa e acima de 1 ng/mL ROF adequada. A dosagem do AMH foi realizada com o *kit* Ultra Sensitive AMH/MIS ELISA ANSHLABS AI 105 por meio de imunoenensaio quantitativo, ou seja, baseado na ligação específica da imunoglobulina com o antígeno. O ensaio foi realizado em três etapas: na primeira, os calibradores, controles e as amostras desconhecidas foram incubados com anticorpo AMH; na segunda, com anticorpo AMH biotinilado; e na terceira, com uma solução de estreptavidina conjugada (SHRP). O complexo conjugado SHRP-anticorpo-antígeno-biotina foi detectado pela reação enzima-substrato. O grau de conversão enzimática do substrato foi determinado pela medição da absorção do comprimento

de onda duplo a 450 nm e 630 nm. A absorção medida foi diretamente proporcional à concentração de AMH nas amostras e nos calibradores (kit anshlabs). O erro intraensaio dessa análise foi de $3,19 \text{ ng/mL} \pm 0,19 \text{ ng/mL}$ e o erro interensaio foi de $1,74 \text{ ng/mL} \pm 0,16 \text{ ng/mL}$.

4.4.2 Variáveis de caracterização da amostra

- Idade: Variável contínua representando a idade da paciente no momento da entrevista.
- Raça: Variável categórica com as seguintes possibilidades: branca; parda/mulata/cabloca/morena e preta/negra. Classificação nos quesitos cor e raça, de acordo com o julgamento da paciente em questão.
- Escolaridade: Variável categórica representando o último nível cursado: primário, fundamental, médio, superior ou pós-graduação.
- Relacionamento estável: Variável binária representando casamento religioso, em diligência, ou em cartório, ou coabitação em mesma moradia.
- Ingesta de álcool: Variável binária representando ingestão de qualquer tipo de bebida alcoólica pelo menos um dia na semana, não levando em consideração a quantidade.
- Tabagismo: Variável binária representando fumo de qualquer tipo de cigarro pelo menos um dia na semana, não levando em consideração a quantidade.
- Ingestão de café: Variável binária representando ingestão de café (com exceção de descafeinado) pelo menos um dia na semana, não levando em consideração a quantidade.
- Uso de método contraceptivo hormonal: Variável binária representando uso prévio ou no momento da entrevista.
- Presença de ovário policístico: Variável binária representando diagnóstico já fornecido por algum médico.
- Gestação prévia: Variável binária, representando se a paciente obteve em algum momento diagnóstico ultrassonográfico ou sérico de gestação.

- Aborto prévio: Variável binária, representando se a paciente realizou previamente aborto induzido ou espontâneo.
- Quimioterapia prévia: Variável binária, representando se a paciente foi submetida a alguma sessão de quimioterapia.
- Radioterapia prévia: Variável binária, representando se a paciente foi submetida a alguma sessão de radioterapia.
- Cirurgia ovariana prévia: Variável binária, representando se a paciente foi submetida a algum procedimento cirúrgico que tenha incluído abordagem de algum ovário.
- Peso: Variável contínua avaliada pela equipe de pesquisadores no momento da entrevista e aferida em kilogramas.
- Estatura: Variável contínua avaliada pela equipe de pesquisadores no momento da entrevista e aferida em metros.
- Circunferência abdominal: Variável contínua avaliada pela equipe de pesquisadores no momento da entrevista e aferida em centímetros. Considerada a menor medida entre a crista ilíaca e a margem inferior da última costela.
- Número de filhos vivos: Variável contínua.

4.5 Tamanho do estudo

Tendo em vista que todos os achado da literatura correlacionam PN apenas com marcadores indiretos do potencial reprodutivo (como o FSH e o volume ovariano), este estudo se destaca por ser inédito, pois utilizou um marcador mais acurado, o AMH; e, conseqüentemente, superior aos citados anteriormente. Partindo dessa premissa da originalidade e tendo ciência que os estritos critérios de inclusão implicariam em considerável dificuldade de localização e recrutamento de mulheres para o estudo, optou-se por um estudo que descartasse uma grande diferença entre os grupos. O tamanho amostral foi determinado considerando o pressuposto de Cohen (1988), que referiu que o tamanho do efeito (do inglês, *effectsize*) de 0,80 é considerado grande. Levando-se em conta o poder de 80%, seria necessário avaliar 20 PIG, 240 AIG e 20 GIG

para descartar, nas duas comparações PIG vs. AIG e GIG vs. AIG, uma diferença acima de 0.66 desvios padrão (DP).

4.6 Análise estatística

Para a caracterização da amostra populacional, as variáveis categóricas foram representadas como número e percentagem, utilizando-se o teste qui-quadrado para verificar se existia diferença significativa entre os valores dessas variáveis para cada um dos grupos. Para as variáveis contínuas, inicialmente foi testada a normalidade da variável com o teste de *kurtosis*. As variáveis normais foram representadas por meio de sua média e seu DP. As variáveis não paramétricas foram caracterizadas pelas suas medianas e pelos intervalos interquartis.

As características clínicas das variáveis foram comparadas para os três grupos (AIG, PIG, GIG) com o teste de análise de variância (ANOVA), no caso de variáveis normais, e com o teste Kruskal Wallis para as variáveis não paramétricas. Esses dois últimos testes, juntamente com a *kurtosis* foram realizados por meio do programa Stata versão 13.1 (Stata Corp, 4905 Lakeway Dr College Station, TX 77845 USA).

Foram calculadas as medidas de posição central e de dispersão do AMH em relação aos grupos PIG, AIG e GIG. O gráfico de *box-plot* foi construído para verificar a distribuição do AMH com o PN. A análise de variância foi aplicada para comparar os grupos em relação à RO. Como os pressupostos de normalidade dos resíduos não foram atingidos foi realizada a transformação logarítmica na base 10 da variável AMH. Para a análise foi utilizado o programa SAS versão 9.3 (SAS Institute Inc., North Caroline University, USA), por meio do procedimento PROC GLM. Foi considerado o nível de significância de 5%.

Por meio de análise complementar, a variável AMH foi categorizada utilizando o ponto de corte 1 ng/mL. Foi testada a hipótese nula de que não existe diferença na proporção de pessoas com AMH adequado em relação aos três grupos, considerando o teste exato de Fisher. Para essa análise foi realizado o procedimento PROC FREQ, por meio do programa SAS.

5. Resultados

5.1 Participantes do estudo

A população do estudo consistiu de pacientes nascidas no período de 31/05/1978 e 01/06/1979 no HCFMRP USP, na cidade de Ribeirão Preto, Brasil, que integraram a coorte do Departamento de Puericultura e Pediatria e da FMRP USP. A amostra total da coorte foi representada por 6.827 recém-nascidos (RN), sendo 3.316 mulheres e 3.511 homens. Do total dos indivíduos do sexo feminino, 3.095 foram RN a termo (nascimento entre 37 e 41 semanas de gestação) e 221 RN pré-termo (nascimento abaixo de 37 semanas de gestação). Das 3.185 pacientes estudadas (excluindo-se óbitos e gêmeos) 2.683 eram AIGs, 318 PIGs e 184 GIGs. Essas pacientes foram recrutadas em três períodos distintos: dois pelo Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP (1986-1987 e 2002-2004, de modo que 1087 mulheres nascidas a termo tiveram os seus dados atualizados nos arquivos da Pediatria até o ano de 2004) e um pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP (2007-2008 com recrutamento de 440 mulheres da coorte: 330 do grupo AIG e 110 da população de PIG). A quarta convocação foi realizada para o desenvolvimento do presente estudo.

Tentou-se contato com essas 1087 mulheres, que tiveram seus dados atualizados pelo Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP, sendo que 691 não foram localizadas (nem todas mantiveram o mesmo endereço do momento do nascimento e muitas mudaram seus nomes após o casamento), 106 se recusaram a participar da pesquisa, três aceitaram, porém não compareceram à entrevista porque não queriam realizar exame de sangue.

Das 287 mulheres que comparecem à entrevista, sete foram excluídas em função de diagnóstico comprovado de SOP, a partir da interseção da amostra do presente estudo com a análise realizada em 2007-2008 pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, em que foram ratificados os critérios diagnósticos da SOP de acordo com o Consenso de Roterdam (ROTTERDAM, 2004). Melo et al. (2010) concluíram que a prevalência de pacientes portadoras de SOP foi duas vezes maior em nascidas PIG em comparação às AIG. Além disso, como a presença da síndrome, por si, influencia no teste de ROF utilizado nesse estudo e o AMH seria uma das causas de subfertilidade, optou-se pela

exclusão desses casos na tentativa de reduzir o ruído e minimizar fatores de confundimento. Portanto, foram incluídas neste estudo 280 mulheres (20 foram classificadas como FIG, 240 como AIG e 20 como GIG). Entretanto, seis foram excluídas da análise por apresentarem amostras de sangue insatisfatórias para a análise, sendo três FIG, duas AIG e uma GIG. Dessa forma, foram analisados dados de 19 pacientes FIG, 238 AIG e 17 GIG. O fluxograma completo do estudo pode ser observado na Figura 1. É importante ressaltar que houve preservação das percentagens de FIG, GIG e AIG da coorte original de 1978, conforme demonstrado no Quadro 3.

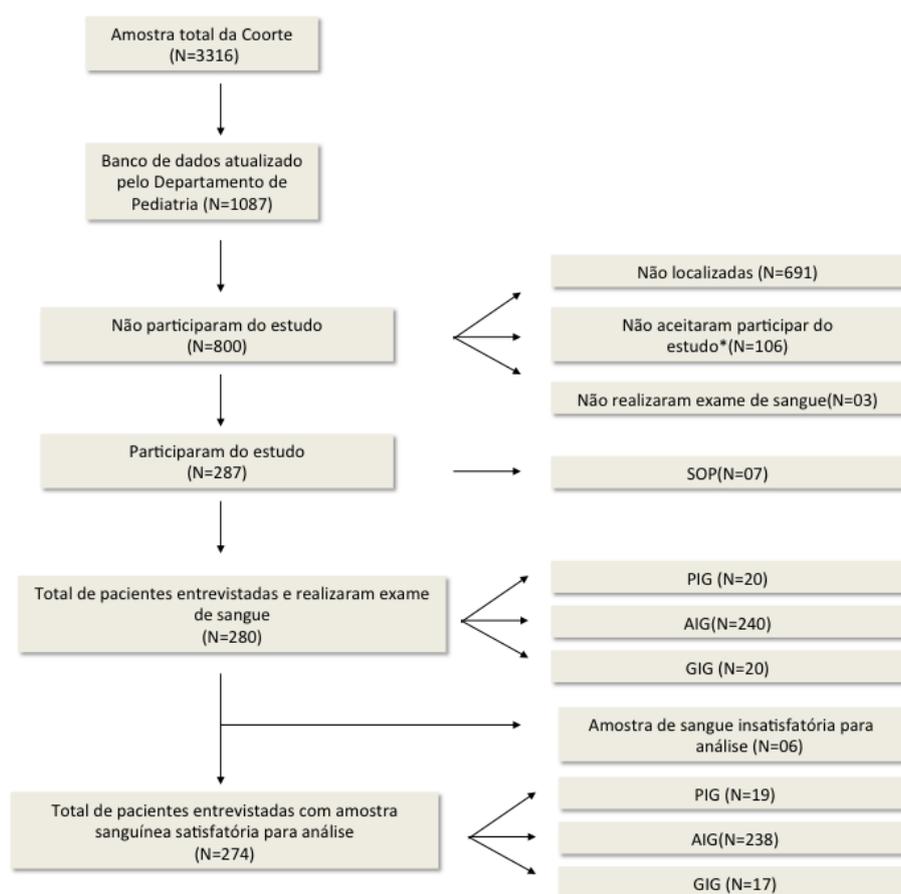


Figura 1: Fluxograma completo do estudo. *Não aceitaram participar do estudo: 83 pacientes se recusaram a participar devido à falta de tempo; seis mudaram de endereço e não puderam ser localizadas, cinco estavam amamentando; nove estavam grávidas; uma morreu; uma realizou cirurgia bariátrica recente à época da chamada; uma estava em estado vegetativo e uma era deficiente e não podia sair de casa desacompanhada.

Coorte original de 1978	Coorte atual de 2014-2015
10% PIG (318/3185)	7% PIG (19/274)
84% AIG (2683/3185)	87% AIG (238/274)
6% GIG (184/3185)	6% GIG (17/274)

Quadro 3: Percentual de PIG, AIG e GIG na coorte original e na coorte atual.

5.2 Variáveis clínicas

Na Tabela 1 foram descritas características sociais/étnicas, hábitos de vida e aspectos clínicos das voluntárias incluídas no estudo. Não se observou diferença significativa entre os três grupos avaliados em relação a: raça, escolaridade, relacionamento estável, etilismo, tabagismo, ingestão de café, uso de método contraceptivo, características clínicas, gestação prévia, quimioterapia prévia, radioterapia prévia e cirurgia ovariana prévia. Como aborto prévio foi a única característica que apontou diferença entre os grupos, com tendência à maior prevalência nas pacientes PIG, realizou-se análise de correlação, observando-se que o coeficiente de Spearman foi -0,176, apontando para baixa correlação ($p=0,0026$).

Em relação às variáveis contínuas, a única que apresentou diferença entre os grupos foi o peso ($p<0,01$), com os RN PIG atingindo peso final na vida adulta comparativamente menor do que os GIG (obtiveram os maiores pesos da casuística), enquanto os AIG apresentaram pesos intermediários entre esse grupos. Foi realizado pós-teste, ANOVA, grupo a grupo, ratificando essa relação apenas na comparação do grupo PIG com AIG ($p<0,01$) e PIG com GIG ($p<0,01$) (Tabela 2).

Tabela 1: Características clínicas das pacientes incluídas no estudo.

	PIG (n=19)	AIG (n=238)	GIG (n=17)	Não relatado	P valor
Idade	34,13±0,56	34,04±0,57	33,82±0,39	0(0)	
Raça				1 (0.0)	0.43
<i>Branca</i>	14 (73.7)	198 (83.5)	16 (94.1)		
<i>Parda/Mulata/Cabloca/Morena</i>	2 (10.5)	22 (9.3)	1 (5.9)		
<i>Preta/Negra</i>	3 (15.8)	17 (7.1)	0 (0)		
Escolaridade				6 (0.0)	0.84
<i>Pós-graduação</i>	0 (0)	2 (0.9)	0 (0)		
<i>Superior</i>	5 (26.3)	86 (37.1)	9 (53)		
<i>Médio</i>	13 (68.4)	111 (47.8)	7 (41.2)		
<i>Fundamental</i>	2 (9.1)	32 (13.8)	1 (5.9)		
<i>Primário</i>	0 (0)	1 (0.4)	0 (0)		
Relacionamento estável no. (%)	16 (72.7)	194 (80.8)	14 (82.4)	2 (0.0)	0.64
Etilismo no. (%)	4 (21)	52 (21.9)	6 (35.3)	0 (0)	0.43
Tabagismo no. (%)	5 (26.3)	31 (13.0)	1 (5.9)	0 (0)	0.17
Ingestão de café no. (%)	15 (78.9)	168 (70.6)	15 (88.2)	0 (0)	0.23
Método contraceptivo prévio no. (%)	8 (42.1)	111 (46.8)	8 (47.1)	1 (0)	0.92
SOP no. (%)	2 (10.5)	27 (11.3)	4 (23.5)	0 (0)	0.32
Gestação prévia no. (%)	14 (73.7)	159 (66.8)	11 (64.7)	0 (0)	0.81
Aborto prévio no. (%)	6 (31.6)	29 (12.2)	0 (0)	0 (0)	0.01
Quimioterapia prévia no. (%)	0 (0)	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0.93
Radioterapia prévia no. (%)	0 (0)	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0.93
Cirurgia ovariana prévia no. (%)	0 (0)	3 (1.3)	0 (0)	0 (0)	0.79
Peso	63.4 ± 18.1	74.9 ± 17.2	80.6 ± 23.9	6 (0)	<0.01
Estatura	158.2 ± 6.6	155.6 ± 35	156.6 ± 41.0	5 (0)	0.95
Circunferência abdominal	86.1 (77-100)	92.6(84-102)	95.7(85-101)	13 (0)	0.06
Número de filhos vivos	1(0-2)	1(0-2)	1(0-2)	0 (0)	0.98

PIG: Pequeno para idade gestacional; **AIG:** Adequado para idade gestacional; **GIG:** Grande para idade gestacional; **SOP:** Síndrome do ovário policístico.

Tabela 2: Pós-teste grupo a grupo em relação ao PN e peso atingido na vida adulta.

Peso	P valor
PIG x AIG	< 0,01
PIG x GIG	< 0,01
AIG x GIG	0,20

5.3 Resultado principal

A concentração sérica média do AMH foi de 2,14 ng/mL, 2,13 ng/mL e 2,57 ng/mL nos grupos FIG, AIG e GIG, respectivamente (Tabela 3 e Figura 2A).

Tabela 3: Medidas de resumo da variável AMH nos grupos FIG, AIG e GIG.

Peso	N	Média	IC 95% LI	IC 95% LS	Desvio Padrão	Mediana	Q1	Q3	Mínimo	Máximo
FIG	19	2,14	0,95	3,32	2,46	1,01	0,53	3,34	0,00	8,01
AIG	238	2,13	1,74	2,51	3,03	0,99	0,41	2,33	0,00	17,20
GIG	17	2,57	1,27	3,86	2,52	1,67	1,01	2,27	0,62	8,20

FIG: Pequeno para idade gestacional; **AIG:** Adequado para idade gestacional; **GIG:** Grande para idade gestacional; **LI:** Limite inferior; **LS:** Limite superior; **Q1:** Intervalo interquartil de 25%; **Q3:** Intervalo interquartil de 75%.

Após a transformação logarítmica, foi realizada a análise de variância para comparação dos grupos FIG, AIG e GIG em relação à RO, não sendo demonstrada diferença estatisticamente significativa entre eles ($p=0,11$) (Tabela 4 e Figura 2B).

Tabela 4: Medidas de resumo da variável log AMH nos grupos FIG, AIG e GIG.

Peso	N	Média	IC 95% LI	IC 95% LS	Desvio Padrão	Mediana	Q1	Q3	Mínimo	Máximo	Peso	P-valor
FIG	19	18	0,26	-0,29	0,80	1,10	0,09	-0,60	1,21	-1,71	2,08	
AIG	238	233	-0,12	-0,33	0,08	1,57	0,01	-0,80	0,85	-4,61	2,84	0,11
GIG	17	17	0,59	0,17	1,01	0,82	0,51	0,01	0,82	-0,48	2,10	

FIG: Pequeno para a idade gestacional; **AIG:** Adequado para a idade gestacional; **GIG:** Grande para a idade gestacional; **LI:** Limite inferior; **LS:** Limite superior; **Q1:** Intervalo interquartil de 25%; **Q3:** Intervalo interquartil de 75%. P-valor referente à análise de variância.

5.4 Outras análises

Como análise complementar, a variável AMH foi categorizada, considerando-se RO adequada quando AMH acima de 1 ng/mL e baixa quando menor de 1 ng/mL. Mesmo com essa categorização (Tabela 5) não houve

diferença entre os grupos: FIG: 52,6% (10/19) apresentaram ROF adequada e 47,4% (9/19) ROF baixa; AIG: 49,5% (118/238) ROF adequada e 50,5% (120/238) ROF baixa e GIG: 76,4% (13/17) ROF adequada e 23,6% (4/17) ROF baixa ($p=0,09$).

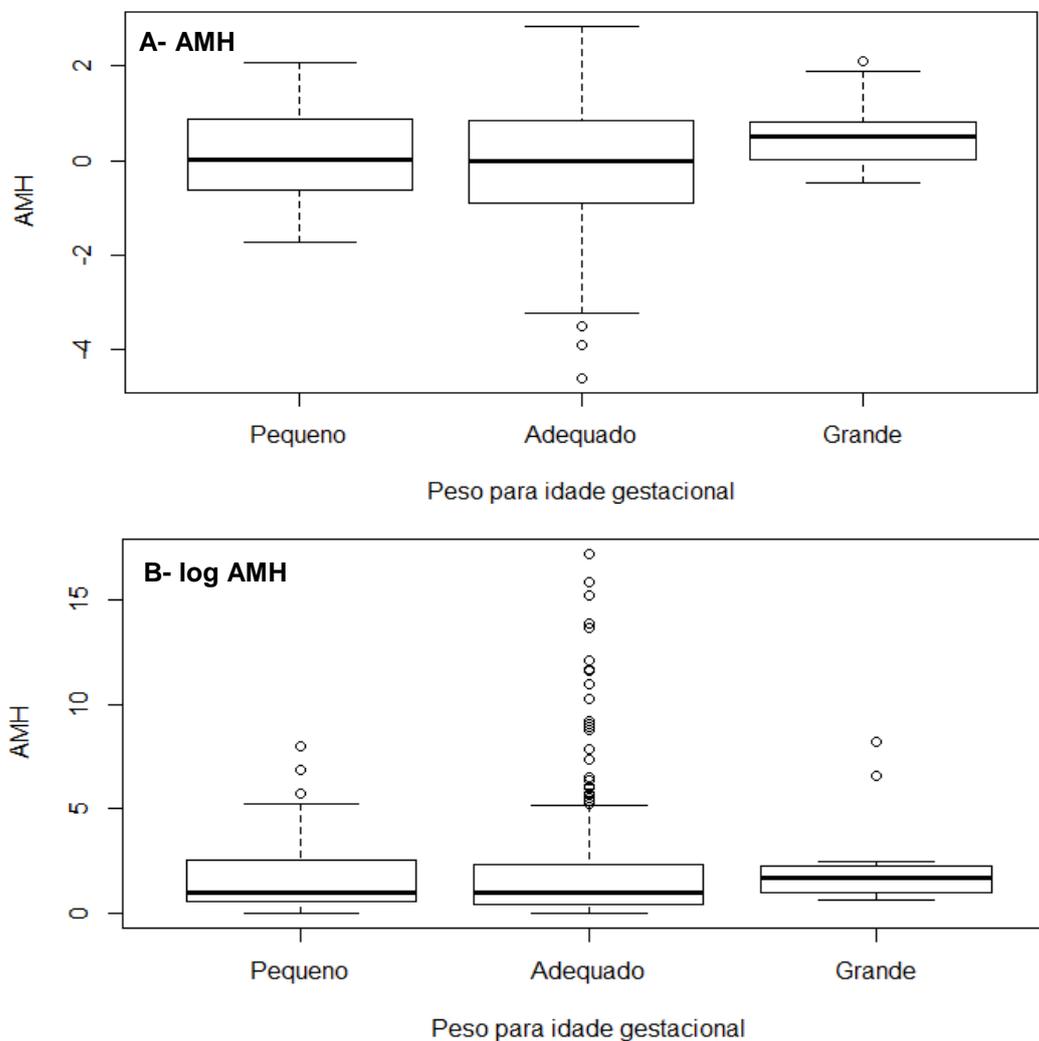


Figura 2: Boxplot do AMH em relação aos grupos FIG, AIG e GIG.

Tabela 5: Relação entre AMH e peso.

AMH	Peso				P-valor
	PIG	AIG	GIG	Total	
Adequado	10	118	13	141	0,09
	3,65	43,07	4,74	51,46	
Baixo	9	120	4	133	
	3,26	43,8	1,46	48,54	
Total	19	238	17	274	

AMH: Hormônio antimülleriano; P-valor referente ao teste exato de Fisher.

Segundo Cohen (1988), um *effectsize* de 0,80 é considerado grande. Levando-se em conta o poder de 80% e o tamanho da amostra (238 controles, 19 PIG e 17 GIG), é possível descartar nas duas comparações PIG vs. AIG e GIG vs. AIG a diferença de 0.7 DP.

6. *Discussão*

Não se observou diferença significativa nas concentrações séricas de AMH entre mulheres nascidas PIG, AIG e GIG avaliadas entre 34 e 35 anos de idade, mesmo após a categorização dos dados em RO adequada e baixa. A casuística estudada permitiu descartar uma grande diferença entre as concentrações séricas de AMH entre os grupos PIG vs. AIG e GIG vs. AIG, com poder de 80%.

Apesar de alguns autores sugerirem que o PN pode interferir na ROF durante a idade reprodutiva, esse dado é exploratório e se baseia em marcadores indiretos do potencial reprodutivo, como é o caso de uma hipersecreção de FSH na infância (IBANEZ et al., 2002a) e redução do tamanho do ovário na vida adulta (IBANEZ et al., 2003). Até a presente data, não há nenhum estudo realmente bem delineado que permita afirmar isso, sendo este pioneiro nesse campo. Outra limitação dos estudos supracitados (IBANEZ et al., 2002a,b; 2003) é a baixa casuística (<50 pacientes cada). Além disso, estudos longitudinais já demonstraram que a elevação do FSH é um preditor relativamente tardio da transição menopáusica, uma vez que esse evento ocorre somente cerca de 10 anos antes da menopausa, que corresponde ao período em que a infertilidade já prevalece (van ROOIJ et al., 2004). Isso significa que níveis elevados de FSH não podem ser utilizados como preditores precoces de redução da fertilidade (SOWERS et al., 2008). A medida individual do volume ovariano também se mostrou imprecisa na predição da ROF, apresentando variações interciclos maiores que a CFA (LAMBALK et al., 2009), não se podendo classificar o volume ovariano como preditor de menopausa. O presente estudo se utilizou do marcador mais confiável da ROF, que é o AMH (van ROOIJ et al., 2004), sendo este um dos pontos fortes desta pesquisa. Além disso, avaliou mulheres de uma coorte do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP com dados confiáveis de peso e idade ao nascer, que foram extraídos dos prontuários do HCFMRP-USP.

Outro dado que também atua na redução de viés é classificar o PN em relação à IG e não considerar o peso isoladamente. Essa classificação confirma a restrição de crescimento intrauterino por meio de dados pós-natais (PN, IG e sexo do neonato) e o conhecimento desses parâmetros possibilita determinar os efeitos do déficit do crescimento fetal excluindo o efeito da prematuridade (BATTAGLIA; LUBCHENCO, 1967) que seria um fator de confundimento *per si*. Ao se

considerar isoladamente o PN, os bebês prematuros não são identificados, tornando esta classificação inapropriada para se estudar a relação entre o peso abaixo do P10 e a prevalência de doenças na vida adulta.

Estudos realizados em modelos animais (CHAN et al., 2015) sugeriram que a exposição precoce à desnutrição leva ao esgotamento folicular e envelhecimento ovariano por meio do estresse oxidativo (BERNAL et al., 2010), que pode levar à indução de apoptose em folículos pré-ovulatórios (TSAI-TURTON; LUDERER, 2006) e causar efeitos tóxicos sobre a maturação do oócito (TAMURA et al., 2008). Apesar de não se encontrar na literatura estudos sobre PN influenciando a ROF por meio do mecanismo epigenético, há autores que advogam a favor de uma relação epigenética entre genes e idade da menopausa, que também representa um marcador de exaustão da RO. Para considerações futuras, sugere-se uma investigação mais detalhada do fator epigenético, a fim de demonstrar o PN como um gatilho genético que poderia transmutar a RO na mulher adulta.

Como achados secundários, observou-se que os RN PIG atingiram peso final na vida adulta comparativamente menor do que os GIG, que obtiveram os maiores pesos da casuística, enquanto os AIG apresentaram pesos intermediários entre esses grupos. Este achado equipara-se a outros estudos que estratificaram o PN e peso do adulto dentro das categorias de IG, notando-se que o peso adulto aumenta com o aumento do PN (EIDE et al., 2005). Também se observou maior prevalência de abortos nas pacientes PIG em comparação com os outros grupos, entretanto a correlação foi baixa com este desfecho. Especulou-se como uma das possíveis explicações que um AMH baixo reflete em menor ROF, com provável piora da qualidade oocitária e, conseqüentemente, embrionária, o que aumentaria a taxa de abortos. Já foi relatado que baixo PN está associado com a redução da probabilidade de reprodução na vida adulta (de KEYSER et al., 2012, van GENDT et al., 2015) e de gestação (EKHOLM et al., 2005), mas nenhum deles analisou a taxa de aborto como desfecho reprodutivo, o que pode ser um incentivo para futuras pesquisas.

As principais limitações do presente estudo foram: 1) a pequena casuística avaliada nos grupos PIG e GIG, decorrentes dos restritivos critérios de

elegibilidade adotados e da dificuldade de se localizarem os sujeitos. Todavia, como já mencionado, a presente casuística permitiu descartar uma grande diferença nas concentrações séricas de AMH entre os grupos FIG vs. AIG e GIG vs. AIG; 2) A impossibilidade de se excluírem todos os casos de SOP e o uso de contraceptivo hormonal, que são fatores que também influenciam no valor do AMH (ARBO et al., 2007, HART et al., 2010); 3) A ausência de informações sobre as gestações das mães das pacientes, pois há comorbidades que poderiam ativar os mecanismos epigenéticos que podem influenciar na RO e 4) Falta de padronização mundial em relação aos *kits* de AMH utilizados para dosagem. Isso se torna um inconveniente para avaliações sobre o desempenho do teste em termos de reprodutibilidade e calibração (fundamental para a criação de um protocolo único) e para a realização de metanálises pela impossibilidade de se compararem estudos que utilizaram diferentes ensaios. A AnshLabs possui dois imunoenaios: AMH ELISA ultrasensível para uso padrão, com valores variando de 1-62 pmol/l; e outro ensaio para amostras com valores menores de AMH (0.05 - 5 pmol/l). Optou-se por empregar o AnshLabs, já que o *kit* se utiliza de uma proteína humana recombinante de AMH e anticorpos com epítomos lineares, o que garante a estabilidade do teste ao longo do tempo. Atualmente, o AMH Gen II assay é um dos *kits* mais usados e mesmo assim apresenta problemas persistentes de calibração (RUSTAMOV et al., 2012). O AnshLabs Ultra-Sensitive AMH (que foi o kit utilizado neste protocolo) é semelhante ao Gen II e estudos já comprovaram desempenho semelhante em ambos, validando esse teste para uso clínico e em pesquisas (WELSH; SMITH; NELSON, 2014). Na conjuntura atual, não é possível afirmar qual a variação de AMH, que de fato é relevante como preditor de eventos reprodutivos na mulher. Identifica-se a necessidade de se conseguir um *kit* com pequena variabilidade intra e interensaio, pouca variabilidade nas diferentes populações e etnias e estabelecimento de um valor de corte padronizado, em que fique claro o valor de normalidade para cada faixa etária. Em função da inexistência desses fatores, torna-se difícil afirmar se uma diferença média ou pequena na variação do AMH seria significativa ou não do ponto de vista clínico.

Com base nestes achados é possível concluir que o presente estudo não traz implicações diretas para a prática clínica, mas estimula o delineamento de novas pesquisas com maiores casuísticas, que, se bem justificadas, podem ser conduzidas para investigar se o PN teria impacto médio ou pequeno nas concentrações de AMH nas mulheres na menacme.

7. Conclusão

Não se observou diferença nas concentrações séricas de AMH entre mulheres nascidas PIG, AIG e GIG avaliadas entre os 34 e 35 anos de idade, mesmo após a categorização dos dados em ROF adequada e baixa. A casuística analisada permitiu detectar ou descartar uma grande diferença entre os grupos (*effectsize* de 0,7). Dessa forma, evidenciou-se que o PN não apresenta grande influência sobre a ROF, estimada pelas concentrações séricas de AMH, em mulheres na menacme, entre os 34 e 35 anos de idade. Caso novos estudos evidenciem que diferenças pequenas ou moderadas nas concentrações séricas de AMH possam apresentar relevantes repercussões clínicas em mulheres nessa faixa etária, novas investigações serão necessárias, sendo os dados do presente estudo úteis para o cálculo amostral.

8. Referências Bibliográficas¹

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

ARBO, E. D. V. et al. Serum anti-mullerian hormone levels and follicular cohort characteristics after pituitary suppression in the late luteal phase with oral contraceptive pills. **Hum Reprod**, v. 22, n. 12, p. 3192-3196, 2007.

BARKER, D. J. Intrauterine programming of adult disease. **Mol Med Today**, v. 1, n. 9, p. 418-423, 1995.

BARNHART, K.; DUNSMOOR-SU R.; COUTIFARIS C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 77, n. 6, p. 1148-1155, 2002.

BATTAGLIA, F. C.; LUBCHENCO L. O. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. **J Pediatr**, v. 71, n. 2, p. 159-163, 1967.

BERNAL, A. B. et al. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15558, 2010.

BLOCK, E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages. **Acta Anat (Basel)**, v. 14, n. 1-2, p. 108-123, 1952.

BLOCK, E. A quantitative morphological investigation of the follicular system in newborn female infants. **Acta Anat (Basel)**, v. 17, n. 3, p. 201-206, 1953.

BLUMEL, J. E. et al. Quality of life after the menopause: a population study. **Maturitas**, v. 34, n. 1, p. 17-23, 2000.

BROEKMANS, F. J. et al. Antral follicle counts are related to age at natural fertility loss and age at menopause. **Menopause**, v. 11, n. 6 Pt 1, p. 607-614, 2004.

CHAN, K. A. et al. Early life exposure to undernutrition induces ER stress, apoptosis, and reduced vascularization in ovaries of adult rat offspring. **Biol Reprod**, v. 92, n. 4, p. 110, 2015.

CHANDRA, A. et al. Fertility, family planning, and reproductive health of U.S. women: data from the 2002 National Survey of Family Growth. **Vital Health Stat**, v. 23, n. 25, p. 1-160, 2005.

COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences**. 2nd Ed. Hillsdale NJ: Erlbaum, 1988.

COMITTEE OPINION. **Ovarian reserve testing**. The American College of Obstetricians and Gynecologists, Number 618, 2015. Disponível em: <https://www.acog.org/-/media/Committee-Opinions/Committee-on-Gynecologic-Practice/co618.pdf?dmc=1&ts=20141226T0556470537>. Acessado em: 22 maio 2016.

CONWAY, G. S. Premature ovarian failure. **Br Med Bull**, v. 56, n. 3, p. 643-649, 2000.

CRAMER, D. W.; XU, H.; HARLOW, B. L. Family history as a predictor of early menopause. **Fertil Steril**. v. 64, n. 4, p. 740-5, 1995.

DALLA POZZA, S. B. et al. Young adults born small for gestational age: is reduced baroreceptor sensitivity a risk factor for hypertension? **Clin Cardiol**, v. 29, p. 215-218, 2006.

de BOO, H. A.; HARDING, J. E. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 46, n. 1, p. 4-14, 2006.

de BRUIN, J. P. et al. The role of genetic factors in age at natural menopause. **Hum Reprod**, v. 16, n. 9, p. 2014-2018, 2001.

de KEYSER, N. et al. Premature birth and low birthweight are associated with a lower rate of reproduction in adulthood: a Swedish population-based registry study. **Hum Reprod**, v. 27, n. 4, p. 1170-1178, 2012.

DI PASQUALE, E. et al. Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 5, p. 1976-1979, 2006.

EIDE, M. G. et al. Size at birth and gestational age as predictors of adult height and weight. **Epidemiology**, v. 16, n. 2, p. 175-181, 2005.

EKHOLM, K. et al. The probability of giving birth among women who were born preterm or with impaired fetal growth: a Swedish population-based registry study. **Am J Epidemiol**, v. 161, n. 8, p. 725-733, 2005.

FADDY, M. J. et al. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. **Hum Reprod**, v. 7, n. 10, p. 1342-1346, 1992.

FADDY, M. J.; GOSDEN R. G. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. **Hum Reprod**, v. 11, n. 7, p. 1484-1486, 1996.

FAMILIARI, G. et al. Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. **Hum Reprod**, v. 8, n. 12, p. 2080-2087, 1993.

FERRARETTI, A. P. et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. **Hum Reprod**, v. 26, n. 7, p. 1616-1624, 2011.

FICICIOGLU, C. et al. Early follicular antimullerian hormone as an indicator of ovarian reserve. **Fertil Steril**, v. 85, n. 3, p. 592-596, 2006.

GLEICHER, N., WEGHOFER, A.; BARAD D. H. Anti-Mullerian hormone (AMH) defines, independent of age, low versus good live-birth chances in women with severely diminished ovarian reserve. **Fertil Steril**, v. 94, n. 7, p. 2824-2827, 2010.

GLEICHER, N. et al. Differences in ovarian aging patterns between races are associated with ovarian genotypes and sub-genotypes of the FMR1 gene. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 10, p. 77, 2012.

GLEICHER, N. et al. FMR1-dependent variability of ovarian aging patterns is already apparent in young oocyte donors. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 11, p. 80, 2013.

GOSDEN, R. G. et al. Prevalence of premature ovarian failure in monozygotic and dizygotic twins. **Hum Reprod**, v. 22, n. 2, p. 610-615, 2007.

GROFF, A. A. et al. Assessing the emotional needs of women with spontaneous premature ovarian failure. **Fertil Steril**, v. 83, n. 6, p. 1734-1741, 2005.

GUO, T. et al. FMR1 premutation is an uncommon explanation for premature ovarian failure in Han Chinese. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e103316, 2014.

HAGEN, C. P. et al. Low concentration of circulating antimullerian hormone is not predictive of reduced fecundability in young healthy women: a prospective cohort study. **Fertil Steril**, v. 98, n. 6, p. 1602-1608, 2012.

HANSEN, K. R. et al. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. **Hum Reprod**, v. 23, n. 3, p. 699-708, 2008.

HART, R. et al. Serum antimullerian hormone (AMH) levels are elevated in adolescent girls with polycystic ovaries and the polycystic ovarian syndrome (PCOS). **Fertil Steril**, v. 94, n. 3, p. 1118-1121, 2010.

HEHENKAMP, W. J. et al. Loss of ovarian reserve after uterine artery embolization: a randomized comparison with hysterectomy. **Hum Reprod**, v. 22, n. 7, p. 1996-2005, 2007.

HIMELSTEIN-BRAW, R.; PETERS H.; FABER M. Morphological study of the ovaries of leukaemic children. **Br J Cancer**, v. 38, n. 1, p. 82-87, 1978.

HOURVITZ, A. et al. Assisted reproduction in women over 40 years of age: how old is too old? **Reprod Biomed Online**, v. 19, n. 4, p. 599-603, 2009.

IBANEZ, L. et al. Hypersecretion of FSH in infant boys and girls born small for gestational age. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 5, p. 1986-1988, 2002a.

IBANEZ, L. et al. Reduced ovulation rate in adolescent girls born small for gestational age. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 7, p. 3391-3393, 2002b.

IBANEZ, L. et al. Hypergonadotrophinaemia with reduced uterine and ovarian size in women born small-for-gestational-age. **Hum Reprod**, v. 18, n. 8, p. 1565-1569, 2003.

IBANEZ, L. et al. Early development of adiposity and insulin resistance after catch-up weight gain in small-for-gestational-age children. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 6, p. 2153-2158, 2006.

JAQUET, D.; CZERNICHOW P. Born small for gestational age: increased risk of type 2 diabetes, hypertension and hyperlipidaemia in adulthood. **Horm Res**, v. 59, Suppl 1, p. 131-137, 2003.

JAYAPRAKASAN, K. et al. A prospective, comparative analysis of anti-Mullerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. **Fertil Steril**, v. 93, n. 3, p. 855-864, 2010.

KAHAPOLA ARACHCHIGE, K. M. et al. Waiting for an elevated FSH--too late a marker of reduced ovarian reserve? **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 52, n. 5, p. 460-464, 2012.

KEAY, S. D.; LIVERSEDGE N. H.; JENKINS J. M. Could ovarian infection impair ovarian response to gonadotrophin stimulation? **Br J Obstet Gynaecol**, v. 105, n. 3, p. 252-253, 1998a.

KEAY, S. D. et al. The relation between immunoglobulin G antibodies to Chlamydia trachomatis and poor ovarian response to gonadotropin stimulation before in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 70, n. 2, p. 214-218, 1998b.

KOK, H. S. et al. Genetic studies to identify genes underlying menopausal age. **Hum Reprod Update**, v. 11, n. 5, p. 483-493, 2005.

KRAWCZUK-RYBAK, M. et al. The progressive reduction in the ovarian reserve in young women after anticancer treatment. **Horm Metab Res**, v. 45, n. 11, p. 813-819, 2013.

LA MARCA, A. et al. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). **Hum Reprod Update**, v. 16, n. 2, p. 113-130, 2010.

LA MARCA, A.; SUNKARA, S. K. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. **Hum Reprod Update**, v. 20, n. 1, p. 124-140, 2014.

LAISSUE, P. et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. **Eur J Endocrinol**, v. 154, n. 5, p. 739-744, 2006.

LAMBALK, C. B. et al. Testing ovarian reserve to predict age at menopause. **Maturitas**, v. 63, n. 4, p. 280-291, 2009.

LAMPIC, C. et al. Fertility awareness, intentions concerning childbearing, and attitudes towards parenthood among female and male academics. **Hum Reprod**, v. 21, n. 2, p. 558-564, 2006.

LEE, J. Y. et al. Age-related distributions of anti-Mullerian hormone level and anti-Mullerian hormone models. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 91, n. 8, p. 970-975, 2012.

LEIDY, L. E.; GODFREY, L. R.; SUTHERLAND, M. R. Is follicular atresia biphasic? **Fertil Steril**, v. 70, n. 5, p. 851-859, 1998.

MACKLON, N. S.; FAUSER B. C. Aspects of ovarian follicle development throughout life. **Horm Res**, v. 52, n. 4, p. 161-170, 1999.

MAHESHWARI, A.; HAMILTON, M.; BHATTACHARYA, S. Effect of female age on the diagnostic categories of infertility." **Hum Reprod**, v. 23, n. 3, p. 538-542, 2008.

MATALLIOTAKIS, I. M. et al. Women with advanced-stage endometriosis and previous surgery respond less well to gonadotropin stimulation, but have similar IVF implantation and delivery rates compared with women with tubal factor infertility. **Fertil Steril**, v. 88, n. 6, p. 1568-1572, 2007.

MATIKAINEN, T. et al. Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. **Nat Genet**, v. 28, n. 4, p. 355-360, 2001.

MELO, A. S. et al. High prevalence of polycystic ovary syndrome in women born small for gestational age. **Hum Reprod**, v. 25, n. 8, p. 2124-2131, 2010.

MENKEN, J.; TRUSSELL, J.; LARSEN, U. Age and infertility. **Science**, v. 233, n. 4771, p. 1389-1394, 1986.

MURABITO, J. M. et al. Heritability of age at natural menopause in the Framingham Heart Study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 6, p. 3427-3430, 2005.

NAIR, S. et al. Anti-mullerian hormone (AMH) is associated with natural menopause in a population-based sample: The CARDIA Women's Study. **Maturitas**, v. 81, n. 4, p. 493-498, 2015.

NELSON, S. M.; LA MARCA, A. The journey from the old to the new AMH assay: how to avoid getting lost in the values. **Reprod Biomed Online**, v. 23, n. 4, p. 411-420, 2011.

NELSON, S. M. Biomarkers of ovarian response: current and future applications. **Fertil Steril**, v. 99, n. 4, p. 963-969, 2013.

NELSON, S. M.; KLEIN, B. M.; ARCE, J. C. Comparison of antimullerian hormone levels and antral follicle count as predictor of ovarian response to controlled ovarian stimulation in good-prognosis patients at individual fertility clinics in two multicenter trials. **Fertil Steril**, v. 103, n. 4, p. 923-930 e921, 2015.

OKTEM, O.; OKTAY, K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. **Cancer Res**, v. 67, n. 21, p. 10159-10162, 2007.

PANDOLFI, C. et al. Low birth weight and later development of insulin resistance and biochemical/clinical features of polycystic ovary syndrome. **Metabolism**, v. 57, n. 7, p. 999-1004, 2008.

PARAZZINI, F.; PROGETTO MENOPAUSA ITALIA STUDY GROUP. Determinants of age at menopause in women attending menopause clinics in Italy. **Maturitas**, v. 56, n. 3, p. 280-287, 2007.

PELOSI, E. et al. Dynamics of the ovarian reserve and impact of genetic and epidemiological factors on age of menopause. **Biol Reprod**, v. 92, n. 5, p. 130, 2015.

PLANTE, B. J. et al. The impact of smoking on antimullerian hormone levels in women aged 38 to 50 years. **Menopause**, v. 17, n. 3, p. 571-576, 2010.

ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**, v. 81, n. 1, p. 19-25, 2004.

RUSTAMOV, O. et al. Anti-Mullerian hormone: poor assay reproducibility in a large cohort of subjects suggests sample instability. **Hum Reprod**, v. 27, n. 10, p. 3085-3091, 2012.

SCHEFFER, G. J. et al. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. **Hum Reprod**, v. 18, n. 4, p. 700-706, 2003.

SEIFER, D. B. et al. Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. **Fertil Steril**, v. 77, n. 3, p. 468-471, 2002.

SEIFER, D. B.; BAKER, V. L.; LEADER, B. Age-specific serum anti-Mullerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States. **Fertil Steril**, v. 95, n. 2, p. 747-750, 2011.

SHEBL, O. et al. Age-related distribution of basal serum AMH level in women of reproductive age and a presumably healthy cohort. **Fertil Steril**, v. 95, n. 2, p. 832-834, 2011.

SOLEIMANI, R. et al. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. **Aging (Albany NY)**, v. 3, n. 8, p. 782-793, 2011.

SOULES, M. R. et al. Stages of reproductive aging workshop (STRAW). **J Womens Health Gend Based Med**, v. 10, n. 9, p. 843-848, 2001.

SOWERS, M. R. et al. Anti-mullerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 9, p. 3478-3483, 2008.

STEINER, A. Z. et al. Antimullerian hormone as a predictor of natural fecundability in women aged 30-42 years. **Obstet Gynecol**, v. 117, n. 4, p. 798-804, 2011.

STERN, J. E. et al. Live birth rates and birth outcomes by diagnosis using linked cycles from the SART CORS database. **J Assist Reprod Genet**, v. 30, n. 11, p. 1445-1450, 2013.

TAMURA, H. et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **J Pineal Res**, v. 44, n. 3, p. 280-287, 2008.

te VELDE, E. R.; PEARSON P. L. The variability of female reproductive ageing. **Hum Reprod Update**, v. 8, n. 2. p. 141-154, 2002.

TEHRANI, F. R.; SOLAYMANI-DODARAN, M.; AZIZI, F. A single test of antimullerian hormone in late reproductive-aged women is a good predictor of menopause. **Menopause**, v. 16, n. 4, p. 797-802, 2009.

TEMPLETON, A.; MORRIS, J. K.; PARSLow, W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. **Lancet**, v. 348, n. 9039, p. 1402-1406, 1996.

THILAGAM, A. Mathematical modelling of decline in follicle pool during female reproductive ageing. **Math Med Biol**, v. 33, n. 1, p. 107-121, 2016.

TIAN, J. Y. et al. Birth weight and risk of type 2 diabetes, abdominal obesity and hypertension among Chinese adults. **Eur J Endocrinol**, v. 155, n. 4, p. 601-607, 2006.

TSAI-TURTON, M.; LUDERER, U. Opposing effects of glutathione depletion and follicle-stimulating hormone on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1224-1236, 2006.

van ASSELT, K. M. et al. Heritability of menopausal age in mothers and daughters. **Fertil Steril**. v. 82, n. 5, p. 1348-51, 2004.

van GENDT, A. W. et al. Reproductive outcomes of women and men born very preterm and/or with a very low birth weight in 1983: a longitudinal cohort study in the Netherlands. **Eur J Pediatr**, v. 174, n. 6, p. 819-825, 2015.

van ROOIJ, I. A. et al. Anti-mullerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. **Menopause**, v. 11, n. 6 Pt 1, p. 601-606, 2004.

van ROOIJ, I. A. et al. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. **Fertil Steril**, v. 83, n. 4, p. 979-987, 2005.

VIGIER, B. et al. Production of anti-Mullerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. **Endocrinology**, v. 114, n. 4, p. 1315-1320, 1984.

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

WEINSTEIN, M. et al. Timing of menopause and patterns of menstrual bleeding. **Am J Epidemiol**, v. 158, n. 8, p. 782-791, 2003.

WELSH, P.; SMITH, K.; NELSON, S. M. A single-centre evaluation of two new anti-Mullerian hormone assays and comparison with the current clinical standard assay. **Hum Reprod**, v. 29, n. 5, p. 1035-1041, 2014.

WELT, C. K. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 68, n. 4, p. 499-509, 2008.

YOSHIDA Y. et al. Analyzing the possible involvement of anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone receptor II single nucleotide polymorphism in infertility. **J Assist Reprod Genet**. v. 31, n. 2, p. 163-168, 2014.

9. Anexo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, de uma pesquisa. Após ser devidamente esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Relação do Peso ao nascer e Peso para a Idade Gestacional com a Reserva Ovariana em Mulheres acima de 30 anos. Pesquisadores Responsáveis: Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro e Gustavo Salata Romão

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (16) 33518340 - Pesquisadores participantes: Antônio Augusto Moura da Silva, Heloisa Bettiol, Marco Antônio Barbieri e Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro - Telefones para contato: (16) 36022580

Este estudo pretende verificar se mulheres nascidas com peso abaixo ou acima do esperado apresentam sinais precoces de esgotamento dos folículos no ovário (o que significaria menor grau de fertilidade ou maior dificuldade para engravidar) entre os 30 e 35 anos de idade. Neste estudo também serão verificados outros aspectos supostamente relacionados a fertilidade da mulher, tais como o tipo de profissão, hábitos de vida, características dos ciclos menstruais, distribuição da gordura corporal além de alguns antecedentes da história pessoal e familiar. As informações obtidas por este estudo serão de grande importância porque embora se saiba que existem subgrupos de mulheres com graus diferentes de fertilidade por volta dos 30 anos de idade, ainda não existem exames que possam identificar precocemente as mulheres sub-férteis. O maior conhecimento a esse respeito poderá facilitar o aconselhamento e a assistência diferenciada para as mulheres em relação ao seu grau de fertilidade.

Para participar desse estudo será necessário que você seja submetida a coleta de sangue, entrevista, exame dos sinais vitais, medidas antropométricas e

exame de ultra-som no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em data e horário previamente agendados.

A entrevista com um(a) pesquisador(a) terá duração média entre 30 e 40 minutos e serão verificadas informações sobre a sua história pessoal, suas condições de vida, trabalho e família, além de diversos aspectos sobre as suas condições de saúde. Nessa mesma ocasião serão verificados seus dados antropométricos (peso, estatura e circunferência abdominal), seus sinais vitais (pressão arterial, pulso e temperatura) e será coletada uma amostra de 20 ml (o equivalente a meia xícara de café) do seu sangue para dosagens hormonais e bioquímicas. Serão dosados os seguintes exames: AMH (hormônio anti-mulleriano), TSH (hormônio tireotrófico), PRL (prolactina), Testosterona, S-HBG (globulina transportadora de hormônio sexuais), Insulina, Glicemia e Ca-125. caso você não esteja usando métodos hormonais de anticoncepção (como pílulas e injeções), também serão dosados o FSH (hormônio folículo estimulante), o Estradiol, a Inibina B e as Activinas A, B e AB. Para a coleta de sangue você deverá estar em jejum de pelo menos 12 horas para sólidos e 8 horas para líquidos.

O procedimento de coleta de sangue periférico é de baixo risco para a sua saúde, podendo ocorrer em casos raros alguns hematomas (manchas arroxeadas) próximas ao local de punção e que desaparecem em algumas semanas.

Após a coleta de sangue será realizado um exame ultrassonográfico (Ultra-som) para verificar as características do útero e dos ovários. O exame de Ultra-som não envolve irradiação e não oferece riscos à sua saúde, sendo considerado um exame seguro para as pacientes. O exame de ultra-som pode ser realizado pela via transabdominal (por cima da barriga – nas mulheres que ainda não tiveram relação sexual) ou por via endovaginal (via – vaginal, nas mulheres que já tiveram relação sexual). Para realizar o exame por via transabdominal, você será orientada a ingerir água e permanecer com a bexiga cheia (sem urinar) por alguns minutos, enquanto é realizado o exame. Para realizar o exame por via endovaginal não é necessário permanecer com a bexiga cheia e o transdutor (parte do aparelho que capta as imagens) é inserido por via vaginal, envolvido em um preservativo descartável para a sua proteção. Os exames de ultra-som realizados pela via

transabdominal e transvaginal geralmente são bem tolerados e não causam desconforto para as pacientes.

Para a participação nesta pesquisa não haverá remuneração financeira, mas haverá auxílio para o transporte até o Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, no valor de R\$ 30,00 (trinta reais) e um auxílio para alimentação (após a coleta de sangue) no valor de R\$ 15,00 (quinze reais).

Todas as informações obtidas mediante a sua participação neste estudo serão mantidas em absoluto sigilo. Quando o estudo for publicado, seu nome não será divulgado e nem tampouco serão divulgadas informações que permitam a sua identificação.

A sua participação nessa pesquisa não implicará em qualquer mudança em seu acompanhamento médico ou tratamento.

Caso não queira participar desse estudo, ou queira retirar o seu consentimento em participar desse estudo a qualquer tempo, fica assegurado que não haverá nenhum prejuízo a você, à sua saúde, ao seu acompanhamento médico ou à sua participação em outros estudos.

Nome do pesquisador _____

Assinatura do pesquisador _____

Data ___/___/_____

Nome do sujeito da pesquisa _____

Assinatura do sujeito da pesquisa _____

Data ___/___/_____