

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE POSGRADO



HOSPITAL ESPAÑOL

**HISPAREP CLÍNICA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA DEL
HOSPITAL ESPAÑOL DE MÉXICO, DF.**

**CORRELACION DE LA CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE
HORMONA ANTIMÜLLERIANA, NIVELES DE FSH BASALES Y
NÚMERO DE OVOCITOS CAPTURADOS EN CICLOS DE ALTA
COMPLEJIDAD**



**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**

PRESENTA:

Dr. Gonzalo de Jesús Siu Moguel.

ASESOR DE TESIS:

Dr. Carlos Gerardo Salazar López Ortiz.

JULIO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en HISPAREP, clínica de reproducción asistida del Hospital Español de México D.F. bajo la dirección del Dr. Carlos Gerardo Salazar López Ortiz.

Este trabajo de Tesis presentado por el alumno Gonzalo de Jesús Siu Moguel se presenta en forma con visto bueno por el Asesor de la Tesis Dr. Carlos Gerardo Salazar López Ortiz, con fecha del 30 de julio del 2012 para su impresión final.

**ASESOR PRINCIPAL
Dr. Carlos Gerardo Salazar López Ortiz.**

Autorizaciones

Dr. Manuel Álvarez Navarro

**Jefe de Enseñanza e Investigación
Hospital Español de México, D.F.**

Dr. Gerardo Velázquez Cornejo

**Profesor Titular del Curso de Especialización en
Biología de la Reproducción Humana UNAM/H. Español**

Dr. Carlos Gerardo Salazar López Ortiz

Asesor de Tesis

**Profesor Adjunto del Curso de Especialización en
Biología de la Reproducción Humana UNAM/H. Español**

**CORRELACION DE LA CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE
HORMONA ANTIMÜLLERIANA, NIVELES DE FSH BASALES Y
NÚMERO DE OVOCITOS CAPTURADOS EN CICLOS DE ALTA
COMPLEJIDAD**

**Investigador principal:
Dr. Gonzalo de Jesús Siu Moguel**

**Investigador Responsable:
Dr. Carlos Gerardo Salazar López Ortiz
Director médico HISPAREP**

**Investigador Asociado:
Dr. Gerardo Velázquez Cornejo
Director de enseñanza HISPAREP**

**Investigador Asociado:
Dr. Sergio Tellez Velasco
Coordinador clínico HISPAREP**

**Investigador Asociado:
MRN Chiharu Murata
Instituto Nacional de Pediatría**

INDICE

Resumen	V
Abstract	VI
1. Antecedentes	1
2. Marco de referencia.....	6
3. Justificación.....	15
4. Objetivos	18
4.1. Objetivo General	18
4.2. Objetivos Particulares	18
5. Hipótesis	19
6. Material y Métodos.....	20
6.1. Tipo de estudio	
6.2. Ubicación temporal y espacial	
6.3. Criterios de selección de la muestra	
6.4. Variables	
6.5. Tamaño de la muestra	
6.6. Procedimiento	
6.7. Análisis estadístico	
6.8. Descripción operativa del estudio	
7. Resultados	22
8. Discusión.....	27
9. Conclusiones	29
10. Bibliografía	30

RESUMEN

La reserva ovárica se refiere al número de ovocitos que restan dentro del ovario. Conforme avanza la edad, la reserva ovárica tiende a disminuir, siendo mucho más evidente, después de los 40 años. Las mujeres en la actualidad posponen la maternidad, por lo tanto es más común que acudan a los diferentes centros de reproducción, con el deseo de un embarazo. Es indispensable poder conocer de la cantidad y calidad de ovocitos con los que cuenta una mujer, para así poder ofrecer un tratamiento individualizado. La hormona antimülleriana se produce en los folículos preantrales y antrales pequeños, por eso se considera que puede ser un marcador adecuado de la reserva ovárica. **Materiales y métodos:** Se analizaron 27 pacientes entre del 30 de Noviembre del 2011 al 30 de Junio del 2012 con sospecha de baja reserva, que se sometieron a un tratamiento de alta complejidad. Se realizó determinación de los niveles de hormona antimülleriana, así como los niveles de FSH en el día 3 del ciclo, previo a la realización del ciclo de estimulación ovárica. **Resultados:** Se encontró una relación directa entre el nivel de hormona antimülleriana y el número de ovocitos capturados. Se llevó a cabo análisis de regresión lineal para predecir el número de ovocitos capturados. Las variables independientes incluidas fueron: edad, índice de masa corporal, hormona antimülleriana y niveles basales de FSH, solo se encontró una p estadísticamente significativa ($p < .0001$.) al utilizar los niveles de hormona antimülleriana como predictor de la respuesta ovárica. **Conclusión:** Los niveles de hormona Antimülleriana es un marcador confiable de la reserva ovárica. Se relaciona directamente con el número de ovocitos capturados, de mejor manera que los niveles basales de FSH.

Abstract

Ovarian reserve refers to the number of oocyte remaining within the ovary. With age, ovarian reserve tends to decrease, being much more evident after 40 years. The women now delay childbearing, so it is more common than go to different fertility centers, with the desire of pregnancy. It is essential to know the quantity and quality of oocytes are present in a woman, in order to offer individualized treatment. The AMH is produced in preantral and antral small follicles, it is considered to be a suitable marker of ovarian reserve. **Materials and methods:** We analyzed 27 patients between from November 30, 2011 to June 30, 2012 with suspected low reserve, who underwent IVF treatment of high complexity. **Results:** We found a direct relationship between the level of AMH and the number of retrieved oocytes. Linear regression was used to examine the association between retrieved oocytes and the different variables. The independent variables included were age, BMI, AMH and FSH basal levels, only found a statistically significant p ($p < .0001$.), using AMH levels as a predictor of ovarian response. **Conclusion:** The levels of AMH are a reliable marker of ovarian reserve. Is directly related to the number of retrieved oocytes, a better way than the basal levels of FSH.

1. ANTECEDENTES.

La hormona antimülleriana (AMH) también conocida como sustancia inhibidora mülleriana, es una glicoproteína dimérica formada por 560 aminoácidos, cuyo gen se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 19. Pertenece a la familia del factor transformador- β , cuyos miembros de esta familia son implicados en el crecimiento y diferenciación. Esta familia también incluye las inhibinas, activinas, proteínas morfogenéticas del hueso y factores de crecimiento y diferenciación. Los miembros de esta familia juegan un importante papel en las interacciones epitelio-mesenquimales, crecimiento celular, producción de matriz extracelular, y remodelación tisular.

La AMH es expresada exclusivamente por las células gonadales siendo el tracto reproductivo su principal sitio de acción. El efecto biológico principal es el de inhibir el desarrollo de los conductos de Müller en los fetos masculinos, durante las primeras 8 semanas de desarrollo, representando así el primer paso en la diferenciación sexual(1)(Figura 1).

Alfred Jost en 1947 sugirió que existía un factor específico que era responsable de la regresión de los derivados müllerianos en el feto masculino. Demostró esta teoría al implantar un cristal de testosterona y tejido testicular cerca de los ovarios en fetos de conejo, comprobando que el tejido testicular inducía la regresión de los conductos de Müller adyacentes. Con este experimento determinó que debía de existir una sustancia testicular diferente a la testosterona, la cual era responsable de la regresión(2).

Régine Picon, en 1969, co-trabajadora del laboratorio de Jost, desarrolló un ensayo semicuantitativo para poder medir la actividad biológica de esta molécula, donde utilizaba tractos genitales de fetos de rata en los días 14-15 postcoito.

Durante 1978, Picard y cols. utilizaron el nombre “Anti-Müllerian Hormone” y presentaron la fórmula de la hormona bovina. La purificación de dicha molécula se realizó utilizando testículos fetales y neonatales. En 1984, logró purificar dicha molécula. Para 1986, se logró la clonación del ADNc bovino; ese mismo año se logra la clonación del gen humano de la hormona anti-mülleriana, localizado en el cromosoma 19 p13.2-p13.3(3).

Desde el momento que se logró detectar la hormona se inició la búsqueda de un método de medida sensible y específico. Al inicio se logró detectar la producción en los testículos durante la vida fetal mediante inmunohistoquímica, pero esto implicaba una técnica invasiva, lo cual limitaba la utilización de ésta. En 1990, se logró desarrollar un estudio de ELISA, que permite cuantificar la AMH circulante en suero, siendo tan sensible que logra detectar de 0.1-0.5 ng/ml(4).

En las mujeres, la AMH se expresa en el ovario mucho después de que los conductos Müllerianos pierden su sensibilidad a la hormona. En el ovario humano, la AMH se expresa después de la semana 36 de gestación, mientras que en ratones la producción de AMH comienza en los días inmediatamente posteriores al nacimiento(5).

Mesonefros + epitelio celómico

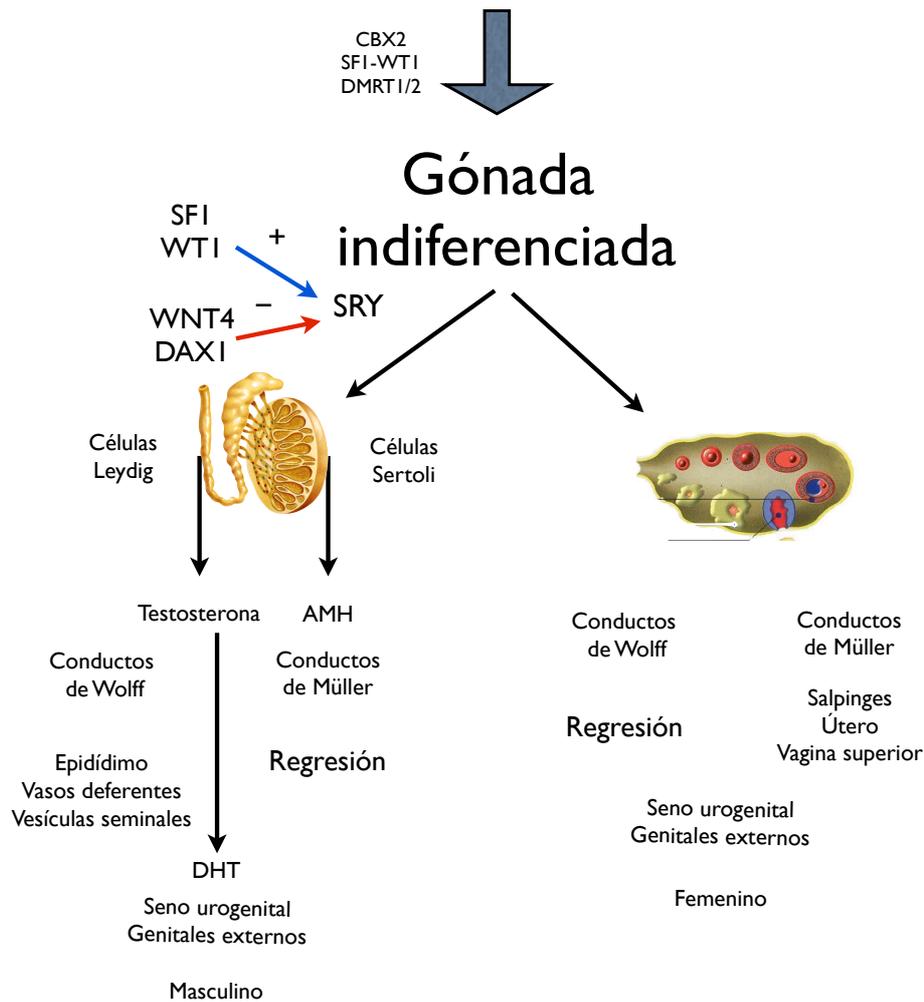


Figura 1. Representación esquemática de los principales pasos de la diferenciación sexual y de la participación de la hormona antimülleriana en este proceso.

En el periodo postnatal la AMH tiene efectos diversos dependiendo el sexo del producto: en los masculinos inhibe la diferenciación y función de las células de Leydig; mientras que en los femeninos inhibe la maduración folicular y crecimiento de las células de cáncer de mama. El efecto postnatal no es crucial ya que la función no se altera cuando suceden mutaciones de l receptor de AMH.

En los hombres la AMH es producida en grandes cantidades por las células de Sertoli justo antes de la diferenciación de los túbulos seminíferos fetales hasta la pubertad. En individuos sexualmente maduros, las células de Sertoli continúan sintetizando pequeñas cantidades de AMH. Posterior a la pubertad es secretada a la luz de los túbulos seminíferos, siendo mayor la concentración en el plasma seminal que en el suero, esto debido a la barrera hemato-testicular. El receptor II de AMH (AMHR2) es expresado en las células mesenquimales que rodean los conductos de Müller, en las células de Sertoli y en menor grado en las células de Leydig.

En los individuos de sexo femenino pequeñas cantidades de AMH y AMHR2 se co-expresan por las células de la granulosa, folículos preantrales y antrales pequeños. La expresión disminuye mientras progresa la maduración folicular. (Figura 2) Cuando los folículos se agotan de los ovarios al final de la vida reproductiva la AMH no es detectable en suero(6).

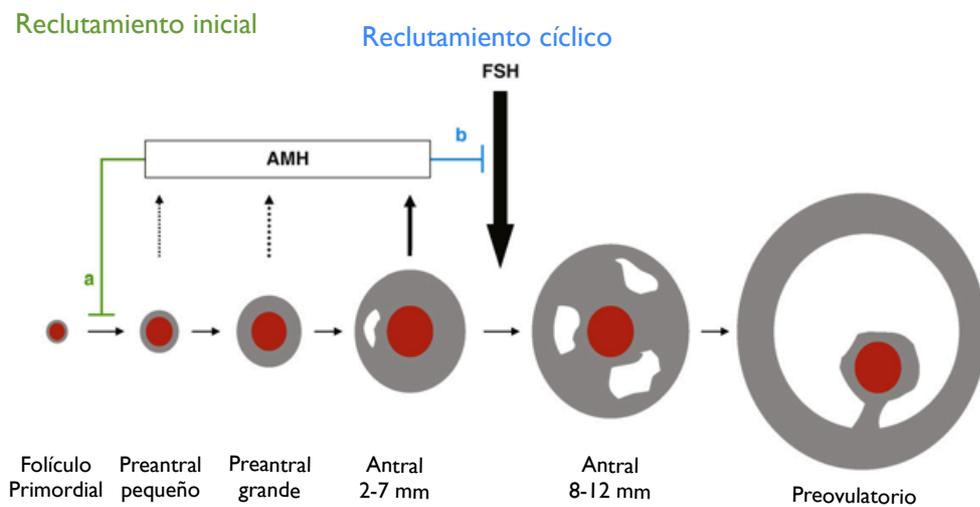


Figura 2. La HAM se expresa en las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales pequeños, esta expresión, disminuye conforme la maduración folicular progresa

Después del nacimiento, AMH es regulada positivamente por la hormona folículo estimulante y negativamente por los andrógenos. Durante la pubertad cuando las células de Leydig empiezan a producir testosterona, la expresión de AMH por

las células de Sertoli es reprimida, siempre que los receptores de andrógenos estén presentes. En su ausencia, la influencia estimulante de la FSH se hace aparente.

En las personas de sexo femenino, la expresión de AMH inicia en cuanto la maduración folicular alcanza el estadio preantral, después del nacimiento o en las últimas semanas del embarazo. El mecanismo de regulación es poco conocido(7).

2. MARCO DE REFERENCIA.

La fertilidad en las mujeres está determinada de acuerdo al número de folículos que presenta el ovario entre otras cosas, es ampliamente sabido que el envejecimiento tiene un efecto deletéreo en el número de ovocitos disponibles. La mayor concentración de folículos se encuentra durante la vida fetal, mientras que cuando la mujer alcanza la menarca se estima que restan 400-500 mil folículos y que se ovulan 400-500 ovocitos durante toda la vida reproductiva.

La tendencia actual de la población es postergar la maternidad. Con esta situación, se ha observado un incremento significativo en el número de ciclos que se realizan en las clínicas de reproducción. De acuerdo a las estadísticas de la red LARA en el año 2000 se realizaron 16,188 ciclos, mientras que en el año 2009 se tiene registro de 38,020 ciclos realizados; la edad de las pacientes también se ha incrementado.

La reserva ovárica es un término funcional de acuerdo a la forma en que los ovarios responden a la estimulación con gonadotropinas. De manera general se menciona la reserva ovárica como el número y calidad de folículos que posee el ovario. Se puede considerar que la reserva ovárica es adecuada cuando con un esquema típico de estimulación se obtienen 4 o más ovocitos, aumentando las probabilidades de conseguir un recién nacido sano mediante alguna técnica de reproducción asistida(8).

El principal factor relacionado a la reserva ovárica en la mujer es la edad, tanto para determinar la calidad como la cantidad. Existen múltiples variaciones respecto a la capacidad reproductiva con la edad(9), lo que nos lleva a la necesidad de poder distinguir a las mujeres jóvenes con una reserva ovárica disminuida o las mujeres que aun conservan la capacidad reproductiva a pesar de la edad.

La importancia clínica radica en identificar aquellas pacientes con riesgo de no obtener una respuesta adecuada a la estimulación ovárica o conocer las probabilidades de obtener un embarazo incluso si la edad es avanzada. Si se pudiera predecir la respuesta que se va a obtener, seríamos capaces de poder individualizar los manejos, ajustando dosis o quizás no iniciando ciclos de estimulación(10).

La manera ideal de conocer la reserva ovárica sería el conteo de todos los folículos presentes en ambos ovarios como los realizados en los estudios histopatológicos tanto en biopsias ováricas como en estudios post-mortem, debido a lo que implica poder realizar dicho conteo, no se puede utilizar como método de evaluación. Se ha tratado de identificar una forma para poder saber el tamaño del pool folicular que existe y la calidad del mismo, de ahí que se utilicen pruebas de reserva ovárica como, la determinación de la hormona folículo estimulante (FSH) en día 3 del ciclo, determinación de inhbina o estradiol. La mayoría de los estudios para conocer la reserva ovárica, no predicen la calidad de los ovocitos.

Tanto para las pacientes como para los médicos es de suma importancia conocer las probabilidades de éxito previo al inicio de un ciclo de estimulación. La probabilidad de tener un recién nacido vivo en casa varía de acuerdo a las estadísticas de cada centro de reproducción, sin embargo existen factores predisponentes propios de cada pareja(11), como lo son la edad, el tiempo de infertilidad, la respuesta ovárica a la estimulación, la calidad embrionaria; siendo la edad uno de los más importantes y que se utiliza constantemente para dar un pronóstico. Las diferentes pruebas de reserva ovárica, fallan a la hora de aportar información sobre las posibilidades de una pareja para obtener un embarazo(12).

La utilidad de contar con un marcador confiable de la disminución de la reserva ovárica que correlacione adecuadamente con una pobre respuesta a la estimulación, se debe a que esta baja respuesta se asocia a una tasa elevada de cancelaciones de los ciclos de estimulación y a bajas tasas de éxito. Aunque las tasas de embarazo disminuyen con la edad, las pruebas de reserva ovárica son necesarias cuando no coincide la edad biológica y los patrones menstruales. La disminución de la reserva ovárica, es un proceso dinámico donde a pesar de que el ovario continúe su funcionamiento de forma cíclica, el número de folículos sigue declinando, los mecanismos por lo que esto sucede aun no se identifican con certeza(13).

Existen diversas pruebas disponibles para medir la reserva ovárica, dentro de las que tenemos:

Medición de FSH en el día 3 del ciclo

La medición basal de la FSH en la fase folicular temprana se considera un indicador indirecto de la reserva ovárica. Es una de las pruebas que más se utiliza en los centros de reproducción asistida. Se observó que la medición de la FSH podía predecir la respuesta ovárica y que se relaciona con las tasas de éxito en los ciclos de fertilización in vitro (FIV), donde se sugirió también que una FSH elevada se asociaba a mayor tasa de abortos(14).

En la actualidad se ha cuestionado la capacidad predictiva de la FSH basal, Creus y cols. reportaron que la concentración de dicha hormona fue capaz de predecir mayor tasa de cancelación que la edad, aunque la edad predijo mayor tasa de embarazo(15). Se ha mencionado que la edad protege contra los efectos deletéreos de la reserva ovárica disminuida(16). En múltiples estudios se ha demostrado que la medición de la FSH no es fidedigna de la respuesta que una paciente pueda tener a la estimulación, en un estudio retrospectivo de pacientes que fueron sometidas a un ciclo de Fertilización in vitro, demostró que la edad se asociaba a mayor falla en la implantación y menor tasa de éxito en los

tratamientos. Se compararon los resultados en mujeres mayores o menores de 40 años con FSH elevada, las mujeres menores de 40 años presentaron mayores tasas de cancelación, mientras que las mujeres > 40 años tuvieron menor tasa de implantación y de recién nacido vivo(17).

Cual es el nivel de normalidad de la FSH? Existen diversos estudios donde se trata de demostrar cual es este nivel. Van Rooij y cols. observaron que solo cuando se obtiene un valor superior a 20 UI/l, la tasa de embarazo disminuye, independientemente de la edad. En mujeres que presentan ciclos menstruales regulares, los niveles de FSH no se correlacionan con la respuesta ovárica ni con las tasas de embarazo. La mayoría de los estudios se realizan en pacientes que buscan tratamiento por problemas de fertilidad, mientras que hace falta más evidencia en pacientes sanas. Una de las principales limitaciones que presenta este estudio es la variabilidad inter-ciclo(18), aunque también se puede presentar gran variabilidad inter-ensayo, siendo de suma importancia poder definir los valores de normalidad dentro de la población que cada centro atienda.

La medición basal de FSH previó a un ciclo de FIV, nos reporta una sensibilidad para detectar baja respuesta, menor del 10%, por el contrario, es una prueba muy específica, ya que el 98% de las mujeres con valores normales, logran un embarazo(19). Con todo lo anterior, llegamos a la conclusión que la medición de FSH es un estudio ampliamente usado en los diferentes centros de reproducción, ya que tiene bajo costo y es bien tolerado. Aunque no debe ser utilizado para excluir pacientes del tratamiento, excepto cuando encontramos valores muy elevados, sino para poder elegir estrategias diferentes o quizás utilizar otros métodos diagnósticos.

Estradiol

Conforme aumenta la edad de la mujer, se encuentra un acortamiento de la fase folicular, lo que se puede explicar por un reclutamiento folicular temprano, reflejando así en un estradiol elevado(20).

Existe un metanálisis que evalúa 10 estudios reportando mediante un análisis de regresión logística que ninguno tiene un impacto en el valor predictivo de la prueba(13). Se han mencionado diferentes valores desde < 300 pg/ml, <500 pg/ml hasta un nivel < 100 pg/ml en el día 5 de estimulación. Debido a que no se ha logrado demostrar una relación directa de esta medición con el resultado reproductivo, en el último consenso de Boloña para bajas respondedoras, se hace mención que la medición de E₂, no es valiosa para el diagnóstico(21).

Inhibina

Las inhibinas pertenecen a la familia de los “transforming Growth Factor beta (TGF-β), están constituidos por 2 subunidades α y β, son secretadas por las células de la granulosa y las células lúteas durante el ciclo menstrual(22). Actúan ejerciendo un efecto inhibitor en la síntesis y secreción de la FSH. La inhibina A se produce durante la fase folicular en los folículos maduros. Debido a que la inhibina B es secretada por los folículos preantrales, se considera una medida indirecta de la reserva ovárica(23). La inhibina presenta un incremento gradual desde la fase folicular temprana y disminuye durante la fase lútea. La inhibina B también presenta un respuesta cuando administramos FSH exógena(24).

La evidencia demuestra que la capacidad que presenta la determinación de inhibina B para predecir una baja respuesta es inferior a las demás pruebas, por eso es que no se recomienda y se utiliza solo como método de evaluación adicional(13).

Prueba de citrato de clomifeno (PCC)

Descrita a finales de la década de los 80's por Navot y cols., la prueba consiste en la administración de 100 mg de citrato de clomifeno de los días 5-9 del ciclo y medir la concentración de FSH los días 3 y 10 del mismo ciclo. El resultado de la prueba debe ser una FSH menor de 26 mUI/mL, ya que valores mayores a esta cifra se asociaron a menores tasas de embarazo. Broekmans y cols., en un metanálisis no lograron encontrar resultados homogéneos, ni para la predicción de baja respuesta o de no embarazo. Existen estudios, donde se pone en duda la utilidad de la PCC ya que incluso la medición de FSH basal a demostrado mejores resultados(25, 26).

Prueba de reserva ovárica con FSH exógena (EFORT).

Descrita en 1994, en esta prueba se administran 300 UI de FSHr, en el 3er día del ciclo, se toma una muestra sanguínea para medir la concentración de estradiol y FSH, antes de la aplicación y 24 hrs posteriores a la misma(27). 90% de las mujeres sometidas a esta prueba que tuvieron valores considerados normales (FSH \leq 11 mUI/ml y estradiol (E2) \geq 30 pg/ml) presentaron una respuesta adecuada a la estimulación ovárica, cuando se comparó solo con la FSH, EFORT fue más sensible y específica para detectar baja respuesta. Dentro de los inconvenientes de esta prueba es el costo y el riesgo de hiperestimulación ovárica.

Prueba de estimulación con GnRH agonista (GAST)

La respuesta fisiológica a la aplicación de un agonista de GnRH, consiste en un incremento inicial de E2, para posteriormente realizar una supresión total(28). Tomando en cuenta esta respuesta, esta prueba mide la concentración sérica de E2, del día 2 al día 3, posterior a la administración de un agonista, lo que estimula la secreción hipofisaria de FSH y LH(29). Cuando se utiliza en mujeres

con ciclos menstruales regulares, GAST, se considera que puede predecir la baja respuesta.

Conteo de folículos antrales

La pérdida de la reserva ovárica está relacionada funcionalmente con la disminución de los folículos antrales disponibles para el reclutamiento por gonadotropinas. El ultrasonido endovaginal es una herramienta que permite evaluar la actividad de los ovarios antes y durante la estimulación ovárica. La medición de los folículos de entre 2-5 mm, en el día 1 o 2 del ciclo, se ha relacionado directamente con la respuesta ovárica y el embarazo⁽³⁰⁾. El consenso de Boloña para pobre respuesta, considera dentro de las pruebas de reserva ovárica para hacer diagnóstico, el conteo de los folículos mediante USG endovaginal, considerando normal entre 5-7 folículos totales⁽²¹⁾. Dificultades con la realización de esta medición son: las diferencias inter-observador, así como las variaciones biológicas⁽³¹⁾.

Vascularidad ovárica

El USG es utilizado ampliamente para el seguimiento folicular durante los ciclos de estimulación, se ha tratado de correlacionar la vascularidad ovárica con la respuesta a la estimulación ovárica. Doppler pulsado endovaginal se usa ampliamente para medir el flujo sanguíneo ovárico. Algunos estudios demuestran la correlación negativa entre la edad y el flujo sanguíneo perifolicular disminuido en el día del disparo con hCG o un día previo. La presencia de flujo sanguíneo perifolicular en la fase folicular temprana, se ha asociado a una tasa de embarazo mayor⁽³²⁾. Aún no se logra estandarizar como prueba de reserva ovárica, debido a la gran variedad de equipos y que no existe una técnica establecida para realizar la medición.

Volumen ovárico

Con el paso del tiempo y la pérdida de los folículos, las dimensiones de los ovarios se ve disminuida. En las mujeres postmenopáusicas se observa una disminución del volumen ovárico⁽³³⁾. Broekmans y cols. en su metanálisis que incluye 10 estudios, presentan demasiada heterogeneidad entre ellos, por eso lleva a la conclusión que no es un estudio adecuado para la valoración de la reserva ovárica⁽¹³⁾.

Biopsia ovárica.

Ya que se trata de un estudio invasivo, con riesgos transoperatorios y posibilidad de formación de adherencias, se ha destinado exclusivamente para investigación. Se analizaron biopsias obtenidas por laparoscopia y se observó que en las mujeres mayores de 35 años, la densidad folicular era solo del 30% comparado con pacientes más jóvenes, aunque esto no representaba la densidad del ovario completo^(34, 35).

Hormona Antimülleriana

Los primeros estudios donde se valoró la relación de la AMH con la reserva ovárica se realizaron en la década de los 90's, ya que se logró utilizar un estudio de ELISA para poder detectarla. Se utilizaba tradicionalmente para detectar tumores de las células de la granulosa. Utilizando ratones con ausencia de AMH, se observó que existían mayor número de folículos reclutados, comparándolos con los de vida salvaje, como consecuencia, la reserva ovárica disminuyó a menor edad⁽³⁶⁾.

Múltiples estudios han demostrado la relación que existe entre la AMH y los ovocitos recuperados posterior a una punción, concluyendo que obtener una baja respuesta en un ciclo de FIV, se relaciona con niveles séricos bajos de AMH y por consiguiente con una reserva ovárica disminuida^(7, 37).

Fanchin et al, en 2003, publicó un estudio donde comparaba la relación entre los diversos marcadores de baja respuesta en el día 3 del ciclo. Incluyó 75 mujeres infértiles midiendo los niveles de FSH, inhibina B, Estradiol, conteo de folículos antrales, LH y AMH. Encontró que la relación de AMH con el conteo folicular, fue estadísticamente significativa. La concentración de AMH disminuye cuando se inicia la estimulación ovárica, probablemente por que disminuyen los folículos pequeños, ya que cuando alcanzan el diámetro de 8 mm, dejan de producir dicha hormona(38, 39).

Uno de los mayores éxitos en un ciclo de FIV, es el embarazo clínico, cuando mediante USG se logra demostrar la vitalidad del embrión, la AMH se ha asociado como un predictor de embarazo en las mujeres sometidas a un ciclo de FIV, encontrando valores más elevados en día 3, siendo estos de mejor pronóstico(40, 41).

Gnoth et al, en el 2008 estudiaron 316 mujeres en su 1er ciclo de estimulación para FIV, tomaron en cuenta para el estudio, la edad, niveles de FSH, inhibina B y AMH. Se consideró < 1.26 ng/ml el punto de cohorte para la AMH, demostrando una sensibilidad del 97% para detectar pobre respuesta (< 4 ovocitos); cuando el valor es de < 0.5 ng/ml se considero muy pobre respuesta (< 2 ovocitos) en un 88% de los casos, aunque no lograron correlacionar con la tasa de embarazo(42).

3. JUSTIFICACIÓN

La reproducción asistida, se ha convertido hoy en día en un tratamiento cada vez más común dentro de la población, sobre todo por el rol que desempeñan actualmente las mujeres, siendo cada vez más participativas y competitivas en los diferentes puestos que suelen ocupar. Por lo mismo, muchas de ellas prefieren diferir la maternidad hasta haber conseguido diversos objetivos, pero el reloj biológico no se detiene y la fertilidad de una mujer se define principalmente por la reserva ovárica, que es el número de ovocitos restantes.

Todas las pacientes que acuden a la clínica de reproducción, tienen la ilusión de poder engendrar un hijo sano. Muchas de ellas son mujeres mayores de 40 años, que sabemos corren el riesgo de presentar una mala respuesta a la estimulación con gonadotropinas. Muchas de ellas desean intentar un ciclo de estimulación a pesar de que las probabilidades se encuentren contra ellas. En esto radica la importancia de que el estudio inicial de la paciente nos permita poder definir un tratamiento adecuado para cada una de nuestras pacientes.

Un grupo de pacientes que acuden a la clínica de reproducción, tienen riesgo de presentar una pobre respuesta, ya sea por edad o por cirugías previas. En caso de que nosotros conociéramos la manera en que estas pacientes van a responder a la estimulación, o la posibilidad de saber la calidad ovocitaria de las mismas, se podría orientar cual es el mejor tratamiento.

El estudio básico de la pareja infértil, incluye la determinación de los valores de FSH en la fase folicular temprana, la cual sabemos que no corresponde en su totalidad, con la respuesta observada en las diferentes pacientes. Muchas pacientes que presentan niveles altos de FSH en la fase folicular temprana, se someten a un ciclo de estimulación ovárica, muchas de ellas creando falsas expectativas tanto para ellas como para nosotros los médicos, muchas de las cuales terminan siendo canceladas por pobre respuesta.

La literatura ha sugerido que la medición de la hormona antimülleriana es un marcador más fidedigno del tipo de respuesta que la paciente va a presentar, se sugiere que es más confiable ya que es producida exclusivamente por folículos pequeños, los cuales pueden ser reclutados durante la estimulación ovárica. Además se ha observado que la medición de los valores de AMH, también se pueden relacionar con las tasas de embarazo, aunque la evidencia actual aún es incierta.

Al poder demostrar la relación de los niveles de AMH con el número de ovocitos obtenidos, podremos así disponer de una herramienta mucho más efectiva para poder orientar nuestras recomendaciones y así nuestros tratamientos puedan ser más individualizados.

Existen algunos inconvenientes para convertir este estudio en uno de primera línea en nuestro país, principalmente es que no se procesa dentro del territorio mexicano, por lo que se tiene que enviar a un laboratorio extranjero, lo que incrementa los costos. Al poder demostrar que existe una adecuada correlación entre esta medición y la respuesta ovárica, se podrá tomar como un estudio inicial básico y así poder adecuar los tratamientos para las necesidades de cada paciente.

Como hemos podido observar, los estudios para la reserva ovárica que tradicionalmente se utilizan como son la medición de FSH en el día 3 del ciclo, no aportan información valiosa, excepto cuando los valores son demasiado altos. De ahí que surja la necesidad de poder validar la medición de AMH comparado con los valores de FSH.

En los casos que encontremos valores bajos de la hormona, será conveniente ofrecer algún tratamiento alternativo, como puede ser la ovodonación. Si es adecuada la correlación de los valores de AMH, con la cantidad de ovocitos capturados, se puede planear quizás, realizar ciclos de estimulación leve y con esto disminuir costos para nuestras pacientes.

La utilidad de esta prueba es amplia, en nuestro país hacen falta estudios para poder demostrarlo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Comparar los niveles de AMH y FSH en mujeres que acuden a la clínica de reproducción asistida y su capacidad de detectar a las pacientes pobres respondedoras.

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar el papel de la AMH en las pacientes que acuden a nuestra clínica en busca de algún tratamiento de reproducción asistida, principalmente detectando aquellas con baja respuesta.
- Evaluar si los niveles de AMH se relacionan con las tasas de embarazo clínico.
- Determinar si los valores de dicha hormona son utilizables en nuestra población

5. HIPOTESIS

La reserva ovárica está definido por el número de de ovocitos que presenta el ovario, si la hormona antimülleriana es producida por los ovocitos pequeños, la medición de los niveles de dicha hormona representa un marcador indirecto de la reserva ovárica. A menor nivel de la hormona, encontraremos una menor respuesta a la estimulación ovárica.

Los niveles de FSH no corresponden con la cantidad de ovocitos capturados, mientras que la medición de la AMH si se relaciona. La hormona anti-mülleriana, al poder predecir la cantidad de los ovocitos en las pacientes que se someten a tratamientos de reproducción asistida, se puede convertir en una herramienta de uso diario en todos los centros de reproducción asistida.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño.

Estudio descriptivo, observacional, abierto, prospectivo, transversal no aleatorizado.

6.2 Universo de estudio.

Pacientes de Hisparep, que acudan para algún tratamiento de reproducción asistida de alta complejidad con riesgo para pobre respuesta (cirugía ovárica, mayores de 40 años de edad), que se hayan sometido a técnicas de baja complejidad sin lograr respuesta adecuada.

6.3 Tamaño de la muestra.

Se analizaron 27 pacientes entre el 30 de Noviembre del 2011 al 30 de Junio del 2012.

6.4 Criterios de inclusión.

Pacientes que acudan con diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria sin importar el tiempo de evolución.

Pacientes con determinación de AMH, sin importar la fase del ciclo.

Pacientes con determinación de FSH en el día 3-5 del ciclo.

Pacientes con conteo de folículos antrales, en la fase folicular temprana.

Pacientes con riesgo de pobre respuesta (Edad mayor de 40 años o que se hayan sometido a cirugía ovárica).

6.4 Criterios de exclusión.

Pacientes con diagnóstico de menopausia y que acudan para ovodonación.

Pacientes que no acepten realizarse el estudio de hormona antimülleriana

6.5 Variables.

Independientes.		Dependientes.	
Variable	Escala	Variable	Escala
Edad	Cuantitativa	Nivel de FSH	Cuantitativa
Peso	Cuantitativa	Nivel de AMH	Cuantitativa
Índice de masa corporal	Cualitativa ordinal	Conteo de folículos antrales	Cuantitativa
Embarazo previo	Cualitativa nominal		
Años de infertilidad	Cuantitativa		

6.6 Descripción operativa del estudio.

De todas las mujeres que acuden a la clínica de reproducción en busca de embarazo, se analizaron aquellas que presentaban riesgo para pobre respuesta a la estimulación. Se les solicitó 1 mes previo al inicio del ciclo de estimulación, una determinación en sangre de los niveles de hormona antimülleriana. Durante el ciclo de estimulación en el día 2 del ciclo se midieron los niveles basales de hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y estradiol (E2), así como un USG endovaginal, donde se tomó la medida de los ovarios y el conteo de los folículos antrales. Posteriormente todas las pacientes del estudio se les realizó un ciclo de estimulación con antagonista esquema flexible, se utilizó FSH recombinante a dosis estándar, se utilizó menotropinas en el día 8 del ciclo 75 U y el disparo se realizó con hCG urinaria 10,000 U al alcanzar un tamaño folicular mayor de 17 mm. Se realizó la captura ovocitaria bajo anestesia, se fecundó mediante FIV convencional y una sola paciente mediante ICSI. Se realizó la transferencia embrionaria en un día 3 de desarrollo. Se solicitó hCG cuantitativa en el día 14 posterior a la transferencia.

7. Resultados.

Se mencionan las principales características de las pacientes incluidas en el presente estudio (Tabla 1):

Se analizaron 27 pacientes que acudieron a la clínica de reproducción HISPAREP.

Características	Valores
Edad (años)	39 (29-44)
Peso (Kg)	62 (48-87)
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	23.8 (18.7-37.7)
Nivel de AMH (ng/mL)	0.6 (0.16-1.8)
Nivel de FSH (mU/mL)	8.39 (3.8-19.62)
Nivel de estradiol (pg/mL)	41.25 (9.37-508)
Conteo de folículos antrales	5 (2-10)
Nivel de TSH (μU/mL)	2.27 (0.83-3.8)
Nivel de prolactina (ng/mL)	15.3 (8.4-29.5)

Tabla 1.- Principales características de las pacientes incluidas en el estudio

Las pacientes que se analizaron presentaban una edad de 39 años (IC95% 37.8-40.9). Mientras que el peso fue de 62.18 Kg (IC95% 58.8.65.4). Se calculó el índice de masa corporal en todas las pacientes siendo 23.8 (IC95% 22.5-25.1)(Fig.3).

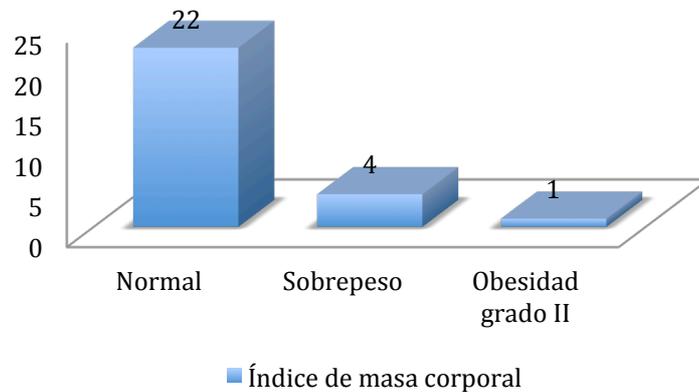


Figura 3.- Distribución de acuerdo a índice de masa corporal

De las 27 pacientes que incluimos en nuestro estudio 81% se encontraban con una peso dentro de lo normal (< 25 Kg/m²). 4 pacientes con sobrepeso y solo 1 pacientes con obesidad grado 2.

Embarazo previo

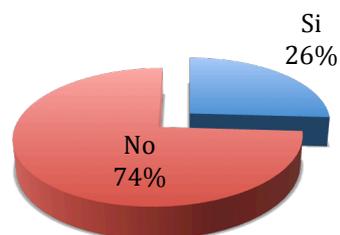


Figura 4.- Antecedente de embarazo previo

Se observó que un 74% de las pacientes nunca habían estado embarazadas(Fig. 4).

Causa de infertilidad

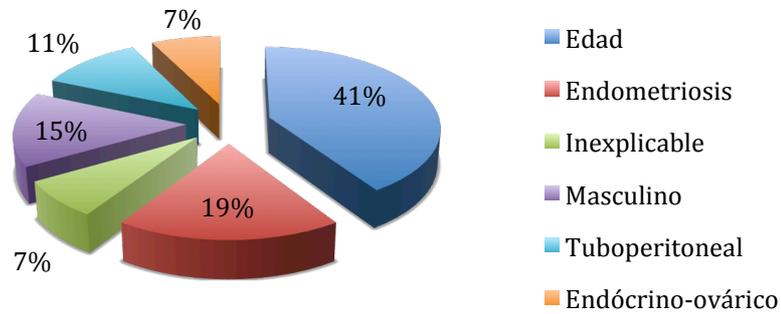


Fig. 5.- Principales causas de atención

La principal causa de atención a las pacientes fue por edad en un 41%, seguido por endometriosis en un 19%, factor masculino 15%. Se consideraron las patologías por las que las pacientes acudieron(Fi. 5).

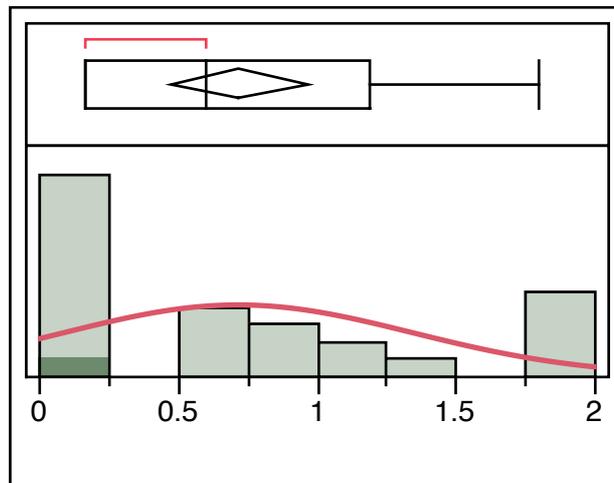


Fig. 6.- Distribución de los niveles de AMH

La distribución que existió de la hormona Antimülleriana dentro de la muestra analizada(Fi.g 6).

Se realizó análisis estadístico con el programa JMP versión 9, del instituto SAS.

Se llevó a cabo análisis de regresión lineal para predecir la captura ovocitaria. Las variables independientes incluidas fueron: edad, índice de masa corporal, hormona Antimülleriana y niveles basales de FSH.

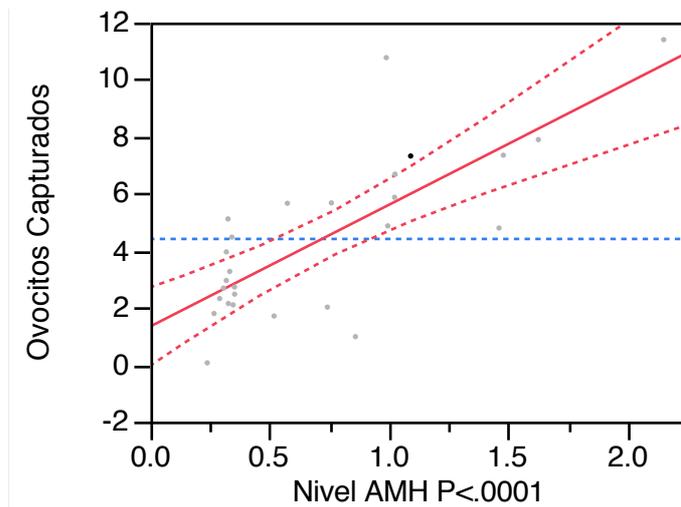


Fig. 7.- Relación entre los niveles de AMH y los ovocitos capturados

Dentro del análisis completo comparado con la edad, índice de masa corporal, nivel basal de FSH y niveles de hormona Antimülleriana. Se encontró una relación estadísticamente significativa ($p < .0001$), entre el número de ovocitos que se obtuvieron durante la aspiración folicular y los niveles de hormona antimülleriana (Fig. 7).

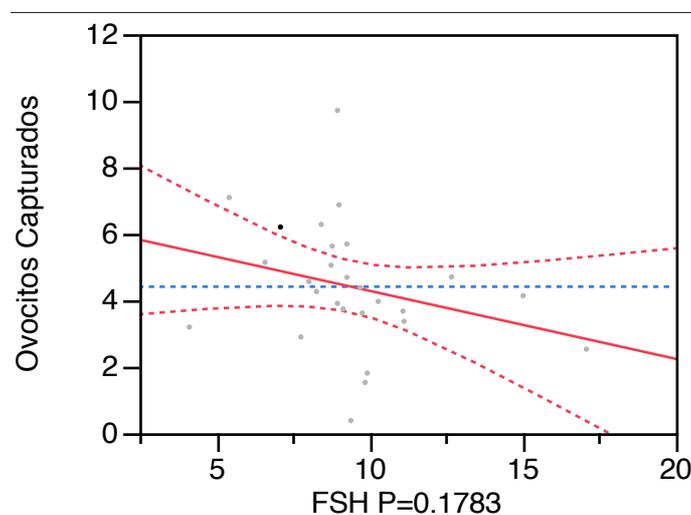


Fig. 8.- Relación entre FSH y ovocitos capturados. P no significativa

Al comparar el nivel de FSH con los ovocitos capturados, no se encontró relación alguna encontrando una p de 0.17 (Fig. 8).

Correlación de Pearson, donde podemos encontrar la relación de los niveles de AMH con los ovocitos aspirados estadísticamente significativa con una $p < .05$

8. DISCUSIÓN

Las pacientes que presentan una pobre respuesta a la estimulación ovárica, tienen menos probabilidades de conseguir un hijo vivo en casa. Es indispensable el estudio inicial de la pareja infértil y más aún poder evaluar la reserva ovárica.

La edad es uno de los principales factores relacionados con la fertilidad de las pacientes. Sabemos que la fertilidad comienza a declinar a partir de los 35 años, siendo de mayor importancia al llegar a los 40 años y hasta la etapa de la menopausia(43). Dentro del grupo de estudio tenemos 10 mujeres menores de 40 años, de las cuales podemos observar existe una baja respuesta a la estimulación ovárica. Podemos demostrar la utilidad que tiene la hormona Antimülleriana para poder predecir la respuesta al tratamiento, para poder ofrecer un mejor pronóstico a las pacientes.

En este estudio medimos la relación que existe entre el número de ovocitos y los niveles basales de FSH y de hormona antimülleriana. Encontramos que los niveles de hormona antimülleriana son un factor importante en el número de ovocitos que se logran capturar, con esto demostramos que la medición de dicha hormona es una prueba de reserva ovárica confiable. Nashuda encontró en 2011, resultados similares en mujeres que acuden a las clínicas a donar, relacionó el nivel de AMH con la cantidad de ovocitos capturados, encontrando que cuando existe un nivel de AMH mayor, mayor es el número de ovocitos que se logran obtener(44).

Se sugiere que las pacientes se deben de someter a una determinación de hormona antimülleriana, antes de iniciar el estímulo hormonal, sobre todo en mujeres jóvenes que la respuesta ovárica no es la esperada. Sabemos que la FSH no es un buen marcador para la respuesta ovárica como se mencionaba en el trabajo de Toner en 1991(45), en este trabajo se mencionó que el nivel de FSH es mejor predictor que la edad. Aunque la edad de la paciente es un factor determinante, lo es también la reserva ovárica; y en la actualidad los mejores marcadores para valorar la reserva ovárica son el conteo de folículos antrales y los niveles de AMH(46), como lo pudimos observar en el trabajo realizado.

Dentro del campo de la reproducción, aún existen muchos aspectos que no se logran conocer en su totalidad, existen muchos tratamientos empíricos los cuáles

nos dan una respuesta paradójica, de ahí que surja la necesidad de conocer la reserva ovárica de las pacientes previo al tratamiento.

Además de la cantidad de ovocitos capturados, algo realmente importante es la calidad de los mismos, se ha mencionado que los niveles de la hormona antimülleriana puede predecir la cantidad de ovocitos pero aún no se logra correlacionar con el embarazo en un ciclo de fertilización in vitro(47). No encontramos asociación entre los niveles de hormona Antimülleriana y embarazo.

Hacen falta más estudios para poder validar el uso de la hormona Antimülleriana en nuestro país como un estudio indispensable para los centros de reproducción asistida.

9. CONCLUSIONES

La medición de los niveles de hormona antimülleriana debe ser un estudio básico de las parejas infértiles.

La edad es un factor determinante para la fertilidad de una mujer. Cada vez es más común que las mujeres pospongan la maternidad, principalmente por factores sociales. Las técnicas de reproducción asistida han mejorado desde que se utilizaron por primera ocasión. Existen múltiples esquemas de estimulación ovárica.

Cada vez son más las pacientes que acuden solicitando un tratamiento con edades mayores de 35 años, estas pacientes tienen riesgo de presentar pobre respuesta al tratamiento. Es indispensable conocer de antemano las pacientes que pueden presentar esta condición, para así planear adecuadamente la estrategia de tratamiento.

La hormona Antimülleriana demostró que es un marcador de la respuesta ovárica, ya que se asoció al número de ovocitos capturados. Tradicionalmente se ha utilizado los niveles de FSH en la fase folicular temprana para poder conocer la reserva ovárica, en nuestro estudio, no presentó significancia estadística, mientras que la AMH sí se observó.

Aún hace falta poder conocer la calidad de los ovocitos, no se ha encontrado un marcador para esto.

Hacen falta más estudios, con casos y controles, para poder establecer los niveles de normalidad dentro de nuestra población.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct;84(10):3836-44.
2. Visser JA, McLuskey A, Verhoef-Post M, Kramer P, Grootegoed JA, Themmen AP. Effect of prenatal exposure to diethylstilbestrol on Mullerian duct development in fetal male mice. *Endocrinology.* 1998 Oct;139(10):4244-51.
3. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, et al. Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell.* 1986 Jun 6;45(5):685-98.
4. Josso N, Legeai L, Forest MG, Chaussain JL, Brauner R. An enzyme linked immunoassay for anti-mullerian hormone: a new tool for the evaluation of testicular function in infants and children. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 Jan;70(1):23-7.
5. Almog B, Shehata F, Suissa S, Holzer H, Shalom-Paz E, La Marca A, et al. Age-related normograms of serum antimullerian hormone levels in a population of infertile women: a multicenter study. *Fertil Steril.* 2011 Jun;95(7):2359-63, 63 e1.
6. Visser JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2005 Apr 29;234(1-2):81-6.
7. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, et al. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod.* 2002 Dec;17(12):3065-71.
8. Fasouliotis SJ, Simon A, Laufer N. Evaluation and treatment of low responders in assisted reproductive technology: a challenge to meet. *J Assist Reprod Genet.* 2000 Aug;17(7):357-73.
9. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update.* 2002 Mar-Apr;8(2):141-54.
10. Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2003 Jan-Feb;9(1):61-76.
11. Smeenk JM, Stolwijk AM, Kremer JA, Braat DD. External validation of the templeton model for predicting success after IVF. *Hum Reprod.* 2000 May;15(5):1065-8.
12. van Rooij IA, Broekmans FJ, Hunault CC, Scheffer GJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, et al. Use of ovarian reserve tests for the prediction of ongoing pregnancy in couples with unexplained or mild male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2006 Feb;12(2):182-90.
13. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 2006 Nov-Dec;12(6):685-718.
14. Levi AJ, Raynault MF, Bergh PA, Drews MR, Miller BT, Scott RT, Jr. Reproductive outcome in patients with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2001 Oct;76(4):666-9.

15. Creus M, Penarrubia J, Fabregues F, Vidal E, Carmona F, Casamitjana R, et al. Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome. *Hum Reprod.* 2000 Nov;15(11):2341-6.
16. Hanoch J, Lavy Y, Holzer H, Hurwitz A, Simon A, Revel A, et al. Young low responders protected from untoward effects of reduced ovarian response. *Fertil Steril.* 1998 Jun;69(6):1001-4.
17. van Rooij IA, Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2003 Mar;79(3):482-8.
18. Scott RT, Jr., Hofmann GE, Oehninger S, Muasher SJ. Intercycle variability of day 3 follicle-stimulating hormone levels and its effect on stimulation quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1990 Aug;54(2):297-302.
19. Barnhart K, Osheroff J. Follicle stimulating hormone as a predictor of fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1998 Jun;10(3):227-32.
20. Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1995 Nov;64(5):991-4.
21. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod.* 2011 Jul;26(7):1616-24.
22. Lockwood GM, Muttukrishna S, Groome NP, Matthews DR, Ledger WL. Mid-follicular phase pulses of inhibin B are absent in polycystic ovarian syndrome and are initiated by successful laparoscopic ovarian diathermy: a possible mechanism regulating emergence of the dominant follicle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 May;83(5):1730-5.
23. Muttukrishna S, Fowler PA, Groome NP, Mitchell GG, Robertson WR, Knight PG. Serum concentrations of dimeric inhibin during the spontaneous human menstrual cycle and after treatment with exogenous gonadotrophin. *Hum Reprod.* 1994 Sep;9(9):1634-42.
24. Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril.* 1997 Jan;67(1):110-4.
25. Jain T, Soules MR, Collins JA. Comparison of basal follicle-stimulating hormone versus the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril.* 2004 Jul;82(1):180-5.
26. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Schoemaker J, Lambalk CB. The clomiphene citrate challenge test versus the exogenous follicle-stimulating hormone ovarian reserve test as a single test for identification of low responders and hyperresponders to in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2006 Jun;85(6):1714-22.
27. Fanchin R, de Ziegler D, Olivennes F, Taieb J, Dzik A, Frydman R. Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable screening test for detecting 'poor responders' in in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1994 Sep;9(9):1607-11.
28. Winslow KL, Toner JP, Brzyski RG, Oehninger SC, Acosta AA, Muasher SJ. The gonadotropin-releasing hormone agonist stimulation test--a sensitive predictor of performance in the flare-up in vitro fertilization cycle. *Fertil Steril.* 1991 Oct;56(4):711-7.

29. Sharara FI, Scott RT, Jr., Seifer DB. The detection of diminished ovarian reserve in infertile women. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Sep;179(3 Pt 1):804-12.
30. Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT, Soong YK, Hsu KH. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril.* 1998 Mar;69(3):505-10.
31. Frattarelli JL, Levi AJ, Miller BT, Segars JH. A prospective assessment of the predictive value of basal antral follicles in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2003 Aug;80(2):350-5.
32. Robson SJ, Barry M, Norman RJ. Power Doppler assessment of follicle vascularity at the time of oocyte retrieval in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2008 Dec;90(6):2179-82.
33. Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D, Vujisic S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril.* 2003 Jan;79(1):190-7.
34. Lass A. Assessment of ovarian reserve: is there still a role for ovarian biopsy in the light of new data? *Hum Reprod.* 2004 Mar;19(3):467-9.
35. Kwok R, Johnson NP. Ovarian biopsy has no role as a routine diagnostic test of ovarian reserve: a systematic review. *Reprod Biomed Online.* 2012 May;24(5):492-5.
36. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology.* 1999 Dec;140(12):5789-96.
37. Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Sheldon RM. Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril.* 2002 Mar;77(3):468-71.
38. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod.* 2003 Feb;18(2):323-7.
39. Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG.* 2005 Oct;112(10):1384-90.
40. Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Serum antimullerian hormone/mullerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril.* 2004 Nov;82(5):1323-9.
41. Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, et al. Dynamic assays of inhibin B, anti-Mullerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod.* 2005 Nov;20(11):3178-83.
42. Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Mullerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod.* 2008 Jun;23(6):1359-65.
43. Baird DT, Collins J, Egozcue J, Evers LH, Gianaroli L, Leridon H, et al. Fertility and ageing. *Hum Reprod Update.* 2005 May-Jun;11(3):261-76.

44. Nakhuda GS, Douglas NC, Thornton MH, Guarnaccia MM, Lobo R, Sauer MV. Anti-Mullerian hormone testing is useful for individualization of stimulation protocols in oocyte donors. *Reprod Biomed Online*. 2011 Feb;22 Suppl 1:S88-93.
45. Toner JP, Philput CB, Jones GS, Muasher SJ. Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertil Steril*. 1991 Apr;55(4):784-91.
46. Lie Fong S, Baart EB, Martini E, Schipper I, Visser JA, Themmen AP, et al. Anti-Mullerian hormone: a marker for oocyte quantity, oocyte quality and embryo quality? *Reprod Biomed Online*. 2008 May;16(5):664-70.
47. Riggs R, Kimble T, Oehninger S, Bocca S, Zhao Y, Leader B, et al. Anti-Mullerian hormone serum levels predict response to controlled ovarian hyperstimulation but not embryo quality or pregnancy outcome in oocyte donation. *Fertil Steril*. 2011 Jan;95(1):410-2.