

RENATA DOS SANTOS BATISTA REIS WOLOSZYNEK

**Validação, valores normativos e aplicabilidade clínica de
um ensaio imunoenzimático para determinação sérica do
hormônio anti-Mülleriano**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Nahime de Brito

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Woloszynek, Renata dos Santos Batista Reis
Validação, valores normativos e aplicabilidade clínica de um ensaio
imunoenzimático para determinação sérica do hormônio anti-Mülleriano / Renata dos
Santos Batista Reis Woloszynek. -- São Paulo, 2014.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientador: Vinicius Nahime de Brito.

Descritores: 1.Hormônio antimülleriano 2.Imunoensaio 3.Valores de referência
4.Síndrome de Turner 5.Síndrome do ovário policístico 6.Criptorquidismo

USP/FM/DBD-113/14

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): auxílio à pesquisa regular 2011/2129070 e bolsa de mestrado 2012/205258.

Dedicatória

Para meu esposo Fernando, meu porto seguro.

A meus pais, pelo amor e cuidado.

Agradecimientos

O sábio Salomão disse: “Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças”, e para concluir este trabalho, foi o que fiz, dei o meu melhor. Mas, nunca estive sozinha, muitos contribuíram comigo e são essas pessoas que quero agradecer.

Ao Criador de um Universo insondável, eu agradeço a oportunidade de ver pelos olhos da ciência, ainda que, obscuramente, as obras de Suas mãos.

Agradeço a meus pais, Benedito e Irani, pelo amor incondicional que me é concedido. Por acreditarem em mim e esforçadamente abrirem o caminho para minhas inúmeras viagens.

A meu amado esposo Fernando, que, indiscutivelmente, sempre está a meu lado. Nos momentos bons e ruins, me ouvindo, aconselhando, motivando, direcionando e corrigindo meus passos, enfim, sendo meu porto seguro. Por suportar a distância e a ausência. Por suportar o mau tempo. Por seu amor, respeito e companheirismo. Este trabalho só se realiza por sua causa. Obrigada, amor!

A meus irmãos, Allan e Pamela, a meus familiares e amigos que fizeram parte desta jornada, que torceram por mim e deram-me força para continuar.

A Luiza e Helena, que me incentivaram a fazer este mestrado e apresentaram-me à Dra. Berenice.

À Dra. Berenice que me deu uma oportunidade ao me aceitar no grupo de endocrinologia, e pelo seu exemplo de profissionalismo.

A meu orientador Dr. Vinicius, que depois de certa insistência recebeu-me como sua aluna, mesmo sem me conhecer. Obrigada por acreditar em meu potencial para desenvolver este trabalho. Pela paciência e cordialidade, por ter me ensinado a ser aprendiz de pesquisadora.

A Nilda, Rosangele e Cida que, eficientemente, sempre responderam minhas dúvidas e ajudaram-me quando foi possível.

A todos que conheci na pós-graduação: Daiane, Tathiana, Rosana e a todos os alunos que também enfrentam as dificuldades da pesquisa e saem vitoriosos.

A Luciana Leopoldino e Márcia Ester, que me ensinaram a técnica do ELISA. Meninas, obrigada pela paciência! A Luciana Brito, Helena e Marcelo Batista, por me instruírem na validação do Gen II.

A Alexandra e Renata, por me receberem no ambulatório de Turner e auxiliarem-me na coleta de dados das pacientes. Ao Dr. Marcondes, que gentilmente me recebeu no ambulatório de SOP. Ao Cristiano, Michelle, Viviane e Wagner, por compartilharem comigo seus conhecimentos, pelas risadas e palavras sinceras de apoio e estímulo. Ao Dr. Carlos Longui e sua aluna Letícia, por nos fornecerem os dados dos pacientes com criptorquidismo da Santa Casa.

A todos os voluntários e pacientes que participaram deste estudo. Aos alunos da ETEC Euro Albino de Souza de Mogi Guaçu, e aos queridos amigos e funcionários da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP, pessoas que carinhosamente contribuíram na parte principal deste estudo e torceram por meu sucesso.

Aos amigos da Biologia Molecular que, desde o início, me ofereceram ajuda e compreenderam minhas ausências. A Cecília Salete, pela motivação.

A Luiza, que me presenteou com sua leal amizade. A Adriana e Lili, pela sinceridade e força.

A Cintia, minha amiga, fiel companheira, sempre presente com seu carisma e zelo. Obrigada por sua afeição, por seus conselhos e incentivo, por ouvir minhas ansiedades, meus questionamentos sobre a vida e sobre mim mesma, por me fazer entender que “no final tudo dá certo”.

A Deus por ser fiel a suas promessas e fazer o impossível acontecer.

Epígrafe

“Se fizermos todas as tentativas possíveis para aumentar nosso conhecimento e usá-lo para o bem da humanidade, isto fará uma diferença em nós, e em nosso mundo”.

Ben Carson

Normalização Adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Histórico do hormônio anti-Mülleriano.....	2
1.2	O papel do AMH na fisiologia do sexo feminino.....	4
1.3	Influências do uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e índice de massa corpórea sobre os valores séricos de AMH	9
1.4	Aplicabilidade clínica dos valores séricos de AMH no sexo feminino	12
1.4.1	Reserva ovariana	12
1.4.2	Menopausa.....	12
1.4.3	Quimioterapia	14
1.4.4	Cirurgias ginecológicas	15
1.4.5	Síndrome de Turner.....	16
1.4.6	Síndrome do ovário policístico.....	19
1.4.7	Reprodução humana assistida.....	21
1.4.8	Tumor de células da granulosa	23
1.5	Valores normativos de AMH no sexo feminino	24
1.6	O papel do AMH na fisiologia do sexo masculino.....	25
1.7	Aplicabilidade clínica do AMH no sexo masculino.....	27
1.7.1	Distúrbios do desenvolvimento sexual.....	27
1.7.2	Síndrome da persistência dos derivados Müllerianos.....	28
1.7.3	Criptorquidismo.....	28
1.7.4	Micropênis.....	29
1.7.5	Diagnóstico diferencial entre retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento puberal e hipogonadismo hipogonadotrófico isolado	29
1.7.6	Infertilidade masculina	30
1.8	Valores normativos de AMH no sexo masculino.....	32
1.9	Imunoensaios para determinação sérica de AMH	33
1.10	Validação de método	34
2	OBJETIVOS.....	38
3	MÉTODOS.....	40
3.1	Considerações éticas.....	41
3.2	Casuística.....	41
3.3	Avaliação hormonal.....	44
3.4	ELISA AMH Gen II	48

3.5	Validação do ensaio AMH Gen II	50
3.6	Análise estatística	53
4	RESULTADOS	54
4.1	Validação do ensaio AMH Gen II	55
4.1.1	Sensibilidade analítica	55
4.1.2	Sensibilidade funcional	56
4.1.3	Precisão intraensaio	57
4.1.4	Precisão interensaio	58
4.1.5	Linearidade	59
4.1.6	Paralelismo	60
4.1.7	Estudo de estabilidade	61
4.1.8	Comparação entre métodos	62
4.2	Valores normativos de AMH e influências do uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e índice de massa corpórea.....	63
4.2.1	Sexo feminino.....	63
4.2.2	Sexo masculino.....	68
4.3	Aplicabilidade clínica dos valores séricos de AMH	72
4.3.1	Síndrome de Turner.....	72
4.3.2	Síndrome do ovário policístico.....	74
4.3.3	Criptorquidismo.....	77
5	DISCUSSÃO.....	78
5.1	Validação do ensaio AMH Gen II	80
5.2	Valores normativos de AMH e influências do uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e índice massa corpórea.....	81
5.3	Aplicabilidade clínica do AMH.....	84
5.3.1	Síndrome de Turner.....	84
5.3.2	Síndrome do ovário policístico.....	85
5.3.3	Criptorquidismo.....	86
6	CONCLUSÕES.....	88
7	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICES	107
	A Questionário	
	B Dados clínicos e hormonais dos 100 controles femininos	
	C Dados clínicos e laboratoriais dos 104 controles masculinos	
	D Achados clínicos e hormonais das 66 pacientes com ST	
	E Achados clínicos e laboratoriais das 29 pacientes com SOP	
	F Achados clínicos e hormonais dos 31 pacientes com criptoquidismo	

Lista de Abreviaturas

AMH	Hormônio anti-Mülleriano
AMHR-II	Gene que codifica o receptor tipo II do AMH
ANVISA	Agência de Nacional de Vigilância Sanitária
CFA	Contagem de folículos antrais
CLIA	<i>Clinical Laboratory Improvement</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratories Standards Institute</i>
CV	Coefficiente de variação
D4	Androstenediona
DDS	Distúrbios do desenvolvimento sexual
DHEAS	De-hidroepiandrosterona sulfato
DP	Desvio-padrão
DSL	<i>Diagnostic Systems Laboratories</i>
E2	Estradiol
ECLIA	Ensaio eletroquimioluminométrico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EOC	Estimulação ovariana controlada
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FIA	Fluoroimunoensaio
FIV	Fertilização "in vitro"
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GATA4	Gene que codifica o fator de transcrição GATA4
Gen II	ELISA AMH segunda geração
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HHI	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado
IC	Idade cronológica
IFMA	Ensaio imunofluorimétrico

IMC	Índice de massa corpórea
INB	Inibina B
INSL3	<i>Insulin-like factor 3</i>
IOT	Immunotech
IU	Unidades internacionais
LH	Hormônio luteinizante
ng	Nanograma
nmol	Nanomol
pg	Picograma
pmol	Picomol
PRL	Prolactina
PROG	Progesterona
RCCD	Retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento
RHA	Reprodução humana assistida
rhCG	Gonadotrofina coriônica humana recombinante
RIE	Radioimunoensaio
RNA _m	RNA mensageiro
SF1	Gene que codifica o fator esteroidogênico 1
SHEO	Síndrome da hiperestimulação ovariana
SHBG	Globulina ligadora de hormônios sexuais
SOP	Síndrome do ovário policístico
SOX9	<i>SRY-related HMG box gene</i>
SPDM	Síndrome da persistência dos derivados Müllermanos
ST	Síndrome de Turner
TESL	Testosterona livre
TESTO	Testosterona total
TMB	Tetrametilbenzidina
WT1	Gene supressor do tumor de Wilm's
µL	Microlitro
17-OHP	17-hidroxiprogesterona

Lista de Figuras

Figura 1 -	Representação esquemática do papel do AMH nos dois compartimentos do desenvolvimento folicular ovariano normal	5
Figura 2 -	Representação esquemática do perfil dos valores séricos de AMH e testosterona no sexo masculino	26
Figura 3 -	Representação esquemática do princípio e procedimento do ELISA AMH Gen II	49
Figura 4 -	Relação entre os valores de AMH, observados e esperados, obtidos no estudo de linearidade	59
Figura 5 -	Correlação entre os valores séricos de AMH e a idade cronológica no sexo feminino	64
Figura 6 -	Correlação entre os valores séricos de AMH e a idade cronológica no sexo masculino	69

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Flutuação dos valores séricos de AMH durante o ciclo menstrual de mulheres saudáveis	8
Tabela 2 -	Valores de corte de AMH para o diagnóstico da SOP	21
Tabela 3 -	Valores normativos de AMH no sexo feminino	24
Tabela 4 -	Valores normativos de AMH no sexo masculino	32
Tabela 5 -	Definição dos parâmetros avaliados na validação de métodos.....	36
Tabela 6 -	Valores normais de 17-hidroxiprogesterona, LH, FSH, estradiol e progesterona em mulheres adultas.....	45
Tabela 7 -	Valores normais de inibina B, prolactina, testosterona total e globulina ligadora de hormônios sexuais em mulheres adultas	46
Tabela 8 -	Valores normais de dehidroepiandrosterona sulfato e androstenediona obtidos nos ensaios eletroquimioluminométrico e quimioimunoensaio respectivamente, em mulheres adultas.....	46
Tabela 9 -	Valores normais de LH, FSH, testosterona total e inibina B em homens adultos	47
Tabela 10 -	Valores normais de LH, FSH, testosterona total e inibina B em meninos pré-púberes.....	47
Tabela 11 -	Diluição e cálculo empregado para obtenção dos valores esperados na análise da linearidade.....	52
Tabela 12 -	Diluição e cálculo para obtenção dos valores esperados na análise da recuperação	52
Tabela 13 -	Sensibilidade analítica do ensaio AMH Gen II	55
Tabela 14 -	Sensibilidade funcional do ensaio AMH Gen II.....	56
Tabela 15 -	Precisão intraensaio do ensaio AMH Gen II	57
Tabela 16 -	Precisão interensaio do ensaio AMH Gen II	58
Tabela 17 -	Linearidade do ensaio AMH Gen II	59
Tabela 18 -	Paralelismo do ensaio AMH Gen II	60
Tabela 19 -	Estudo de estabilidade	61
Tabela 20 -	Correlação entre métodos IOT e Gen II	62

Tabela 21 -	Características clínicas e hormonais dos 100 controles femininos.....	64
Tabela 22 -	Características clínicas e hormonais dos 100 controles femininos distribuídos por faixa etária	65
Tabela 23 -	Características clínicas e hormonais dos 100 controles femininos usuárias e não usuárias de contraceptivos hormonais	65
Tabela 24 -	Características clínicas e hormonais dos 100 controles femininos tabagistas e não tabagistas	66
Tabela 25 -	Características clínicas e hormonais dos 100 controles femininos distribuídos pelo índice de massa corpórea	66
Tabela 26 -	Correlação de Pearson ajustada para a idade entre os valores séricos de AMH e as demais variáveis no grupo de 100 controles femininos	67
Tabela 27 -	Características clínicas e laboratoriais dos 104 controles masculinos	69
Tabela 28 -	Características clínicas e laboratoriais dos 104 controles masculinos distribuídos por faixa etária	70
Tabela 29 -	Características clínicas e laboratoriais dos 104 controles masculinos tabagistas e não tabagistas	70
Tabela 30 -	Características clínicas e hormonais dos 104 controles masculinos distribuídos pelo índice de massa corpórea	71
Tabela 31 -	Correlação de Pearson entre os valores séricos de AMH e as demais variáveis no grupo de 104 controles masculinos.....	71
Tabela 32 -	Características clínicas das 66 pacientes com síndrome de Turner.....	73
Tabela 33 -	Características hormonais das 66 pacientes com síndrome de Turner	73
Tabela 34 -	Características clínicas das 29 pacientes com SOP	75
Tabela 35 -	Características clínicas e laboratoriais das 29 pacientes com SOP	76
Tabela 36 -	Características clínicas e laboratoriais dos 31 pacientes com criptorquidia	77

Resumo

Woloszynek RSBR. *Validação, valores normativos e aplicabilidade clínica de um ensaio imunoenzimático para determinação sérica do hormônio anti-Mülleriano* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O hormônio anti-Mülleriano (AMH) é um marcador de reserva ovariana e função testicular. A aplicação clínica desse hormônio requer padronização adequada de valores de referência, de acordo com o imunoensaio utilizado. Os objetivos deste estudo foram: validar o imunoensaio AMH Gen II (*Beckman Coulter Company, TX, USA*), estabelecer valores normais de AMH em homens e mulheres saudáveis, avaliar a influência do uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e índice de massa corpórea (IMC) sobre os valores de AMH e verificar as concentrações séricas desse hormônio em pacientes com síndrome de Turner (ST), síndrome dos ovários policísticos (SOP) e em meninos com criptorquidismo submetidos ao teste de estímulo com rhCG (gonadotrofina coriônica humana recombinante). A validação do ensaio AMH Gen II foi realizada utilizando protocolo simplificado, conforme as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Para estabelecer valores normais de AMH, 133 mulheres e 135 homens saudáveis foram selecionados prospectivamente. Além disso, 66 pacientes com ST, 29 com SOP e 31 com criptorquidismo foram estudados. A sensibilidade analítica e funcional do ensaio AMH Gen II foram 0,02 e 0,2 ng/mL, respectivamente. Os coeficientes de variação intra e interensaio variaram entre 5,2% - 9,0% e 4,6% - 7,8% em diferentes concentrações, respectivamente. A linearidade, paralelismo e estabilidade das amostras apresentaram percentual de recuperação entre 80% - 120%. O ensaio AMH Gen II correlacionou-se fortemente com o ensaio Immunotech anteriormente utilizado ($r = 0,9$; $p < 0,001$). No sexo feminino, os valores séricos de AMH demonstraram declínio progressivo com o aumento da idade ($r = -0,4$; $p < 0,001$). Por outro lado, os valores de AMH não diferiram entre usuárias e não usuárias de contraceptivos hormonais, entre tabagistas e não tabagistas, bem como entre mulheres obesas e não obesas. No sexo masculino, a idade não influenciou as concentrações séricas de AMH; no entanto, os valores de AMH foram significativamente reduzidos com o aumento do IMC ($r = -0,3$, $p = 0,008$), contudo, esses valores permaneceram dentro do intervalo observado no grupo de indivíduos com peso normal. Todas as pacientes com ST apresentaram valores indetectáveis de AMH. Em contraste, na SOP as concentrações de AMH foram significativamente maiores do que nos controles femininos, mas com 76% de sobreposição entre os dois grupos. Em meninos com criptorquidismo, a concordância entre os valores basais de AMH e a testosterona pós-estímulo com rhCG foi de 74%, houve correlação positiva significativa entre os valores basais de AMH e a testosterona pós-estímulo ($r = 0,5$; $p < 0,001$). Em conclusão, o ensaio AMH Gen II é confiável para a determinação sérica do AMH. Valores normativos de AMH apresentaram ampla faixa de normalidade em ambos os sexos. Valores reduzidos de AMH em homens obesos encontraram-se dentro da faixa de indivíduos normais. Na ST, o potencial uso do AMH para avaliar a reserva ovariana exige estudos longitudinais. A utilização do AMH como um critério diagnóstico da SOP deve ser associada aos critérios já estabelecidos. Em meninos com criptorquidismo, um AMH normal provê informação útil sobre a função testicular, mas não exclui a necessidade do teste de estímulo com rhCG e pacientes com resultados discordantes necessitam de acompanhamento clínico.

Descritores: Hormônio anti-Mülleriano; Imunoensaio; Valores de referência; Síndrome de Turner; Síndrome do ovário policístico; Criptorquidismo.

Summary

Woloszynek, RSBR. *Validation, normative values and clinical applicability of an enzyme immunoassay for the determination of serum anti-Müllerian hormone* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2014.

The anti-Müllerian hormone (AMH) is a marker of ovarian reserve and testicular function. The clinical application of this hormone requires proper standardization of reference values according to the immunoassay used. The aims of this study were: to validate the AMH Gen II immunoassay (Beckman Coulter Company, TX, USA), to establish reference AMH values in healthy men and women, the influence of hormonal contraceptive use, smoking and body mass index (BMI) on the values of AMH and to check serum concentrations of this hormone in patients with Turner syndrome (TS), polycystic ovary syndrome (PCOS) and in boys with cryptorchidism underwent stimulation test rhCG (recombinant human chorionic gonadotropin). The validation of the AMH Gen II assay was performed using simplified protocol following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute. To establish reference AMH values, 133 healthy women and 135 men were prospectively selected. In addition, 66 patients with TS, 29 with PCOS and 31 with cryptorchidism were studied. The analytical and functional sensitivity of the AMH Gen II assay was 0.02 and 0.2 ng / mL, respectively. Intra and inter-assay coefficients of variation in different concentrations ranged between 5.2-9.0% and 4.6-7.8%, respectively. The linearity, parallelism and stability studies showed recovery % between 80 and 120%. The AMH Gen II assay strongly correlated with the previously used Immunotech assay ($r = 0.9$, $p < 0.001$). In females, serum AMH showed a progressive decline with increasing age ($r = -0.4$, $p < 0.001$). On the other hand, AMH values did not differ between users and nonusers of hormonal contraceptives, smokers and nonsmokers, obese and non-obese. In males, age did not influence the levels of serum AMH, however, AMH values were significantly reduced with increasing BMI ($r = -0.3$, $p = 0.008$), but, these values were within the range observed in the group of subjects with body weight. All TS patients showed undetectable AMH levels. In contrast, in PCOS AMH values were significantly higher than in women controls, but with overlap of 76% between the two groups. In boys with cryptorchidism, the concordance between baseline AMH and testosterone after stimulation with rhCG was 74%, there was a significant positive correlation between baseline AMH values and testosterone values after stimulation ($r = 0.5$, $p < 0.001$). In conclusion, AMH Gen II assay is reliable for determining the serum AMH. Reference AMH values showed a wide range in both sexes. Reduced values of AMH in obese men were within the range of normal individuals. In ST, the potential use of AMH to assess ovarian reserve requires longitudinal studies. The use of AMH as a diagnostic criterion of SOP must be based on the association with the criteria already established. In boys with cryptorchidism, a normal AMH provides useful information on testicular function, but does not exclude the need for stimulation test rhCG, patients with discordant results require follow-up.

Descriptors: Anti-Müllerian hormone; Immunoassay; Reference values; Turner syndrome; Polycystic ovary syndrome, Cryptorchidism.

1 Introdução

1.1 Histórico do hormônio anti-Mülleriano

Nos primórdios da diferenciação sexual humana, o feto de ambos os sexos possui uma genitália externa bipotencial e dois pares de ductos genitais internos: (1) os ductos de Wolff, que no sexo masculino diferenciam-se em ductos deferentes, eferentes, vesícula seminal e epidídimo e (2) os ductos de Müller, que no sexo feminino diferenciam-se em tubas uterinas, útero e terço superior da vagina¹.

Em 1947, os experimentos de Alfred Jost destinados à observação dos processos de diferenciação sexual em fetos de coelhos castrados demonstraram que cristais de testosterona eram capazes de masculinizar os ductos de Wolff, os quais não afetavam o desenvolvimento dos ductos de Müller. Sugeriu-se, então, que um produto de origem testicular, diferente da testosterona era responsável pela regressão dos ductos de Müller em fetos masculinos, o qual foi denominado substância inibidora de Müller, atualmente conhecido como hormônio anti-Mülleriano (AMH)².

Durante o período de diferenciação sexual no sexo masculino, sabe-se que o AMH é produzido pelas células de Sertoli dos testículos, sendo o responsável pela regressão dos ductos de Müller, e a testosterona produzida pelas células de Leydig atua no desenvolvimento e diferenciação dos ductos de Wolff. Por outro lado, no sexo feminino, a ausência do AMH é determinante para o desenvolvimento e diferenciação dos ductos de Müller¹.

As primeiras evidências da estrutura química do AMH surgiram a partir de 1978, quando este hormônio foi isolado e purificado, enquanto que o sequenciamento do gene codificador do AMH foi descrito somente em 1986. Nos últimos anos, o uso de técnicas

moleculares permitiu a identificação dos receptores de AMH e sua via de sinalização, bem como o entendimento dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão do AMH¹.

O AMH é uma glicoproteína dimérica de 140-kDa pertencente à família do fator transformador do crescimento β , que está envolvido em processos de crescimento e diferenciação celular. O gene que codifica o AMH, está localizado no cromossomo 19p13.2-13.3, é composto por 5 éxons e tem sua transcrição controlada pelos genes *SFI*, *SOX9*, *WT1* e *GATA4*¹.

O AMH é traduzido em um pró-hormônio, que antes de ser secretado como hormônio maduro sofre glicosilação e dimerização para produzir um dímero de 144-kDa composto por monômeros idênticos de 72-kDa; cada monômero contém um domínio aminoterminal (chamado “pro” região) e um domínio carboxiterminal (chamado região “madura”). Durante a transição citoplasmática, cerca de 5% - 20% do AMH sofre clivagem sítio específico entre o domínio aminoterminal e o domínio carboxiterminal para formar dois polipeptídeos de 58-kDa e 12-kDa unidos por ligação não-covalente, formando, assim, o hormônio biologicamente ativo³.

O AMH mantém 11-12 resíduos de cistina conservados, dos quais sete estão localizados no domínio carboxiterminal. Esta região demonstra homologia com 108 de 112 resíduos conservados entre sequências de ratos e humanos, além de ser uma região estável, não afetada pela proteólise⁴.

Dois tipos de receptores estão envolvidos na ação do AMH: os receptores não específicos tipo I (ALK6, ALK2 e ALK3) e o receptor específico tipo II, este último é codificado pelo gene AMHR-II^{1,3}.

1.2 O papel do AMH na fisiologia do sexo feminino

A foliculogênese ovariana compreende duas etapas: (1) o recrutamento inicial, processo contínuo em que os folículos primordiais começam o processo de maturação e (2) o recrutamento cíclico, processo dirigido pelo aumento dos valores séricos do hormônio folículo estimulante (FSH), que promove o crescimento de um grupo de folículos antrais pequenos a partir dos quais o folículo dominante destinado a ovular é selecionado⁵.

O AMH é produzido pelas células da granulosa de folículos ovarianos e pode ser detectado a partir da 36ª semana de gestação. A expressão de AMH persiste em folículos pré-antrais pequenos e grandes, bem como em folículos antrais pequenos de até 7 milímetros de diâmetro, atingindo expressão máxima em folículos antrais de 4 milímetros. Uma vez que os folículos antrais pequenos tornam-se sensíveis ao FSH, a expressão de AMH diminui progressivamente até atingir valores indetectáveis em folículos antrais maiores que 8 milímetros. Nenhuma expressão de AMH é detectada em folículos atrésicos (**Figura 1**)^{5, 6}. Esse padrão de expressão sugere que o AMH exerça efeito inibitório sobre o recrutamento inicial e sobre a sensibilidade ao FSH. Estudos experimentais “*in vitro*” e “*in vivo*” confirmaram esses efeitos⁷.

Em 1999, Durlinger *et al.*⁸ estudaram camundongos *knockout* para o gene do AMH e camundongos do tipo selvagem, observaram que, aos 4 meses de idade, os ovários de camundongos *knockout* continham mais folículos em crescimento e menos folículos primordiais comparados aos camundongos selvagens⁸. O recrutamento aumentado na ausência do AMH resultou em rápida depleção do *pool* de folículos primordiais, que se tornou evidente aos 13 meses de idade quando os ovários dos camundongos *knockout* estavam quase desprovidos de folículos primordiais, e os

ovários dos camundongos selvagens ainda continham considerável número de folículos primordiais⁸. Estes achados foram confirmados por estudos posteriores do mesmo grupo em cultura de células ovarianas de camundongos neonatais cultivadas na presença e ausência de AMH. Na presença de AMH, houve redução de 40% - 50% no número de folículos em crescimento comparados à cultura controle⁹.

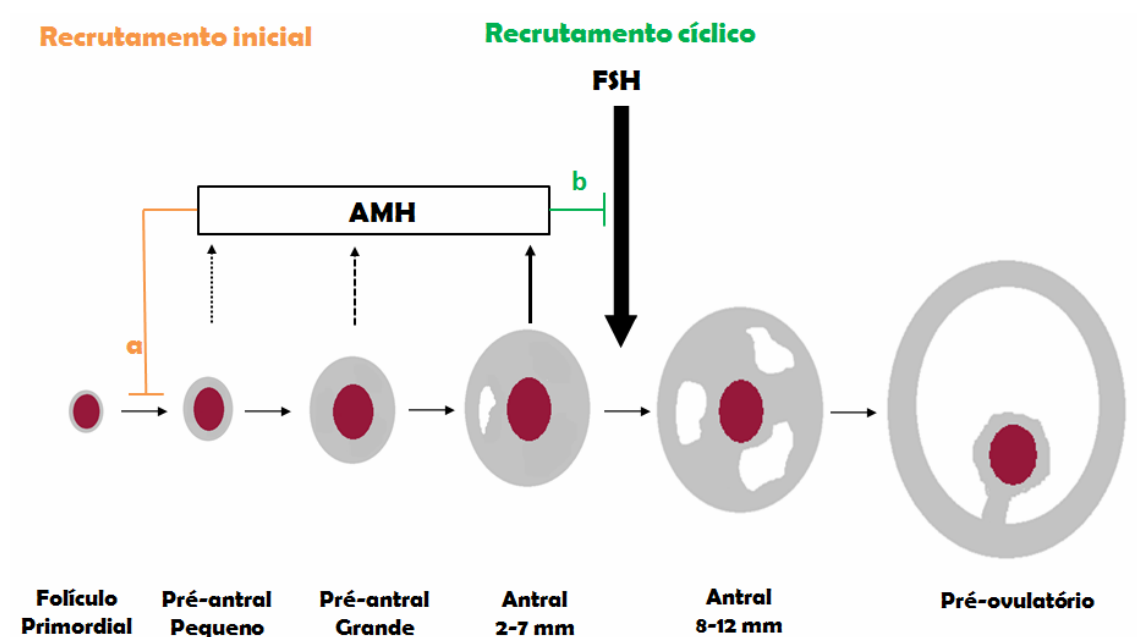


Figura 1 - Representação esquemática do papel do AMH nos dois compartimentos do desenvolvimento folicular ovariano normal. O AMH é expresso em folículos pré-antrais pequenos e grandes e em folículos antrais pequenos. Os efeitos inibitórios do AMH são observados (a) sobre o recrutamento inicial de folículos primários do pool de folículos primordiais e (b) na sensibilidade de folículos antrais ao FSH. Adaptada de Broekmans *et al.*⁵

Da mesma forma, Carlsson *et al.*¹⁰ demonstraram supressão do recrutamento inicial de folículos primordiais em cultura de células ovarianas humanas tratadas com AMH por 7 dias¹⁰. Contudo, este resultado não foi confirmado por Schmidt *et al.*¹¹ que observaram crescimento aumentado de folículos em cultura de tecido ovariano humano criopreservado tratado com AMH por 4 semanas. A diferença no tipo de material

utilizado (fresco vs. congelado) e o tempo de incubação (7 dias vs. 4 semanas) podem explicar os resultados conflitantes¹¹.

Na inibição da sensibilidade ao FSH, o papel do AMH foi demonstrado. Um estudo detalhado do ciclo reprodutivo de camundongos *knockout* para o gene AMH e camundongos selvagens revelou discreta redução nos valores de FSH em camundongos *knockout*, ainda assim, a seleção de folículos antrais pequenos dependentes de FSH foi mais pronunciada na ausência de AMH¹². Além disso, foi observado recrutamento de folículos pré-antrais grandes em camundongos *knockout*, mas não em camundongos selvagens¹². Estes achados foram confirmados por Durlinger *et al.*¹³ em cultura de folículos ovarianos pré-antrais de camundongos tratados com AMH e FSH e, somente, FSH. Na presença de AMH e FSH, os folículos apresentaram diâmetros reduzidos comparados àqueles cultivados somente na presença de FSH¹³. Estudos recentes com a cultura de folículos ovarianos, tanto de roedores como de mulheres normo-ovulatórias indicam que o AMH também exerce efeito inibitório sobre a expressão do receptor do hormônio luteinizante (LH) e sobre a atividade da aromatase dependente de FSH^{14, 15}.

Esses trabalhos indicam fortemente o papel regulatório do AMH sobre o recrutamento de folículos primários, bem como de seu controle sobre o número de folículos em crescimento que se tornam sensíveis ao FSH para posterior seleção e ovulação.

O AMH é secretado do ovário para a circulação e pode ser dosado no soro. Sabe-se que, no sexo feminino, os valores séricos de AMH são detectáveis ao nascimento e aumentam gradativamente até o fim da puberdade, atingindo pico máximo por volta dos 16 anos de idade. A partir daí, os valores de AMH permanecem relativamente estáveis até os 25 anos, quando passam a apresentar forte correlação

negativa com a idade, mostrando declínio longitudinal até atingir concentrações séricas indetectáveis cerca de 5 anos antes da menopausa¹⁶⁻¹⁸.

Está bem documentado que os valores de AMH são marginalmente influenciados pelas gonadotrofinas¹⁹. No entanto, a ocorrência de flutuações durante as diferentes fases do ciclo menstrual ainda é controversa. Alguns autores afirmam que não observaram flutuações na secreção de AMH durante o ciclo menstrual²⁰⁻²², outros demonstraram flutuações significantes²³⁻²⁶. Diferenças no desenho do estudo, número, idade e características dos indivíduos, bem como o tipo de imunoensaio utilizado para dosagem de AMH podem explicar a divergência entre os resultados apresentados. A **Tabela 1** resume os dados da literatura referentes às flutuações nos valores séricos do AMH, durante o ciclo menstrual de mulheres saudáveis com ciclos menstruais regulares.

Tabela 1 - Flutuação dos valores séricos de AMH durante o ciclo menstrual de mulheres saudáveis

Autor	Ano	n	Idade	Método de coleta	ELISA	Resultados
Cook <i>et al.</i>	2000	20	22-35 anos	3 medidas de AMH durante um ciclo menstrual: no início da fase folicular, no período periovulatório e no meio da fase lútea.	não declarado	Houve aumento significativo nos valores séricos de AMH no período periovulatório.
La Marca <i>et al.</i>	2006	24	21-36 anos	5 medidas de AMH durante um ciclo menstrual: do 2º dia fase folicular até o pico de LH	Immunotech	Não houve flutuação significativa nos valores séricos de AMH durante o ciclo menstrual.
Hehenkamp <i>et al.</i>	2006	44	25-46 anos	7 medidas de AMH durante um ciclo menstrual: entre o meio e o fim da fase lútea; no início, meio e fim da fase folicular; no período periovulatório e no início da fase lútea.	DSL	Não houve flutuação significativa nos valores séricos de AMH durante o ciclo menstrual.
Tsepelidis <i>et al.</i>	2007	20	18-35 anos	12 medidas de AMH durante um ciclo menstrual: do início da fase folicular até o final a fase lútea.	DSL	Não houve flutuação significativa nos valores séricos de AMH durante o ciclo menstrual.
Wunder <i>et al.</i>	2008	36	20-32 anos	4 medidas de AMH durante um ciclo menstrual: no final da fase folicular, no dia do pico de LH e no início da fase lútea.	DSL	Houve redução significativa nos valores séricos de AMH no final da fase folicular do ciclo menstrual.
Sowers <i>et al.</i>	2010	20	30-40 anos	Medidas diárias de AMH durante um ciclo menstrual completo.	DSL	Houve aumento significativo nos valores séricos de AMH no início da fase folicular do ciclo menstrual, mas somente em mulheres jovens.
Deb <i>et al.</i>	2013	34	18-35 anos	14 medidas de AMH durante um ciclo menstrual: no início e o no meio da fase folicular, no período periovulatório e na fase lútea.	DSL	Houve aumento significativo nos valores séricos de AMH na fase lútea do ciclo menstrual.

ELISA: ensaio imunoenzimático; Immunotech: Beckman Coulter; DSL: Diagnostic System Laboratories.

1.3 Influências do uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e índice de massa corpórea sobre os valores séricos de AMH

Até o momento na literatura, não há um consenso entre os autores com relação aos valores séricos de AMH e o uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e obesidade.

O uso de contraceptivos hormonais é um método de contracepção reversível muito difundido e amplamente utilizado no tratamento de distúrbios reprodutivos endócrinos. O efeito dos contraceptivos é estabelecido sobretudo pela supressão da secreção das gonadotrofinas hipofisárias, a que resulta na redução da atividade ovariana, ou seja, na inibição do crescimento folicular e ovulação²⁷. Os efeitos da administração de contraceptivos hormonais sobre os valores séricos de AMH são contraditórios. Ainda não foi esclarecido, como o uso de contraceptivos a curto ou longo prazos, bem como a composição e a via de administração podem afetar os folículos em desenvolvimento e a dinâmica de secreção do AMH²⁷.

Em 2008, Streuli *et al.*²⁸ estudaram os efeitos dos contraceptivos sobre os valores de AMH entre usuárias e não usuárias de contraceptivos hormonais administrados por via oral e vaginal e não encontraram qualquer diferença nos valores séricos de AMH entre os três grupos²⁸. Esses resultados foram confirmados pelos estudos de Steiner *et al.*²⁹ e Li *et al.*³⁰. Por outro lado, três estudos recentes^{27, 31, 32} revelaram redução significativa nos valores séricos de AMH em usuárias de contraceptivos hormonais independente da via de administração e do tempo de uso, sugerindo que os contraceptivos hormonais podem exercer um efeito inibitório sobre o recrutamento inicial de folículos ovarianos, porém o mecanismo hormonal ainda não foi elucidado.

Sabe-se que o tabagismo exerce efeitos adversos sobre a função reprodutiva. Estudos em animais e em humanos mostraram que as substâncias tóxicas do cigarro aceleram a depleção folicular ovariana e reduzem a idade média para a menopausa, porém há pouca evidência sobre os mecanismos exatos que envolvem o declínio prematuro da fertilidade³³.

Em 2010, Sowers *et al.*³⁴ obtiveram medidas séricas de AMH de mulheres fumantes e não fumantes com idade entre 39-45 anos durante 6 anos. Ao final do estudo, os dados revelaram que o grupo de mulheres fumantes apresentou declínio acelerado nos valores séricos de AMH, bem como idade precoce para a menopausa comparado ao grupo de não fumantes³⁴. Igualmente, Plante *et al.*³³ demonstraram redução de 44% nos valores séricos de AMH em mulheres fumantes comparadas a não fumantes³³. Por outro lado, outros estudos envolvendo grande coorte de mulheres saudáveis em idade fértil observaram valores séricos de AMH semelhantes entre fumantes e não fumantes^{32, 35, 36}. La Marca *et al.*³⁶ acreditam que o tabagismo pode reduzir o número de folículos ovarianos, porém sugeriram que este efeito pode ser menor que o esperado e, com isso, poucos estudos são capazes de encontrar significância estatística entre os grupos de fumantes e não fumantes³⁶.

A obesidade é uma condição caracterizada pelo armazenamento excessivo de triglicérides nas células adiposas. A Organização Mundial de Saúde definiu obesidade como índice de massa corpórea (IMC) acima de 30 Kg/m²³⁷. A obesidade e o sobrepeso impactam não apenas a saúde em geral, mas também a saúde reprodutiva. Diversos estudos evidenciam os efeitos adversos da obesidade sobre a fertilidade de mulheres que pretendem engravidar naturalmente³⁷. O aumento do IMC contribui para taxas reduzidas de concepção espontânea, aumento do risco de aborto, complicações na gravidez, resposta reduzida ao tratamento da fertilidade, bem como para a anovulação e

irregularidade menstrual³⁷. Nos últimos anos, vários estudos avaliaram a associação entre o IMC e os valores séricos de AMH que demonstraram resultados controversos.

Freeman *et al.*³⁸ analisaram a influência do IMC sobre os valores séricos de AMH entre mulheres obesas e não obesas seguidas por 10 anos, os resultados revelaram redução de 65% nos valores séricos de AMH em mulheres obesas comparadas a mulheres com peso normal³⁸. Trabalhos posteriores como o de Su *et al.*³⁹ confirmaram estes resultados, demonstraram 77% de redução nos valores séricos de AMH em mulheres obesas. Controversamente, três estudos independentes^{37, 40, 41} mostraram valores séricos de AMH semelhantes entre obesas e não obesas. La Marca *et al.*³⁶ sugeriram que a discrepância entre os resultados pode estar associada a relação entre o IMC e a idade. A maioria dos estudos inclui mulheres em idade pré-menopausa e como a média do IMC aumenta com a idade, enquanto os valores de AMH diminuem, a relação entre AMH e IMC pode ser influenciada pela idade³⁶. Por outro lado, Sowers *et al.*³⁴ propuseram que a relação entre obesidade e valores reduzidos de AMH poderia estar associada ao aumento da atividade da aromatase ovariana. Sabe-se que o AMH e a adiponectina inibem a atividade da aromatase e que mulheres obesas apresentam valores baixos de adiponectina. O mecanismo sugerido foi que, na presença de baixas concentrações de adiponectina, a atividade aumentada da aromatase poderia suprimir a ação do AMH e, assim, valores reduzidos de AMH seriam um mecanismo fisiológico em resposta à obesidade e não, necessariamente, indicação de prejuízo ovariano³⁴. No entanto, essa hipótese ainda não foi confirmada.

1.4 Aplicabilidade clínica dos valores séricos de AMH no sexo feminino

1.4.1 Reserva ovariana

O termo reserva ovariana refere-se ao número de folículos primordiais remanescentes, e é usado para definir a quantidade e a qualidade desses folículos em determinado tempo⁴². Sabe-se que idade, doenças oncológicas, cirurgias, entre outros, exercem um impacto negativo sobre a reserva ovariana. Estudos apontam para o valor sérico de AMH, como o melhor marcador de reserva ovariana quando comparado à idade isoladamente, e a outros marcadores como a dosagem sérica de FSH, estradiol (E2), inibina B (INB) e a contagem de folículos antrais (CFA) por ultrassom transvaginal no 3º dia da fase folicular do ciclo menstrual^{43, 44}.

A utilização do AMH como marcador de reserva ovariana apresenta uma série de vantagens em relação a outros marcadores, pois, sofre pouca influência de hormônios exógenos^{28, 29}, apresenta valores estáveis durante o ciclo menstrual^{20, 21}, tem correlação direta com o número de folículos antrais²⁶ e com a idade reprodutiva⁴⁴, além de não ser um exame invasivo.

1.4.2 Menopausa

A menopausa é definida como período menstrual final e marca o fim da vida reprodutiva feminina. Este evento ocorre, em média, aos 51 anos de idade, mas varia entre 40-60 anos⁴⁵. Independentemente da idade para a menopausa, irregularidade menstrual ocorre cerca de 4-5 anos, antes do período menstrual final, e o fim da

fertilidade verifica-se cerca de 10 anos antes da menopausa⁴⁵. A estimativa do tempo que falta para entrar na menopausa, facilitaria o aconselhamento de infertilidade relacionada à idade, bem como a prevenção de distúrbios cardiovasculares e metabólicos, osteoporose, câncer de mama, útero e intestino⁴⁶. Dessa forma, por ter forte correlação com a idade e com o número de folículos em crescimento, o AMH é um parâmetro útil na predição do tempo de transição para menopausa⁴⁵.

Em 2004, van Rooij *et al.*⁴⁵ avaliaram mudanças nos valores séricos de AMH e de outros marcadores de reserva ovariana em 81 mulheres com idade entre 25-46 anos. Durante o tempo de seguimento, 14 mulheres apresentaram valores séricos de AMH indetectáveis 4 anos antes do aparecimento da menopausa. Além disso, quando associado à idade, o valor preditivo do AMH para o tempo de transição para a menopausa foi de 92%⁴⁵. Estudos posteriores confirmaram estes resultados⁴⁶⁻⁴⁸. Broer *et al.*⁴⁹ construíram um normograma baseado nos valores séricos de AMH de 257 mulheres normo-ovulatórias seguidas por 11 anos. A análise do normograma permitiu prever a idade para a menopausa, sugerindo que mulheres, com idade entre 20-22 anos e valores séricos de AMH < 0,3 ng/mL, alcançariam a menopausa em média aos 49 anos⁴⁹.

Recentemente, Dólleman *et al.*⁵⁰ compararam o valor preditivo do AMH e da idade da menopausa natural das mães na predição do tempo de transição para a menopausa em 649 mulheres. Os autores observaram que tanto o AMH como a idade da menopausa natural das mães são valiosos na previsão do tempo de transição da menopausa das filhas, porém, os valores de AMH foram mais acurados (92%) do que a idade da menopausa natural das mães (79%)⁵⁰.

1.4.3 Quimioterapia

A terapia do câncer leva à infertilidade e falência ovariana prematura. Embora ainda sejam desconhecidos os mecanismos exatos de injúria ovariana, há considerável evidência de apoptose folicular e fibrose cortical. A extensão do prejuízo ovariano parece ser dependente da dose de agentes alquilantes e radioterapia pélvica⁵¹. Grande parte das mulheres jovens tratadas por câncer são nulíparas, e muitas desejam ter filhos nos anos posteriores ao término do tratamento. Embora a função ovariana possa se recuperar, e os ciclos menstruais serem restabelecidos após o término do tratamento, a reserva ovariana permanecerá persistentemente afetada⁵². O aconselhamento de pacientes jovens sobre as perspectivas da fertilidade é muito difícil e, frequentemente, baseado no plano de tratamento. A detecção precoce do prejuízo ovariano em pacientes com câncer facilitaria o aconselhamento sobre os riscos reprodutivos e a necessidade de estratégias de preservação da fertilidade por meio da criopreservação de oócitos, bem como a antecipação da necessidade de terapia hormonal para sintomas da menopausa e prevenção da saúde óssea. Existem poucos dados na literatura descrevendo a utilidade de medidas hormonais e ultrassonográficas da reserva ovariana em sobreviventes do câncer. Em alguns estudos, o AMH foi identificado como possível marcador de prejuízo ovariano durante o tratamento de câncer⁵¹.

Brougham *et al.*⁵³ estudaram o comportamento dos valores de AMH e outros marcadores ovarianos antes, durante e depois do tratamento de diversos tipos de cânceres, como rhabdomyosarcoma e neuroblastoma, em 22 meninas com idade entre 0-15 anos. O risco de gonadotoxicidade foi classificado como baixo/médio, de acordo com o agente quimioterápico e a quantidade administrada, e alto quando incluía radiação pélvica com envolvimento dos ovários. Os valores séricos de AMH

diminuíram rapidamente durante a quimioterapia, tornando-se indetectável em 50% das pacientes. Após o término do tratamento, no grupo de baixo e médio risco os valores de AMH recuperaram-se. No grupo de alto risco, o AMH tornou-se indetectável em todas as participantes e não demonstrou recuperação subsequente, sugerindo que o prejuízo da reserva ovariana é dependente da dose administrada⁵³. Outros autores obtiveram resultados semelhantes^{54, 55}. Um estudo recente⁵⁶ indicou que o AMH pode prever a atividade ovariana a longo prazo após a quimioterapia, mas esse trabalho com um número pequeno de casos foi discordante de estudos anteriores⁵⁷. Por ser independente de gonadotrofinas e detectável em todas as idades, o AMH pode ser clinicamente útil para avaliar o prejuízo da reserva ovariana em pacientes que se recuperam de câncer, porém estudos longitudinais são necessários para confirmar esse dado.

1.4.4 Cirurgias ginecológicas

A cistectomia ovariana laparoscópica é considerada uma intervenção eficaz no tratamento de cistos e tumores ovarianos benignos. Contudo, a segurança desse procedimento vem sendo questionada a respeito do prejuízo ovariano⁵⁸. Drogas anestésicas, procedimentos cirúrgicos da laparoscopia, uso de agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e hemorragia durante a miomectomia podem afetar o estado folicular ovariano⁵⁸. O AMH foi identificado como importante marcador de declínio da função ovariana após cirurgias ginecológicas.

Recentemente, Iwase *et al.*⁵⁸ determinaram valores séricos de AMH e FSH em 65 mulheres submetidas à cistectomia ovariana laparoscópica. A avaliação hormonal foi obtida no pré-operatório e 1 mês após o procedimento cirúrgico. No pós-operatório, os valores séricos de AMH apresentaram-se significativamente reduzidos comparados aos

valores do pré-operatório, sugerindo comprometimento da atividade ovariana. Por outro lado, nenhuma diferença foi observada entre as duas medidas de FSH⁵⁸. Outros estudos confirmam esses achados, porém, os dados ainda são inconclusivos, sendo necessários novos estudos controlados^{59, 60}.

1.4.5 Síndrome de Turner

A síndrome de Turner é encontrada em cerca de 1:2.000 nascidos vivos do sexo feminino. A forma clássica está associada com o cariótipo 45,X (50%), e as variantes mostram um mosaico de 45,X/46,XX (25%) ou apresentam anomalias estruturais do cromossomo X, como deleções (25%). O espectro clínico da ST é amplo e altamente variável, mas, baixa estatura e disgenesia gonadal são aspectos característicos^{61, 62}. A disgenesia gonadal na ST resulta em atraso ou falência do desenvolvimento puberal e infertilidade na maior parte das pacientes. Entretanto, cerca de 30% das meninas com ST têm desenvolvimento puberal espontâneo e 2% - 5% tem ciclos menstruais regulares antes do início de menopausa prematura^{61, 62}. Gravidez espontânea ocorre somente em cerca de 2% das mulheres com ST, sobretudo em idade jovem (23-24 anos) e parece estar associada ao cariótipo mosaico^{61, 62}.

Falência ovariana prematura em pacientes com ST ocorre em razão de uma acelerada perda de folículos ovarianos que pode começar tão cedo quanto 18 semanas na vida fetal. Estudos recentes relatam que os folículos podem ser viáveis mesmo em ovários de garotas de 12-13 anos com ST clássica sem desenvolvimento puberal espontâneo, apesar da qualidade desses folículos ser duvidosa^{61, 62}. Desse modo, a preservação da fertilidade em pacientes com ST pode ser factível por meio da criopreservação do tecido ovariano, antes dos folículos começarem a desaparecer.

Contudo, determinar possíveis candidatas entre meninas e jovens adolescentes com ST e o tempo certo para esta intervenção, são necessários marcadores bioquímicos de reserva ovariana na infância^{61, 62}.

Já discutimos que CFA, FSH, INB e E2 séricos no 3º dia da fase folicular do ciclo menstrual são medidos para avaliar a reserva ovariana. Mas, esses marcadores são baseados no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal de mulheres adultas. Durante a infância, FSH, INB e E2 são baixos⁶². Embora os valores de gonadotrofinas sejam mais elevados em pacientes com ST, especialmente, nos primeiros 2-5 anos de vida, há uma sobreposição significativa entre meninas com ST e meninas normais, especialmente, no meio da infância. Portanto, valores de gonadotrofinas podem não refletir a reserva ovariana antes do início da puberdade⁶². Como o declínio do AMH precede as mudanças dos marcadores tradicionais⁶³, sendo marginalmente influenciado pelas gonadotrofinas¹⁹, acredita-se que este hormônio possa ser aplicado como um bom marcador de reserva ovariana na infância. Recentemente, três estudos independentes avaliaram o potencial do AMH, como marcador de reserva ovariana em pacientes com ST.

Em 2010, Hagen *et al.*¹⁶ estudaram o potencial dos valores de AMH, como marcador de reserva ovariana em 172 pacientes com ST, com idade entre 0-60 anos e com cariótipos variados. As participantes foram categorizadas em três grupos, de acordo com a função ovariana. No grupo um, foram agrupadas aquelas com ausência de puberdade espontânea; no grupo dois, meninas que apresentavam puberdade espontânea, mas, com interrupção da função ovariana e, no grupo três, aquelas que atingiram puberdade espontânea e apresentaram função ovariana preservada durante o seguimento do estudo. No grupo de 172 pacientes com ST, os valores de AMH foram detectáveis em cerca de 20%. De acordo com o cariótipo, os valores séricos de AMH

foram detectáveis em 100% daquelas com cariótipo 45,X/46,XX; em 43%, naquelas com miscelânea de cariótipos e, em 15% das pacientes com cariótipo 45,X. Os valores de AMH correlacionaram-se positivamente com a função ovariana nos três grupos, apresentando valores de AMH sérico de: 1,9 ng/mL, 0,8 ng/mL e < 0,3 ng/mL, respectivamente. Além disso, os autores estabeleceram valor de corte de AMH de 1,1 ng/mL para rastreamento de falência ovariana com 96% e 86% de sensibilidade e especificidade, respectivamente¹⁶. Estes dados apoiam os resultados anteriores de Borgström *et al.*⁶⁴ que avaliaram o tecido ovariano de 57 meninas com ST, com idade entre 8-19 anos. Os autores observaram valores de AMH mensuráveis em cerca de 20% das pacientes. O valor preditivo positivo do AMH para a determinação da presença de folículos ovarianos nos materiais estudados foi 0,64 ($p = 0,0003$)⁶⁴.

Visser *et al.*⁶² avaliaram os valores séricos de AMH em 270 pacientes com ST, com idade entre 0-20 anos. O AMH foi mensurável em 22% das pacientes. De acordo com o cariótipo, o AMH foi detectável em 77% das ST cariótipo 45,X/46,XX, em 25% naquelas com miscelânea de cariótipos e, em 10%, das ST cariótipo 45,X. Interessantemente, ST cariótipo 45,X/46,XX apresentou probabilidade 37 vezes maiores do que a ST 45,X para apresentar AMH mensurável. Os valores de AMH correlacionaram-se com o aparecimento de puberdade espontânea. O desenvolvimento espontâneo das mamas foi observado em 91% das ST com AMH detectável e em 37% daquelas com AMH indetectável. Menarca espontânea foi observada em 58% das pacientes com AMH detectável e somente em 3% daquelas com AMH indetectável. Além disso, 16% das pacientes com ST sem terapia com GH apresentaram AMH detectável, em contraste, com a terapia de GH o percentual de pacientes com AMH detectável foi de 30%. A probabilidade de AMH mensurável foi quatro vezes maior para ST com terapia de GH quando comparada com ST sem terapia de GH, sugerindo

efeito positivo do GH sobre a função ovariana⁶². Estes três trabalhos juntos sugerem fortemente que o AMH é um marcador promissor de função ovariana não apenas em mulheres adultas, mas também em pacientes pediátricas com ST.

1.4.6 Síndrome do ovário policístico

A síndrome do ovário policístico (SOP) é uma condição prevalente e afeta cerca de 10% das mulheres em idade fértil⁶⁵. Além de oligoanovulação crônica, a principal característica da SOP inclui hiperandrogenemia e/ou hiperandrogenismo, morfologia ovariana policística avaliada por ultrassonografia transvaginal, secreção de gonadotrofinas alteradas e resistência à insulina, frequentemente, associada à obesidade. Mulheres afetadas pela SOP também apresentam risco aumentado a diabetes tipo 2, síndrome metabólica, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares⁶⁶.

Sabe-se que, na SOP, há um desenvolvimento aumentado de folículos antrais⁶⁷. O exame histológico de ovários policísticos exhibe um número normal de folículos primordiais; no entanto, o número de folículos em desenvolvimento é dobrado comparado a ovários normais⁶⁷. Curiosamente, na SOP a circulação de AMH pode apresentar-se até 75 vezes mais elevada em células da granulosa de ovários policísticos anovulatórios, e até duas vezes mais elevada em células da granulosa de ovários policísticos ovulatórios, quando comparados a controles saudáveis⁶⁸. Anteriormente, acreditava-se que os valores elevados de AMH na SOP estavam associados unicamente ao acúmulo de folículos, porém estudos recentes revelaram secreção anormal de AMH pelas células da granulosa⁶⁹.

Dentre muitas hipóteses, os principais eventos envolvidos na fisiopatologia da SOP são o excesso de folículos em crescimento desencadeado pelo hiperandrogenismo

intraovariano e o arraste folicular promovido por disfunção quantitativa ou qualitativa do FSH⁷⁰. Atualmente, os efeitos inibitórios do AMH sobre o FSH foram acrescentados à lista de hipóteses. Jonard *et al.*⁷⁰ sugeriram que valores elevados de AMH podem exercer efeito inibitório potencializado sobre o FSH e, conseqüentemente, sobre a atividade da aromatase ovariana induzida pelo FSH para subsequente secreção de E2 e inibinas⁷⁰.

De fato, Pellatt *et al.*⁷¹ observaram expressão diminuída do RNAm da aromatase e dos receptores de FSH em células da granulosa de ovários normais cultivadas em altas concentrações de AMH⁷¹. Por outro lado, o trabalho de Li *et al.*⁷² revelou expressão significativamente aumentada do promotor do gene do AMH, bem como de seu receptor em células da granulosa de ovários policísticos quando cultivadas na ausência de FSH. Este estudo sugere que na SOP o aumento da atividade do promotor seja a causa da superprodução de AMH e que, em concentrações basais normais, o FSH seja incapaz de inibir esta superprodução e promover a progressão da foliculogênese⁷². Os fatores que levam ao aumento da atividade do promotor do AMH ainda são desconhecidos, mas podem estar associados a fatores genéticos ou específicos, tais como: hiperandrogenismo, valores elevados de LH e resistência insulínica⁷².

Atualmente, três consensos estão disponíveis para o diagnóstico da SOP. Assim, os critérios do *National Institutes of Health* (NIH) de 1990 são restritos e incluem somente anovulação e hiperandrogenismo⁷³, os critérios do consenso de Rotterdam de 2003 (*European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society of Reproductive Medicine*) são mais amplos e incluem a morfologia ovariana policística como um critério⁷⁴. Recentemente, a *Androgen Excess and PCOS Society* (*AE-PCOS Society*) propôs que o hiperandrogenismo deve ser obrigatório⁷⁵.

Estudos sugerem que os valores séricos de AMH podem ser aplicados ao diagnóstico da SOP em substituição à ultrassonografia^{5, 6}, visto que esses valores correlacionam-se positivamente com a CFA^{43,44} e também com os valores séricos de LH e testosterona^{63, 66}. Nos últimos anos, foram propostos diversos valores de corte para o AMH com critérios clínicos e laboratoriais para o diagnóstico da SOP. A **Tabela 2** resume os dados de quatro trabalhos que estabeleceram valores de corte de AMH para o diagnóstico da SOP^{66, 76-78}.

Tabela 2 - Valores de corte de AMH para o diagnóstico da SOP

Autor	Ano	n	Cut-off	Sensibilidade	Especificidade	ELISA
Pigny <i>et al.</i>	2006	169	8,4 ng/mL	67%	92%	Immunotech
Rosenfeld <i>et al.</i>	2012	102	6,2 ng/mL	81%	95%	Gen II
Houmburg <i>et al.</i>	2013	215	6,7 ng/mL	60%	98%	DSL Gen II
Lauritsen <i>et al.</i>	2014	447	2,5 ng/mL	92%	98%	Immunotech

ELISA: ensaio imunoenzimático; Immunotech: Beckman Coulter; DSL: Diagnostic System Laboratories; Gen II: Beckman Coulter-Diagnostic System Laboratories.

1.4.7 Reprodução humana assistida

A infertilidade é uma condição que afeta homens e mulheres, e uma vez confirmada é comum a procura por recursos da reprodução humana assistida (RHA) e fertilização “*in vitro*” (FIV). Em geral, o tratamento da RHA inicia-se com a administração de gonadotrofinas como parte da estimulação ovariana controlada (EOC)⁷⁹. Os valores séricos de AMH declinam gradualmente durante a administração

de gonadotrofinas, sobretudo em razão dos efeitos negativos, diretos ou indiretos, do FSH sobre a secreção ovariana^{79, 80}. A EOC com FSH induz o crescimento de folículos que perdem a expressão de AMH, e esta é, provavelmente, a principal causa da redução do AMH durante a EOC. Dessa forma, pela redução do AMH durante a administração de FSH, a medida de AMH para prever a resposta ovariana a esse hormônio deve ser realizada alguns meses ou dias antes do início do tratamento⁷⁹. É aceito que o AMH é um marcador essencial para prever a resposta ovariana quantitativa e qualitativa à estimulação com gonadotrofinas em razão da forte correlação com o número de oócitos em mulheres submetidas à EOC⁷⁹.

Cerca de 2% - 3% das mulheres submetidas à EOC obtêm resposta insatisfatória. A determinação de AMH é importante para prever o risco de resposta insatisfatória ou ausência de resposta^{79, 81}. Em 2008, Jayaprakasan *et al.*⁸² estudaram prospectivamente 135 mulheres submetidas à FIV e observaram que valores séricos de AMH < 0,9 ng/mL estavam associados a uma resposta insatisfatória ou cancelamento da FIV com 100% de sensibilidade e 73% de especificidade⁸². A obtenção de informações precoces da resposta à EOC é importante para evitar o tratamento naquelas mulheres que não responderiam normalmente à estimulação, reduzindo, assim, o cancelamento de ciclos, custos e desgaste psicológico do casal⁷⁹.

Em contraste, a resposta ovariana excessiva ao FSH, conhecida como síndrome da hiper estimulação ovariana (SHEO), leva a uma condição grave que pode ameaçar a vida da mulher^{79, 81}. A forma moderada da SHEO ocorre em 15% - 20% dos ciclos de estimulação ovariana, a forma severa da síndrome é relatada entre 1% - 3%^{79, 81}. Os fatores de risco para o desenvolvimento da SHEO incluem idade jovem, sinais de síndrome do ovário policístico, história anterior de SHEO e estradiol alto. O AMH pode prever o risco de desenvolver essa síndrome^{79, 81}. Nardo *et al.*⁸³ demonstraram que

valores séricos de AMH $> 3,5$ ng/mL, antes do início da EOC indicam risco aumentado de hiper resposta ovariana com 88% e 70% de sensibilidade e especificidade, respectivamente⁸³.

Em 2013, Hussain *et al.*⁸⁴ compararam os valores de AMH e FSH na predição dos resultados da FIV. Mulheres com valores de AMH e FSH normais mostraram maiores taxas de sucesso comparadas a mulheres com ambos os hormônios ou, um ou outro, fora da normalidade. No grupo de pacientes com AMH baixo, os resultados negativos foram mais frequentes do que nos grupos com FSH normal ou alto, sugerindo que o AMH é mais eficaz na predição dos resultados da FIV⁸⁴.

1.4.8 Tumor de células da granulosa

A expressão do AMH é limitada pelas células da granulosa, por isso o uso do desse hormônio como marcador de tumor das células da granulosa vem sendo proposto. De fato, os valores séricos de AMH apresentam-se aumentados em 76% - 93% das pacientes, variando de 2-1.124 ng/mL⁸⁵.

Parece que o AMH é superior à inibina A e ao E2 no seguimento de pacientes com tumor de células da granulosa, uma vez que a produção de E2 nesse tipo de tumor é amplamente variável, e a inibina A pode apresentar-se elevada em diferentes tipos de câncer⁸⁵. Além disso, o AMH é sensível e específico no acompanhamento de pacientes submetidas à ooforectomia, permitindo detecção precoce da reincidência, o que é de grande importância em uma condição caracterizada pela alta incidência de recorrência mesmo após 10-20 anos da ressecção do tumor primário⁸⁵.

1.5 Valores normativos de AMH no sexo feminino

Considerando a extensa aplicabilidade clínica do AMH no sexo feminino, estabelecer valores normativos de AMH em todas as faixas etárias é fundamental. Poucos estudos apresentam valores normativos de AMH em uma grande coorte de mulheres saudáveis em todas as faixas etárias e com ciclos menstruais regulares. Anteriormente, a maioria dos estudos incluía um pequeno número de indivíduos com intervalo limitado de idade, além da inclusão de sujeitos com doenças somáticas e utilização de imunoenaios com baixa sensibilidade^{86, 87}. A **Tabela 3** resume os dados de três estudos¹⁶⁻¹⁸ mostrando valores normativos de AMH em mulheres saudáveis.

Tabela 3 - Valores normativos de AMH no sexo feminino

Autor	Ano	n	Idade	ELISA	Valores de AMH
Hagen <i>et al.</i>	2010	926	0-69 anos	Immunotech	Percentil 2,5-97,5 / ng/mL Sangue do cordão: 0,28-2,2 Até 3 meses: 0,6-4,1 Até 12 meses: 0,4-2,6 4 a 8 anos: 0,3-5,5 8 a 25 anos: 0,6-8,4 25 a 69 anos: redução para valores <0,28 aos 46 anos.
La Marca <i>et al.</i>	2011	277	18-50 anos	Immunotech	Mediana (Percentil 25-75) ng/mL <30 anos: 4,1 (2,5-6,3) 31 a 35 anos: 3,5 (1,8-6,1) 36 a 40 anos: 3,0 (1,7-5,3) 41 a 45 anos: 1,4 (0,8-3,5) 46 a 50 anos: 1,1 (0,7 - 2,8)
Lie Fong <i>et al.</i>	2012	804	0-47 anos	Gen II	Mediana (mínimo-máximo) ng/mL 0 a 47 anos: 3,3 (0-18,3)

ELISA: ensaio imunoenzimático; Immunotech: Beckman Coulter;

Gen II: Beckman Coulter-Diagnostic System Laboratories

1.6 O papel do AMH na fisiologia do sexo masculino

Nos homens, as células de Sertoli desempenham papel fundamental na diferenciação sexual do feto e nos processos da espermatogênese, contribuindo para a expressão de um fenótipo masculino normal⁸⁸.

O AMH é secretado pelas células de Sertoli em altas concentrações, desde a 8ª semana de gestação até a puberdade, quando o aumento da produção de andrógenos pelas células de Leydig inibe a secreção de AMH e seus níveis decrescem lentamente até atingirem valores residuais na vida adulta^{1, 89}. Durante os 6 primeiros meses de vida pós-natal, ocorre a minipuberdade, na qual os valores séricos de LH, FSH, testosterona e AMH estão elevados sem manifestações clínicas de puberdade. Nesta fase, os valores de testosterona e AMH concomitantemente elevados decorrem da falta de expressão de receptores de testosterona nas células de Sertoli (**Figura 2**)^{1, 89}.

O papel fisiológico e o significado clínico da secreção pós-puberal de AMH no homem adulto, ainda é incerto, mas parece estar limitado ao controle da função testicular⁹⁰. Estudos sugerem que, neste período, o AMH exerça efeito inibitório, tanto sobre a atividade da aromatase nas células de Sertoli como na produção da testosterona pelas células de Leydig^{1, 79}. De fato, um estudo revelou baixas concentrações de testosterona e hipoplasia das células de Leydig em camundongos que secretavam AMH excessivamente⁹¹. Além disso, Behringer *et al.*⁹² observaram hiperplasia das células de Leydig em camundongos *knockout* para o gene do receptor tipo II de AMH⁹².

O AMH pode ser detectado tanto no soro como no fluido seminal, porém neste último são observadas concentrações de AMH significativamente mais altas⁷⁹.

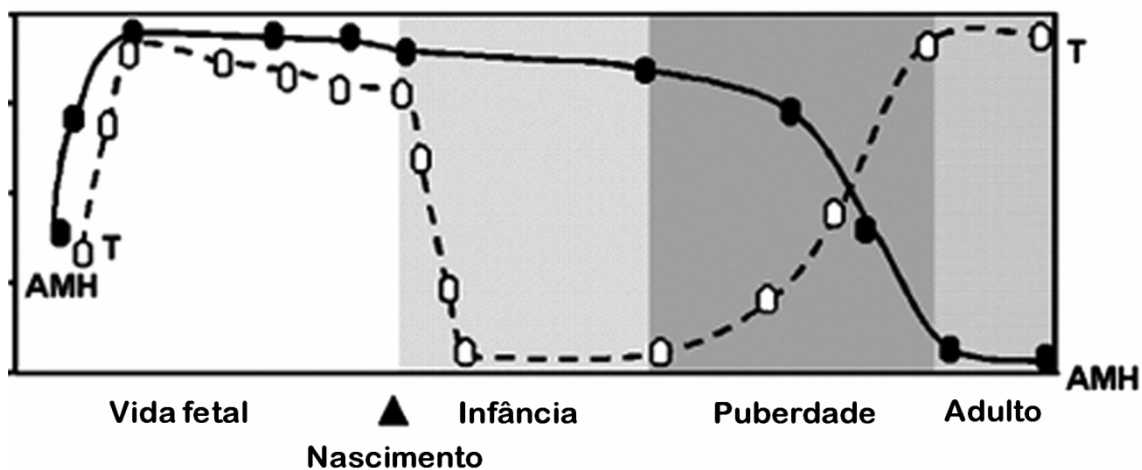


Figura 2 - Representação esquemática do perfil dos valores séricos de AMH e testosterona no sexo masculino. Adaptada de Rey *et al.*¹

Estudos comparando os valores séricos e seminais de AMH em homens adultos sugerem que, após a puberdade, o AMH seja secretado das células de Sertoli para o lúmen dos túbulos seminíferos resultando em altas concentrações no fluído seminal⁷⁹. Valores de AMH seminal correlacionam-se com a concentração espermática e são mais altos em homens saudáveis e oligozoospermicos do que em homens azoospermicos⁹³.

Como o AMH é produzido em altas concentrações antes da puberdade, sua medida é um marcador confiável da presença de tecido testicular na infância quando os valores séricos de testosterona são muito baixos⁹⁴. Por outro lado, na vida adulta a medida de AMH tanto no soro como no fluído seminal pode ser útil na obtenção de dados sobre a espermatogênese, particularmente, em homens inférteis⁷⁹.

1.7 Aplicabilidade clínica do AMH no sexo masculino

1.7.1 Distúrbios do desenvolvimento sexual

A avaliação da etiologia dos distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) deve ser realizada precocemente, durante o período pré-natal. A investigação dos DDS deve ser conduzida por um grupo multidisciplinar incluindo endocrinologista pediátrico, psicólogo, neonatologista, urologista, obstetra, geneticista e biólogos “*expert*” em dosagens hormonais e biologia molecular. A triagem endócrina é fundamental para esclarecimento diagnóstico, porém, história adequada e exame físico detalhado conduzem ao diagnóstico correto⁹⁵.

A determinação da 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) basal para o diagnóstico de hiperplasia adrenal congênita é o passo inicial na investigação dos DDS sem gônadas palpáveis, e a determinação da concentração sérica de AMH, em substituição ao teste clássico de estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG), vem sendo a etapa inicial proposta por alguns autores na investigação dos DDS 46,XY sem gônadas palpáveis⁹⁵.

No sexo masculino, o AMH aumenta durante as 2 primeiras semanas de vida. Se em recém-nascidos com genitália ambígua os valores de AMH são inferiores a 39,2 ng/mL na primeira semana de vida e permanecem baixos em uma segunda determinação realizada na minipuberdade entre 15-90 dias após o nascimento, uma situação de digenesia gonadal, DDS ovotesticular ou 46,XX testicular deve ser considerada⁹⁵.

1.7.2 Síndrome da persistência dos derivados Müllerianos

O diagnóstico da síndrome da persistência dos derivados Müllerianos (SPDM) pode ser considerado em indivíduos 46,XY com fenótipo masculino normal, mas, com criptorquidismo bilateral, hérnia inguinal e resíduos de derivados Müllerianos¹. Duas variantes da SPDM podem ser caracterizadas: indivíduos com níveis elevados de AMH e indivíduos com níveis indetectáveis de AMH. A primeira está relacionada à presença de mutações inativadoras no gene do receptor do AMH, e a segunda é decorrente de mutações no próprio gene do AMH, resultando em baixa produção e secreção desse hormônio¹. A determinação do AMH seleciona o estudo molecular do gene responsável pela síndrome, uma vez que os níveis são baixos quando há mutação do gene codificador do AMH e elevados quando a mutação é no AMHRII¹.

1.7.3 Criptorquidismo

O criptorquidismo é um sinal clínico com várias etiologias possíveis. Pode resultar de defeitos anatômicos da região abdominal e inguinal, hipogonadismo hipogonagotrófico ou mutações raras do hormônio *insulin-like fator 3* (INSL3) ou de seu receptor⁸⁹. De acordo com sua etiologia, o criptorquidismo pode estar associado ao funcionamento normal ou anormal das células de Sertoli. No criptorquidismo bilateral, o AMH é baixo em 75% dos pacientes com gônadas não palpáveis e 35% naqueles com gônadas inguinais, indicando função prejudicada das células de Sertoli⁸⁹.

1.7.4 Micropênis

O crescimento e a diferenciação do pênis ocorrem entre os 1º - 2º trimestre de vida fetal mediados pela testosterona e pela di-hidrotestosterona¹. Micropênis é definido como um pênis anatomicamente normal cujo comprimento em estiramento está mais do que 2,5 desvios-padrão abaixo do comprimento médio normal do pênis estirado de meninos normais da mesma idade⁸⁹. Criptorquidismo e micropênis podem ocorrer simultaneamente. A etiologia pode estar relacionada ao hipogonadismo hipogonadotrófico, defeitos no receptor de LH, distúrbios sindrômicos como a síndrome de Prader Willi, síndrome de Klinefelter e insensibilidade parcial aos andrógenos⁸⁹. Na presença de micropênis, a determinação de AMH pode auxiliar na identificação de sua etiologia, se de origem testicular, na qual o AMH sérico é baixo ou se relacionado a outras causas⁸⁹.

1.7.5 Diagnóstico diferencial entre retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento puberal e hipogonadismo hipogonadotrófico isolado

A puberdade é um processo crítico do desenvolvimento humano que resulta na maturação sexual e aquisição da função reprodutiva. O termo retardo constitucional do crescimento é aplicado quando ocorre ausência de sinais de puberdade após os 13 anos nas meninas, e após os 14 anos nos meninos⁹⁶. Estabelecer o diagnóstico diferencial entre retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento (RCCD) e hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) é um grande desafio na prática clínica⁹⁶. Em indivíduos com RCCD, o endocrinologista pediátrico deve diferenciar aqueles

que apresentam apenas um retardo constitucional daqueles com deficiência de produção e secreção das gonadotrofinas^{96, 97}. Até o momento, nenhuma avaliação laboratorial discrimina com segurança estas duas condições, e o seguimento clínico desses pacientes até a vida adulta é necessário para estabelecer o diagnóstico definitivo^{96, 97}. A dosagem sérica de AMH representa uma promissora abordagem para este diagnóstico diferencial. Em pacientes com RCCD, esperam-se valores normais de AMH, e naqueles com HHI valores baixos de AMH indicariam comprometimento da função testicular^{96, 97}.

Em 2010, Coutant *et al.*⁹⁶ avaliaram a utilidade do AMH e da INB para discriminar HHI de RCCD. Interessantemente, os autores observaram que um *cut-off* de INB de 35 pg/mL discriminou HHI de RCCD com 100% de sensibilidade e especificidade. Em contraste, o desempenho do AMH apresentou-se menor que 80%, demonstrando que a INB é melhor que AMH no diagnóstico diferencial entre HHI e RCCD⁹⁶.

1.7.6 Infertilidade masculina

Alguns investigadores sugerem que o AMH pode ser um bom marcador de infertilidade masculina⁹⁰, visto que é secretado exclusivamente pelas células de Sertoli dos testículos¹ e tem correlação com a espermatogênese⁸⁸, além de ser detectável tanto no soro como no fluido seminal⁴, mas os dados obtidos até o momento não são tão promissores.

Em 2005, Al-Qahtani *et al.*⁴ observaram redução significativa nos valores séricos de AMH em homens oligozoospermicos comparados a indivíduos controles⁴. No entanto, este resultado não foi confirmado por um estudo subsequente do mesmo grupo⁹⁸. Igualmente, Tüttelmann *et al.*⁹⁹ estudaram 199 homens, sendo 31

azoospermicos, 60 oligozoospermicos e 108 controles e não encontraram diferença estatisticamente significativa nos valores séricos de AMH entre os três grupos⁹⁹. Estes achados sugerem que a determinação sérica de AMH não tem significado diagnóstico em homens com espermatogênese prejudicada.

Um estudo recente¹⁰⁰ revelou que os valores de AMH estão significativamente reduzidos em homens com azoospermia obstrutiva e azoospermia não obstrutiva quando comparados a homens férteis normais, mas a grande sobreposição entre os valores de AMH de indivíduos controles e homens inférteis impede que este hormônio seja um marcador diagnóstico útil¹⁰⁰.

Outros pesquisadores^{101, 102} investigaram se os valores de AMH, tanto séricos como seminais podem ser preditivos da presença de sêmen nos testículos de pacientes com azoospermia não obstrutiva. Foi claramente demonstrado que ambas as determinações não são úteis em predizer a presença de sêmen na aspiração por agulha fina¹⁰² e extração de esperma testicular¹⁰¹.

La Marca *et al.*⁷⁹ sugeriram que, assim como outros marcadores de função testicular (FSH e INB), variações nos valores séricos de AMH podem ocorrer por razões não relacionadas à espermatogênese, e considerando que o papel fisiológico do AMH no homem adulto não foi completamente elucidado, somente estudos futuros poderão esclarecer o significado clínico do AMH na fase adulta⁷⁹.

1.8 Valores normativos de AMH no sexo masculino

Tendo em vista a potencial aplicabilidade clínica do AMH no sexo masculino, é fundamental estabelecer valores de normalidade. Na literatura, raros estudos apresentam valores normativos de AMH em homens saudáveis em todas as faixas etárias, sobretudo em homens adultos. A **Tabela 4** resume os dados de dois estudos^{88, 103} mostrando valores normativos de AMH em homens saudáveis.

Tabela 4 - Valores normativos de AMH no sexo masculino

Autor	Ano	n	Idade	ELISA	Valores de AMH
Aksglaede <i>et al.</i>	2010	1027	0-69 anos	Immunotech	Mediana (Percentil 5-95) ng/mL Sangue do cordão: 21 (7,4-48) Até 5 meses: 147 (105-270,3) Até 12 meses: 151,5 (55,3-196) 4 a 6 anos: 106 (55,3-187) G1a: 98 (45-170,5) G1b: 82 (42-156) G2: 35,4 (6,4-157) G3: 9,2 (3,1-103) G4: 6 (2,1-16) G5: 7 (3,2-18) 21 a 69 anos: 6 (1,8-14)
Grinspon <i>et al.</i>	2011	421	0-52 anos	Immunotech	Mediana (Percentil 3-97) ng/mL 0 a 14 dias: 9 (35,4-145,3) 15 dias a 5 meses: 98 (59-206) 5 meses a 2 anos: 158,5 (96-326,2) 2 a 9 anos: 96 (33-256,4) 9-18 anos: 100 (36-192) G2: 41,3 (10-142,4) G3: 10 (4,2-59,2) G4: 9,1 (4,6-23) G5: 11,5 (5,3-27,3) >18 anos: 7,8 (3,5-19,2)

ELISA: ensaio imunoenzimático; Immunotech: Beckman Coulter; G1-G5: estágio genital de acordo com Tanner; G1a: pré-púbere menor que 9 anos; G1b: pré-púbere maior que 9 anos.

1.9 Imunoensaios para determinação sérica de AMH

A necessidade de ensaios sensíveis e específicos para a quantificação do AMH levou ao desenvolvimento de vários modelos de ensaios imunoenzimáticos (ELISA)¹⁰⁴. O primeiro relato de ELISA para AMH desenvolvido por Hudson *et al.*¹⁰⁵ usava um par de anticorpos monoclonais contra AMH humano recombinante, ambos dirigidos contra epítomos da pró-região. Contudo, o uso deste ensaio por Lee *et al.*⁸⁶ demonstrou resultados com alta variabilidade intra e interensaios nas dosagens de AMH decorrentes da instabilidade do material biológico, problemas de coleta, armazenamento e degelo das amostras⁸⁶.

Nos últimos anos, dois imunoensaios comercialmente disponíveis para determinação de AMH foram introduzidos pela Diagnostic Systems Laboratories Ltd (DSL) e pela Immunotech Ltd (IOT), que usavam anticorpos e curvas de calibração diferentes¹⁰⁶. Embora a maioria dos estudos observasse boa correlação entre os dois *kits*^{107, 108}, outros, entretanto, relataram medidas de AMH 30% mais elevadas obtidas pelo ensaio IOT quando comparadas àquelas obtidas pelo ensaio DSL¹⁰⁹.

Recentemente, a consolidação destas duas companhias pela Beckman Coulter disponibilizou o novo ensaio AMH segunda geração (Gen II), que substituiu os dois ensaios anteriores¹⁰⁶. O AMH Gen II utiliza os anticorpos do ensaio DSL, dirigidos contra epítomos da região carboxiterminal da molécula do AMH, e a curva-padrão do ensaio IOT. Valores de AMH obtidos pelo *kit* AMH Gen II deveriam correlacionar-se com os ensaios anteriores, mas serem mais elevados do que aqueles medidos pelo ensaio DSL¹⁰⁶. Estudos recentes avaliaram a correlação entre os três *kits*.

Em 2010, Kumar *et al.*¹⁰⁴ observaram forte correlação ($r = 0,9$, $p < 0,001$) entre o ensaio Gen II e o IOT¹⁰⁴. Por outro lado, apesar de encontrar forte correlação entre os

três kits, Li *et al.*¹¹⁰ relataram valores de AMH obtidos pelo Gen II 35% mais elevados do que aqueles obtidos pelo IOT, a despeito de ambos os ensaios utilizarem a mesma curva padrão¹¹⁰.

Dois trabalhos recentes avaliaram a correlação entre o ensaio Gen II e o DSL. Wallace *et al.*¹¹¹ encontraram valores de AMH obtidos pelo ensaio Gen II 40% mais altos que os valores obtidos pelo ensaio DSL, Rustamov *et al.*¹¹² observaram redução de 20% - 40% nos valores obtidos pelo Gen II comparados ao DSL¹¹².

Dada à extensa utilidade da determinação dos valores de AMH, tanto no sexo feminino como no masculino, a obtenção de imunoenaios mundialmente padronizados e bem validados é fundamental para a aquisição de resultados homogêneos, confiáveis e reprodutíveis.

1.10 Validação de método

Um sistema analítico ideal seria aquele com elevado grau de exatidão, precisão, com limite de detecção em zero, sem qualquer interferente e que apresentasse 100% de sensibilidade e especificidade. Um sistema com essas características ainda não foi disponibilizado para as rotinas diagnósticas. Como o laboratório ideal ainda está longe da realidade, é preciso que as limitações dos testes sejam conhecidas, assim como seus parâmetros de desempenho analítico e clínico para prestar serviços laboratoriais de qualidade¹¹³.

A validação de um método consiste na realização de uma série de experimentos, com a finalidade de documentar seu desempenho. Além de ser realizada antes da introdução do método na rotina diagnóstica, requer conhecimentos e habilidades para

um bom desempenho técnico e utilização de equipamentos e materiais disponíveis no laboratório, bem como o uso de ferramentas estatísticas que permitam definir a conduta em relação aos resultados. A análise de desempenho obtida em uma validação permite dimensionar os erros presentes para determinar com segurança se estes afetam ou não os resultados¹¹³.

Habitualmente, o fabricante do produto informa suas características de desempenho, validação estatística e uso clínico. Apesar da confiabilidade nas informações do fabricante, isto não é suficiente para a implantação na rotina laboratorial. Para isto, é necessário um processo de verificação e validação em cada laboratório¹¹³.

Nos Estado Unidos da América, os requisitos do *Clinical Laboratory Improvement (CLIA)* para aprovação de métodos pelo *Food and Drugs Administration (FDA)* solicitam demonstração documentada de que o laboratório atinge especificações de desempenho comparáveis às estabelecidas pelo fabricante, considerando que as condições na indústria diagnóstica podem ser diferentes daquelas observadas na prática laboratorial, gerando resultados díspares dos observados¹¹³.

No Brasil, o Comitê Brasileiro de Análises Clínicas e Diagnóstico “*in vitro*” estabeleceu normas técnicas referentes à recepção, transporte e armazenamento de produtos, bem como a validação de reagentes e sistemas diagnósticos. Em 2005, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a RDC 302 que regulamenta o funcionamento de laboratórios clínicos e cita a necessidade de validação¹¹³.

Diversos parâmetros podem ser estudados durante a validação de método dentre os quais destacamos: a sensibilidade analítica e funcional, precisão intra e interensaios, linearidade, paralelismo, estabilidade, comparação entre métodos e limite de

normalidade¹¹³. Os dados da **Tabela 5** resumem os conceitos e as definições dos parâmetros avaliados na validação de métodos^{104, 113}.

Tabela 5 - Definição dos parâmetros avaliados na validação de métodos

Parâmetros	Definição
Sensibilidade analítica	É a menor concentração de um analito que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado.
Sensibilidade funcional	É a menor concentração de um analito que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão.
Precisão	É a concordância entre os resultados de medidas independentes obtidos sob condições estipuladas. Estuda o erro aleatório, baseado no desvio-padrão de medidas repetidas.
Precisão intraensaio	Corresponde à concordância entre resultados de sucessivas medidas do mesmo analito obtidas no mesmo ensaio.
Precisão interensaio	Corresponde à concordância entre resultados de sucessivas medidas do mesmo analito obtidas em ensaios diferentes.
Linearidade	É a capacidade de um método gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito dentro de uma faixa analítica especificada.
Paralelismo	É a capacidade de um método medir um analito corretamente quando uma amostra é submetida a múltiplas diluições.
Estabilidade	Verifica se as condições de armazenamento e degelo das amostras afetam as concentrações do analito em um determinado período de tempo.
Comparação entre métodos	Permite conhecer as semelhanças e diferenças entre o método atual e o método candidato.
Limite de normalidade	Estuda os limites clínicos do analito.

Diante de tudo o que foi exposto, e considerando que os valores séricos de AMH estão relacionados, tanto à função reprodutiva feminina como ao desenvolvimento sexual e espermatogênese no homem, percebemos a necessidade de validar um imunoensaio reprodutível e estabelecer valores normativos de AMH em uma população feminina e masculina brasileira. Uma vez estabelecidos tais valores, a aplicabilidade clínica desse hormônio nas diferentes situações patológicas poderá ser utilizada de forma confiável.

2 Objetivos

1. Validar o imunoensaio AMH Gen II (*Beckman Coulter Company, TX, USA*) para determinação sérica do AMH;
2. Estabelecer valores normativos de AMH em homens e mulheres saudáveis;
3. Verificar a influência do uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e IMC sobre os valores de AMH em ambos os sexos; e
4. Verificar os valores séricos de AMH em mulheres com síndrome de Turner e síndrome do ovário policístico e em meninos com criptorquidismo submetidos ao teste de estímulo com rhCG.

3 Métodos

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) (aprovação nº 0666/11) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi concedido aos voluntários, pacientes ou responsáveis.

3.2 Casuística

Profissionais da saúde do HCFMUSP foram convidados a participar do estudo. Duzentos e sessenta e oito voluntários saudáveis de 18-50 anos foram selecionados, sendo: 133 do sexo feminino e 135 do masculino. Todos responderam a um questionário contendo dados pessoais, peso, altura, história médica, tabagismo, bem como história reprodutiva e uso de contraceptivos hormonais no sexo feminino **(Apêndice A)**.

No sexo feminino, foi realizada coleta de sangue entre os 2º e 7º dias da fase folicular do ciclo menstrual, para avaliar os níveis séricos de AMH. Usuárias de contraceptivos hormonais foram orientadas a realizar a coleta de sangue na presença de fluxo menstrual. Além de coleta para dosagem de AMH, foi realizada uma coleta concomitante para dosagem de LH, FSH, estradiol (E2) e inibina B (INB). Por outro

lado, no sexo masculino, foi realizada a coleta de sangue para dosagem de AMH, bem como para dosagem de LH, FSH, testosterona total (TESTO) e INB.

Mulheres que apresentaram doenças crônicas, irregularidade menstrual, referência a ovário policístico, infertilidade, histerectomia, ooforectomia, além de valores séricos de LH e/ou FSH fora da normalidade foram excluídas da análise; homens que apresentaram doenças crônicas, referência à infertilidade e orquiectomia, além de valores séricos de LH, FSH e/ou TESTO fora dos limites da normalidade também foram excluídos.

Do total de mulheres incluídas na pesquisa (n = 133), 100 foram estudadas. As causas de exclusão das mulheres no estudo foram: irregularidade menstrual (n = 1), infertilidade (n = 2), história de ovário policístico (n = 11) e valores séricos de LH e/ou FSH fora da normalidade (n = 19). Em contraste, do total de homens incluídos no estudo (n = 135), 104 foram estudados. As causas de exclusão dos homens no estudo foram valores alterados de LH, FSH e/ou TESTO (n = 31). Os dados clínicos e laboratoriais de cada indivíduo incluso do grupo controle deste estudo encontram-se disponíveis no **Apêndice B e C**.

Para avaliar a aplicabilidade clínica dos valores séricos de AMH no sexo feminino, 66 pacientes com ST e 29 SOP foram estudadas. Todas as pacientes foram diagnosticadas no Serviço de Endocrinologia do Desenvolvimento do HCFMUSP.

O diagnóstico de ST foi estabelecido mediante análise de cariótipo de sangue periférico com banda G, incluindo a contagem de, pelo menos, 30 metáfases, em conjunto com a avaliação clínica e laboratorial. Pacientes submetidas à gonadectomia foram excluídas. Os achados clínicos e hormonais de cada paciente com ST estão apresentados no **Apêndice D**.

Todas as mulheres diagnosticadas com SOP foram avaliadas, de acordo com os critérios de três consensos: Consenso do NIH⁷³, que inclui a presença de disfunção menstrual e hiperandrogenemia ou hiperandrogenismo; Consenso de Rotterdam⁷⁴ que abrange a presença de dois de três critérios, disfunção menstrual, hiperandrogenemia ou hiperandrogenismo e ovário policístico e, finalmente, o consenso da AES⁷⁵ que contempla a presença de disfunção menstrual e/ou ovário policístico e hiperandrogenemia e/ou hiperandrogenismo. Disfunção menstrual (oligoamenorreia) foi definida como ciclo menstrual > 35 dias ou < 10 ciclos por ano. Morfologia ovariana policística foi definida como contagem de ≥ 12 folículos de 2-9 mm de diâmetro ou volume ovariano $> 10 \text{ cm}^3$ em, pelo menos, um ovário¹¹⁴. Hirsutismo foi definido como escore de Ferriman e Gallwey ≥ 8 ¹¹⁵ e hiperandrogenemia, valores de TESTO, testosterona livre (TESL), de-hidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) e androstenediona (D4) aumentados¹¹⁶. Valores séricos de LH, FSH, E2, progesterona (PROG), globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), prolactina (PRL) e 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) também foram avaliados. Os dados clínicos e laboratoriais de cada paciente com SOP estão demonstrados no **Apêndice E**.

Para avaliar a aplicabilidade clínica dos valores séricos de AMH no sexo masculino, 31 pacientes com criptorquidismo unilateral ou bilateral foram estudados. Todos os pacientes foram diagnosticados no Serviço de Endocrinologia Pediátrica da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi concedido a todos os responsáveis. O diagnóstico de criptorquidismo foi estabelecido, mediante exame físico das gônadas (localização, tamanho e consistência), bem como laparoscopia e avaliação genética (cariótipo) quando necessário. Nesse grupo de pacientes, um teste de estímulo foi realizado pela administração subcutânea de dose única de 250 mcg (6500UI) de rhCG (gonadotrofina

coriônica humana recombinante) Ovidrel®. A coleta de sangue foi realizada em dois momentos: a primeira, em condição basal precedendo a aplicação do rhCG, para determinação de LH, FSH, TESTO, INB e AMH e a segunda, realizada 7 dias após a aplicação, quando foram avaliados os valores de TESTO e hCG. A função testicular foi considerada normal quando os valores de TESTO pós-estímulo apresentaram-se ≥ 111 ng/dL (percentil 10). Meninos submetidos ao tratamento com hCG ou testosterona nos últimos 6 meses, bem como os que apresentaram eixo hipotálamo-hipófise-testículo ativado ou qualquer sinal de anormalidade genital que pudesse sugerir um quadro de DDS foram excluídos do estudo. Os achados clínicos e hormonais de cada paciente com criptorquidismo encontram-se descritos no **Apêndice F**.

3.3 Avaliação hormonal

Durante este estudo, foram utilizados seis métodos de dosagens hormonais: ensaio imunofluorométrico (IFMA) AutoDELFIA (*PerkinElmer, Wallac, Finlândia*), para dosagens de LH, FSH, PRL, SHBG; fluoroimunoensaio (FIA) AutoDELFIA (*PerkinElmer, Wallac, Finlândia*) para dosagens de E2, TESTO e PROG; ensaio eletroquimioluminométrico (ECLIA) *Elecsys and Cobas Analyses (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA)*, para dosagem de LH, FSH, E2, PROG, TESTO, SHBG, PRO e DHEAS; quimioimunoensaio Siemens Immulite 2000 (*Siemens Healthcare Diagnostics, NY, USA*) para dosagem de D4; radioimunoensaio (RIE) para dosagem de 17-OHP (*Beckman Coulter Company, TX, USA*); ensaioimunoenzimático (ELISA) para determinação de INB, Inibina B Gen II (*Beckman Coulter Company, TX, USA*) e AMH, AMH Gen II (*Beckman Coulter Company, TX, USA*). Os coeficientes de variação intra e

interensaios foram inferiores a 5% a todos os ensaios automatizados e inferiores a 15% para ensaios manuais.

As amostras de sangue (20 mL) foram coletadas por punção venosa em tubo seco. Após a centrifugação e separação do soro, o material foi armazenado a -20°C até o momento das análises, em média, 9 meses. Todas as análises manuais foram realizadas em duplicata. Os valores de referência para cada analito em ambos os sexos estão descritos nos dados das **Tabelas 6, 7, 8, 9, 10**.

Tabela 6 - Valores normais de 17-hidroxiprogesterona, LH, FSH, estradiol e progesterona em mulheres adultas

Parâmetros	Fase folicular	Fase ovulatória	Fase lútea	Ensaio
17-OHP (ng/mL)	0,1 a 1,1		0,7 a 3,1	RIE
LH (IU/L)	0,2 a 6,8	13,8 a 71,8	até 12,0	IFMA
LH (IU/L)	2,4 a 12,6			ECLIA
FSH (IU/L)	2,4 a 9,3		até 8,0	IFMA
FSH (IU/L)	3,5 a 12,5	4,7 a 21,5	1,7 a 7,7	ECLIA
Estradiol (pg/mL)	22 a 215	191 a 572	22 a 232	FIA
Estradiol (pg/mL)	até 166	86 a 498	44 a 211	ECLIA
Progesterona (ng/mL)	0,4 a 1,1	0,5 a 0,8	3,6 a 21,7	FIA
Progesterona (ng/mL)	até 1,5	0,8 a 3,0	1,7 a 27,0	ECLIA

17-OHP: 17-hidroxiprogesterona; RIE: radioimunoensaio; IFMA: ensaio imunofluorométrico; ECLIA: ensaio eletroquimioluminométrico; FIA: fluoroimunoensaio.

Tabela 7 - Valores normais de inibina B, prolactina, testosterona total e globulina ligadora de hormônios sexuais em mulheres adultas

Parâmetros	Valores de Referência	Ensaio
Inibina B (pg/mL)	11,7 a 207,8	ELISA
Prolactina (ng/mL)	2 a 15	IFMA
Prolactina (ng/mL)	4,8 a 23,3	ECLIA
Testosterona total (ng/dL)	até 98	FIA
Testosterona total (ng/dL)	8,4 a 48,1	ECLIA
SHBG (nmol/L)	22 a 130	IFMA
SHBG (nmol/L)	32 a 128	ECLIA
Testosterona livre (pmol/L)	2 a 45	Cálculo de Vermeulen

SHBG: Globulina ligadora dos hormônios sexuais; ELISA: ensaio imunoenzimático; IFMA: ensaio imunofluorométrico; ECLIA: ensaio eletroquimioluminométrico; FIA: fluoroimunoensaio.

Tabela 8 - Valores normais de de-hidroepiandrosterona sulfato e androstenediona obtidos nos ensaios eletroquimioluminométrico e quimioimunoensaio, respectivamente, em mulheres adultas

De-hidroepiandrosterona sulfato		Androstenediona	
Idade	Valor de Referência	Idade	Valor de Referência
15 a 19 anos	651 a 3.680 ng/mL	18 a 20 anos	1,3 a 4,3 ng/mL
20 a 24 anos	1480 a 4.070 ng/mL	21 a 30 anos	0,7 a 2,8 ng/mL
25 a 34 anos	988 a 3.400 ng/mL	31 a 40 anos	0,6 a 2,9 ng/mL
35 a 44 anos	609 a 3.370 ng/mL	41 a 50 anos	< 0,3 a 2,3 ng/mL
45 a 54 anos	354 a 2.560 ng/mL		

Tabela 9 - Valores normais de LH, FSH, testosterona total e inibina B em homens adultos

Parâmetros	Valores de Referência	Ensaio
LH (IU/L)	até 10,4	IFMA
LH (IU/L)	1,7 a 8,6	ECLIA
FSH (IU/L)	até 10,5	IFMA
FSH (IU/L)	1,5 a 12,4	ECLIA
Testosterona total (ng/dL)	269 a 967	FIA
Testosterona total (ng/dL)	249 a 836	ECLIA
Inibina B (pg/mL)	70,2 a 336,7	ELISA

IFMA: ensaio imunofluorométrico; ECLIA: ensaio eletroquimioluminométrico; FIA: fluoroimunoensaio; ELISA: ensaio imunoenzimático.

Tabela 10 - Valores normais de LH, FSH, e testosterona total em meninos pré-púberes

Parâmetros	Valores de Referência	Ensaio
LH (IU/L)	até 0,6	IFMA
FSH (IU/L)	até 3,0	IFMA
Testosterona total (ng/dL)	até 19	FIA

IFMA: ensaio imunofluorométrico; FIA: fluoroimunoensaio; ELISA: ensaio imunoenzimático.

3.4 ELISA AMH Gen II

O teste AMH Gen II é um ensaio imunoenzimático não competitivo que utiliza dois anticorpos, um de captura e um de detecção. Calibradores, controles e amostras foram incubados em placa de microtitulação revestida com anticorpo anti-AMH. Após a incubação e a lavagem, o anticorpo de detecção ligado à biotina foi adicionado em cada poço. Após a segunda incubação e lavagem, a enzima peroxidase ligada à streptavidina foi acrescentada aos poços. Após a terceira incubação e lavagem, o substrato tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado. Por último, foi acrescentada uma solução ácida para parar a reação. O grau de consumo enzimático do substrato foi determinado por uma dupla medida da absorbância em um comprimento de onda de 450 nm e entre 600-630 nm. A absorbância medida é diretamente proporcional à concentração do AMH nas amostras (**Figura 3**). Um conjunto de calibradores foi usado para traçar uma curva de calibração da absorbância versus a concentração de AMH. A concentração de AMH nas amostras foi calculada com base nesta curva de calibração. O intervalo da curva de calibração variou entre 0,2-21 ng/mL.

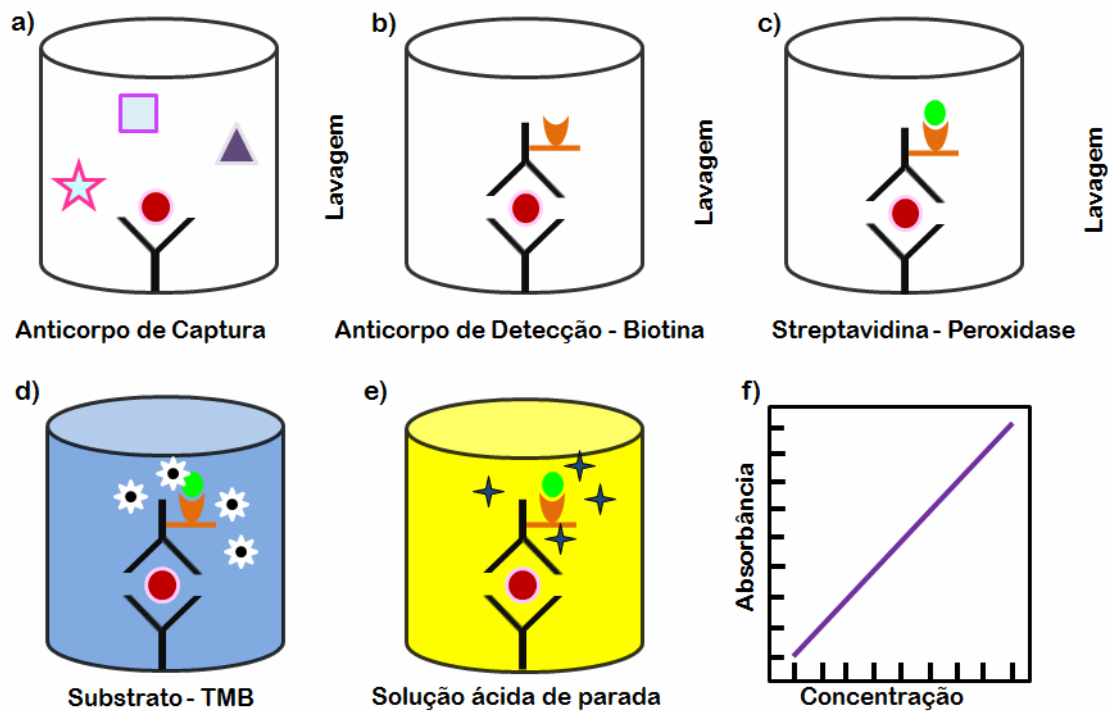


Figura 3 - Representação esquemática do princípio e procedimento do ELISA AMH Gen II. a) Calibradores, controles e amostras incubados em placa revestida com anticorpo anti-AMH; b) Após incubação e lavagem, foi adicionado anticorpo de detecção ligado à biotina; c) Após segunda incubação e lavagem, foi acrescentada enzima peroxidase ligada à streptavidina; d) Após a terceira incubação e lavagem, foi adicionado o substrato TMB; e) Foi acrescentada solução ácida para parar a reação; f) Medida da absorbância diretamente proporcional à concentração do AMH nas amostras

3.5 Validação do ensaio AMH Gen II

A validação do ensaio AMH Gen II (*Beckman Coulter Company, TX, USA*) foi realizada, conforme o protocolo simplificado estabelecido na rotina do Laboratório de Hormônios do HCFMUSP, seguindo as recomendações do CLSI¹¹⁷⁻¹²¹. Amostras de soro de pacientes com resultados prévios de AMH obtidas aleatoriamente da rotina do Laboratório de Hormônios foram usadas. Os parâmetros da validação foram analisados, de acordo com o protocolo descrito abaixo:

1. Sensibilidade analítica: o padrão zero da curva de calibração foi dosado dez vezes em um único ensaio. Calculou-se a média e o desvio-padrão (DP) das absorbâncias. A sensibilidade analítica foi definida pela concentração de AMH correspondente à média das absorbâncias mais dois DP;
2. Sensibilidade funcional: duas amostras com valores baixos e com diferentes concentrações de AMH foram dosadas em triplicata por 5 dias consecutivos. A média, o DP e o coeficiente de variação (CV) foram calculados. A sensibilidade funcional foi definida como a menor concentração de AMH com $CV \leq$ ou igual 20%.
3. Precisão intraensaio: quatro amostras com diferentes concentrações de AMH foram dosadas dez vezes em um único ensaio. A média, o DP e o CV foram calculados. Para métodos manuais, o critério de aceitação é que o CV seja < 15%.
4. Precisão interensaio: quatro amostras com diferentes concentrações de AMH foram dosadas em triplicata por 5 dias consecutivos. A média, o DP e o CV foram calculados. Para métodos manuais, o critério de aceitação é que o CV seja < 15%.

5. Linearidade: duas amostras, uma com valor baixo e outra com valor alto de AMH foram misturadas e diluídas em seis proporções diferentes, que foram medidas em duplicata em um único ensaio. Os resultados observados foram plotados contra os valores esperados. Os valores esperados foram calculados, dividindo a concentração da amostra não diluída pelo fator de diluição utilizado (**Tabela 11**). Em seguida, o percentual de recuperação foi calculado (pelo valor observado / valor esperado) x 100; onde o valor aceitável deve estar entre 80% e 120%.
6. Paralelismo: uma amostra com valor alto de AMH foi diluída com um diluente fornecido pelo fabricante do ensaio AMH Gen II em três diferentes concentrações, que foram medidas em duplicata em um único ensaio. Os resultados observados foram plotados contra os valores esperados. Os valores esperados foram calculados, dividindo a concentração da amostra não diluída pelo fator de diluição utilizado (**Tabela 12**). Em seguida, o percentual de recuperação descrito acima foi calculado.
7. Estudo de estabilidade: nove amostras frescas (não refrigeradas) foram rapidamente dosadas em duplicata em um único ensaio no dia da coleta do material. Depois disso, as amostras foram armazenadas em câmara fria (-20°C) por 90 dias. Após este período, as amostras foram dosadas novamente em duplicata. O percentual de recuperação descrito acima foi calculado.
8. Comparação entre métodos: 26 amostras com resultados prévios de AMH obtidos pelo ensaio IOT (Beckman Coulter Company, Marseille, FR) foram dosadas em duplicata em um único ensaio, usando o teste AMH Gen II. Após obtenção dos resultados, o coeficiente de correlação foi calculado.

Tabela 11 - Diluição e cálculo empregado para obtenção dos valores esperados na análise da linearidade

Alíquotas	Amostra Baixa	Amostra Alta	Concentração Relativa	Valores Esperados
C1	500 µL	0 µL	0	C1
C2	400 µL	100 µL	0,2	$(C1 \times 0,8) + (C6 \times 0,2)$
C3	300 µL	200 µL	0,4	$(C1 \times 0,6) + (C6 \times 0,4)$
C4	200 µL	300 µL	0,6	$(C1 \times 0,4) + (C6 \times 0,6)$
C5	100 µL	400 µL	0,8	$(C1 \times 0,2) + (C6 \times 0,8)$
C6	0 µL	500 µL	1,0	C6

C: concentração.

Tabela 12 - Diluição e cálculo para obtenção dos valores esperados na análise da recuperação

Alíquotas	Amostra Alta	Diluyente	Concentração Relativa	Valores Esperados
C1	100 µL	0 µL	1	C1
C2	100 µL	100 µL	1/2	C1/2
C3	25 µL	100 µL	1/5	C1/5
C4	20 µL	180 µL	1/10	C1/10

C: concentração.

3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa estatístico SigmaStat for Windows, versão 3.5. Para apresentar os dados clínicos e laboratoriais, foi utilizada a estatística descritiva (média, mediana, DP, CV, mínimo, máximo e percentis). Os valores normativos de AMH foram estabelecidos, mediante a aplicação de percentis 2,5 e 97,5.

A comparação entre os valores de AMH nos indivíduos normais e nos indivíduos com patologias associadas foi testada, mediante a aplicação do teste T de Student. As relações entre o uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e IMC sobre os valores séricos de AMH foram avaliadas por meio do teste T de Student ou ANOVA para dados com distribuição normal e teste U de Mann Whitney ou Kruskal Wallis para dados com distribuição não normal.

O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado entre os valores de AMH e as demais variáveis numéricas. Quando necessário o coeficiente de correlação foi ajustado para a idade (coeficiente de correlação parcial). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 Resultados

4.1 Validação do ensaio AMH Gen II

4.1.1 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do método correspondeu a 0,02 ng/mL (**Tabela 13**).

Tabela 13 - Sensibilidade analítica do ensaio AMH Gen II

n	Absorbância
1	0,004
2	0,004
3	0,001
4	0,004
5	-0,002
6	-0,003
7	-0,006
8	0,000
9	0,013
10	-0,004
Média	0,0011
DP	0,0055
Média +2DP	0,0121
Concentração	0,02 ng/mL

DP: desvio-padrão.

4.1.2 Sensibilidade funcional

A sensibilidade funcional correspondeu a 0,2 ng/mL (**Tabela 14**).

Tabela 14 - Sensibilidade funcional do ensaio AMH Gen II

n	Amostra 1 (ng/mL)	Amostra 2 (ng/mL)
1	0,2	0,4
2	0,2	0,4
3	0,2	0,4
4	0,2	0,3
5	0,2	0,4
6	0,2	0,4
7	0,3	0,4
8	0,3	0,4
9	0,2	0,4
10	0,3	0,4
11	0,3	0,4
12	0,3	0,4
13	0,2	0,3
14	0,2	0,4
15	0,2	0,3
Média	0,23	0,38
DP	0,03	0,03
CV%	10,8	8,0

DP: desvio-padrão, CV: coeficiente de variação; Critério de aceitação: $CV \leq 20\%$.

4.1.3 Precisão intraensaio

Na precisão intraensaio, os CV corresponderam a 7,3%, 5,2%, 5,5%, e 9,0% nas concentrações de 0,4, 1,0, 3,6 e 11,3 ng/mL, respectivamente (**Tabela 15**).

Tabela 15 - Precisão intraensaio do ensaio AMH Gen II

n	Amostra 1 (ng/mL)	Amostra 2 (ng/mL)	Amostra 3 (ng/mL)	Amostra 4 (ng/mL)
1	0,4	0,9	3,5	11,3
2	0,4	1,0	3,6	13,3
3	0,4	1,0	3,7	10,4
4	0,4	1,0	4,0	10,8
5	0,4	1,0	3,5	10,3
6	0,4	1,0	3,4	11,0
7	0,5	1,0	3,3	10,5
8	0,4	1,0	3,7	11,8
9	0,4	1,0	3,4	10,9
10	0,4	1,1	3,6	12,8
Média	0,39	0,98	3,57	11,32
DP	0,03	0,05	0,20	1,01
CV%	7,3	5,2	5,5	9,0

DP: desvio-padrão, CV: coeficiente de variação; Critério de aceitação: CV < 15%.

4.1.4 Precisão interensaio

Na precisão interensaio, os CV foram 7,8%, 4,6%, 6,4% e 5,9% nas concentrações de 0,4, 0,9, 3,2 e 18,8 ng/mL, respectivamente (**Tabela 16**).

Tabela 16 - Precisão interensaio do ensaio AMH Gen II

n	Amostra 1 (ng/mL)	Amostra 2 (ng/mL)	Amostra 3 (ng/mL)	Amostra 4 (ng/mL)
1	0,4	0,9	3,3	19,4
2	0,4	1,0	3,2	19,1
3	0,4	1,0	3,3	20,1
4	0,4	0,9	3,4	18,6
5	0,4	1,0	3,2	21,3
6	0,4	0,9	3,4	20,5
7	0,4	0,9	2,8	17,5
8	0,5	0,9	2,9	18,0
9	0,5	1,0	2,9	17,9
10	0,4	0,9	3,3	18,6
11	0,4	1,0	3,1	18,2
12	0,3	0,9	3,1	17,6
13	0,4	1,0	3,4	18,3
14	0,4	1,0	3,3	17,9
15	0,4	0,9	3,4	18,7
Média	0,40	0,93	3,19	18,78
DP	0,03	0,04	0,20	1,11
CV%	7,8	4,6	6,4	5,9

DP: desvio-padrão, CV: coeficiente de variação; Critério de aceitação: CV < 15%.

4.1.5 Linearidade

A linearidade do método variou entre $< 0,2$ a $17,3$ ng/mL (Tabela 17).

Tabela 17 - Linearidade do ensaio AMH Gen II

Alíquotas	Valor Observado 1 (ng/mL)	Valor Observado 2 (ng/mL)	Média dos Valores Observados (ng/mL)	Valor Esperado (ng/mL)	OBS/ESP %
C1	$< 0,2$	$< 0,2$	$< 0,2$	$< 0,2$	
C2	3,0	3,0	3,0	3,5	86
C3	5,8	5,9	5,8	6,9	84
C4	9,5	10,0	9,7	10,4	94
C5	15	14,1	14,5	13,9	105
C6	17,6	17,0	17,3	17,3	

C: concentração; OBS: valor observado; ESP: valor esperado.
Critério de aceitação: recuperação entre 80% e 120%.

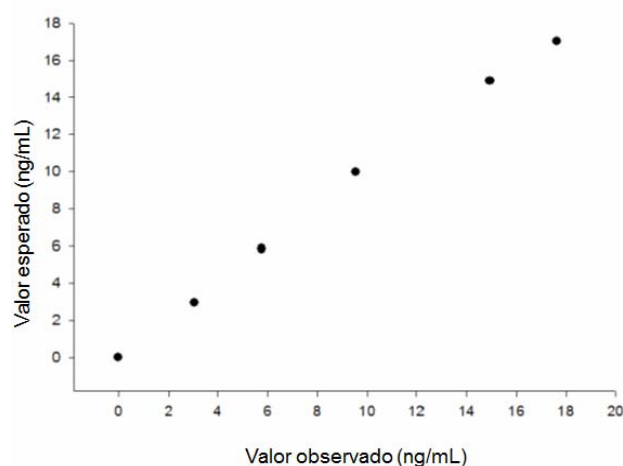


Figura 4 - Relação entre os valores de AMH, observados e esperados, obtidos no estudo de linearidade

4.1.6 Paralelismo

O estudo do paralelismo mostrou que as amostras podem ser diluídas até 1/10 (Tabela 18).

Tabela 18 - Paralelismo do ensaio AMH Gen II

Alíquotas	Valor Observado 1 (ng/mL)	Valor Observado 2 (ng/mL)	Média dos Valores Observados (ng/mL)	Valor Esperado (ng/mL)	OBS/ESP %
C1	21,0	20,5	20,9		
C2	10,4	9,8	10,1	10,4	97
C3	4,1	4,0	4,0	4,2	97
C4	1,9	1,9	1,9	2,1	92

C: concentração; OBS: valor observado; ESP: valor esperado
Critério de aceitação: recuperação entre 80% e 120%.

4.1.7 Estudo de Estabilidade

No estudo de estabilidade das amostras, a média de variação da concentração de AMH entre a amostra conservada a -20°C em relação à basal foi de 6,3% (**Tabela 19**).

Tabela 19 - Estudo de estabilidade

Amostras	Valores Observados 02/08/2012		Média (ng/mL)	Valores Observados 15/11/2012		Média (ng/mL)	Diferença %
	(ng/mL)	(ng/mL)		(ng/mL)	(ng/mL)		
1	0,20	0,20	0,20	0,20	0,21	0,21	105
2	0,38	0,39	0,39	0,37	0,38	0,38	97
3	0,98	0,97	0,98	0,92	0,90	0,91	93
4	2,23	2,30	2,27	2,20	2,14	2,17	96
5	2,67	2,72	2,70	2,71	2,61	2,66	99
6	3,37	3,29	3,33	3,26	3,19	3,23	97
7	6,67	6,18	6,43	8,03	7,45	7,74	120
8	7,48	7,09	7,29	8,20	8,33	8,27	113
9	18,25	18,66	18,46	18,24	18,42	18,33	99

Critério de aceitação: diferença entre 80% e 120%.

4.1.8 Comparação entre métodos

Houve forte correlação entre os ensaios Gen II e IOT ($r = 0,9$, $p < 0,001$), contudo, os valores de AMH obtidos pelo ensaio Gen II apresentaram-se em média 33% mais baixos que aqueles obtidos com o ensaio IOT (**Tabela 20**).

Tabela 20 - Correlação entre métodos IOT e Gen II.

n	IOT (ng/mL)	Gen II (ng/mL)
1	1,8	1,2
2	2,9	2,0
3	3,3	3,9
4	3,5	2,4
5	3,8	2,2
6	4,6	4,0
7	5,4	0,8
8	5,8	3,3
9	13,0	7,9
10	13,4	6,9
11	14,6	9,1
12	14,6	10,8
13	15,6	11,2
14	15,7	8,8
15	17,3	13,8
16	19,2	21,0
17	11,5	6,7
18	11,4	7,6
19	9,0	5,5
20	9,7	6,6
21	8,0	3,8
22	7,8	3,1
23	7,5	8,9
24	6,9	2,0
25	6,6	6,5
26	6,1	2,3

Correlação de Pearson: $r = 0,9$, $p < 0,001$

4.2 Valores normativos de AMH e influências do uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e índice de massa corpórea

4.2.1 Sexo feminino

No grupo de 100 mulheres saudáveis, a idade cronológica (IC) variou entre 18-48 anos, a média foi 31 ± 8 anos. Setenta e duas mulheres não faziam uso de contraceptivos hormonais e 63 não eram tabagistas. Com relação ao peso corporal, 66 apresentaram peso normal (IMC até 25 kg/m^2); 24, sobrepeso (IMC entre $26\text{-}30 \text{ kg/m}^2$) e 10 eram obesas ($\text{IMC} > 30 \text{ kg/m}^2$). Houve correlação negativa significativa entre a IC e os valores séricos de AMH ($r = -0,4, p < 0,001$) (**Figura 5**). A mediana e o percentil 2,5-97,5 para os valores de AMH no grupo total foram, respectivamente: 2,6 e 0,3-12,4 ng/mL. Os dados da **Tabela 21** resumem as características clínicas e hormonais das 100 mulheres incluídas no grupo controle. Os valores séricos de AMH distribuídos pela IC estão apresentados nos dados da **Tabela 22**.

Observamos sobreposição nos valores séricos de AMH entre todas as faixas etárias. Todas as mulheres acima de 40 anos apresentaram valores de AMH $\leq 1,4$ ng/mL, 6 com idade entre 18-30 anos e 11 com idade entre 31-40 anos (19%) também apresentaram valores de AMH $\leq 1,4$ ng/mL.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos valores séricos de AMH entre usuárias e não usuárias de contraceptivos hormonais ($p = 0,207$) (**Tabela 23**), entre mulheres tabagistas e não tabagistas ($p = 0,149$) (**Tabela 24**), bem como entre as diferentes categorias de IMC ($p = 0,290$) (**Tabela 25**).

No sexo feminino, a correlação entre os valores séricos de AMH e os demais hormônios (LH, FSH, E2 e INB) foi ajustada para a IC. Houve correlação significativa somente entre os valores de AMH e FSH ($r = -0,4$, $p < 0,001$) (Tabela 26).

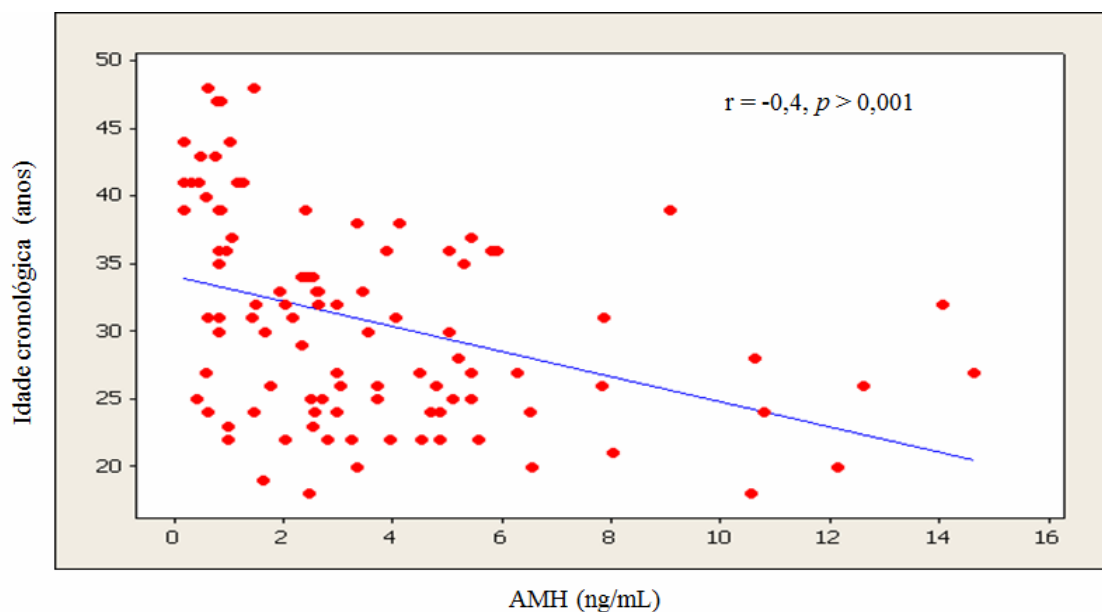


Figura 5 - Correlação entre os valores séricos de AMH e a idade cronológica no sexo feminino

Tabela 21 - Características clínicas e hormonais dos 100 controles femininos

Parâmetros	Média ± DP	Mediana	Mínimo	Máximo	2,5 - 97,5
Idade (anos)	31 ± 8	31	18	48	19 - 47
IMC (kg/m ²)	24 ± 5	23	18	35	18 - 34
LH (IU/L)	3,9 ± 1,9	4,1	0,1	8,5	0,5 - 7,7
FSH (IU/L)	5,9 ± 1,8	5,8	1,2	10,7	2,3 - 9,8
E2 (pg/mL)	40 ± 25	37	13	168	13 - 115
INB (pg/mL)	92 ± 50	95	1	257	4 - 208
AMH (ng/mL)	3,5 ± 3,2	2,6	< 0,2	14,6	0,3 - 12,4

IMC: índice de massa corpórea; E2: estradiol; INB: inibina B.

Tabela 22 - Características clínicas e hormonais dos 100 controles femininos distribuídos por faixa etária

Parâmetros	18-30 anos (n = 50)		31-40 anos (n = 37)		41-50 anos (n = 13)	
	Mediana	2,5 - 97,5	Mediana	2,5 - 97,5	Mediana	2,5 - 97,5
Idade (anos)	25	18 - 30	35	31 - 39	43	41 - 48
IMC (kg/m²)	22	18 - 34	22	18 - 34	27	21 - 34
LH (IU/L)	3,5	0,3 - 8,1	4,4	1,3 - 7,1	3,1	1,8 - 5,5
FSH (IU/L)	5,3	1,8 - 8,9	6,3	3,4 - 9,7	7,1	4,6 - 10,5
E2 (pg/mL)	32	13 - 62	41	18 - 121	37	16 - 147
INB (pg/mL)	98	3 - 199	99	16 - 213	63	6 - 108
AMH (ng/mL)	3,7	0,6 - 12,5	2,4	0,5 - 9,6	0,8	< 0,2 - 1,4

IMC: índice de massa corpórea; E2: estradiol; INB: inibina B.

Tabela 23 - Características clínicas e hormonais dos 100 controles femininos usuárias e não usuárias de contraceptivos hormonais

Parâmetros	Não usuárias de CH (n = 72)		Usuárias de CH (n = 28)	
	Mediana	2,5 - 97,5	Mediana	2,5 - 97,5
Idade (anos)	32	20 - 47	26	21 - 38
IMC (kg/m²)	23	18 - 35	23	18 - 33
LH (IU/L)	4,2	1,5 - 7,3	2,6	0,4 - 6,7
FSH (IU/L)	6,0	3,6 - 10,1	5,4	1,5 - 9,4
E2 (pg/mL)	40	15 - 123	32	13 - 72
INB (pg/mL)	97	4 - 208	85	6 - 223
AMH (ng/mL)	2,6	< 0,2 - 10,7	3,4	0,6 - 14,2

CH: contraceptivos hormonais; IMC: índice de massa corpórea; E2: estradiol; INB: inibina B.

Tabela 24 - Características clínicas e hormonais dos 100 controles femininos tabagistas e não tabagistas

Parâmetros	Não tabagistas (n = 63)		Tabagistas (n = 37)	
	Mediana	2,5 - 97,5	Mediana	2,5 - 97,5
Idade (anos)	30	22 - 47	31	18 - 44
IMC (kg/m²)	23	18 - 34	24	18 - 35
LH (IU/L)	3,9	0,4 - 6,7	4,1	1,5 - 8,4
FSH (IU/L)	5,4	2,0 - 8,7	6,4	3,9 - 10,0
E2 (pg/mL)	37	13 - 125	34	18 - 100
INB (pg/mL)	86	2 - 219	105	26 - 160
AMH (ng/mL)	2,7	< 0,2 - 10,0	2,6	0,4 - 12,4

IMC: índice de massa corpórea; E2: estradiol; INB: inibina B.

Tabela 25 - Características clínicas e hormonais dos 100 controles femininos distribuídos pelo índice de massa corpórea

Parâmetros	IMC até 25 (n = 66)		IMC 26-30 (n = 24)		IMC > 30 (n = 10)	
	Mediana	2,5 - 97,5	Mediana	2,5 - 97,5	Mediana	2,5 - 97,5
Idade (anos)	29	20 - 44	33	20 - 48	35	22 - 41
IMC (kg/m²)	21	18 - 25	29	26 - 30	34	31 - 35
LH (IU/L)	4,3	0,5 - 7,5	3,8	1,5 - 6,4	2,8	0,9 - 8,0
FSH (IU/L)	5,8	2,4 - 10,2	6,0	3,2 - 9,3	5,4	2,3 - 8,5
E2 (pg/mL)	37	13 - 88	32	15 - 135	36	15 - 116
INB (pg/mL)	99	6 - 207	73	7 - 182	75	6 - 225
AMH (ng/mL)	2,9	0,3 - 11,2	2,5	0,3 - 12,4	1,9	0,4 - 10,9

IMC: índice de massa corpórea; E2: estradiol; INB: inibina B

Tabela 26 - Correlação de Pearson ajustada para a idade entre os valores séricos de AMH e as demais variáveis no grupo de 100 controles femininos

Variável	Coefficiente de Correlação	Valor de <i>p</i>
Idade	- 0,4	< 0,001
IMC	0,1	0,290
LH	0,4	0,015
FSH	- 0,4	< 0,001
E2	0,01	0,620
INB	0,01	0,105

IMC: índice de massa corpórea; E2: estradiol; INB: inibina B.

4.2.2 Sexo masculino

No grupo de 104 homens saudáveis, a IC variou entre 18-48 anos, a média foi 30 ± 8 anos. Sessenta e dois homens não eram tabagistas, 68 apresentaram peso corporal normal, 30 tinham sobrepeso e seis eram obesos. Houve fraca correlação negativa, mas não significativa entre a IC e os valores séricos de AMH ($r = -0,2; p = 0,1$) (**Figura 6**). A mediana e o percentil 2,5-97,5 para os valores de AMH no grupo total foram respectivamente: 6,0 e 2,0-19,2 ng/mL. Observamos grande variabilidade e sobreposição nos valores séricos de AMH entre os indivíduos. Os dados da **Tabela 27** resumem as características clínicas e laboratoriais dos 104 homens incluídos no grupo controle. Os valores séricos de AMH distribuídos pela IC estão apresentados nos dados da **Tabela 28**.

Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores séricos de AMH entre indivíduos tabagistas e não tabagistas ($p = 0,637$) (**Tabela 29**). Por outro lado, houve correlação negativa e significativa entre os valores de AMH e as diferentes categorias de IMC ($r = -0,3, p = 0,008$), mas, os valores séricos de AMH de homens com sobrepeso e obesos estavam dentro do intervalo daqueles com peso normal (**Tabela 30**).

Observamos correlação significativa entre os valores de AMH e LH, FSH e INB, respectivamente ($r = -0,3, p = 0,002$; $r = -0,4, p < 0,001$; $r = 0,4, p < 0,001$). Contudo, não encontramos correlação significativa entre o AMH e a TESTO (**Tabela 31**).

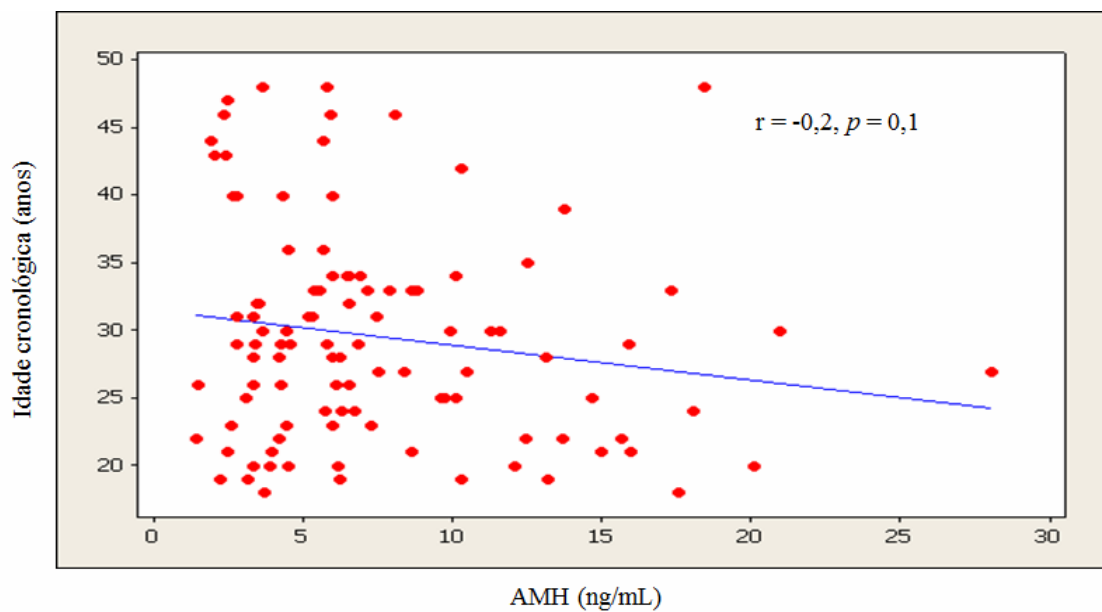


Figura 6 - Correlação entre os valores séricos de AMH e a idade cronológica no sexo masculino

Tabela 27 - Características clínicas e laboratoriais dos 104 controles masculinos

Parâmetros	Média ± DP	Mediana	Mínimo	Máximo	2,5 - 97,5
Idade (anos)	30 ± 8	29	18	48	19 - 47
IMC (kg/m²)	25 ± 4	24	19	41	19 - 34
LH (IU/L)	4,5 ± 1,7	4,2	0,7	10,0	2,2 - 8,6
FSH (IU/L)	3,4 ± 2	3,0	1,0	10,5	1,1 - 9,5
TESTO (ng/dL)	493 ± 177	463	255	1354	273 - 794
INB (pg/mL)	195 ± 84	182	44	579	68 - 382
AMH (ng/mL)	7,5 ± 5	6,0	1,4	21,0	2,0 - 19,2

IMC: índice de massa corpórea; TESTO: testosterona total; INB: inibina B

Tabela 28 - Características clínicas e laboratoriais dos 104 controles masculinos distribuídos por faixa etária

Parâmetros	18-30 anos (n = 63)		31-40 anos (n = 29)		41-50 anos (n = 12)	
	Mediana	2,5 - 97,5	Mediana	2,5 - 97,5	Mediana	2,5 - 97,5
Idade (anos)	25	19 - 30	33	31 - 40	46	42 - 48
IMC (kg/m²)	24	20 - 30	25	19 - 36	27	23 - 32
LH (IU/L)	4,5	2,2 - 8,6	4,3	2,5 - 7,9	3,6	1,3 - 8,5
FSH (IU/L)	2,6	1,1 - 9,9	3,2	1,5 - 6,6	3,9	1,4 - 6,3
TESTO (ng/dL)	486	287 - 794	458	274 - 917	429	265 - 672
INB (pg/mL)	179	68 - 325	213	102 - 480	146	57 - 304
AMH (ng/mL)	6,3	1,9 - 20,5	6,0	2,7 - 14,8	4,7	2,0 - 16,2

IMC: índice de massa corpórea; TESTO: testosterona total; INB: inibina B

Tabela 29 - Características clínicas e laboratoriais dos 104 controles masculinos tabagistas e não tabagistas

Parâmetros	Não tabagistas (n = 62)		Tabagistas (n = 42)	
	Mediana	2,5 - 97,5	Mediana	2,5 - 97,5
Idade (anos)	29	19-48	29	19-44
IMC (kg/m²)	24	19-34	25	22-30
LH (IU/L)	4,3	2,2-9,2	4,2	1,4-8,0
FSH (IU/L)	3,1	1,3-9,5	2,8	1,1-6,7
TESTO (ng/dL)	472	282-1001	427	266-783
INB (pg/mL)	200	58-396	167	77-310
AMH (ng/mL)	6,1	1,9-18	6,0	2,0-20,9

IMC: índice de massa corpórea; TESTO: testosterona total; INB: inibina B.

Tabela 30 - Características clínicas e hormonais dos 104 controles masculinos distribuídos pelo índice de massa corpórea

Parâmetros	IMC até 25 (n = 68)		IMC 26-30 (n = 30)		IMC > 30 (n = 6)	
	Mediana	2,5 - 97,5	Mediana	2,5 - 97,5	Mediana	2,5 - 97,5
Idade (anos)	27	19 - 45	31	19 - 48	38	28 - 47
IMC (kg/m²)	23	19 - 25	27	26 - 30	34	31 - 41
LH (IU/L)	4,2	2,2 - 8,6	4,6	2,2 - 7,6	3,8	3,1 - 9,3
FSH (IU/L)	2,7	1,1 - 9,5	3,1	1,4 - 7,4	3,8	2,4 - 6,0
TESTO (ng/dL)	486	276 - 936	414	275 - 709	327	291 - 461
INB (pg/mL)	206	84 - 344	153	65 - 300	140	123 - 534
AMH (ng/mL)	6,7	2,1 - 20,4	5,4	2,0 - 15,6	2,7	2,4 - 5,4

IMC: índice de massa corpórea; TESTO: testosterona total; INB: inibina B.

Tabela 31 - Correlação de Pearson entre os valores séricos de AMH e as demais variáveis no grupo de 104 controles masculinos

Variável	Coefficiente de Correlação	Valor de <i>p</i>
Idade	- 0,2	0,1
IMC	- 0,3	0,008
LH	- 0,3	0,002
FSH	- 0,4	0,001
TESTO	0,07	0,463
INB	0,4	0,001

IMC: índice de massa corpórea; TESTO: testosterona total; INB: inibina B.

4.3 Aplicabilidade clínica dos valores séricos de AMH

4.3.1 Síndrome de Turner

No grupo de 66 pacientes com ST, a média da IC no momento da avaliação laboratorial foi 21 ± 8 anos, variando entre 2-38 anos. Trinta e seis pacientes (55%) apresentaram cariótipo 45,X, 5 (7%) cariótipo 45,X/46,XX e 25 (38%), cariótipos pertencentes a outras categorias. Puberdade espontânea foi identificada em 18 pacientes (29%); nesse grupo, 16 (89%) fizeram uso de GH; 44 pacientes (71%) necessitaram de indução da puberdade, destas 34 (77%) usaram GH. No grupo total de 66 pacientes com ST não foram observados valores de AMH detectáveis. Os dados das **Tabelas 32 e 33** resumem os achados clínicos e hormonais das 66 pacientes com ST.

Tabela 32 - Características clínicas das 66 pacientes com síndrome de Turner

Parâmetros	n (%)	Sem uso de GH	Uso de GH
n	66	14	52
Idade (anos, média ± DP)	21 ± 8	20 ± 7,4	21 ± 7,1
Cariótipo 45,X	36 (55)	6 (17)	30 (83)
Cariótipo 45,X/46,XX	5 (7)	1(20)	4 (80)
Cariótipos Diversos	25 (38)	7 (28)	18 (72)
Puberdade espontânea	18 (29)	2 (11)	16 (89)
Puberdade induzida	44 (71)	10 (23)	34 (77)

GH: hormônio do crescimento; DP: desvio-padrão.

Tabela 33 - Características hormonais das 66 pacientes com síndrome de Turner

Parâmetros	Média ± DP	Mediana	Mínimo	Máximo	2,5 - 97,5
Idade (anos)	21 ± 8	21	2	38	6 - 36
LH (IU/L)	21 ± 18,6	17,6	0,1	95,5	0,8 - 10,3
FSH (IU/L)	43,7 ± 35,7	35,7	0,1	153,7	1 - 119,7
E2 (pg/mL)	32 ± 41	16	13	326	13 - 66
AMH (ng/mL)	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2

E2: estradiol.

4.3.2 Síndrome do Ovário Policístico

No grupo de 29 mulheres com SOP, a média da IC ao diagnóstico foi 27 ± 5 anos, variando de 18-36 anos. Todas as mulheres foram diagnosticadas pelos critérios dos três consensos; disfunção menstrual e hiperandrogenismo clínico e/ou laboratorial foram observados em todas as pacientes. Vinte e três mulheres (79%) apresentaram hiperandrogenemia. Dados do escore de Ferriman e Gallwey estavam disponíveis para 21 pacientes, destas 17 (81%) apresentaram hirsutismo. Informações sobre volume ovariano estavam disponíveis para 20 pacientes, nesse grupo, 15 (75%) apresentaram volume ovariano aumentado. A média e a mediana dos valores séricos de AMH no grupo foram $9,2 \pm 5,8$ e $6,9$ ng/mL, significativamente maior do que nos controles femininos $3,5 \pm 3,2$ e $2,6$ ng/mL ($p < 0,001$), porém, com 76% de sobreposição entre os dois grupos. Os valores de AMH apresentaram-se $> 12,4$ ng/mL (limite superior do grupo normal) em quatro de 15 mulheres (27%) com volume ovariano aumentado e em duas de cinco (40%) que apresentaram volume ovariano normal. Os dados da **Tabela 34** resumem as características clínicas e laboratoriais das 29 pacientes com SOP. Os dados da **Tabela 35** descrevem as alterações clínicas observadas nas 29 pacientes com SOP.

Houve correlação positiva significativa entre as concentrações séricas de AMH e TESTO ($r = 0,5$; $p = 0,003$). Por outro lado, não houve correlação significativa entre os valores de AMH e as demais variáveis.

Tabela 34 - Características clínicas e laboratoriais das 29 pacientes com SOP

Parâmetros	Média ± DP	Mediana	Mínimo	Máximo	2,5 - 97,5
Idade (anos)	27 ± 5	26	18	36	19 - 35
IMC (kg/m²)	32 ± 7	32	20	48	21 - 46
VO (cm³)	11,8 ± 4,2	11,9	4,1	19,5	5,1 - 19,3
Escore F-G	13 ± 5	13	5	27	6 - 25
LH (IU/L)	8,2 ± 3,9	7,6	2,0	16,8	3,1 - 16,5
FSH (IU/L)	5,5 ± 2,7	4,6	1,7	17,3	1,8 - 10,0
LH / FSH (IU/L)	1,8 ± 0,9	1,6	0,6	3,7	0,6 - 3,4
E2 (pg/mL)	57 ± 28	52	27	184	30 - 123
PROG (ng/mL)	0,3 ± 0,1	0,3	0,3	0,6	0,3 - 0,5
PRL (ng/mL)	7,0 ± 2,7	6,6	3,2	14,5	3,5 - 14,2
170HP (ng/mL)	1,1 ± 0,5	0,9	0,2	2,7	0,4 - 2,3
DHEAS (ng/mL)	2424 ± 1496	2125	780	7860	833 - 5808
D4 (ng/mL)	3,0 ± 1,1	3,0	0,8	5,0	1,3 - 5,0
TESTO (ng/dL)	88 ± 46	85	20	217	30 - 202
SHBG (nmol/L)	28 ± 15	25	9	73	10 - 67
TESL (pmol/L)	65 ± 34	54	16	164	20 - 133
AMH (ng/mL)	9,2 ± 5,8	6,9	1,4	> 21,0	2,8 - > 21,0

IMC: índice de massa corpórea; VO volume ovariano; Escore F-G: Ferriman e Gallwey; E2: estradiol; PROG: progesterona; PRL: prolactina; 17-OHP: 17-hidroxiprogesterona; DHEAS: de-hidroepiandrosterona sulfato; D4: androstenediona; TESTO: testosterona total; SHBG: globulina ligadora de hormônios sexuais; TESL: testosterona livre.

Tabela 35 - Alterações clínicas observadas nas 29 pacientes com SOP

Parâmetros	n (%)
n	29
IMC > 25 kg/m²	19 (65)
Disfunção menstrual	29 (100)
Volume Ovariano > 10 cm³ (n = 20)^a	15 (75)
Escore de Ferriman e Gallwey ≥ 8 (n = 21)^a	17 (81)
Hiperandrogenemia	23 (79)
TESTO aumentada	9 (31)
TESL aumentada	19 (65)
SHBG diminuída	13 (45)
DHEAS aumentada, (n = 28)^a	4 (14)
D4 aumentada, (n = 26)^a	11 (42)

IMC: índice de massa corpórea; a: dados não disponíveis para todas as pacientes.

4.3.3 Criptorquidismo

No grupo de 31 pacientes com criptorquidismo, a média da IC ao diagnóstico foi $3,3 \pm 2,7$ anos, variando de 8 meses a 9 anos. Três pacientes (10%) apresentaram testículos retráteis, 21 (68%) criptorquidismo unilateral e sete (22%) criptorquidismo bilateral. No grupo, a média dos valores de AMH foi 109 ± 53 ng/mL, a mediana foi 97 ng/mL. Vinte e três pacientes (74%) demonstraram valores normais de AMH basal e TESTO pós-estímulo, cinco (16%) apresentaram AMH basal diminuído, mas, com valores normais de TESTO pós-estímulo e três (10%) demonstraram TESTO pós-estímulo < 111 ng/dL, mas, com valores normais de AMH basal. A **Tabela 36** resume os dados clínicos e laboratoriais dos 31 pacientes com criptorquidismo. Observamos correlação positiva significativa entre os valores basais de AMH e TESTO pós-estímulo ($r = 0,5, p < 0,001$).

Tabela 36 - Características clínicas e laboratoriais dos 31 pacientes com criptorquidismo

Parâmetros	Média \pm DP	Mediana	Mínimo	Máximo	2,5-97,5
Idade (anos)	$3,3 \pm 2,7$	2,5	0,8	9,0	0,8 - 9,0
Peso (kg)	$14,8 \pm 7,1$	12,0	7,4	40	8,2 - 31,1
LH basal (IU/L)	$0,14 \pm 0,11$	0,1	0,05	0,5	0,05 - 0,4
FSH basal (IU/L)	$0,65 \pm 0,39$	0,6	0,1	1,4	0,1 - 1,4
TESTO basal (ng/dL)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
INB basal (pg/mL)	106 ± 65	96	29	348	32 - 247
AMH basal (ng/mL)	109 ± 53	97	48	260	49 - 244
TESTO pós (ng/dL)	248 ± 136	200	51	547	59 - 531
hCG pós (IU/L)	$14,4 \pm 8,3$	11,8	4,5	39,1	5,4 - 34,1

TESTO: testosterona total; INB: inibina B; hCG: gonadotrofina coriônica humana.

5 Discussão

Estudos recentes apontam que o AMH é o melhor marcador de reserva ovariana, quando comparado à idade isoladamente e à dosagem de FSH, E2, INB e CFA^{43, 44}. No entanto, ainda permanece em discussão se o AMH sofre influência²³⁻²⁶ ou não²⁰⁻²² do ciclo menstrual, uso de contraceptivos hormonais²⁷⁻³², tabagismo³³⁻³⁶ e IMC³⁷⁻⁴¹. A aplicabilidade clínica do AMH vem sendo descrita não apenas na avaliação da reserva ovariana, mas também na predição do tempo de transição para a menopausa⁴⁵⁻⁵⁰, extensão de prejuízo ovariano após quimioterapia⁵¹⁻⁵⁷ e cirurgias ginecológicas⁵⁸⁻⁶⁰, rastreamento de falência ovariana, como na ST^{16, 62, 64}, critério diagnóstico da SOP^{66, 76-78}, preditor de resposta ovariana aos procedimentos da RHA⁷⁹⁻⁸⁴, bem como marcador bioquímico de tumor das células da granulosa⁸⁵.

No sexo masculino, o AMH está envolvido tanto nos processos de diferenciação sexual do feto como no desenvolvimento sexual e espermatogênese após o nascimento^{1, 90}. Sabe-se que os valores séricos de AMH têm aplicação clínica nos distúrbios do desenvolvimento sexual^{94, 95} e diagnóstico diferencial entre retardo constitucional do crescimento e hipogonadismo hipogonadotrófico isolado em crianças^{96, 97}. Já no homem adulto, os valores séricos de AMH podem ser aplicados na avaliação da fertilidade masculina⁹⁸⁻¹⁰².

Até o momento, poucos estudos reportam valores normativos de AMH, tanto no sexo feminino¹⁶⁻¹⁸ como no masculino^{88, 103}. Tendo em vista todas as possíveis aplicabilidades clínicas desse hormônio em ambos os sexos, estabelecer valores normativos é um processo essencial.

O primeiro imunoenensaio para AMH foi estabelecido por Hudson *et al.* em 1990¹⁰⁵. Depois disso, outros ensaios foram desenvolvidos e forneceram informação

clínica relevante relacionada a valores normais e estado de doença, porém, com resultados conflitantes¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Até 2010, dois ensaios estavam disponíveis para dosagem de AMH que forneciam resultados distintos mesmo entre estudos semelhantes. A recente consolidação das empresas DSL e Beckman Coulter trouxe ao mundo científico um novo imunoensaio mais sensível e reprodutível^{104, 106, 111}, que pode contribuir para a homogeneidade entre os resultados publicados, bem como para melhorar a compreensão das aplicabilidades clínicas do AMH.

Neste trabalho, nós validamos o imunoensaio AMH Gen II e estabelecemos valores normativos de AMH em homens e mulheres adultos. Além disso, avaliamos a influência do uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e IMC sobre os valores séricos de AMH e verificamos as concentrações séricas desse hormônio em pacientes com ST, SOP e em meninos com criptorquidismo submetidos ao teste de estímulo com rhCG, visando a obter uma melhor compreensão dos valores de AMH em suas diversas aplicações.

5.1 Validação do ensaio AMH Gen II

O AMH Gen II substituiu os ensaios DSL e IOT, utilizando os anticorpos do DSL e a curva padrão do IOT¹¹². Os valores de AMH estavam previstos para se correlacionarem com ambos os *kits*, sobretudo com o IOT, uma vez que ambos usam a mesma curva de calibração, mas, são mais elevados do que aqueles obtidos pelo DSL¹¹².

No presente estudo, o ensaio imunoenzimático AMH Gen II atingiu todos os critérios de validação preestabelecidos para aceitação dos resultados e implantação do

método na rotina laboratorial. A sensibilidade analítica e funcional, bem como a precisão intra e interensaio, linearidade e paralelismo apresentaram-se compatíveis com os dados de validação desse mesmo ensaio publicados anteriormente^{104, 111}.

Os valores séricos de AMH foram comparados entre amostras frescas e armazenadas a -20°C por 90 dias, sendo observada variação aceitável de até 6,3%, indicando que as amostras são estáveis frente à proteólise desencadeada pelo armazenamento¹⁰⁶. Dois estudos recentes avaliaram a estabilidade de amostras armazenadas a -20°C, utilizando o ensaio Gen II. Kumar *et al.*¹⁰⁴ reportaram < 1% de variação em amostras armazenadas por 7 dias, Rustamov *et al.*¹¹² encontraram 23% de variação nos valores de AMH em amostras armazenadas por 5 dias. Esses resultados discrepantes não foram explicados.

Observamos forte correlação entre o Gen II e o IOT, assim como outros pesquisadores^{104, 110}. Contudo, inversamente ao esperado encontramos valores de AMH, em média, 33% mais baixos comparados àqueles obtidos pelo IOT. Neste estudo, o longo período de armazenamento das amostras dosadas inicialmente pelo ensaio IOT (em média 2 anos) e, posteriormente, pelo Gen II pode explicar estes resultados.

5.2 Valores normativos de AMH e influências do uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e índice massa corpórea

Em nosso grupo de controles femininos, encontramos declínio nos valores séricos de AMH com o aumento da idade, assim como outros autores¹⁶⁻¹⁸. A mediana dos valores de AMH foi 2,6 ng/mL, La Marca *et al.*¹⁷ e Lie Fong *et al.*¹⁸ observaram mediana de 3,4 e 3,3 ng/mL, respectivamente, em mulheres com idade entre 0-50 anos.

Observamos ampla variabilidade interindividual nas concentrações de AMH, sabemos que as variações nos valores de AMH podem ser determinadas não apenas pela idade¹⁶⁻¹⁸, mas também pela presença de SOP⁶⁷⁻⁶⁹, menopausa⁴⁶⁻⁴⁸, número de folículos produtores de AMH^{26, 44} e predisposição genética¹⁸. Todas as mulheres incluídas neste estudo apresentaram valores normais de LH e FSH, declararam ciclos menstruais regulares e nenhuma história conhecida de ovário policístico ou infertilidade. Entretanto, a seleção dos indivíduos foi realizada mediante questionário e avaliação laboratorial, nenhuma avaliação clínica e/ou ultrassonográfica, bem como investigação de hirsutismo e/ou hiperandrogenemia foi realizada, limitação que pode ter contribuído para a inclusão de mulheres com SOP.

No presente estudo, encontramos valores de AMH < 1,4 ng/mL em todas as mulheres acima de 40 anos e em 19% das mulheres com idade entre 18-40 anos. Recentemente, Hagen *et al.*¹²² avaliaram a capacidade do AMH para prever fecundabilidade em mulheres saudáveis de 20-35 anos. Os resultados demonstraram que valores baixos de AMH (0,0-1,8 ng/mL) não previram fecundabilidade reduzida, sugerindo que valores baixos de AMH em mulheres jovens não poderiam estar necessariamente relacionados à reserva ovariana diminuída. Por outro lado, mulheres com valores altos de AMH apresentaram maior incidência de subfecundidade, fato explicado por uma possível associação com a presença da SOP¹²². A capacidade do AMH em prever a idade para a menopausa foi avaliada por Freeman *et al.*¹²³, os autores observaram que, para valores de AMH < 1,5 ng/mL, a média do tempo para a menopausa foi de 6 anos às mulheres com idade entre 45-48 anos e acima de 13 anos às mulheres com idade entre 35-39 anos¹²³.

Neste trabalho, não encontramos diferença nos valores séricos de AMH entre usuárias e não usuárias de contraceptivos hormonais, mulheres tabagistas e não

tabagistas e entre obesas e não obesas, assim como outros pesquisadores^{28-30, 35-37, 40, 41}. Controversamente, diversos estudos recentes demonstraram influência do uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e IMC sobre os valores de AMH^{27, 31-34, 38, 39}. Diante desses resultados, fica evidente que os questionamentos referentes às influências dessas variáveis sobre os valores de AMH permanecem. Outros estudos são necessários para elucidar tais questões.

Em nosso grupo de controles masculinos, a mediana dos valores séricos de AMH foi 6,0 ng/mL. Aksglaede *et al.*⁸⁸ e Grinspon *et al.*¹⁰³ descreveram mediana semelhante em homens com idade entre 18-60 anos: 6,0 e 7,8 ng/mL, respectivamente. Além disso, em concordância com os mesmos autores, observamos valores de AMH significativamente maiores do que no sexo feminino e ampla variação entre os indivíduos. Em contraste, apesar de encontrarmos correlação negativa entre os valores de AMH e a idade, esta correlação não foi significativa.

Não verificamos diferença nos valores de AMH entre homens tabagistas e não tabagistas. Por outro lado, observamos redução nos valores de AMH com aumento do IMC. Embora o grupo de homens obesos seja constituído de apenas seis controles, neste grupo, os valores de AMH foram significativamente reduzidos, porém, com os demais hormônios dentro da normalidade e valores de AMH encontrados entre indivíduos com peso normal. Em 2012, Pietiläinen *et al.*⁹⁰ estudaram as concentrações séricas de AMH em 128 homens adultos e também observaram valores diminuídos de AMH em homens obesos. Os pesquisadores sugeriram que a obesidade pode exercer efeito negativo sobre a função das células de Sertoli, por um mecanismo ainda não elucidado⁹⁰. Outro fator potencial é a IC maior no grupo de homens obesos, uma vez que a média do IMC aumenta com a idade e os valores de AMH diminuem, a relação entre AMH e IMC pode ser influenciada pela idade.

5.3 Aplicabilidade clínica do AMH

5.3.1 Síndrome de Turner

A maior parte das mulheres com ST tem digenesia gonadal com reserva ovariana diminuída, resultando na ausência de desenvolvimento puberal, infertilidade e menopausa precoce. Sinais de puberdade espontânea, cariótipo mosaico e valores baixos de FSH são fatores preditivos de função ovariana preservada na ST⁶². Estudos recentes sugerem que valores de AMH detectáveis em pacientes com ST podem ser um bom marcador bioquímico de função ovariana preservada^{16, 62, 64}. Além disso, em 2013, Visser *et al.*⁶² demonstraram que a terapia com GH pode aumentar a probabilidade para encontrar AMH detectável na ST⁶².

No presente estudo, nenhuma paciente com ST apresentou AMH detectável, independentemente do uso ou não de GH. De acordo com três estudos recentes, na ST o AMH é detectável em média em 22% das pacientes, sendo 13% na ST cariótipo 45,X, 92% na ST cariótipo 45,X/46,XX e 35% na ST com cariótipos diversos^{16, 62, 64}. A maior parte de nossas pacientes exibiu cariótipos que estão associados à forma mais severa da ST, apenas cinco pacientes (7%) exibiram cariótipo 45,X/46,XX. Logo, a diferença entre nossos resultados e os achados da literatura parecem estar relacionados à predominância do cariótipo 45,X e miscelânea. Além disso, o desenho deste estudo pode ter contribuído com os resultados observados, uma vez que as determinações de AMH não foram realizadas no momento do diagnóstico, quando essas pacientes poderiam apresentar AMH detectável.

5.3.2 Síndrome do ovário policístico

Estudos recentes apontam para o AMH, como uma ferramenta útil no diagnóstico da SOP, quando associada aos consensos diagnósticos preestabelecidos^{66, 77, 78}. Em nosso grupo de mulheres com SOP, a média dos valores séricos de AMH foi 9,2 ng/mL. Este resultado está em concordância com os achados de Woo *et al.*¹²⁴ e Homburg *et al.*⁷⁷ que observaram média semelhante: 11,6 e 10,8 ng/mL, respectivamente.

A sobreposição nos valores de AMH entre mulheres normais e mulheres com SOP observada no presente estudo, também foi descrita por outros autores^{66, 77}. Já discutimos que mulheres normais sem ovário policístico podem apresentar valores elevados de AMH e vice-versa¹⁶⁻¹⁸. Embora valores elevados de AMH possam estar até 75 vezes aumentados na SOP⁶⁸, valores baixos também são observados mesmo naquelas com ovário policístico⁶⁶.

No presente estudo, encontramos correlação positiva e significativa entre os valores séricos de AMH e testosterona total em mulheres com SOP, estes resultados estão de acordo com os estudos de Rosenfield *et al.*⁶⁶ e Begawy *et al.*¹²⁵. Em contraste, enquanto os mesmos pesquisadores descreveram correlação positiva e significativa entre os valores séricos de AMH e o volume ovariano, não observamos tais resultados. O fato das informações sobre o volume ovariano não estar disponível a todas as pacientes pode ter contribuído com nossos achados.

Diversos autores^{66, 76-78} estabeleceram valores de corte de AMH na tentativa de substituir a morfologia ovariana no diagnóstico da SOP, alguns com considerável sensibilidade e especificidade^{66, 78}, outros, nem tanto^{76, 77}. Recentemente, Eilertsen *et al.*¹²⁶ utilizando os critérios de Rotterdam, substituíram a morfologia ovariana por um

cut-off de AMH de 2,8 ng/mL e identificaram a SOP com 95% e 97% de sensibilidade e especificidade, respectivamente¹²⁶. Os achados de Lauritsen *et al.*⁷⁸ apoiam esses resultados.

O uso dos valores séricos de AMH tem aplicabilidade no diagnóstico da SOP, porém, a grande sobreposição entre mulheres normais e com SOP exige cautela nesta interpretação. Os valores de AMH isoladamente não confirmam o diagnóstico de SOP e devem ser associados aos critérios dos consensos estabelecidos para o diagnóstico desta patologia.

5.3.3 Criptorquidismo

O criptorquidismo é a falha na descida de um ou ambos os testículos para o escroto, e é o defeito congênito mais frequente observado em crianças do sexo masculino⁹⁷. O teste de estímulo com hCG é utilizado para avaliar a função testicular de meninos pré-puberais. O diagnóstico precoce de insuficiência testicular evita o atraso terapêutico, reduzindo complicações metabólicas, perda de massa óssea e anormalidades psicossociais¹²⁷.

Em 2010, Ahmed *et al.*¹²⁷ avaliaram a concordância entre os valores séricos de AMH e testosterona em 26 meninos com malformações genitais submetidos ao teste de estímulo com hCG com duração de 3 semanas. Os resultados demonstraram que a concordância entre o AMH e a testosterona pós-estímulo foi dependente da duração do teste, uma vez que a melhor concordância observada entre os hormônios (73%) foi no 22º dia do teste quando comparadas àquelas observadas nos 1º e 4º dias¹²⁷.

No presente estudo, os valores séricos de AMH observados nos pacientes com criptorquidismo foram avaliados, de acordo com os valores de referências descritos por

Grinspon *et al.*¹⁰³. Em nosso grupo, encontramos 74% de concordância entre os valores basais de AMH e TESTO pós-estímulo com rhCG, sugerindo que valores normais de AMH basal provêm informações úteis a respeito da função testicular, mas não excluem a necessidade do teste. Os pacientes com AMH basal e/ou TESTO pós-estímulo anormais necessitam de seguimento clínico para confirmar ou excluir a disfunção gonadal.

Em resumo, validamos o ensaio AMH Gen II e observamos que esse ensaio é confiável para a determinação sérica do AMH. Estabelecemos valores normativos de AMH com ampla faixa de normalidade em ambos os sexos e observamos a influência do IMC sobre o AMH em homens obesos, contudo, nesse grupo as concentrações séricas de AMH encontravam-se dentro do intervalo de indivíduos com peso normal. Não observamos valores de AMH detectáveis em nossas pacientes com ST, mas verificamos valores elevados de AMH em mulheres com SOP. Em meninos com criptorquidismo, um AMH normal provê informação útil sobre a função testicular, mas não exclui a necessidade do teste de estímulo com rhCG. Dessa forma, nosso trabalho confirma os dados encontrados na literatura.

6 Conclusões

- O ensaio imunoenzimático AMH Gen II atingiu todos os critérios de validação para aceitação dos resultados e implantação do método na rotina laboratorial;
- Os valores normativos de AMH apresentaram ampla faixa de variabilidade em ambos os sexos;
- O uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e IMC não influenciou os valores de AMH no sexo feminino. No sexo masculino, os valores de AMH foram significativamente reduzidos com o aumento do IMC, contudo, os valores de AMH permaneceram dentro do intervalo observado no grupo de indivíduos com peso normal;
- Em pacientes com ST, o AMH não foi detectável, podendo refletir a predominância de cariótipos associados à forma mais severa da ST e, a coleta em uma fase tardia na maioria das pacientes. O potencial uso desse hormônio para avaliar a reserva ovariana na ST exige estudos longitudinais;
- A média dos valores de AMH foi significativamente maior em pacientes com SOP. A sobreposição nos valores de AMH entre mulheres normais e com SOP limita seu uso para diagnóstico dessa patologia. O uso do AMH como critério diagnóstico deve ser baseado na associação com os critérios previamente estabelecidos; e
- Em meninos com criptorquidismo, um AMH normal provê informação útil sobre a função testicular, mas não exclui a necessidade do teste de estímulo com rhCG, pacientes com resultados discordantes necessitam de acompanhamento clínico.

7 Referências

1. Rey R. Anti-Müllerian hormone in disorders of sex determination and differentiation. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005 Feb;49(1):26-36.
2. Jost A. The age factor in the castration of male rabbit fetuses. *Proc Soc Exp Biol Med [Internet]*. 1947; 66:[302 p.].
3. di Clemente N, Jamin SP, Lugovskoy A, Carmillo P, Ehrenfels C, Picard JY, et al. Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-beta. *Mol Endocrinol*. 2010 Nov;24(11):2193-206.
4. Al-Qahtani A, Muttukrishna S, Appasamy M, Johns J, Cranfield M, Visser JA, et al. Development of a sensitive enzyme immunoassay for anti-Mullerian hormone and the evaluation of potential clinical applications in males and females. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 Sep;63(3):267-73.
5. Broekmans FJ, Visser JA, Laven JSE, Broer SL, Themmen APN, Fauser BC. Anti-Mullerian hormone and ovarian dysfunction. *Trends Endocrinol Metab*. 2008 Nov; 19(9):340-7.
6. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, et al. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Hum Reprod Update*. 2014 Jan.
7. van Houten EL, Themmen AP, Visser JA. Anti-Müllerian hormone (AMH): regulator and marker of ovarian function. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2010 May;71(3): 191-7.
8. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999 Dec;140(12):5789-96.

9. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2002 Mar;143(3):1076-84.
10. Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen AP, Hovatta O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod*. 2006 Sep;21(9):2223-7.
11. Schmidt KL, Kryger-Baggesen N, Byskov AG, Andersen CY. Anti-Müllerian hormone initiates growth of human primordial follicles in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. 2005 Apr;234(1-2):87-93.
12. Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, et al. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice. *Endocrinology*. 2007 May;148(5):2301-8.
13. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001 Nov;142(11):4891-9.
14. Grossman MP, Nakajima ST, Fallat ME, Siow Y. Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertil Steril*. 2008 May;89(5 Suppl):1364-70.
15. Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of anti-Müllerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Oct;91(10):4064-9.
16. Hagen CP, Aksglaede L, Sorensen K, Main KM, Boas M, Cleemann L, et al. Serum levels of anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian function in 926 healthy females from birth to adulthood and in 172 Turner syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Nov;95(11):5003-10.

17. La Marca A, Sighinolfi G, Giulini S, Traglia M, Argento C, Sala C, et al. Normal serum concentrations of anti-Müllerian hormone in women with regular menstrual cycles. *Reprod Biomed Online*. 2010 Oct;21(4):463-9.
18. Lie Fong S, Visser JA, Welt CK, de Rijke YB, Eijkemans MJ, Broekmans FJ, et al. Serum anti-müllerian hormone levels in healthy females: a nomogram ranging from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Dec;97(12):4650-5.
19. La Marca A, Grisendi V, Griesinger G. How much does AMH really vary in normal women? *Int J Endocrinol*. 2013;2013:9594-87.
20. Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJ. Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Oct;91(10):4057-63.
21. La Marca A, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A. Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod*. 2006 Dec;21(12):3103-7.
22. Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy C, Englert Y. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod*. 2007 Jul;22(7):1837-40.
23. Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME. Serum müllerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril*. 2000 Apr;73(4):859-61.
24. Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, Kretschmer R, Birkhauser MH. Statistically significant changes of antimüllerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women. *Fertil Steril*. 2008 Apr;89(4):927-33.
25. Sowers M, McConnell D, Gast K, Zheng H, Nan B, McCarthy JD, et al. Anti-Müllerian hormone and inhibin B variability during normal menstrual cycles. *Fertil Steril*. 2010 Sep;94(4):1482-6.

26. Deb S, Campbell BK, Clewes JS, Pincott-Allen C, Raine-Fenning NJ. Intracycle variation in number of antral follicles stratified by size and in endocrine markers of ovarian reserve in women with normal ovulatory menstrual cycles. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013 Feb;41(2):216-22.
27. Kallio S, Puurunen J, Ruukonen A, Vaskivuo T, Piltonen T, Tapanainen JS. Antimüllerian hormone levels decrease in women using combined contraception independently of administration route. *Fertil Steril.* 2013 Apr;99(5):1305-10.
28. Streuli I, Fraisse T, Pillet C, Ibecheole V, Bischof P, de Ziegler D. Serum antimüllerian hormone levels remain stable throughout the menstrual cycle and after oral or vaginal administration of synthetic sex steroids. *Fertil Steril.* 2008 Aug;90(2):395-400.
29. Steiner AZ, Stanczyk FZ, Patel S, Edelman A. Antimüllerian hormone and obesity: insights in oral contraceptive users. *Contraception.* 2010 Mar;81(3):245-8.
30. Li HW, Wong CY, Yeung WS, Ho PC, Ng EH. Serum anti-müllerian hormone level is not altered in women using hormonal contraceptives. *Contraception.* 2011 Jun;83(6):582-5.
31. Kristensen SL, Ramlau-Hansen CH, Andersen CY, Ernst E, Olsen SF, Bonde JP, et al. The association between circulating levels of antimüllerian hormone and follicle number, androgens, and menstrual cycle characteristics in young women. *Fertil Steril.* 2012 Mar;97(3):779-85.
32. Bentzen JG, Forman JL, Pinborg A, Lidegaard Ø, Larsen EC, Friis-Hansen L, et al. Ovarian reserve parameters: a comparison between users and non-users of hormonal contraception. *Reprod Biomed Online.* 2012 Dec;25(6):612-9.
33. Plante BJ, Cooper GS, Baird DD, Steiner AZ. The impact of smoking on antimüllerian hormone levels in women aged 38 to 50 years. *Menopause.* 2010 May-Jun;17(3):571-6.

34. Sowers MR, McConnell D, Yosef M, Jannausch ML, Harlow SD, Randolph JF. Relating smoking, obesity, insulin resistance, and ovarian biomarker changes to the final menstrual period. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1204:95-103.
35. Waylen AL, Jones GL, Ledger WL. Effect of cigarette smoking upon reproductive hormones in women of reproductive age: a retrospective analysis. *Reprod Biomed Online.* 2010 Jun;20(6):861-5.
36. La Marca A, Spada E, Grisendi V, Argento C, Papaleo E, Milani S, et al. Normal serum anti-Müllerian hormone levels in the general female population and the relationship with reproductive history. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012 Aug;163(2):180-4.
37. Sahmay S, Usta T, Erel CT, Imamoğlu M, Küçük M, Atakul N, et al. Is there any correlation between amh and obesity in premenopausal women? *Arch Gynecol Obstet.* 2012 Sep;286(3):661-5.
38. Freeman EW, Gracia CR, Sammel MD, Lin H, Lim LC, Strauss JF. Association of anti-mullerian hormone levels with obesity in late reproductive-age women. *Fertil Steril.* 2007 Jan;87(1):101-6.
39. Su HI, Sammel MD, Freeman EW, Lin H, DeBlasis T, Gracia CR. Body size affects measures of ovarian reserve in late reproductive age women. *Menopause.* 2008 Sep-Oct;15(5):857-61.
40. Halawaty S, ElKattan E, Azab H, ElGhamry N, Al-Inany H. Effect of obesity on parameters of ovarian reserve in premenopausal women. *J Obstet Gynaecol Can.* 2010 Jul;32(7):687-90.
41. Shaw CM, Stanczyk FZ, Eggleston BL, Kahle LL, Spittle CS, Godwin AK, et al. Serum antimüllerian hormone in healthy premenopausal women. *Fertil Steril.* 2011 Jun;95(8):2718-21.

42. Ledger WL. Clinical utility of measurement of anti-Mullerian hormone in reproductive endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Dec;95(12):5144-54.
43. Grynberg M, Genro V, Gallot V, El-Ali A, Frydman R, Fanchin R. Early follicle development during the luteal-follicular transition affects the predictability of serum follicle-stimulating hormone but not antimüllerian hormone levels on cycle day 3. *Fertil Steril.* 2010 Oct;94(5):1827-31.
44. Wiweko B, Prawesti DM, Hestiantoro A, Sumapraja K, Natadisastra M, Baziad A. Chronological age vs biological age: an age-related normogram for antral follicle count, FSH and anti-Mullerian hormone. *J Assist Reprod Genet.* 2013 Dec;30(12):1563-7.
45. van Rooij IA, Tonkelaar I, Broekmans FJ, Looman CW, Scheffer GJ, de Jong FH, et al. Anti-müllerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause.* 2004 2004 Nov-Dec;11(6 Pt 1):601-6.
46. Tehrani FR, Solaymani-Dodaran M, Tohidi M, Gohari MR, Azizi F. Modeling age at menopause using serum concentration of anti-mullerian hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Feb;98(2):729-35.
47. Sowers MR, Eyvazzadeh AD, McConnell D, Yosef M, Jannausch ML, Zhang DW, et al. Anti-Mullerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Sep;93(9):3478-83.
48. Kaori I, Ayako T, Kazuhiro A, Ryosuke T, Tsuyoshi H, Ippei T, et al. Role of antimüllerian hormone as a biomarker of the menopausal transition. *Menopause.* 2013 Feb;20(2):218-22.
49. Broer SL, Eijkemans MJ, Scheffer GJ, van Rooij IA, de Vet A, Themmen AP, et al. Anti-mullerian hormone predicts menopause: a long-term follow-up study in normoovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Aug;96(8):2532-9.

-
50. Dólleman M, Depmann M, Eijkemans MJ, Heimensem J, Broer SL, van der Stroom EM, et al. Anti-Mullerian hormone is a more accurate predictor of individual time to menopause than mother's age at menopause. *Hum Reprod*. 2014 Mar; 29(3): 584-91.
51. Gracia CR, Sammel MD, Freeman E, Prewitt M, Carlson C, Ray A, et al. Impact of cancer therapies on ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2012 Jan;97(1):134-40.e1.
52. Loh JS, Maheshwari A. Anti-Mullerian hormone--is it a crystal ball for predicting ovarian ageing? *Hum Reprod*. 2011 Nov;26(11):2925-32.
53. Brougham MF, Crofton PM, Johnson EJ, Evans N, Anderson RA, Wallace WH. Anti-Müllerian hormone is a marker of gonadotoxicity in pre- and postpubertal girls treated for cancer: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jun;97(6): 2059-67.
54. Decanter C, Morschhauser F, Pigny P, Lefebvre C, Gallo C, Dewailly D. Anti-Müllerian hormone follow-up in young women treated by chemotherapy for lymphoma: preliminary results. *Reprod Biomed Online*. 2010 Feb;20(2):280-5.
55. Lie Fong S, Laven JS, Hakvoort-Cammel FG, Schipper I, Visser JA, Themmen AP, et al. Assessment of ovarian reserve in adult childhood cancer survivors using anti-Müllerian hormone. *Hum Reprod*. 2009 Apr;24(4):982-90.
56. Anderson RA, Cameron DA. Pretreatment serum anti-müllerian hormone predicts long-term ovarian function and bone mass after chemotherapy for early breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 May;96(5):1336-43.
57. Yu B, Douglas N, Ferin MJ, Nakhuda GS, Crew K, Lobo RA, et al. Changes in markers of ovarian reserve and endocrine function in young women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy. *Cancer*. 2010 May;116(9):2099-105.

-
58. Iwase A, Hirokawa W, Goto M, Takikawa S, Nagatomo Y, Nakahara T, et al. Serum anti-Müllerian hormone level is a useful marker for evaluating the impact of laparoscopic cystectomy on ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2010 Dec;94(7):2846-9.
59. Chang HJ, Han SH, Lee JR, Jee BC, Lee BI, Suh CS, et al. Impact of laparoscopic cystectomy on ovarian reserve: serial changes of serum anti-Müllerian hormone levels. *Fertil Steril*. 2010 Jun;94(1):343-9.
60. Celik HG, Dogan E, Okyay E, Ulukus C, Saatli B, Uysal S, et al. Effect of laparoscopic excision of endometriomas on ovarian reserve: serial changes in the serum antimüllerian hormone levels. *Fertil Steril*. 2012 Jun;97(6):1472-8.
61. Hagen CP, Main KM, Kjaergaard S, Juul A. FSH, LH, inhibin B and estradiol levels in Turner syndrome depend on age and karyotype: longitudinal study of 70 Turner girls with or without spontaneous puberty. *Hum Reprod*. 2010 Dec;25(12):3134-41.
62. Visser JA, Hokken-Koelega AC, Zandwijken GR, Limacher A, Ranke MB, Flück CE. Anti-Müllerian hormone levels in girls and adolescents with Turner syndrome are related to karyotype, pubertal development and growth hormone treatment. *Hum Reprod*. 2013 Mar.
63. van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, et al. Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril*. 2005 Apr;83(4):979-87.
64. Borgström B, Birgit B, Hreinsson J, Julius H, Rasmussen C, Carsten R, et al. Fertility preservation in girls with turner syndrome: prognostic signs of the presence of ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Jan;94(1):74-80.

-
65. Broekmans FJ, Knauff EA, Valkenburg O, Laven JS, Eijkemans MJ, Fauser BC. PCOS according to the Rotterdam consensus criteria: Change in prevalence among WHO-II anovulation and association with metabolic factors. *BJOG*. 2006 Oct;113(10):1210-7.
66. Rosenfield RL, Wroblewski K, Padmanabhan V, Littlejohn E, Mortensen M, Ehrmann DA. Antimüllerian hormone levels are independently related to ovarian hyperandrogenism and polycystic ovaries. *Fertil Steril*. 2012 Jul;98(1):242-9.
67. Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, et al. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet*. 2003 Sep;362(9389):1017-21.
68. Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whitehead S, et al. Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jan;92(1):240-5.
69. Mulders AG, Laven JS, Eijkemans MJ, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Changes in anti-Müllerian hormone serum concentrations over time suggest delayed ovarian ageing in normogonadotrophic anovulatory infertility. *Hum Reprod*. 2004 Sep;19(9):2036-42.
70. Jonard S, Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum Reprod Update*. 2004 2004 Mar-Apr;10(2):107-17.
71. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, et al. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril*. 2011 Nov;96(5):1246-51.e1.
72. Li Y, Wei LN, Liang XY. Follicle-stimulating hormone suppressed excessive production of antimüllerian hormone caused by abnormally enhanced promoter activity in polycystic ovary syndrome granulosa cells. *Fertil Steril*. 2011 Jun;95(7):2354-8, 8.e1.

-
73. Dunaif A, Thomas A. Current concepts in the polycystic ovary syndrome. *Annu Rev Med.* 2001;52:401-19.
74. Group REA-SPCW. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004 Jan;81(1): 19-25.
75. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Nov;91(11):4237-45.
76. Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Serum anti-Mullerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar;91(3):941-5.
77. Homburg R, Ray A, Bhide P, Gudi A, Shah A, Timms P, et al. The relationship of serum anti-Mullerian hormone with polycystic ovarian morphology and polycystic ovary syndrome: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 2013 Apr;28(4):1077-83.
78. Lauritsen MP, Bentzen JG, Pinborg A, Loft A, Forman JL, Thuesen LL, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a normal population according to the Rotterdam criteria versus revised criteria including anti-Mullerian hormone. *Hum Reprod.* 2014 Apr;29(4):791-801.
79. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artenisio AC, et al. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update.* 2010 Mar-Apr;16(2):113-30.
80. La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamaro LF, Orvieto R, Levratti P, et al. Anti-Müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Hum Reprod.* 2004 Dec;19(12):2738-41.

81. Broer SL, Mol B, Dólleman M, Fauser BC, Broekmans FJ. The role of anti-Müllerian hormone assessment in assisted reproductive technology outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2010 Jun;22(3):193-201.
82. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. A prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril*. 2010 Feb;93(3):855-64.
83. Nardo LG, Gelbaya TA, Wilkinson H, Roberts SA, Yates A, Pemberton P, et al. Circulating basal anti-Müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2009 Nov;92(5):1586-93.
84. Hussain M, Cahill D, Akande V, Gordon U. Discrepancies between Antimullerian hormone and Follicle Stimulating Hormone in Assisted Reproduction. *Hindawi [Internet]*. 2013; 2013:[1-6 pp.].
85. La Marca A, Volpe A. Anti-Mullerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol*. 2006 Jun;64(6):603-10.
86. Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, et al. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Feb;81(2):571-6.
87. Sir-Petermann T, Márquez L, Cárcamo M, Hitschfeld C, Codner E, Maliqueo M, et al. Effects of birth weight on anti-mullerian hormone serum concentrations in infant girls. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Feb;95(2):903-10.
88. Aksglaede L, Sorensen K, Boas M, Mouritsen A, Hagen CP, Jensen RB, et al. Changes in anti-Mullerian hormone (AMH) throughout the life span: A population-based study of 1027 healthy males from birth (cord blood) to the age of 69 years. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Dec;95(12):5357-64.

89. Grinspon RP, Rey RA. Anti-Mullerian hormone and Sertoli cell function in paediatric male hypogonadism. *Horm Res Paediatr.* 2010;73(2):81-92.
90. Pietiläinen KH, Kaprio J, Vaaralahti K, Rissanen A, Raivio T. Circulating anti-Mullerian hormone levels in adult men are under a strong genetic influence. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jan;97(1):E161-4.
91. Lyet L, Louis F, Forest MG, Josso N, Behringer RR, Vigier B. Ontogeny of reproductive abnormalities induced by deregulation of anti-müllerian hormone expression in transgenic mice. *Biol Reprod.* 1995 Feb;52(2):444-54.
92. Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, Palmiter RD, Brinster RL. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing müllerian inhibiting substance. *Nature.* 1990 May;345(6271):167-70.
93. Fujisawa M, Yamasaki T, Okada H, Kamidono S. The significance of anti-Müllerian hormone concentration in seminal plasma for spermatogenesis. *Hum Reprod.* 2002 Apr;17(4):968-70.
94. Rey RA, Grinspon RP. Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011 Apr;25(2):221-38.
95. Hughes IA. Disorders of Sex Development Preface. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010 Apr;24(2):VII-VII.
96. Coutant R, Biette-Demeneix E, Bouvattier C, Bouhours-Nouet N, Gatelais F, Dufresne S, et al. Baseline inhibin B and anti-Mullerian hormone measurements for diagnosis of hypogonadotropic hypogonadism (HH) in boys with delayed puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Dec;95(12):5225-32.
97. Josso N, Rey RA, Picard JY. Anti-Müllerian Hormone: A Valuable Addition to the Toolbox of the Pediatric Endocrinologist. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:674105.

98. Appasamy M, Muttukrishna S, Pizzey AR, Ozturk O, Groome NP, Serhal P, et al. Relationship between male reproductive hormones, sperm DNA damage and markers of oxidative stress in infertility. *Reprod Biomed Online*. 2007 Feb;14(2):159-65.
99. Tüttelmann F, Dykstra N, Themmen AP, Visser JA, Nieschlag E, Simoni M. Anti-Müllerian hormone in men with normal and reduced sperm concentration and men with maldescended testes. *Fertil Steril*. 2009 May;91(5):1812-9.
100. Muttukrishna S, Yussoff H, Naidu M, Barua J, Arambage K, Suharjono H, et al. Serum anti-Müllerian hormone and inhibin B in disorders of spermatogenesis. *Fertil Steril*. 2007 Aug;88(2):516-8.
101. Isikoglu M, Ozgur K, Oehninger S, Ozdem S, Seleker M. Serum anti-Müllerian hormone levels do not predict the efficiency of testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *Gynecol Endocrinol*. 2006 May;22(5):256-60.
102. Goulis DG, Tsametis C, Iliadou PK, Polychronou P, Kantartzi PD, Tarlatzis BC, et al. Serum inhibin B and anti-Müllerian hormone are not superior to follicle-stimulating hormone as predictors of the presence of sperm in testicular fine-needle aspiration in men with azoospermia. *Fertil Steril*. 2009 Apr;91(4):1279-84.
103. Grinspon RP, Bedecarrás P, Ballerini MG, Iñiguez G, Rocha A, Mantovani Rodrigues Resende EA, et al. Early onset of primary hypogonadism revealed by serum anti-Müllerian hormone determination during infancy and childhood in trisomy 21. *Int J Androl*. 2011 Oct;34(5 Pt 2):e487-98.
104. Kumar A, Kalra B, Patel A, McDavid L, Roudebush WE. Development of a second generation anti-Mullerian hormone (AMH) ELISA. *J Immunol Methods*. 2010 Oct;362(1-2):51-9.
105. Hudson PL, Dougas I, Donahoe PK, Cate RL, Epstein J, Pepinsky RB, et al. An immunoassay to detect human müllerian inhibiting substance in males and females during normal development. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 Jan;70(1):16-22.

-
106. Nelson SM, La Marca A. The journey from the old to the new AMH assay: how to avoid getting lost in the values. *Reprod Biomed Online*. 2011 Oct;23(4):411-20.
107. Streuli I, Fraise T, Chapron C, Bijaoui G, Bishof P, de Ziegler D. Clinical uses of anti-Mullerian hormone assays: pitfalls and promises. *Fertil Steril*. 2009 Jan;91(1):226-30.
108. Bersinger NA, Wunder D, Birkhäuser MH, Guibourdenche J. Measurement of anti-mullerian hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA in assisted reproduction: differences between serum and follicular fluid. *Clin Chim Acta*. 2007 Sep;384(1-2):174-5.
109. Freour T, Mirallie S, Bach-Ngohou K, Denis M, Barriere P, Masson D. Measurement of serum Anti-Mullerian hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA: Comparison and relevance in Assisted Reproduction Technology (ART). *Clin Chim Acta*. 2007 Jan;375(1-2):162-4.
110. Li HW, Ng EH, Wong BP, Anderson RA, Ho PC, Yeung WS. Correlation between three assay systems for anti-Müllerian hormone (AMH) determination. *J Assist Reprod Genet*. 2012 Dec;29(12):1443-6.
111. Wallace AM, Faye SA, Fleming R, Nelson SM. A multicentre evaluation of the new Beckman Coulter anti-Mullerian hormone immunoassay (AMH Gen II). *Ann Clin Biochem*. 2011 Jul;48(Pt 4):370-3.
112. Rustamov O, Smith A, Roberts SA, Yates AP, Fitzgerald C, Krishnan M, et al. Anti-Mullerian hormone: poor assay reproducibility in a large cohort of subjects suggests sample instability. *Hum Reprod*. 2012 Oct;27(10):3085-91.
113. Mendes ME. Validação de sistema analítico. *Gestão da Fase Analítica do Laboratório*. 2010;I(II):15-38. Epub 1º edition digital.

114. Balen AH, Laven JS, Tan SL, Dewailly D. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update*. 2003 Nov-Dec;9(6):505-14.
115. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1961 Nov;21:1440-7.
116. Marcondes JA, Barcellos CR, Rocha MP. [Difficulties and pitfalls in the diagnosis of polycystic ovary syndrome]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011 Feb;55(1):6-15.
117. NCCLS. Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods. Proposed Guidelines EP-6. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1986a.
118. NCCLS. Interference Testing in Clinical Chemistry. Proposed Guidelines EP7-P. Wayne, PA: National Committee Laboratory Standards; 1986b.
119. NCCLS. Method Comparison and Bias Estimation using Patient Samples. Approved Guidelines EP9-A: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1995.
120. NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guidelines EP5-A. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1999.
121. NCCLS. Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation. Approved Guideline EP17-A. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2004. p. 664.
122. Hagen CP, Vestergaard S, Juul A, Skakkebaek NE, Andersson AM, Main KM, et al. Low concentration of circulating antimüllerian hormone is not predictive of reduced fecundability in young healthy women: a prospective cohort study. *Fertil Steril*. 2012 Dec;98(6):1602-8.e2.

-
123. Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Gracia CR. Anti-mullerian hormone as a predictor of time to menopause in late reproductive age women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 May;97(5):1673-80.
124. Woo HY, Kim KH, Rhee EJ, Park H, Lee MK. Differences of the association of anti-Müllerian hormone with clinical or biochemical characteristics between women with and without polycystic ovary syndrome. *Endocr J.* 2012 Sep;59(9):781-90.
125. Begawy AF, El-Mazny AN, Abou-Salem NA, El-Taweel NE. Anti-Mullerian hormone in polycystic ovary syndrome and normo-ovulatory women: Correlation with clinical, hormonal and ultrasonographic parameters. *Middle East Fertility Society Journal.* 2010;15(1):253-8. Epub Sep.
126. Eilertsen TB, Vanky E, Carlsen SM. Anti-Mullerian hormone in the diagnosis of polycystic ovary syndrome: can morphologic description be replaced? *Hum Reprod.* 2012 Aug;27(8):2494-502.
127. Ahmed SF, Keir L, McNeilly J, Galloway P, O'Toole S, Wallace AM. The concordance between serum anti-Mullerian hormone and testosterone concentrations depends on duration of hCG stimulation in boys undergoing investigation of gonadal function. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010 Jun;72(6):814-9.

Apêndice

APÊNDICE A

Questionário para o sexo feminino

Nome: _____

DN: ____ / ____ / ____

Idade: _____ anos

Peso: _____ Kg

Altura: _____ m

1. Você tem ou já teve quadro clínico de doenças graves?

() Sim

() Não

2. Seu ciclo menstrual costuma ser:

() Regular

() Irregular

3. Você menstruou regularmente nos últimos 3 meses?

() Sim

() Não

4. Você usa anticoncepcional?

() Sim

() Não

5. Você tem história de ovário policístico?

() Sim

() Não

6. Você tem ou já teve problemas relacionados à fertilidade?

() Sim

() Não, nº de filhos _____.

7. Você tem história cirúrgica para retirada total e/ou parcial do útero e /ou ovários?

() Sim

() Não

8. Você é fumante?

() Sim

() Não

Questionário para o sexo masculino

Nome: _____

DN: ____/____/____

Idade: _____ anos

Peso: _____ Kg

Altura: _____ m

1. Você tem ou já teve quadro clínico de doenças graves?

() Sim

() Não

2. Você tem ou já teve problemas relacionados à fertilidade?

() Sim

() Não, nº filhos _____.

3. Você tem história cirúrgica para retirada total e/ou parcial dos testículos?

() Sim

() Não

4. Você é fumante?

() Sim

() Não

APÊNDICE B - Dados clínicos e hormonais dos 100 controles femininos

ID	IC (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	DG	CM	M3M	CH	OP	INF	NF	CG	TAB	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	E2 (pg/mL)	INB (ng/mL)	AMH (ng/mL)
1	18	62	1,69	22	N	R	S	S	N	N	1	N	S	4,1	5,4	31	155	10,6
2	18	88	1,71	30	N	R	S	N	N	N	0	N	S	2,5	5,6	25	61	2,5
3	19	49	1,65	18	N	R	S	N	N	N	0	N	N	5,8	4,5	53	99	1,6
4	20	52	1,64	19	N	R	S	N	N	N	0	N	S	2,2	5,5	35	208	6,6
5	20	65	1,73	22	N	R	S	N	N	N	0	N	S	2,9	4,1	29	108	12,2
6	20	55	1,73	18	N	R	S	N	N	N	0	N	S	6,2	6,2	46	119	3,4
7	21	45	1,50	20	N	R	S	N	N	N	0	N	S	6,8	6,8	24	87	8,0
8	22	49	1,60	19	N	R	S	N	N	N	0	N	N	3,6	5,8	41	122	2,8
9	22	67	1,65	25	N	R	S	N	N	N	0	N	N	3,1	5,3	37	117	4,9
10	22	50	1,59	20	N	R	S	S	N	N	0	N	N	1,0	1,2	13	16	5,6
11	22	51	1,70	18	N	R	S	S	N	N	0	N	N	1,2	5,2	37	98	1,0
14	22	43	1,56	18	N	R	S	N	N	N	0	N	N	2,5	5,3	28	106	3,3
15	22	50	1,47	23	N	R	S	N	N	N	0	N	N	5	5,5	16	61	4,0
12	22	98	1,70	34	N	R	S	N	N	N	2	N	S	2,3	5,1	30	108	4,5
13	22	73	1,63	27	N	R	S	N	N	N	0	N	N	4,6	4,1	14	44	2,0
16	23	60	1,62	23	N	R	S	S	N	N	0	N	S	2,4	5,5	32	91	1,0
17	23	74	1,65	27	N	R	S	N	N	N	2	N	S	4,1	6,1	52	96	2,6
19	24	57	1,67	20	N	R	S	S	N	N	0	N	N	2,0	5,4	29	89	4,9
21	24	55	1,68	19	N	R	S	S	N	N	0	N	N	0,6	4,4	13	43	3,0
22	24	48	1,55	20	N	R	S	N	N	N	1	N	N	6,7	6,6	63	139	2,6

continua

APÊNDICE B - Dados clínicos e hormonais dos 100 controles femininos (continuação)

ID	IC (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	DG	CM	M3M	CH	OP	INF	NF	CG	TAB	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	E2 (pg/mL)	INB (ng/mL)	AMH (ng/mL)
23	24	58	1,65	21	N	R	S	N	N	N	0	N	N	4,5	8,5	52	99	1,5
24	24	94	1,65	35	N	R	S	N	N	N	0	N	S	8,4	6,3	24	94	4,7
18	24	83	1,68	29	N	R	S	S	N	N	3	N	S	2,9	9,0	25	31	0,6
20	24	65	1,53	28	N	R	S	N	N	N	0	N	S	6,0	5,9	25	78	10,8
25	24	68	1,56	28	N	R	S	S	N	N	0	N	N	2,6	2,9	15	27	6,5
26	25	58	1,60	23	N	R	S	S	N	N	0	N	N	2,6	4,2	13	50	5,5
27	25	53	1,74	18	N	R	S	N	N	N	0	N	N	2,7	5,2	40	105	3,7
28	25	53	1,63	20	N	R	S	S	N	N	0	N	N	4,6	4,3	33	151	5,1
29	25	70	1,72	24	N	R	S	S	N	N	0	N	S	8,5	9,3	82	140	0,4
30	25	68	1,65	25	N	R	S	N	N	N	0	N	S	1,6	5,6	30	113	2,5
31	25	60	1,68	21	N	R	S	N	N	N	0	N	N	1,9	4,9	32	101	2,7
32	26	59	1,73	20	N	R	S	S	N	N	0	N	N	2,4	8,3	42	84	1,8
33	26	47	1,57	19	N	R	S	N	N	N	0	N	N	4,7	4,8	22	98	7,9
34	26	58	1,59	23	N	R	S	S	N	N	0	N	N	5,9	3,9	34	110	4,8
36	26	60	1,65	22	N	R	S	N	N	N	0	N	N	4,6	3,8	58	34	3,1
37	26	60	1,63	23	N	R	S	S	N	N	0	N	N	0,9	2,8	13	9	3,7
35	26	90	1,65	33	N	R	S	S	N	N	1	N	N	0,5	2,3	14	17	12,6
39	27	53	1,64	20	N	R	S	S	N	N	0	N	N	3,4	6,3	47	86	4,5
41	27	51	1,64	19	N	R	S	S	N	N	0	N	S	0,7	2,9	13	105	3,0
42	27	65	1,7	22	N	R	S	N	N	N	0	N	S	4,3	5,0	55	126	6,3

continua

APÊNDICE B - Dados clínicos e hormonais dos 100 controles femininos (continuação)

ID	IC (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	DG	CM	M3M	CH	OP	INF	NF	CG	TAB	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	E2 (pg/mL)	INB (ng/mL)	AMH (ng/mL)
43	27	62	1,64	23	N	R	S	N	N	N	0	N	N	0,3	2,8	15	0,8	0,6
38	27	65	1,55	27	N	R	S	S	N	N	0	N	N	4,5	4,3	41	71	14,6
40	27	72	1,55	30	N	R	S	N	N	N	0	N	N	4,6	4,2	47	232	5,4
44	28	55	1,68	19	N	R	S	N	N	N	0	N	N	7,1	7,6	39	84	5,2
45	28	71	1,56	29	N	R	S	N	N	N	0	N	S	6,9	6,1	45	115	10,6
46	29	56	1,65	21	N	R	S	N	N	N	0	N	N	3,9	6,2	26	68	2,3
48	30	57	1,60	22	N	R	S	N	N	N	0	N	N	3,2	6,8	37	103	1,7
49	30	68	1,67	24	N	R	S	N	N	N	0	N	N	6,3	5,6	57	169	3,6
50	30	50	1,54	21	N	R	S	S	N	N	0	N	N	0,1	1,7	15	0,8	0,8
47	30	76	1,54	32	N	R	S	N	N	N	0	N	S	6,5	4,0	41	113	5,1
51	31	54	1,57	22	N	R	S	N	N	N	0	N	S	8,2	6,1	42	86	7,9
52	31	52	1,70	18	N	R	S	N	N	N	1	N	S	5,8	8,0	31	55	2,2
53	31	46	1,62	18	N	R	S	S	N	N	0	N	N	0,8	6,4	13	27	0,8
54	31	49	1,56	20	N	R	S	N	N	N	0	N	N	3,9	5,0	40	89	4,1
56	31	49	1,48	22	N	R	S	S	N	N	0	N	N	4,7	6,6	56	140	0,6
55	31	78	1,70	27	N	R	S	S	N	N	0	N	S	1,7	9,6	19	18	1,4
58	32	50	1,50	22	N	R	S	N	N	N	1	N	N	4,2	6,6	120	208	3,0
60	32	65	1,70	22	N	R	S	S	N	N	0	N	S	5,4	6,4	34	150	14,1
61	32	49	1,56	20	N	R	S	N	N	N	0	N	S	4,1	6,9	46	144	1,5
57	32	85	1,68	30	N	R	S	N	N	N	0	N	N	4,2	6,4	39	115	2,6

continua

APÊNDICE B - Dados clínicos e hormonais dos 100 controles femininos (continuação)

ID	IC (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	DG	CM	M3M	CH	OP	INF	NF	CG	TAB	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	E2 (pg/mL)	INB (ng/mL)	AMH (ng/mL)
59	32	85	1,70	29	N	R	S	N	N	N	3	N	S	4,1	7,9	28	75	2,0
62	33	62	1,70	21	N	R	S	N	N	N	0	N	N	6,7	5,8	25	97	3,4
63	33	54	1,65	20	N	R	S	N	N	N	1	N	N	1,9	5,3	48	99	1,9
64	33	63	1,63	24	N	R	S	N	N	N	0	N	S	2,7	5,3	44	155	2,6
65	33	90	1,60	35	N	R	S	N	N	N	1	N	N	4,0	5,4	37	75	2,7
66	34	51	1,63	19	N	R	S	N	N	N	0	N	N	5,4	6,3	46	128	2,3
68	34	54	1,63	20	N	R	S	N	N	N	0	N	N	5,3	5,7	33	168	2,5
67	34	80	1,64	30	N	R	S	S	N	N	1	N	N	3,4	6,2	25	72	2,4
69	35	58	1,60	23	N	R	S	N	N	N	0	N	S	1,7	8,5	37	70	0,8
70	35	70	1,63	26	N	R	S	S	N	N	1	N	N	4,4	3,5	32	109	5,3
71	36	59	1,74	19	N	R	S	N	N	N	0	N	S	6,9	7,0	43	119	5,8
72	36	51	1,63	19	N	R	S	N	N	N	0	N	S	4,5	7,9	53	86	0,8
74	36	61	1,70	21	N	R	S	N	N	N	0	N	N	6,4	5,4	39	54	3,9
75	36	56	1,64	21	N	R	S	N	N	N	0	N	S	5,8	6,4	26	80	5,1
76	36	53	1,60	21	N	R	S	N	N	N	0	N	N	5,0	5,8	33	69	5,9
73	36	73	1,53	31	N	R	S	S	N	N	1	N	N	2,2	5,4	34	76	1,0
77	36	75	1,48	34	N	R	S	N	N	N	0	N	N	2,9	2,3	132	3	0,8
78	37	57	1,55	24	N	R	S	N	N	N	0	N	S	5,6	10,4	58	110	1,1
79	37	84	1,69	29	N	R	S	N	N	N	1	N	N	1,3	5,2	41	128	5,5
80	38	65	1,63	24	N	R	S	S	N	N	1	N	N	4,8	6,1	67	206	4,1

continua

APÊNDICE B - Dados clínicos e hormonais dos 100 controles femininos (conclusão)

ID	IC (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	DG	CM	M3M	CH	OP	INF	NF	CG	TAB	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	E2 (pg/mL)	INB (ng/mL)	AMH (ng/mL)
81	38	76	1,65	28	N	R	S	N	N	N	1	N	N	2,8	5,2	46	131	3,4
83	39	60	1,60	23	N	R	S	N	N	N	0	N	N	4,7	5,5	48	78	< 0,2
86	39	51	1,57	21	N	R	S	N	N	N	0	N	S	7	7,7	52	136	2,4
84	39	67	1,40	34	N	R	S	S	N	N	2	N	N	2,9	8,9	62	257	0,9
82	39	87	1,72	29	N	R	S	N	N	N	1	N	N	3,1	7,9	31	40	0,8
85	39	65	1,55	27	N	R	S	N	N	N	1	N	S	5,6	4,1	110	145	9,1
87	40	62	1,72	21	N	R	S	N	N	N	0	N	N	5,4	7,3	53	110	0,6
89	41	61	1,61	24	N	R	S	N	N	N	0	N	N	5,1	6,6	37	46	1,3
90	41	65	1,43	32	N	R	S	N	N	N	1	N	N	2,6	7,1	44	70	1,2
92	41	92	1,62	35	N	R	S	N	N	N	4	N	S	2,1	7,1	19	27	0,3
88	41	89	1,73	30	N	R	S	N	N	N	2	N	N	2,7	5,9	168	4	< 0,2
91	41	65	1,58	26	N	R	S	N	N	N	1	N	S	2,9	8,3	32	42	0,5
94	43	65	1,63	24	N	R	S	N	N	N	0	N	N	4,2	7,7	40	108	0,8
93	43	72	1,64	27	N	R	S	N	N	N	2	N	S	2,1	8,2	58	97	0,5
95	44	61	1,56	25	N	R	S	N	N	N	3	N	N	5,6	10,7	34	76	< 0,2
96	44	62	1,60	24	N	R	S	N	N	N	4	N	S	3,4	8,1	99	108	1,0
98	47	54	1,65	20	N	R	S	N	N	N	2	N	S	3,1	10,0	20	29	0,8
97	47	70	1,62	27	N	R	S	N	N	N	1	N	N	4,7	7,0	48	79	0,9
99	48	77	1,62	29	N	R	S	N	N	N	2	N	N	1,6	4,1	15	10	0,6
100	48	85	1,70	29	N	R	S	N	N	N	1	N	N	4,1	6,9	25	63	1,5

ID: identificação; IC: idade cronológica; IMC: índice de massa corpórea; DG: doenças graves; S: sim; N: não; CM: ciclo menstrual; R: regular; M3M: presença de menstruação nos últimos 3 meses; CH: uso de contraceptivos hormonais; OP: presença de ovário policístico; INF: infertilidade; NF: número de filhos; CG: cirurgias ginecológicas; TAB: tabagismo; E2: estradiol; INB: inibina B.

APÊNDICE C - Dados clínicos e laboratoriais dos 104 controles masculinos.

ID	IC (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	DG	INF	NF	CG	TAB	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	TESTO (ng/dL)	INB (pg/mL)	AMH (ng/mL)
1	18	72	1,75	24	N	N	0	N	N	4,2	6,4	486	241	17,6
2	18	71	1,72	24	N	N	0	N	S	5,2	5,7	519	171	3,7
3	19	65	1,68	23	N	N	0	N	N	4,5	1,9	679	269	6,3
4	19	62	1,68	22	N	N	0	N	S	1,4	1,9	677	225	10,3
5	19	70	1,81	21	N	N	0	N	N	5,8	4,6	620	156	3,2
6	19	81	1,75	26	N	N	0	N	S	3,5	4,3	297	77	2,3
7	19	76	1,72	26	N	N	0	N	S	6,1	1,9	521	163	13,2
8	20	64	1,78	20	N	N	0	N	N	2,9	8,3	414	102	6,2
9	20	65	1,77	21	N	N	0	N	N	3,0	1,7	571	221	20,1
10	20	71	1,67	25	N	N	0	N	N	2,2	1,4	423	337	12,1
11	20	75	1,75	24	N	N	0	N	S	3,5	10,5	347	94	4,5
12	20	84	1,90	23	N	N	0	N	N	8,5	3,6	522	108	3,4
13	20	73	1,87	21	N	N	0	N	N	5,0	4,0	578	140	3,9
14	21	65	1,85	19	N	N	0	N	N	2,6	2,0	563	273	16,0
15	21	69	1,71	24	N	N	0	N	N	10,0	1,9	527	134	4,0
16	21	72	1,83	21	N	N	0	N	N	4,4	4,8	429	241	8,7
17	21	73	1,7	25	N	N	0	N	N	2,2	2,5	280	248	15,0
18	21	76	1,65	28	N	N	0	N	N	4,7	2,6	557	184	2,5
19	22	77	1,78	24	N	N	0	N	N	4,2	1,0	524	263	12,5
20	22	71	1,76	23	N	N	0	N	S	5,5	1,3	664	223	13,7
21	22	82	1,80	25	N	N	0	N	S	4,1	1,8	342	141	4,2
22	22	73	1,77	23	N	N	0	N	N	4,6	6,3	663	52	1,4

continua

APÊNDICE C - Dados clínicos e laboratoriais dos 104 controles masculinos (continuação)

ID	IC (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	DG	INF	NF	CG	TAB	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	TESTO (ng/dL)	INB (pg/mL)	AMH (ng/mL)
23	22	75	1,73	25	N	N	0	N	N	5,5	1,1	567	359	15,7
24	23	78	1,81	24	N	N	0	N	N	5,2	1,9	541	278	7,3
25	23	71	1,70	25	N	N	0	N	S	4,6	2,7	468	221	4,5
26	23	98	1,84	29	N	N	0	N	S	5,8	4,5	328	72	2,6
27	23	64	1,63	24	N	N	0	N	N	5,6	4,8	332	210	6,0
28	24	80	1,75	26	N	N	0	N	N	4,5	10,0	403	179	5,7
29	24	82	1,83	24	N	N	0	N	S	5,2	3,4	416	164	6,8
30	24	75	1,78	24	N	N	0	N	S	8,7	2,6	383	162	6,3
31	24	95	1,78	30	N	N	0	N	S	4,2	1,9	388	191	18,1
32	25	72	1,82	22	N	N	0	N	S	3,3	2,9	381	200	10,2
33	25	82	1,8	25	N	N	1	N	N	6,0	5,2	1354	175	3,1
34	25	72	1,70	25	N	N	0	N	N	4,7	1,5	386	203	9,8
35	25	62	1,74	20	N	N	0	N	N	3,1	1,9	543	281	9,6
36	25	94	1,80	29	N	N	0	N	N	5,0	5,1	579	171	14,7
37	26	102	1,83	30	N	N	0	N	S	7,0	2,1	549	175	6,1
38	26	66	1,67	24	N	N	0	N	N	8,0	9,8	373	63	1,5
39	26	72	1,87	21	N	N	0	N	N	4,5	3,3	710	179	6,6
40	26	92	1,78	29	N	N	0	N	S	6,3	3,3	341	103	4,3
41	26	76	1,69	27	N	N	0	N	N	4,0	4,8	430	131	3,4
42	27	65	1,64	24	N	N	0	N	S	6,3	2,1	551	256	7,6
43	27	65	1,67	23	N	N	0	N	S	2,2	2,0	379	195	21,0
44	27	73	1,78	23	N	N	0	N	S	3,3	6,7	313	133	8,4

continua

APÊNDICE C - Dados clínicos e laboratoriais dos 104 controles masculinos (continuação)

ID	IC (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	DG	INF	NF	CG	TAB	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	TESTO (ng/dL)	INB (pg/mL)	AMH (ng/mL)
45	27	67	1,75	22	N	N	0	N	N	2,4	2,0	370	158	10,5
46	28	78	1,75	25	N	N	1	N	N	3,4	1,6	479	262	13,2
47	28	73	1,77	23	N	N	0	N	S	3,8	3,5	783	200	4,2
48	28	117	1,75	38	N	N	3	N	S	3,0	2,3	292	129	3,3
49	28	74	1,72	25	N	N	0	N	S	5,8	3,3	513	159	6,3
50	28	75	1,81	23	N	N	1	N	N	2,6	2,1	267	224	6,0
51	29	70	1,78	22	N	N	0	N	S	4,2	3,9	792	246	3,4
52	29	86	1,93	23	N	N	1	N	S	3,3	3,2	379	151	4,6
53	29	65	1,79	20	N	N	1	N	N	4,2	2,5	796	315	6,9
54	29	84	1,85	25	N	N	1	N	N	2,7	2,7	554	122	15,9
55	29	82	1,85	24	N	N	1	N	N	2,6	3,5	313	190	2,8
56	29	63	1,7	22	N	N	0	N	N	6,8	2,2	356	177	5,8
57	29	78	1,72	26	N	N	0	N	N	6,7	2,0	324	228	4,3
58	30	71	1,66	26	N	N	1	N	N	4,6	3,0	610	100	3,7
59	30	71	1,79	22	N	N	0	N	S	5,7	3,9	692	162	4,5
60	30	70	1,65	26	N	N	0	N	S	2,7	1,6	511	219	11,6
61	30	73	1,76	24	N	N	0	N	S	5,4	1,1	629	234	9,9
62	30	66	1,68	23	N	N	0	N	S	4,5	2,6	415	311	21,0
63	30	82	1,74	27	N	N	0	N	N	3,0	2,2	359	126	11,3
64	31	78	1,75	25	N	N	1	N	N	4,3	3,7	370	261	5,2
65	31	90	1,76	29	N	N	1	N	N	3,9	2,3	382	213	5,3
66	31	82	1,76	26	N	N	0	N	S	4,7	1,7	266	149	7,5

continua

APÊNDICE C - Dados clínicos e laboratoriais dos 104 controles masculinos (continuação)

ID	IC (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	DG	INF	NF	CG	TAB	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	TESTO (ng/dL)	INB (pg/mL)	AMH (ng/mL)
67	31	67	1,78	21	N	N	0	N	N	6,3	9,3	582	127	3,4
68	31	112	1,82	34	N	N	2	N	N	3,8	4,5	451	579	2,8
69	32	72	1,80	22	N	N	1	N	S	2,8	1,4	384	181	6,6
70	32	86	1,80	27	N	N	1	N	S	8,0	3,1	406	106	3,5
71	32	73	1,66	26	N	N	1	N	N	4,8	5,4	765	157	3,5
72	33	74	1,77	24	N	N	0	N	N	4,3	2,7	426	215	5,6
73	33	56	1,72	19	N	N	0	N	N	2,7	2,3	784	332	17,3
74	33	84	1,80	26	N	N	0	N	S	3,1	1,5	558	216	5,5
75	33	72	1,73	24	N	N	0	N	N	4,6	3,8	465	331	7,2
76	33	70	1,70	24	N	N	1	N	N	2,1	1,7	464	437	8,8
77	33	87	1,74	29	N	N	0	N	S	4,1	1,5	483	412	7,9
78	33	90	1,78	28	N	N	0	N	S	6,4	4,8	278	146	5,4
79	33	78	1,79	24	N	N	0	N	S	4,2	1,5	611	249	8,7
80	34	90	1,85	26	N	N	0	N	N	4,7	2,8	594	258	10,2
81	34	90	1,77	29	N	N	1	N	N	6,6	5,0	283	160	6,6
82	34	61	1,78	19	N	N	1	N	N	3,7	1,9	731	233	6,0
83	34	76	1,83	23	N	N	0	N	N	5,0	3,5	443	126	7,0
84	34	75	1,78	24	N	N	0	N	S	7,8	4,0	458	129	6,5
85	35	66	1,75	22	N	N	2	N	N	4,8	1,7	479	210	12,6
86	36	118	1,70	41	N	N	0	N	N	5,4	3,4	292	129	5,7
87	36	80	1,65	29	N	N	2	N	N	3,0	4,1	385	91	4,5
88	39	62	1,68	22	N	N	2	N	N	4,2	3,6	1227	286	13,7

continua

APÊNDICE C - Dados clínicos e laboratoriais dos 104 controles masculinos (conclusão)

ID	IC (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	DG	INF	NF	CG	TAB	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	TESTO (ng/dL)	INB (pg/mL)	AMH (ng/mL)
89	40	105	1,77	34	N	N	0	N	N	3,7	3,2	462	224	2,7
90	40	70	1,75	23	N	N	1	N	S	3,4	3,2	388	184	4,4
91	40	106	1,98	27	N	N	0	N	N	7,5	4,9	408	119	2,8
92	40	50	1,62	19	N	N	1	N	S	2,6	1,9	763	237	6,0
93	42	78	1,81	24	N	N	1	N	N	4,0	4,7	360	336	10,3
94	43	81	1,73	27	N	N	1	N	S	4,2	6,2	438	89	2,0
95	43	63	1,60	25	N	N	0	N	S	4,8	5,5	255	141	2,4
96	44	75	1,63	28	N	N	1	N	S	0,7	1,1	395	97	1,9
97	44	74	1,73	25	N	N	0	N	S	3,6	3,7	631	163	5,7
98	46	80	1,79	25	N	N	2	N	N	3,6	2,9	502	222	8,1
99	46	88	1,69	31	N	N	1	N	N	9,9	6,2	362	152	2,4
100	46	83	1,75	27	N	N	2	N	S	2,7	3,6	546	218	6,0
101	47	90	1,67	32	N	N	0	N	N	3,6	4,1	291	122	2,5
102	48	72	1,76	23	N	N	2	N	N	4,2	2,2	485	196	18,4
103	48	90	1,82	27	N	N	2	N	N	3,4	2,4	688	141	3,7
104	48	65	1,5	29	N	N	2	N	N	3,2	6,4	419	44	5,8

ID: identificação; IC: idade cronológica; IMC: índice de massa corpórea; DG: doenças graves; S: sim; N: não; INF: infertilidade; NF: número de filhos; CG: cirurgias genitais; TAB: tabagismo; TESTO: testosterona total; INB: inibina B

APÊNDICE D - Achados clínicos e hormonais das 66 pacientes com ST.

ID	IC (anos)	Cariótipo	Puberdade	Uso de GH	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	E2 (pg/mL)	AMH (ng/mL)
1	2	45,X			74,5	7,2	13	< 0,2
2	5	45,X[40]						< 0,2
3	6	45,X[28]/46,X,+r[2]		S	5,0	0,1	13	< 0,2
4	9	45,X		S	1,3	24,3	18	< 0,2
5	10	45,X[30]	E	S	67,4	6,3	13	< 0,2
6	12	45,X[12]/46,X,+r[4]ish der (x) (DXZ1+)	E	S	5,8	41,5	19	< 0,2
7	12	45,X[28-1999] / 46,XX/45,X[34-1998]	E	S	28,4	127,7	13	< 0,2
8	13	45,X/46,X+r-ish der(x)(dx21)	I	N	7,4	27,7	13	< 0,2
12	13	45,X[9]/46,X,i,(X)(q10)[11]	E	S	5,6	34,6	13	< 0,2
9	13	45,X	E	S	2,5	6,8	50	< 0,2
10	13	45,X[19+25]	I	S	27,2	92,0	13	< 0,2
11	13	45,X[24]	I	S	17,3	65,7	13	< 0,2
13	14	45,X	E	S	23,8	62,8	17	< 0,2
14	14	45,X[70]	E	S	13,8	58,8	13	< 0,2
16	15	45,X[45]/46,X,i(x)(q10)	E	S	9,4	43,1	15	< 0,2
17	15	45,X[10]/46,X,del(X)(p11.3>qter)[25]	E	S	30,6	98,5	13	< 0,2
15	15	45,X/46,XX,(Xq)	I	S	42,1	153,7	14	< 0,2
21	16	45,X[35]/47,XXX[5]	I	S	17,6	58,2	29	< 0,2
18	16	45,X[70]	I	S	14,5	46,3	51	< 0,2
19	16	45,X	I	S	20,2	103,7	13	< 0,2
20	16	45,X[30]	I	S	26,3	114,4	14	< 0,2
22	17	45,X[36]	E	S	2,2	3,2	13	< 0,2

continua

APÊNDICE D - Achados clínicos e hormonais das 66 pacientes com ST (continuação)

ID	IC (anos)	Cariótipo	Puberdade	Uso de GH	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	E2 (pg/mL)	AMH (ng/mL)
23	17	45,X[40]	I	S	4,0	13,2	41	< 0,2
24	17	45,X[10]	E	S	19,0	71,5	13	< 0,2
26	18	46,X,i(Xq)[39]/47,X,i(Xq),+mar[1]	E	S	15,1	23,6	59	< 0,2
25	18	45,X[20]	I	S	0,1	1,0	54	< 0,2
27	18	45,X,der(5)[70]	I	S	25,2	68,5	13	< 0,2
28	18	45,X/15s+, 21s+	I	S	21,6	95,8	37	< 0,2
30	19	46,X del(X)p(pter->p11.1)	E	N	22,1	41,3	57	< 0,2
29	19	45,X[35]	I	S	9,7	33,3	33	< 0,2
31	20	45,X[6]/46,X,i(Xq)[14]	I	S	6,2	15,0	26	< 0,2
32	20	45,X[69]/47,XXX[66]	I	S	67,5	23,5	28	< 0,2
33	20	45,X0/46,XX/46,XX,DUP(XP)[100]	I	S	8,4	27,2	58	< 0,2
34	21	45,X[5]/46,X, del(Xq)(pter-q21:)[12]	I	N	13,5	35,7	39	< 0,2
35	21	45,X/45,Xt(7q;14q)	I	S	41,7	108,9	13	< 0,2
36	21	45,X, idic (X) (q ter→p11::p11→q ter) [32]/45,X [8]	I	S	17,8	56,0	13	< 0,2
38	21	45,X[11]/46,X,+r[9]	I	S	3,3	8,9	53	< 0,2
39	21	45,X/46,X,i(Xq)	I	S	1,8	38,4	13	< 0,2
40	21	45,X/ 46,X del X	I	S	1,8	8,2	13	< 0,2
37	21	45,X[20]	I	S	20,7	62,6	13	< 0,2
42	22	45,X[20]	I	S	47,3	21,1	13	< 0,2
41	22	45,X[49]/46,XX[1]	I	S	16,0	27,0	51	< 0,2
43	23	45,X[20]/46,X,+mar[30]	I	S	14,8	63,1	13	< 0,2
44	23	45,X/46,X+r (do cromossomo x)	I	N	1,7	6,1	56	< 0,2

continua

APÊNDICE D - Achados clínicos e hormonais das 66 pacientes com ST (conclusão)

ID	IC (anos)	Cariótipo	Puberdade	Uso de GH	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	E2 (pg/mL)	AMH (ng/mL)
45	24	45,X/46,X,i(Xq)	E	S	0,1	1,0	15	< 0,2
46	24	45,X[34]	I	S	32,8	44,7	33	< 0,2
47	25	45,X[50]	E	S	17,5	4,5	13	< 0,2
48	25	45,X	I	S	34,4	86,8	13	< 0,2
49	25	45,X	E	S	23,2	29,1	57	< 0,2
52	26	45,X[8]/46,X,r[12]	I	S	4,5	12,0	13	< 0,2
51	26	45,X[50]	I	S	31,4	59,4	50	< 0,2
50	26	45,X[49]/46,XX[1]	I	S	4,7	9,3	53	< 0,2
53	27	45,X	I	S	24,0	9,4	46	< 0,2
54	28	45,X/46,XX	I	N	19,4	66,8	13	< 0,2
55	29	45,X[50]	I	S	21,9	48,7	46	< 0,2
56	30	45,X[10]/46,X,+mar[10]	E	N	5,2	17,4	13	< 0,2
60	30	45,XX-C	I	N	34,5	56,9	68	< 0,2
57	30	45,X	I	S	95,5	28,7	13	< 0,2
58	30	45,X (45,-C)	E	S	13,8	8,6	326	< 0,2
59	30	45,X[20]	I	S	17,3	45,4	28	< 0,2
61	31	45,X	I	N	38,9	105,1	18	< 0,2
62	31	45,X[50]	I	N	35,1	85,6	16	< 0,2
63	33	45,X [18]/ 46,X,i(Xq)[2]	I	N	19,1	27,4	51	< 0,2
64	36	45,X	I	N	22,0	49,0	65	< 0,2
65	37	45,X	I	N	13,1	6,9	54	< 0,2
66	38	45,X[20]	I	S	32,6	14,1	16	< 0,2

ID: identificação; IC: idade cronológica; E: espontânea; I: induzida; GH: hormônio do crescimento; S: sim; N: não; E2 estradiol

APÊNDICE E -. Achados clínicos e laboratoriais das 29 pacientes com SOP.

ID	IC (anos)	IMC (Kg/m2)	DM	FG	VO (cm3)	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	E2 (pg/mL)	PROG (ng/mL)	PRL (ng/mL)	17OHP (ng/mL)	DHEAS (ng/mL)	D4 (ng/mL)	TESTO (ng/dL)	SHBG (nmol/L)	TESL (pmol/L)	AMH (ng/mL)
1	18	28	P	15	11,8	11,2	4,6	44	0,3	7,4	1,1	3350	3,3	85	9	101	3,5
2	19	24	P	9	11,0	12,2	4,2	55	0,4	11,7	1,2	4430	3,8	146	33	100	20,8
3	21	26	P		4,8	10,9	6,2	44	0,3	6,0	0,9	2680	4,4	88	37	53	8,4
4	21	48	P	13	7,5	8,9	4,0	48	0,3	5,8	0,5	2770	3,2	84	18	75	5,8
5	21	35	P	9		10,9	4,0	62	0,3	3,2	1,6	1880	4,8	95	19	85	6,2
6	22		P		12,8	8,3	5,1	48	0,3		0,8	2440	4,2	122	23	101	8,5
7	23	44	P		13,1	4,2	1,7	82	0,3	7,2	1,5	2000	3,6	195	25	80	> 21,0
8	23	31	P	14	10,2	8,6	5,1	52	0,3	6,6	0,7	1280	0,8	63	32	41	6,8
9	23		P			4,6	5,3	48	0,3	7,3	0,7	4820	2,8	111	73	42	3,8
10	25		P	7		16,8	6,1	65	0,3	14,5	0,9	2020	1,9	108	47	56	14,8
11	25	45	P			4,7	5,0	63	0,3	7,6	1,6	2230	2,0	107	20	94	5,8
12	25	24	P	13	4,1	2,0	3,5	57	0,6			3390	1,9	46	32	30	3,9
13	25	36	P	14		3,9	5,8	59	0,3	14,0	0,7	2410	2,0	39	28	27	1,4
14	26	30	P		13,1	13,9	3,8	97	0,3	8,4	0,9	3710	2,4	80	35	50	5,2
15	26	28	P	23		7,6	5,8	27	0,3	4,4	0,2	1640	1,7	60	18	53	7,8
16	26	22	P	12	17,5	13,0	4,5	78	0,3	5,2	1,1	7860	1,6	94	64	39	13,1
17	27	32	P	19		9,0	3,9	37		6,4	1,3	3050	2,3	112	19	100	6,9
18	28	23	P	10	6,7	5,9	5,2	52	0,3	4,7	1,2	2430	5,0	94	25	72	19,8
19	29	36	P	14	6,5	4,2	2,8	38	0,3	5,9	0,5	1330	3,1	49	10	54	> 21,0
20	29	34	P	7	12,3	11,8	6,1	52		5,5	0,8	1690	2,5	83	18	75	5,8

continua

APÊNDICE E - Achados clínicos e laboratoriais das 29 pacientes com SOP (conclusão)

ID	IC (anos)	IMC (Kg/m ²)	DM	FG	VO (cm ³)	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	E2 (pg/mL)	PROG (ng/mL)	PRL (ng/mL)	17OHP (ng/mL)	DHEAS (ng/mL)	D4 (ng/mL)	TESTO (ng/dL)	SHBG (nmol/L)	TESL (pmol/L)	AMH (ng/mL)
21	31	32	P	13		3,6	4,4	32		8,6				20	21	16	4,1
22	31	20	P	14	14,1	6,7	6,9	38	0,3	6,5	0,6	1580	3,8	44	47	22	10,4
23	31	39	P	6	14,7	6,3	1,9	184	0,3	6,6	0,7	859	3,3	37	12	38	3,4
24	32		P	5	15,7	16,3	17,3	53	0,4	7,6	2,1	1820	5,0	85	44	46	9,6
25	34	35	P	27	20,7	5,5	3,8	58	0,3	6,2	1,6	866		217	30	164	16,4
26	34	32	P	9	18,6	6,5	6,9	50	0,3	3,6	0,8	1060		39	25	29	4,6
27	34		P			5,5	4,0	50	0,3	6,9	1,2	934	3,6	134	20	120	11,7
28	35	37	P	18	11,9	6,4	5,4	47	0,3	7,1	2,7	780	2,8	35	16	32	11,5
29	36	37	P		21,2	8,9	4,6	42	0,3	4,4	0,7	2580	2,8	75	11	82	6,1

ID: identificação; IC: idade cronológica; IMC: índice de massa corpórea; DM: disfunção menstrual; P: presente, FG: escore de Ferriman e Gallwey; VO: volume ovariano; E2: estradiol; PROG: progesterona; PRL: prolactina; 17OHP: 17-hidroxiprogesterona; DHEAS: dehidroepiandrosterona sulfato; D4: androstenediona TESTO: testosterona total; SHBG: proteína ligadora dos hormônios sexuais; TESL: testosterona livre

APÊNDICE F - Achados clínicos e hormonais dos 31 pacientes com criptorquidismo.

ID	IC (anos)	Peso (Kg)	Cariótipo	Diagnóstico	LH basal (IU/L)	FSH basal (IU/L)	TESTO basal (ng/dL)	INB basal (pg/mL)	AMH basal (ng/mL)	TESTO pós pico (ng/dL)	hCG pós pico (IU/L)
1	2,8	12	46,XY	Testículo Retrátil D	0,2	0,9	10	120	98	123	10,2
2	9	11,6	46,XY	Testículo Retrátil D	0,1	0,6	10	33	71	312	11,6
3	9	22	46,XY	Testículo Retrátil E	0,2	0,8	10	78	96	174	13,4
4	0,8	8,4		Criptorquidismo D	0,1	1,2	10	88	69	122	10,2
5	0,9	10,1	46,XY	Criptorquidismo D	0,1	0,3	10	65	48	186	14,1
6	1	9	46,XY	Criptorquidismo D	0,05	0,2	10	118	103	431	32,2
7	1	12,8	46,XY	Criptorquidismo D	0,05	0,1	10	129	151	220	5,7
8	1,1	11	46,XY	Criptorquidismo D	0,1	0,4	10	161	148	442	20,8
9	1,7	9,8		Criptorquidismo D	0,2	0,3	10	119	112	294	18,2
10	2,5	12	46,XY	Criptorquidismo D	0,2	1,0	10	96	97	168	22,4
11	3,1	23	46,XY	Criptorquidismo D	0,05	0,3	10	77	93	179	10,7
12	4	14	46,XY	Criptorquidismo D	0,1	0,6	10	77	118	310	21,6
13	4,8	17	46,XY	Criptorquidismo D	0,2	0,5	10	135	169	197	13,3
14	5	19,1	46,XY	Criptorquidismo D	0,2	0,8	10	51	82	111	6,5
15	1	9,6	46,XY	Criptorquidismo E	0,1	0,8	10	101	164	433	
16	1,1	10,5	46,XY	Criptorquidismo E	0,1	0,4	10	101	180	334	10,4
17	1,1	10,2	46,XY	Criptorquidismo E	0,1	0,7	10	214	260	298	6,2
18	1,1	9,9	46,XY	Criptorquidismo E	0,3	0,1	10	348	239	547	21,2
19	2,3	12	46,XY	Criptorquidismo E	0,05	0,3	10	51	103	145	29
20	2,8	13	46,XY	Criptorquidismo E	0,05	0,5	10	41	50	112	10,1

continua

APÊNDICE F - Achados clínicos e hormonais dos 31 pacientes com criptorquidismo (conclusão)

ID	IC (anos)	Peso (Kg)	Cariótipo	Diagnóstico	LH basal (IU/L)	FSH basal (IU/L)	TESTO basal (ng/dL)	INB basal (pg/mL)	AMH basal (ng/mL)	TESTO pós pico (ng/dL)	hCG pós pico (IU/L)
21	3	14,5	46,XY	Criptorquidismo E	0,1	1,2	10	118	148	318	17,4
22	5	17,9		Criptorquidismo E	0,05	0,3	10	42	52	139	18,4
23	6,4	28	46,XY	Criptorquidismo E	0,2	1,4	10	79	77	392	6,6
24	7	19	46,XY	Criptorquidismo E	0,1	0,2	10	52	64	99	9,2
25	0,8	10,4	46,XY	Criptorquidismo bilateral	0,4	1,3	10	205	124	525	7,3
26	0,8	7,4	46,XY	Criptorquidismo bilateral	0,5	0,2	10	145	67	315	9,6
27	0,8	9,5	46,XY	Criptorquidismo bilateral	0,3	1,4	10	163	84	315	12,7
28	1	11,3	46,XY	Criptorquidismo bilateral	0,1	1,0	10	82	54	129	12
29	5	19	46,XY	Criptorquidismo bilateral	0,05	0,5	10	29	62	51	4,5
30	7,3	40,4	46,XY	Criptorquidismo bilateral	0,05	0,9	10	49	84	61	6,4
31	9	25,7	46,XY	Criptorquidismo bilateral	0,2	0,9	10	113	127	200	39,1

ID: identificação; IC: idade cronológica; D: direito; E: esquerdo; TESTO: testosterona total; INB: inibina B; hCG: gonadotrofina coriônica humana