Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas

SUPRESSÃO DO FSH NA TRANSIÇÃO LÚTEO-FOLICULAR COM ANTICONCEPCIONAL ORAL – EFEITOS SOBRE A COORTE FOLICULAR E OS NÍVEIS SÉRICOS DO FATOR ANTI-MÜLLERIANO

Autor: Elisangela Arbo

Orientador: Prof. Dr. João Sabino L. da Cunha Filho

Dissertação de Mestrado

2006

A666s Arbo, Elisangela
Supressão do FSH na transição lúteo-folicular com anticoncepcional oral : efeitos sobre a coorte folicular e os níveis séricos do fator anti-mülleriano / Elisangela Arbo ; orient. João Sabino L. da Cunha Filho. – 2006.
92 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Anticoncepcionais orais 2. Fase luteal 3. Hormônio folículo estimulante 4. Marcadores biológicos I. Cunha Filho, João Sabino Lahorgue da II. Título.

NLM: QV 177

Catalogação Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que acreditaram no meu potencial em desenvolver este trabalho, oferecendo seu apoio, sua compreensão, sua ajuda técnica ou emocional, seu incentivo, sua contribuição pessoal ou institucional. Em especial, agradeço:

Aos meus pais, Mara Elisa e Hélcio Arbo que, ao abrir mão da nossa convivência diária, me incentivaram a seguir meu próprio caminho;

Ao meu amado esposo André, que com todo o seu amor e compreensão, sempre me incentivou a ir cada vez mais longe, sempre se orgulhando tanto de minhas conquistas, estando sempre e incondicionalmente comigo;

Ao meu orientador, Dr. João Sabino que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou, me proporcionando um aprendizado excepcional;

Aos professores de ontem e hoje, em especial aos Professores Fernando Freitas, Eduardo Passos, José Antonio Magalhães, entre tantos, pelas oportunidades e lições ensinadas;

Aos colegas Daniela Vettori, Andréa Facin, Ricardo Palma Dias pela inenarrável contribuição na minha formação e na realização deste trabalho;

Ao Farmacêutico Luis, do Laboratório de Imunoensaios do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela análise das amostras;

Enfim, a todos aqueles que um dia esboçaram qualquer incentivo, uma palavra amiga e que torceram por mim, o meu “Muito Obrigada”.

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista ao meu amado André, pela infinita compreensão e pelo inestimável amor, que sempre serviram de combustível para todos os meus dias.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACO – anticoncepcional oral

AMH - *anti-müllerian hormone*

AMP – monofosfato de adenosina (*adenosine monophosphate*)

AMPc – monofostato de adenosina cíclico (*cyclic adenosine monophosphase*)

COH – *controlled ovarian hyper-stimulation*

ELISA – ensaio imunoabsorvente enzimático sensível (*enzime-linked immunoabsorvent sensitive assay*)

FSH – hormônio folículo estimulante (*follicle stimulating hormone)*

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas (*gonadothophin releasing hormone*)

HAM - hormônio anti-mülleriano

hCG – gonadotrofina coriônica humana (*chorionic human gonadotrophin*)

LH – hormônio luteinizante (*lutenizing hormone*)

OCP – *oral contraceptive pill*

TGFβ – fator de crescimento transformador β (*transforming growth factor β*)

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Níveis hormonais e medidas foliculares em um ciclo menstrual espontâneo e após a inibição da secreção de FSH na fase lutea tardia, com o uso de anticoncepcional oral. (*Hormonal and follicular measures in a spontaneous menstrual cycle and after intercycle FSH inhibition with the use of OCP in the late luteal phase*)…….....páginas 56 e 83

Figura 1: Níveis de hormônio anti-mülleriano por folículo medido (HAM/número de folículos), no terceiro dia de um ciclo menstrual espontâneo e após a inibição inter-ciclo do FSH após o uso de anticoncepcional na fase lútea tardia. [*Per follicle levels of AMH (AMH/number of follicles) at the third day of a spontaneous menstrual cycle and after inter-cycle FSH inhibition with the use of luteal OCP*]. …….…….…….páginas 57 e 84

Figura 2: Níveis séricos individuais do HAM, FSH e estradiol antes (1) e após (2) o uso do ACO na fase lutea tardia para inibição hipofisária. (*Individual anti-mullerian hormone, FSH, and estradiol serum levels before (1) and after (2) use of OCP in the late luteal phase to pituitary down-regulation*)……...……páginas 58 e 85

Figura 3: A: Gráficos de correlação dos níveis séricos de HAM pelo FSH, estradiol e número de folículos, em um ciclo menstrual espontâneo (coeficientes de Sperman rho foram respectivamente -0.193, -0,293, -0,146, *P*>0,05). B: Gráficos de correlação dos níveis séricos de HAM pelo FSH, estradiol e número de folículos, após a administração na fase lútea de ACO (coeficientes de Sperman rho foram respectivamente 0,404, 0,235,

0,360, *P*>0,05). [*A: Scatterplots of AMH by FSH, estradiol serum levels and follicle number measured per patient, spontaneous menstrual cycle (Sperman's rho coefficients are respectively -0.193, -0.293, -0.146, P>0.05). B: Scatterplots of AMH by FSH, estradiol and follicle number per patient, after late luteal phase OCP administration (Sperman's rho coefficients are respectively 0.404, 0.235, 0.360, P>0.05)*]……..……páginas 58 e 86

ÍNDICE

1. Resumo……..……08

2. Abstract……..……10

3. Introdução……..…11

3.1 Desenvolvimento folicular…….……12

3.11 Bases fisiológicas…….……...12

3.2 Transição lúteo-folicular…….……..14

3.3 Coorte folicular ovariana e homogeneização da coorte folicular…….…..16

3.3.1 Homogeneização da coorte folicular…….……..17

3.4 Anticoncepcionais orais e seu efeito sobre o crescimento folicular……..19

3.5 Hormônio anti-mülleriano…….21

4. Justificativa……..…….27

4.1 Hipótese nula……..……..27

5. Objetivos……..…….28

5.1 Objetivo principal……..…….28

5.2 Objetivos secundários……..…….28

6. Referências da introdução……..29

7. Artigo (versão em inglês)…….37

8. Artigo (versão em português)…….61

9. Conclusões……86

10. Perspectivas…….……..87

11. Anexos……..89

11.1 Termo de consentimento livre e esclarecido…….…..…..…89

11.2 Ficha de coleta de dados…….……..……..91

1. RESUMO

Objetivo: avaliar o efeito da supressão do FSH na fase lútea tardia do ciclo menstrual com anticoncepcional oral (ACO) sobre os níveis do hormônio anti-mülleriano (HAM) e sobre a coorte folicular ovariana (principalmente seu número, diâmetros e homogeneidade)

Delineamento: estudo clínico prospectivo.

Metodologia: foram incluídas no estudo 20 mulheres normoovulatórias, selecionadas no Ambulatório do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que tinham como causa de infertilidade obstrução tubária bilateral ou infertilidade de causa masculina. No terceiro dia de um ciclo menstrual espontâneo foram realizadas ecografia transvaginal e coleta de sangue para as dosagens hormonais. A partir do vigésimo dia desde ciclo menstrual as pacientes ingeriram diariamente um ACO contendo 0.03 mg de etinil estradiol e 0,15 mg de desogestrel. No terceiro dia do ciclo seguinte, as medidas foram repetidas.

Resultados: a média de idade das pacientes foi de 29 anos (23-35). Após o uso do ACO os níveis de FSH e estradiol foram significativamente reduzidos (P<0,001). O número de folículos antrais medidos nos dois momentos não diferiu (15,8 $\pm$ 4,7 antes e 16,6 $\pm$ 3,6 após o uso do ACO), embora após o uso do ACO os folículos apresentaram diâmetros significativamente menores (médias de 4,4 $\pm$ 1,7 antes e de 3,5 $\pm$ 1,2 após, P<0,001). Os níveis do HAM foram significativamente reduzidos após o bloqueio hipofisário, com respectivas medianas (intervalo interquartil) de 3,02 ng/mL (1,21 – 6,39) antes do uso do ACO e 2,22 ng/mL (0,9 – 3,11) após, P=0,04. Não encontramos correlação entre os níveis de HAM e de FSH.

Conclusão: o uso de ACO na fase lútea tardia foi eficaz em inibir a secreção hipofisária de FSH, o que levou a uma coorte folicular mais homogênea, com folículos de menor

diâmetro. A diminuição dos níveis do HAM verificados após o uso do ACO não tiveram correlação com a inibição do FSH.

2. ABSTRACT

Objective: evaluate the effect of FSH suppression in the late luteal phase of menstrual cycle with oral contraceptives pills (OCP) on anti-mullerian factor (AMH) levels and on the follicular cohort (number, diameter and homogeneity of measurable antral follicles).

Design: a prospective trial

Materials and methods: We included in our trial 20 normovulatory infertile women from the ambulatory of the Obstetrics and Gynecology Department of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, with tubal obstruction or male infertility. On the third day of a spontaneous menstrual cycle, they were submitted to a transvaginal ultrasound examination and blood sample collect. All antral follicles greater than 2 mm were noticed. From the 20th day of this menstrual cycle, the patients took daily OCP, containing 0.03 mg of ethinil-estradiol plus 0,15 mg of desogestrel. On the third day of the following cycle, the measurements were repeated.

Results: The patients' mean age was 29 years (23 to 35). After OCP use the levels of FSH and estradiol were significantly reduced (P<0.001). The number of antral follicles measured at both moments did not differ (15.8 $\pm$ 4.7 before and 16.6 $\pm$ 3.6 after, P=0.44), although after OCP the follicles presented significant lower diameters (means of 4.4 $\pm$ 1.7 mm before versus 3.5 $\pm$ 1.2 mm after, P<0.001). The levels of AMH were significantly reduced after pituitary down-regulation, with medians (interquartille range) of 3.02 ng/mL (1.21 – 6.39) before OCP use and 2.22 ng/mL (0.9 – 3.11) after it, P=0.04. We found no correlation between AMH and FSH levels.

Conclusions: The short administration of OCP in late luteal phase was able to inhibit pituitary secretion of FSH during the inter-cycle transition, leading to a more homogeneous follicular cohort. The decrease in AMH levels verified after OCP administration had no correlation with the FSH decrease.

3. INTRODUÇÃO

O objetivo da estimulação ovariana exógena, em ciclos de indução da ovulação, é conseguir a poli-ovulação, com desenvolvimento e maturação de diversos folículos e conseqüente aumento das chances de sucesso dos procedimentos de reprodução assistida. Muito importante para o sucesso dos procedimentos de reprodução assistida é o conhecimento profundo da fisiologia ovariana e os mecanismos envolvidos nos processos de seleção, recrutamento, dominância e desenvolvimento folicular, fenômenos que ocorrem cíclica e continuamente, no ovário feminino. Neste processo, é fundamental o papel do hormônio folículo estimulante (FSH), que possui ação sobre o recrutamento e desenvolvimento folicular.

O FSH é produzido pela hipófise anterior, e no ovário estimula a proliferação e a produção hormonal das células da granulosa dos folículos ovarianos, levando ao crescimento e diferenciação folicular – este hormônio estimula a aromatização dos andrógenos a estrógenos, aumenta a expressão de receptores celulares de LH e do próprio FSH, estimula a produção de fatores locais reguladores do crescimento, como activinas e inibinas, entre outras ações (Speroff e Fritz, 2005). Seus níveis aumentam ao longo da primeira fase do ciclo menstrual, a fase folicular, e declinam drasticamente logo após a ovulação, na segunda fase do ciclo, a fase lútea.

Após a involução do corpo lúteo, na denominada fase lútea tardia, a queda dos níveis de estrógenos e inibina A servem de estímulo para o aumento da secreção do FSH. Seus níveis em ascensão operam como um “sinal ovariano” para o início de um novo ciclo de recrutamento folicular (Roseff, 1989; Fauser, 1997). O desenvolvimento folicular, principalmente a sua seleção e recrutamento, é iniciado, portanto, no final da fase lútea com o aumento paulatino dos níveis séricos de FSH (Mais, 1987; Gonen, 1990; Fauser e van Heusden, 1997). É normalmente concebido de que o FSH deva se elevar a partir de

um nível crítico para que o crescimento e o desenvolvimento folicular ocorram (Gougeon, 1996; Fauser e van Heusden, 1997; Zeleznik, 2001), a partir do qual o crescimento folicular torna-se mais rápido, até a fase pré-ovulatória.

3.1. DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

3.1.1 BASES FISIOLÓGICAS

O pool oocitário feminino é definido ainda durante sua vida intra-uterina, a partir da 16ª semana de idade gestacional. A diferenciação gonadal feminina começa em torno da 6ª – 8ª semana de vida embrionária, com intensa atividade mitótica das células germinativas, atingindo o número aproximado de 6 a 7 milhões de oogônias por volta da 16ª semana (Speroff e Fritz, 2005). Ao nascimento, os ovários contêm cerca de 1-2 milhões de células germinativas e na fase pré-puberal este número já estará reduzido a 500 000 unidades, e durante toda a sua vida reprodutiva, a mulher ovulará apenas cerca de 400 a 500 vezes. Todo o restante do pool oocitário entrará em atresia, o que ocorre com maior intensidade no período que antecede a menopausa (Gougeon, 1994; Fauser e Heusden, 1997; Speroff e Fritz, 2005).

Morfologicamente, os folículos ovarianos são habitualmente classificados seguindo a classificação original de Gougeon (Gougeon, 1984), o qual considera as seguintes classes foliculares:

- folículos primordiais: contêm uma única camada de células planas circundando o oócito;
- folículos primários: o primeiro estágio de crescimento e diferenciação folicular, com uma camada única de células da granulosa circundando o oócito;

- folículos secundários: presença de células da teca externa em torno das células da granulosa;

- folículos pré-antrais (classe 1): presença de várias camadas de células da granulosa circundando o oócito (aproximadamente oito camadas), com as células da teca em desenvolvimento, com diferenciação das camadas da teca interna e externa;

- folículos antrais: presença de uma cavidade cheia de fluido (líquido folicular), em crescimento rápido através da intensa multiplicação das camadas circundantes e produção, pelas células da granulosa, do líquido folicular. Os folículos antrais iniciais têm aproximadamente 0,2 milímetros de diâmetro (classe 2), e a partir daí, os folículos antrais são classificados de acordo com o diâmetro antral (classes 3 a 7, até 16 mm de diâmetro antral).

- folículos pré-ovulatórios (classe 8): provêem da multiplicação rápida das células foliculares, com a expansão da cavidade folicular (ou antro). Nesta fase o oócito encontra-se deslocado para a lateral do antro e circundado por uma infinidade de células da granulosa (*cúmulus oóforus*).

O desenvolvimento dos folículos primordiais até a fase pré-antral acontece de forma aleatória e contínua, independente do estímulo do FSH (Gougeon 1986b; Gougeon, 1996). Este desenvolvimento ocorre mesmo em ocasiões em que o FSH encontra-se suprimido (gestação, uso de contraceptivo oral, lesões hipofisárias, por exemplo). A partir da fase pré-antral, se não houver estímulo hormonal para continuar o seu desenvolvimento, o destino da maioria dos folículos é a atresia (Gougeon, 1986b; Gougeon, 1996; Fauser e Van Heusden, 1997; Speroff e Fritz, 2005).

Deste modo, folículos em diferentes estágios de desenvolvimento podem ser observados no ovário ao mesmo tempo e, embora qualquer um deles possa atingir a maturação até a ovulação, apenas folículos que estiverem em fase de desenvolvimento mais acelerado no inter-ciclo menstrual, coincidindo com o aumento do FSH, vão adquirir

esta capacidade (Gougeon, 1984; Mais, 1987; Gougeon, 1996; Fauser e Van Heusden, 1997).

3.2 TRANSIÇÃO LÚTEO-FOLICULAR

O processo de crescimento folicular ocorre de forma contínua no ovário feminino – a cada dia alguns folículos primordiais deixam a fase de repouso e iniciam o seu crescimento e diferenciação (Gougeon, 1986b). Como apenas um oócito atingirá a maturidade até a ovulação, o destino da maioria dos folículos é a atresia (Gougeon 1986; Gougeon, 1994). O que se denomina correntemente de “recrutamento folicular” é o resgate dos folículos da atresia através do estímulo do FSH, com estímulo à proliferação das células da granulosa, à secreção de estradiol e à formação do antro folicular (Gougeon, 1986; Gougeon, 1986b, Fauser e van Heusden 1997). Este processo ocorre ciclicamente, iniciando a partir da transição lúteo-folicular estendendo-se até a fase folicular inicial – entre os folículos recrutados estará aquele que irá atingir maturidade até a ovulação (Mais, 1987; Taymor, 1996; Fauser e Van Heusden, 1997).

Considera-se que os folículos que cresceram até pré-antrais no início da fase lútea serão os que responderão de maneira adequada ao estímulo do FSH que se inicia na fase lútea tardia, por apresentarem maior número de receptores hormonais, e apresentarão potencial para serem recrutados (Rossef, 1989; Taymor, 1996).

Na fase lútea tardia os folículos antrais iniciais têm alta capacidade de esteroidogênese em resposta ao FSH, com uma atividade da aromatase até 200 vezes maior que nas outras fases do ciclo menstrual (McNatty, 1983). É nesta fase que se observa o maior número de folículos antrais iniciais, entre 2-5 mm de diâmetro (Gougeon, 1996). Com o aumento dos níveis de FSH nesta fase, o crescimento folicular torna-se mais acelerado, e como conseqüência, no inicio da fase folicular seguinte observa-se nos

ovários uma grande quantidade de folículos antrais em desenvolvimento (Gougeon, 1986b; Messinis e Templeton, 1990), os quais se tornam passíveis de mensuração ecográfica.

No final da fase lútea há o aumento gradual da secreção de FSH, como decorrência, principalmente, da falência do corpo lúteo e da queda dos níveis de estradiol e de inibina A (produtos ovarianos), o que irá iniciar o processo de recrutamento folicular (Mais, 1987; Rossef, 1989; Le Nestour, 1993; Taymor, 1996; Fauser e Van Heusden, 1997).

Com a falência do corpo lúteo os níveis de inibina decrescem rapidamente (Welt, 2003), e uma correlação inversa com os níveis de FSH é observada daí em diante (Rossef, 1989). A queda dos níveis de estradiol e progesterona, neste momento do ciclo ovariano também influem diretamente na secreção hipotalâmica de GnRH – há aumento da pulsatilidade da secreção do GnRH, o que acarreta diretamente maior secreção de FSH pela hipófise (Hall, 1992; Le Nestour, 1993; Zariñán, 2001; Welt, 2003).

O aumento dos níveis de FSH no final da fase lútea está, pois, temporalmente relacionado com a ovulação e com a duração do corpo lúteo - seus começam a elevar-se aproximadamente 28 horas antes do início da menstruação (Mais et al., 1987), o que corresponderia a aproximadamente 12 dias após o pico pré-ovulatório de LH (Fauser e Van Heusden, 1997).

Neste momento do ciclo, os níveis em elevação do FSH fornecem condições para o recrutamento folicular, ou seja, a continuidade do crescimento dos folículos que estão em fase pré-antral e antral inicial de desenvolvimento, evitando a sua atresia (Taymor, 1996; Fauser e Van Heusden, 1997). Somente serão recrutados folículos que estiverem neste estágio de desenvolvimento, sendo que os maiores folículos são mais sensíveis ao estímulo do FSH, por conterem maior quantidade de receptores a este hormônio (Taymor, 1996; Fanchin, 2003).

A exposição dos folículos antrais iniciais aos níveis crescentes de FSH do final da fase lútea acelera o crescimento folicular, mas também acentua as discrepâncias entre os seus tamanhos. As discrepâncias nos tamanhos foliculares serão verificadas mais adiante, ao longo da fase folicular, no processo que vai culminar com a dominância folicular em um ciclo ovariano espontâneo, no qual apenas um folículo continua a crescer até a fase pré-ovulatória, graças à maior expressão de receptores para o FSH a maior atividade da enzima aromatase, fundamental para a produção de estradiol (Fauser e Van Heusden, 1997; Fanchin, 2003). A introdução de esquemas de indução da ovulação que utilizam gonadotrofina exógena foi fundamental para alterar o comportamento folicular. As altas doses de FSH na fase folicular inicial nos ciclos estimulados levam ao desenvolvimento folicular múltiplo e à menor duração da fase folicular (Messinis e Templeton, 1990).

3.3 COORTE FOLICULAR OVARIANA E HOMOGENEIZAÇÃO DA COORTE FOLICULAR

Definimos aqui o termo “coorte folicular” como sendo o grupo de folículos antrais que estão em desenvolvimento em um dado momento, normalmente mensurados através de exame ultrassonográfico. Habitualmente se considera como parte da coorte folicular mensurável aqueles folículos com pelo menos 2 milímetros de diâmetro médio. A mensuração da coorte folicular previamente à estimulação ovariana tem importância a partir da sua correlação com o sucesso reprodutivo, e é habitualmente realizada no terceiro dia do ciclo menstrual, período em que os níveis de FSH estão em ascensão, e em que a dominância folicular ainda não se estabeleceu e que os folículos crescem aleatoriamente, com diâmetros que variam entre 2 e 8 mm (Gougeon, 1986b).

Diversos autores correlacionam o número e tamanho dos folículos antrais (de 2 a 5 mm), verificados no início da fase folicular, com a resposta ovariana à estimulação em ciclos de reprodução assistida, refletindo a reserva ovariana. Bancsi, 2002, verificou que o número de folículos antrais no terceiro dia do ciclo é o melhor preditor isolado de boa resposta ovariana à estimulação, quando comparado à idade da paciente e dosagens hormonais basais (medidos igualmente no início do ciclo menstrual) de FSH, inibina B e estradiol (Bancsi, 2002).

O número de folículos antrais mensurados ecograficamente na fase folicular inicial se correlaciona positivamente com os níveis de gestação atingidos (Chang, 1998; Pohl, 2000; Nahum, 2001; Fratarelli, 2003), com o número de oócitos recuperados após a punção ovariana (Tomás, 1997; Chang, 1998; Ng, 2000; Pohl, 2000; Yong, 2003), e tem relação inversa com a idade da paciente (Chang, 1998; Pohl, 2000) e com as taxas de cancelamento de ciclo por má resposta à indução (Chang, 1998; Nahum, 2001; Fraterelli, 2003).

Os níveis suprafisiológicos de FSH, mantidos com a administração exógena de gonadotrofinas, resgata os folículos que habitualmente entrariam em atresia, fazendo com que eles retomem o seu desenvolvimento, levando ao crescimento folicular múltiplo – fundamento da estimulação ovariana (Taymor, 1996). Por outro lado, a supressão do FSH no final da fase lútea precedente, faz com que obtenhamos maior número de folículos passíveis de serem ainda recuperados da atresia, ou seja, ainda em fase de desenvolvimento mais inicial. Ao atingir o início da fase folicular do ciclo menstrual com maior número de folículos antrais em fase semelhante de desenvolvimento, visa-se obter maior sucesso com os regimes de estimulação ovariana.

3.3.1 HOMOGENEIZAÇÃO DA COORTE FOLICULAR

O conceito de homogeneização da coorte folicular adquiriu maior importância a partir do advento dos ciclos de estimulação ovariana sem o bloqueio hipofisário com agonistas do GnRH, em que se administra apenas o antagonista do GnRH em fase mais tardia do ciclo para prevenção do pico endógeno de LH (Borm, 2000). O bloqueio da elevação dos níveis de FSH no final da fase lútea tornou-se importante neste regime de indução da ovulação, pois suprime o crescimento folicular antral inicial, levando os folículos a um tamanho mais homogêneo no início da estimulação. Com a coorte folicular mais homogênea, preconiza-se o desenvolvimento folicular múltiplo porém mais uniforme, garantindo maior número de folículos maduros e maior número de oócitos recuperados, e, consequentemente, maior número de embriões disponíveis para transferência (Fanchin, 2003).

Sabe-se que o número de folículos antrais no início da fase folicular é decorrência de um recrutamento folicular eficiente no final da fase lútea anterior e que o aumento fisiológico do FSH no final da fase lútea pode ser adiado mantendo-se níveis altos de estradiol após a regressão do corpo lúteo e a queda dos níveis de estradiol (Le Nestour, 1993; Fanchin 2003; Fanchin, 2003b). A ausência de FSH quando os folículos estão na fase preantral de desenvolvimento diminui a proliferação das células da granulosa e previne a formação do antro folicular e o conseqüente desenvolvimento folicular às fases seguintes (Adriaens, 2004). Além disto, sabe-se que a presença de folículos maiores inibe o crescimento dos demais folículos, através da secreção de fatores inibitórios locais, como a inibina B (Fanchin, 2003; Fanchin, 2003b).

O bloqueio hipofisário antes dos ciclos de estimulação da ovulação, alcançado com o uso de análogos do GnRH, por exemplo, traduz-se em altas taxas de sucesso em procedimentos de reprodução assistida (Meldrun, 1989; Hughes, 1992; Young, 2003). Sabe-se que os níveis endógenos de FSH no início da estimulação ovariana se correlacionam inversamente com o número de oócitos recuperados, e que o bloqueio

hipofisário não acarreta diminuição no número de folículos antrais observados (Young, 2003).

O efeito do bloqueio hipofisário sobre a coorte folicular foi estudado extensamente por Fanchin e colaboradores (Fanchin, 2003; Fanchin, 2003b; Fanchin, 2004). Com o uso de 17-β-estradiol, na dose de 4 mg/dia, a partir do 20º dia do ciclo menstrual até o 2º dia do ciclo seguinte, estes autores obtiveram uma diminuição do tamanho e a uma melhor homogeneidade dos folículos antrais medidos ecograficamente, quando comparado a um grupo controle (Fanchin, 2003; Fanchin, 2003b).

A maior homogeneidade dos folículos antrais pode também ser adquirida com o uso de antagonistas do GnRH na fase lútea (Fanchin, 2004). O uso do acetato de cetrorelix causou a inibição imediata da secreção hipofisária de FSH, mantendo seus níveis abaixo do limiar necessário para o crescimento folicular, o que se refletiu em uma coorte folicular mais homogênea no início da fase folicular, nos mesmos moldes da obtida com o uso de estradiol.

3.4 ANTICONCEPCIONAIS ORAIS E SEU EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO FOLICULAR

Um dos mecanismos de ação dos anticoncepcionais orais (ACO) ocorre pela inibição direta da secreção endógena de gonadotrofinas, tanto pelo hipotálamo (GnRH), quanto pela hipófise (FSH e LH). O componente progestagênico atua inibindo o pico de LH necessário para a ovulação, enquanto o estrogênico atua inibindo a secreção de FSH, inibindo o crescimento folicular e a emergência de um folículo dominante. O uso combinado permite a adoção de doses menores de progestágeno nas pílulas, pois o etinilestradiol aumenta a concentração intracelular de receptores progestágenos. O efeito anticoncepcional dá-se ainda pelo efeito progestogêncio verificado no endométrio

(decidualização, com atrofia endometrial), cervical (espessamento do muco cervical) e tubário (diminuição da peristalse e lentificação do transporte oocitário) (Speroff e Fritz, 2005).

No entanto, os ACOs não bloqueiam completamente o crescimento folicular inicial, o qual é independente do estímulo das gonadotrofinas. Mesmo com o uso adequado do anticoncepcional oral, devido às baixas doses hormonais nas preparações disponíveis, ainda pode persistir atividade folicular ovariana (Fauser e Van Heusden, 1997), sem haver comprometimento do efeito contraceptivo. O crescimento de folículos até a fase pré-ovulatoria é observado, através de monitoramento ultrassonográfico, em parte das pacientes usuárias de ACO, sendo maior naquelas em que ocorre o esquecimento de uma pílula ou que o intervalo entre as cartelas é superior ao recomendado (Fauser e Van Heusden, 1997), conotando que o crescimento folicular pode ser rapidamente recuperado após suspensão do seu uso.

O uso de anticoncepcionais orais antes de iniciar a estimulação ovariana em ciclos de fertilização assistida, com o propósito de supressão dos níveis de FSH pré-foliculogênese, permite a flexibilidade no manejo dos ciclos induzidos, uma vez que o início do ciclo pode ser programado com a suspensão do medicamento (Biljan, 1998; Braningan, 2000; Gonen, 1990).

O uso de anticoncepcional oral para supressão hipofisária, em ciclos de reprodução assistida, antes do uso do análogo do GnRH, além de prevenir a formação de cistos ovarianos, foi associado a necessidade de menores doses de gonadotrofinas durante a indução, maior número de folículos desenvolvidos, menor tempo de estimulação ovariana para se alcançar desenvolvimento folicular satisfatório, sugerindo-se até melhores taxas de gestação (Biljan, 1998b; Gonem, 1990).

Mesmo em ciclos de estimulação mínima, com uso de citrato de clomifeno, o pré-tratamento com anticoncepcional oral preveniu o surgimento do pico de LH, o que permite

o desenvolvimento de múltiplos oócitos maduros, menores taxas de abandono de ciclo e maiores taxas de gestação, com menores custos que com o uso de agonistas do GnRH (Braningan, 2000). Gonen, 1990, demonstrou que o uso de ACO previamente à estimulação ovariana resultou em melhores resultados reprodutivos em ciclos de FIV, incluindo necessidade de menores doses de gonadotrofinas, menor taxa de cancelamento de ciclo por surgimento de pico endógeno de LH, maior número de oócitos recuperados.

O efeito do uso de anticoncepcionais orais combinados sobre a coorte folicular, porém, ainda não foi testado de forma controlada, sendo seu uso empírico na maioria dos estudos, imediatamente antes da estimulação ovariana, sem estudos que comprovem sua eficácia em homogeneizar a coorte folicular.

3.5 HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO

O hormônio anti-mülleriano (ou fator anti-mülleriano - HAM) é uma glicoproteína dimérica, da família dos *transforming growth factor β* (TGFβ), sendo considerado um fator de crescimento e diferenciação reprodutivo feminino (Speroff e Fritz, 2005; Durlinger, 2002). Nos homens o HAM é expresso pelas células de Sertoli, desde a vida embrionária, em que ocorre a diferenciação testicular, com inibição do desenvolvimento dos ductos de Müller, até a puberdade.

Já no sexo feminino, o HAM é produzido pelas células da granulosa, desde o final da gestação, até a menopausa (Durlinger, 2002; Speroff e Fritz, 2005). Principalmente através de estudos com roedores, se descobriu que o HAM é expresso no sexo feminino principalmente em células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais iniciais, sendo maior a sua expressão naquelas células próximas ao oócito e que circundam o antro folicular. Folículos em estágio mais avançado de desenvolvimento, assim como folículos em atresia e folículos primordiais não expressam o HAM. Seu padrão de expressão

específico sugere que o HAM possui um papel importante os estágios iniciais de desenvolvimento e diferenciação folicular, inibindo a iniciação do crescimento folicular – ou seja, inibindo o recrutamento folicular inicial (Baarends, 1995; Durlinger, 2002b).

Dados de estudos em mulheres mostram que os níveis de HAM se correlacionam positivamente com o número de folículos antrais verificados na primeira fase do ciclo menstrual (Fanchin, 2003; Fanchin, 2005; Laven, 2004). Estudos *in vitro* com culturas de folículos mostram que o HAM inibe o crescimento folicular induzido pelo FSH, principalmente através da inibição da proliferação das células da granulosa e inibição da atividade da aromatase (Durlinger, 2001; Durlinger, 2002b; Carlsson, 2006). Outro estudo com metodologia semelhante, no entanto, mostrou o contrário, que o HAM aumentaria o crescimento folicular induzido pelo FSH (McGee, 2001) e estudos com células de Sertoli demonstraram que o FSH induziria a transcrição do gene do HAM, processo que culminaria com a multiplicação das células da granulosa, através da ativação de uma via não clássica de segundo-mensageiros (Lukas-Croisier, 2003).

Em pacientes com ovários policísticos, os níveis de HAM são maiores que os de pacientes normo-ovulatórias (Pigny, 2003; Laven, 2004), refletindo diretamente o número de folículos antrais iniciais entre 2 e 5 mm, verificados por ultrassonografia (Pigny, 2003). Como a contagem folicular aumenta linearmente com os níveis de HAM, a relação HAM /número de folículos entre 2-5 mm foi igual entre os dois grupos. Neste estudo, os autores não encontraram correlação entre os níveis de HAM e o número de folículos antrais com 6-9 mm. Tais dados corroboram a idéia que o HAM é produzido principalmente pelos folículos antrais iniciais, e que sua produção diminui com o avanço do desenvolvimento folicular. No entanto, estudo com tecido ovariano humano mostrou que a expressão do HAM está diminuída nas fases iniciais do desenvolvimento folicular em mulheres com ovários policísticos, sugerindo que a deficiência local do HAM contribuiria para a entrada de maior número de folículos em crescimento, levando ao aspecto policístico ovariano

destas pacientes (Stubbs, 2005). No entanto, em outro estudo com culturas de folículos humanos, *in vitro*, se verificou maior secreção de HAM/folículo em pacientes com ovários policísticos, e nestes folículos a administração de FSH ao meio de cultura diminuiu a secreção de HAM, mas não nas pacientes controles (Pellatt, 2006). Já em mulheres com endometriose mínima ou leve, encontrou-se níveis significativamente menores de HAM que em mulheres sem endometriose, refletindo uma coorte folicular mais heterogênea (Cunha-Filho, 2006).

A produção de HAM também se altera ao longo do tempo, diminuindo com o avançar da idade e com a diminuição do pool folicular (de Vet, 2002; Laven, 2004). Com base nestas informações, se constatou que os níveis de HAM servem como um marcador de reserva ovariana, se correlacionando mais fortemente com a reserva folicular (ou atividade folicular inicial) no início do ciclo que os níveis de inibina B, estradiol, FSH e LH (Fanchin, 2003c). Quanto à variação inter-ciclo, esta foi estudada por Fanchin et al, 2005. Ao longo de três ciclos consecutivos, os níveis de HAM, e de outros hormônios, foram medidos na fase folicular inicial. Eles encontraram uma boa reprodutibilidade dos níveis de HAM ciclo a ciclo, com uma correlação inversa com os níveis de FSH e inibina B.

Ao longo de um mesmo ciclo, também não se encontrou variação significativa dos níveis do HAM, um reflexo da coorte de folículos iniciais constante ao longo do ciclo ovariano (Mendez-Lozano, 2006; Hahenkamp, 2006; La Marca, 2006). Segundo estes autores, a coorte de folículos antrais iniciais e pré-antrais, os quais são responsáveis pela maior produção do HAM, mantém-se constante ao longo do ciclo ovariano, independentemente do estímulo do FSH e do desenvolvimento da dominância folicular. Esta coorte de folículos, seria, portanto, responsável pela secreção do HAM, o qual não varia ao longo do ciclo.

Em ciclos de hiperestímulo ovariano para reprodução assistida, em que utiliza FSH exógeno, o HAM tem forte correlação com o número de folículos que atingem

sensibilidade ao FSH e iniciam seu crescimento ao longo da estimulação, sugerindo, por outro lado, que o HAM é secretado pelos folículos que possuem capacidade de responder ao FSH (Fleming, 2006). Os níveis de HAM medidos na fase folicular inicial de ciclos de indução da ovulação têm correlação com o número de folículos antrais verificados no início da estimulação (Fanchin, 2003d; Fanchin, 2005; Laven, 2004), refletindo a reserva ovariana, assim como apresentam boa correlação com o número do oócitos recuperados após punção ovariana (de Vet, 2002; Laven, 2004, Fanchin, 2003d; Fanchin, 2005; Fanchin, 2005b; Seifer, 2002; Peñarrubia, 2005; Elda-Gevar, 2005; Fleming, 2006; La Marca, 2006b). As pacientes com pior resposta ao hiper-estímulo apresentam significativamente menores níveis basais de HAM (van Rooij, 2002; Peñarrubia, 2005; Fleming, 2006; La Marca, 2006b).

Também já foi demonstrado que os níveis de HAM declinam ao longo da estimulação ovariana, devido tanto à regressão e atresia dos pequenos folículos que não responderam à estimulação com FSH, quanto à menor secreção deste pelos folículos em crescimento (Fanchin, 2003c; La Marca, 2004).

A interação fisiológica entre o FSH e o HAM, no entanto, ainda não está bem estabelecida. Estudos em ratos com o uso de antagonista do GnRH mostraram que o FSH inibe a expressão do HAM e do seu receptor tipo II em folículos pré-antrais e antrais iniciais (Baarends,1995). Estudos *in vitro* mostraram que o HAM inibe o crescimento folicular induzido pelo FSH, principalmente através da diminuição da proliferação das células da granulosa, assim como diminui a expressão da aromatase e diminui o número de receptores de LH em células da granulosa (Durlinger, 2002). Em tecido ovariano humano, sabe-se que existe uma relação inversa entre o tamanho folicular e a intensidade da expressão do HAM. Folículos acima de 8 mm de diâmetro praticamente não expressam o HAM. (Weenen, 2004). Estes padrões de expressão celular do HAM

sugerem que sua importância durante o processo de diferenciação e crescimento folicular nas fases iniciais.

Assume-se em alguns estudos que o FSH possa agir como regulador negativo da síntese de HAM no ovário. Conforme já descrito por Baarends, 2002, em ratos o FSH diminui a expressão dos receptores do HAM (do tipo I e II). Folículos de ratos que não expressam o HAM são mais sensíveis ao FSH, sugerindo que o efeito negativo do HAM sobre a atividade da aromatase seja através da diminuição da sensibilidade dos receptores ao FSH. Pigny, 2003, postula que o processo de seleção folicular depende da capacidade dos folículos em tornarem-se sensíveis ao FSH, escapando do efeito inibitório do HAM sobre a aromatase, tornando-se então capazes de produzir doses maiores de estradiol. Nas pacientes com ovários policísticos, o excesso de HAM estaria envolvido na atividade diminuída da aromatase, resultando em níveis aumentados de androgênios (Pigny, 2003).

Em mulheres, alguns estudos encontraram uma correlação negativa entre os níveis de HAM e os de FSH medidos na fase folicular inicial (Van Rooij, 2003; Fanchin, 2003c; Fanchin, 2003d; Pigny, 2003; Fanchin, 2005). No entanto, nenhum deles foi capaz de descrever uma relação fisiológica entre o FSH e o HAM. Esta correlação parece ser indireta, relacionada mais à fase do desenvolvimento folicular, e não uma causalidade direta (Fanchin, 2003c). Quando foi realizada a análise do líquido folicular, os níveis de HAM foram infinitamente maiores nos folículos antrais até 8 mm que naqueles maiores, de tamanho pré-ovulatório, mostrando correlação inversa com os níveis de estradiol, sugerindo que este poderia ser um regulador da expressão do HAM (Andersen e Byskov, 2006). Correlação inversa também tem os níveis do HAM no fluido folicular com os níveis de progesterona, especialmente nos folículos pré-ovulatórios (Fanchin, 2005c; Andersen e Byskov, 2006). Na fase lútea, os níveis de HAM diminuem transitoriamente logo após a administração de hCG para maturação folicular, voltando a aumentar gradualmente

alguns dias após (Fanchin, 2005b), o que coincidiria temporalmente com o aumento do FSH na fase lútea, embora esta relação não tenha sido avaliada neste estudo. Em síntese, a luteinização teria um efeito inibitório sobre a expressão folicular do HAM.

Fanchin et al., 2003c, encontrou níveis de HAM no início do ciclo após supressão do FSH com uso de agonista do GnRH semelhantes aos de outros estudos com ciclos espontâneos, concluindo que a supressão hipofisária não teria nenhum efeito sobre a secreção de HAM pelos folículos antrais iniciais, embora o seu estudo não tenha sido desenhado com este objetivo. Neste mesmo estudo, conforme avançava o crescimento folicular ao longo do ciclo de estimulação com FSH recombinante, os níveis de HAM foram declinando, refletindo uma diminuição da sua produção pelas células da granulosa dos folículos em desenvolvimento e confirmando que a secreção de HAM é feita predominantemente pelos folículos antrais iniciais, os quais são muito pouco sensíveis ao FSH (Fanchin, 2003c). O HAM agiria, portanto, diminuindo a sensibilidade das células da granulosa ao FSH.

4. JUSTIFICATIVA

Embora na literatura atual o HAM é descrito como um marcador direto da reserva folicular, tendo correlação com os desfechos reprodutivos, poucos estudos avaliam diretamente sua interação fisiológica com o FSH e como estes dois hormônios estão implicados no processo de recrutamento folicular.

Admitindo que as discrepâncias entre os diâmetros foliculares verificados na fase folicular inicial são em decorrência da sua exposição aos níveis de FSH em elevação desde a fase lútea anterior, consideramos que a inibição do FSH através da administração de anticoncepcional oral combinado irá permitir o desenvolvimento de um pool folicular mais homogêneo, quando medido na fase folicular inicial (homogeneização folicular). Também consideramos que em ciclos espontâneos o HAM não sofre variação cíclica, estaremos avaliando o impacto do bloqueio do FSH sobre os níveis séricos de HAM.

4.1 HIPÓTESE NULA

A administração de anticoncepcional oral na fase lútea tardia causa homogeneização da coorte folicular e inibição da secreção de FSH e não altera a secreção (níveis séricos) do hormônio anti-mülleriano.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar o efeito da supressão do FSH, através do uso de um anticoncepcional oral (contendo 0,03 mg de etinil estradiol + 0,15 mg de desogestrel), utilizado no final da fase lútea, sobre os níveis séricos do HAM.

5.2 OBETIVOS SECUNDÁRIOS

Comparar as características da coorte folicular antes e após o bloqueio da secreção de FSH com o anticoncepcional oral utilizado na fase lútea tardia, através da avaliação:

- do número de folículos antrais medidos ecograficamente;
- do diâmetro folicular médio, e da variabilidade dos diâmetros, a fim de avaliar a homogeneidade de seus tamanhos;
- do cálculo do volume ovariano.

6. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- Adriaens I, Cortvrindt R, Smitz J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture hás marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. Hum Reprod 19(2):398-408, 2004.

- 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 91(10):4064-9, 2006.

- Baarends WM, Uilenbroek JTJ, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen ECM, Themmen APN, Grootegoed JA. Anti-müllerian hormone and ati-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotrophin-induced folicle growth. Endocrinol 136(11):4951-62, 1995.

- Bancsi LFJMM, Broekmans JM, Elijkemans MJC, de Jong FH, Habbema JDF, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. Fertil Steril 77(2):322-36, 2002.

- Biljan MM, Mahutte NG, Dean N, Hemmings R, Bissonnette F, Tan SL. Effects of pretreatment with na oral contraceptive on the time required to achieve pituitary suppression with gonadotropin-releasing hormone analogues and on subsequent implantation and pregnancy rates. Fertil Steril 70(6):1063-69, 1998.

- Biljan MM, Mahutte MG, Dean N, Hemmings R, Bissonnette F, Tan SL. Pretreatment with an oral contraceptive is effective in reducing the incidence of functional ovarian cyst formation during pituitary suppression by gonadotrophin-releasing hormone analogues. J Assisted Rep Gen 15(10):599-604, 1998b.

- Borm G, Mannaerts B. Treatment with the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix in women undergoing ovarian stimulation with recombinat follicle stimulating

hormone is effective, safe and convenient: results of a controlled, randomized, multicenter trial. The European Orgalutan Study Group. Hum Reprod 15:1490-8, 2000.

- Branigan EF, Estes MA. Minimal stimulation IVF using clomiphene citrate and oral contraceptive pill pretreatement for LH suppression. Fertil Steril 73(3):587-90, 2000.

- Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen APN, Hovatta O. Anti-müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles *in vitro*. Hum Reprod 21(9):2223-7, 2006.

- Cunha-Filho JS, Lemos N, Freitas F, Arbo E, Souza CA, Salazar C, Facin A, Rosa V, Weiller E, Passos EP. Decreased anti-müllerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. Hum Reprod 21(S1):i45-6, 2006.

- de Vet A, Laven JSE, de Jong FH, Themmen APN, Fauser BCJM. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. Fertil Steril 77(2):357-62, 2002.

- Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JTJ, Grootegoed JA, Themmen APN. Anti-müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. Endocrinol 142(11):4891-9, 2001.

- Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN. Regulation of ovarian function: the role of anti-müllerian hormone. Reproduction 124:601-9, 2002.

- Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JTJ, Grootegoed JA, Themmen APN. Anti-müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. Endocrinol 143(3):1076-84, 2002b.

- Elder-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, Gal M, Zylber-Haran E, Margalioth EJ. Dynamics assays of inhibin B, anti-müllerian hormone and

estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrassonagraphy as predictors of IVF outcome. Hum Reprod 20(11):3178-83, 2005.

- Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schonauer LM, Kadoch IJ, Cohen-Bacri P, Frydman R. Coordination of early antral follicles by luteal E2 administration: basis for alternative controlled ovarian hyperstimulation regimens. Fertil Steril 79(2):316-21, 2003.

- Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schonäuer LM, Righini C, de Ziegler D, Frydman R. Luteal estradiol administration strengths the relationship between day 3 follicle-stimulation hormone and inhibin B levels and ovarian follicular status. Fertil Steril 79(3):585-9, 2003b.

- Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Serum anti-müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. Hum Reprod 18(2):328-32, 2003c.

- Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol FSH and LH on day 3. Hum Reprod 18(2):323-7, 2003d.

- Fanchin R, Castelo-Branco A, Kadoch IJ, Hosny G, Bagirova M, Frydman R. Premenstrual administration of gonadotrophin-releasing hormone antagonist coordinates early antral follicle sizes and sets up the basis for an innovative concept of controlled ovarian hyperstimulation. Fertil Steril 81(6):1554-9, 2004.

- Fanchin R, Taieb J, Lozano DHM, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. Hum Reprod 20(4):923-7, 2005.

- Fanchin R, Lozano DHM, Louafi N, Frydman NA, Frydman R, Taieb J. Dynamics of serum anti-müllerian hormone levels during the luteal phase of controlled ovarian hyperstimulation. Hum Reprod 20(3):747-51, 2005b.

- Fauser BCJM, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. Endocrine Rev 18:71-106, 1997.

- Fleming R, Deshpande N, Traynor I, Yates RWS. Dynamics of FSH-induced follicular growth in subfertile women: relationship with age, insulin resistance, oocyte yield and anti-müllerian hormone. Hum Reprod 21(6):1436-41, 2006.

- Fratarelli 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 80(2):350-5, 2003.

- Gonen Y, Jacobson W, Casper RF. Gonadotropin suppression with oral contraceptives before in vitro fertilization. Fertil Steril 53:282-7, 1990.

- Gougeon A. Caractères quantitatifs et qualitatifs de la population folliculaire dans l'ovaire humain adulte. Contracep Fertil Sexual, 12(3):527-35, 1986.

- Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. Hum Reprod 1(2):81-7, 1986b.

- Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC. Age-related changes of the population of human ovaries follicles: Increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. Biol Reprod 50:653-63, 1994.

- Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypoteses. Endocrine Rev 17(2):121-55, 1996.

- Hahenkamp WJK, Looman CWN, Themmen APN, de Jong FH, te Velde ER, Broekmans FJM. Anti-müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. J Endocrinol Metab 91(10):4057-63, 2006.

- Hall JE, Schoenfeld DA, Martin KA, Crowley WFJr. Hypothalamic gonadotrophin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicle transition. J Clin Endocrinol Metab 74(3):600-7, 1992.

- Hughes EG, Fedorkow DM, Dava S, Sagle MA, Van de Koppel P, Collins JA. The routine use of gonadotrophin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete

intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. Fertil Steril 58(5):888-96, 1992.

- La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamaro LF, Orvieto R, Levratti P, Volpe A. Anti-müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. Hum Reprod 19(12):2738-41, 2004.

- La Marca A, Stabile G, Carducci Artenisio A, Volpe A. serum anti-Mullerian hormona throughout the human menstrual cycle. Hum Reprod 21(12):3103-7, 2006.

- La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, Volpe A. Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. Hum Reprod (in press), 2006b.

- Laven JSE, Mulders AGMGJ, Visser JA, Themmen AP, de Jong FH, Fauser BCJM. Anti-müllerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. J Endocrinol Metab 89(1):318-23, 2004.

- Le Nestour e, Marraoui j, Lahlou N, Roger M, de Ziegler D, Bouchard P. Role of estradiol in the rise in follicle-stimulating hormone levels during the luteal-follicular transition. J Clin Endocrinol Metab 77:439-42, 1993.

- Lukas-Croisier C, Lasala C, Nicaud J, Bedecarrás P, Kumar TR, Duterte M, Matzuk MM, Picard JY, Josso N, Rey R. Follicle-stimulationg hormone increases testicular anti-müllerian hormone (AMH) production through Sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH gene. Mol Endocrionol 17(4):550-61, 2003.

- Mais V, Cetel NS, Muse KN, Quigley ME, Reid RL, Yen SS. Hormonal dynamics during luteal-follicular transition. J Clin Endocrinol Metab 64:1109-14, 1987.

- McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJW. Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. Biol Reprod 64:293-8, 2001.

- McNatty KP, Hillier SG, van der Boogaard AM, Trimbos-Kemper TC, Reichert LE, van Hall EV. Follicular development during the luteal phase of the human menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 56(5):1022-31, 1983.

- Meldrun DR, Wisot A, Hamilton F, Gutlay AL, Kempton W, Huynh D. Routine pituitary suppression with leuprolide before ovarian stimulation for oocyte retrieval. Fertil Steril 51(3):455-9, 1989.

- Mendez-Lozano DH, Taieb J, Fewereisen E, Alby C, Frydman R, Fanchin R. Detailed dynamics of serum anti-müllerian hormone (AMH) levels during the menstrual cycle and its antral follicle correlates. Fertil Steril 86(S2):S2, 2006.

- Messinis IE, Templeton AA. The importance of follicle-stimulating hormone increase for folliculogenesis. Hum Reprod 5(2):153-6, 1990.

- Nahun R, Shifren JL, Chang Y, Leykin L, Isaacson K, Toth TL. Antral follicle assessment as a tool for predictive outcome in IVF – Is it a better predictor than age and FSH. J Assis Reprod Gen 18(3):151-155, 2001.

- Ng EHY, Tang OS, Ho PC. The significance of the number of antral follicles prior to stimulation in predicting ovarian responses in na IVF programme. Hum Reprod 15(9):1937-42, 2000.

- Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whithead S, Mason H. Granulosa cell production of anti-müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab, rapid electronic publication ahead of print, first published on October 24, 2006.

- Peñarrubia J, Fábregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, Carmona F, Vanrell JA, Balasch J. Basal and stimulation day 5 anti-müllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. Hum Reprod 20(4):915-22, 2005.

- Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated serum level of anti-müllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. J Clin Endocrinol Metab 88(12):5957-62, 2003.

- Pöhl M, Hohlagschwandtner M, Obruca A, Poschalko G, Weigert M, Feichtinger W. Number and size of antral follicles as predictive factors in vitro fertilization and embryo transfer. J Assist Reprod Genetics 17(6):315-8, 2000.

- Roseff SJ, Bangah ML, Kettel LM, Vale W, Rivier J, Burger HG, Yen SS. Dynamic changes in circulatin inhibin levels during the luteal-follicular transition of the human menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 69:1033-9, 1989.

- Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM. Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. Fertil Steril 77(3):468-71, 2002.

- Speroff L, Fritz MA. Clinical Gynecologic and endocrinology and Infertility, 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2005.

- Stubbs SA, Hardy K, da Silva-Buttkus P, Stark J, Webber LJ, Flanagan AM, Themmen APN, Visser JÁ, Groome NP, Franks S. Anti-müllerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab 90(10):5536-43, 2005.

- Taymor ML. The regulation of follicle growth: some clinical implications in reproductive endocrinology. Fertil Steril 65(2):235-47, 1996.

- Tomás C, Nuojua-Huttunen S, Martikainen. Pretreatment transvaginal ultrasound examination predicts ovarian responsiveness to gonadotrophins in in-vitro fertilization. Hum Reprod 12(2):220-3, 1997.

- van Rooij IAJ, Broekmans FJM, te Velde ER, Fauser BCJM, Bancsi LFJMM, de Jong FH, Themmen APN. Serum anti-müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. Hum Reprod 17(12):3065-71, 2002.

- Weenen C, Laven JSE, von Berg ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BCJM, Themmen APN. Anti-müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. Mol Hum Reprod 10(2):77-83, 2004.

- Welt CK, Pagan YL, Smith PC, Rado KB, Hall J. Control of follicle-stimulationg hormone by estradiol and the inhibins: critical role of estradiol at the hypothalamus during the luteal-follicular transition. J Clin Endocrinol Metab 88(4):1766-71, 2003.

- Yong PYK, Baird DT, Joo Thong K, McNeilly AS, Anderson RA. Prospective analysis of the relationships between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulation. Hum Reprod 18(1):35-44, 2003.

- Zariñán T, Olivares A, Söderlund D, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A. Changes in the biological:immunological ratio of basal GnRH-realeasable FSH during the follicular, pre-ovulatory and luteal phases of the human menstrual cycle. Hum Reprod 16(8):1611-18, 2001.

- Zeleznik AJ. Follicle selection in primates: “Many are called but few are chosen”. Biol Reprod 65:655-9, 2001.

7. ARTIGO (versão em inglês)

Serum anti-müllerian hormone levels and follicular cohort characteristics after pituitary down-regulation in the late luteal phase with oral contraceptive pill

Authors: Arbo E[1], Vetori DV[2], Jimenez MF[3], Freitas FM[4], Lemos N[5], Cunha-Filho JS[6]

Authors affilliation:

1- M.D., Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2- M.D., Universidade Federal do Rio Grande do Sul

3- M.D., Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

4- M.D., PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

5- M.D., PhD, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

6- M.D., PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Key-terms: AMH, follicular cohort, FSH down-regulation, OCP

ABSTRACT:

Objective: evaluate the effect of FSH suppression in the late luteal phase of menstrual cycle with oral contraceptives pills (OCP) on anti-mullerian factor (AMH) levels and on the follicular (number, diameter and homogeneity of measurable antral follicles).

Design: a prospective trial

Materials and methods: We included in our trial 20 normovulatory infertile women from the ambulatory of the Obstetrics and Gynecology Department of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, with tubal obstruction or male infertility. On the third day of a spontaneous menstrual cycle, they were submitted to a transvaginal ultrasound examination and blood sample collect. All antral follicles greater than 2 mm were noticed. From the 20th day of this menstrual cycle, the patients took daily OCP, containing 30 mcg of ethinil-estradiol plus 0,15 mg of desogestrel. On the third day of the following cycle, the measurements were repeated.

Results: The patients' mean age was 29 years (23 to 35). After OCP use the levels of FSH and estradiol were significantly reduced ($P<0.001$). The number of antral follicles measured at both moments did not differ (15.8 $\pm$ 4.7 before and 16.6 $\pm$ 3.6 after OCP, $P=0.44$), although after OCP the follicles presented significant lower diameters (means of 4.4 $\pm$ 1.7 mm before versus 3.5 $\pm$ 1.2 mm after, $P<0.001$). The levels of AMH were significantly reduced after pituitary down-regulation, with medians (interquartille range) of 3.02 ng/mL (1.21 – 6.39) before OCP use and 2.22 ng/mL (0.9 – 3.11) after it, $P=0.04$. We found no correlation between AMH and FSH levels.

Conclusions: The short administration of OCP in late luteal phase was able to inhibit pituitary secretion of FSH during the inter-cycle transition, leading to a more homogeneous follicular cohort. The decrease in AMH levels verified after OCP administration has no correlation with the FSH decrease.

INTRODUCTION

The luteal to follicular phase transition is characterized by a FSH levels increase, what occurs after corpora lutea dismiss (1). Follicular growth until the preantral phase is independent from FSH influence (1-2). When serum FSH levels begin to rise, in the luteal-follicular transition, the follicular recruitment will occur in an irregular manner, and the follicles will develop heterogeneously, so that at the beginning of follicular phase one can find, at the same time inside the ovaries, follicles with different sizes (1-4). During controlled ovarian hyper-stimulation (COH) cycles, the inhibition of FSH rise in the late luteal phase with estradiol was already demonstrated to cause the surge of a more homogeneous follicular cohort, with positive impacts over reproductive outcome (5-6).

Anti-müllerian hormone (AMH) is a dimeric glycoprotein, from the transforming growth factor β family (TGFβ), and is considered a local growth factor and cellular differentiation (7-8). In female sex, AMH is produced by granulosa cells of ovarian follicles, since the end of intra-uterine life, until ovarian failure and menopause (7-9). Through studies with rodents, it is known that AMH is expressed mainly by granulosa cells of small antral and pre-antral follicles, and this expression is higher in those granulosa cells that surround the oocyte and the antral cavity (10). Follicles that are in most advanced stages of development, as those follicles in atresia and primordial follicles do not express AMH (10-11). This specific pattern of cellular expression suggests that AMH exerts its mainly actions during the initial phases of follicular growth and differentiation, inhibiting the follicular recruitment during ovarian mensal cycle (11-12).

The physiological interaction between AMH and FSH was not already well established. In spontaneous cycles, levels of AMH and FSH appears to show a inverse correlation, but since both hormone levels are related to the number of antral follicles measured, this relation is speculated to be indirect (13). Nevertheless, during a

spontaneous menstrual cycle, AMH levels remain constant, due to its secretion by the pre-antral and initial antral follicles cohorts, which are also constant during the cycle (14-16). *In vitro* studies have shown that AMH inhibits preantral follicular growth induced by FSH, mainly through a diminished granulosa cells proliferation, and also through a lower aromatase activity (11-12). Another *in vitro* study, however, has shown contrary results (17).

In women, some studies have shown a negative correlation between FSH and AMH, in the follicular phase (13, 18-21), and in women with mild endometriosis the AMH levels are lower than controls, reflecting an heterogeneous follicular cohort (22). Nevertheless FSH is currently assumed as a negative regulator of ovarian AMH synthesis, none of those studies have described a physiological interaction between both hormones, and this relation has not been appropriately studied.

The main objective of this study was to evaluate the effects of FSH inter-cycle inhibition on follicular cohort and its effects on AMH secretion, in normoovulatory women.

METHODOLOGY

Design

We performed a prospective trial.

Subjects

Twenty normoovulatory infertile women were selected from the ambulatory of Obstetrics and Gynecology of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, with infertility of tubal or male origin. The patients should full fit the criteria below: regular menses, with duration of 28 to 34 days; maximum age of 35 years; both ovaries present; absence of any endocrinologycal or ovulation disorder; body mass index between 18 to 25 kg/m^2; absence of any hormonal therapy in the last three months; agreement in participating in the study, through signing the post informed consent term. The research protocol was approved by the hospital ethical committee (IRB equivalent).

Study protocol

Patients were submitted to an ultrasound examination by one operator (EA) on the day-3 of a spontaneous cycle and also blood sample collection through venous puncture for later hormonal assay. Following the twelfth day of this menstrual cycle, they took daily a pill, containing 30 µg of ethinil estradiol plus 0,15 mg of desogestrel. On the third day of the next menstrual bleeding, or after 14 days if menstrual bleeding has not occurred, the same ultrasound scan and hormonal dosages were performed. The objective of the ultrasound scan was to measure the ovarian dimensions to further ovarian volume calculation using the ellipse formula [(л/6) x antero-posterior diameter x lateral diameter x longitudinal diameter] and to evaluate the number and the mean diameter of all follicles (mean of two orthogonal diameters). All follicles between 2 and 10 mm of mean diameter were included

in the analysis. Ultrasounds scans were performed using an 11 Hz transvaginal probe, equipped with a tissue harmonic imaging system, which allowed improved image resolution and better recognition of follicular borders (Aloka SSD 1700, Dyna View, Aloka Co., Ltd.), as already described elsewhere (5, 6).

Hormonal analysis

Blood samples were centrifuged and serums were frozen for posterior analysis, at minus 80°C. Serum AMH levels were determined using an enzyme-linked immunosorbent sensitive assay (ELISA) (DSL-10-14400, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, USA). FSH and estradiol levels were determined using automated systems by chemiluminescence detection (IMMULITE 2000 - Euro/DPC, Llanberis, England and e Elecsys 1010 – Roche, Mannheim, Germany, respectively). The limits for detection were 0.1 mUI/mL for FSH, 5.0 pg/mL for estradiol and 0,017 ng/mL for AMH. The intra-assay coefficients of variance were 10% for FSH, 5.7% for estradiol and 4.6% for AMH.

Statistics

Statistics were performed using the SPSS software, version 12.0 (SPSS Inc., 2003, Chicago, IL.). The measure of central tendency for normally distributed variables was mean ± standard deviation and for non-parametric variables was median and interquartille range. Because of the pairwise design of this study, data from each participant on spontaneous cycle day 3 were compared with data from the same participant on cycle day 3 after OCP intake by using paired statistics. Normally distributed data were analyzed by the Student's *t* test for repeated measures and the non-parametric data by the Wilcoxon's signed-rank test, for related samples. Homogeneity between follicular cohorts' measures was analyzed by Levene's test. We also performed correlation test among the variables. The sample was calculated to detect a difference of at least 1 ng/mL on AMH serum levels

at >80% power at the two sided 0.05 significance level. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The twenty patients included in our study had a mean age of 29.1 ± 4.11 years (ranged from 23 to 34). The mean BMI was 22.6 ± 2.9 kg/m^2. Fifty two percent of them had infertility from masculine causes and 48% from tubal obstruction.

After late luteal phase OCP administration the pituitary secretion of FSH was significantly reduced, and ovary secretion of estradiol either. The medians (interquartille ranges) of FSH serum levels were 5.47 (4.81-9.24) mU/mL before and 1.99 (0.97-2.33) mU/mL after OCP administration (P<0.001) and for estradiol serum levels were 36.17 (26.81 – 47.6) and 8.98 (6.04-16.1) pg/mL (P<0.001), respectively.

Serum AMH levels were also significantly reduced after OCP intake, with medians (interquartille range) of 3.02 ng/mL (1.21 – 6.39) before and 2.22 ng/mL (0.9 – 3.11) after it (P=0.04) (table 1). Moreover, the ratio between AMH and number of follicles measured (per-follicle AMH ratio) was significantly lower at the second measure - medians and interquartille ranges of 0.17 (0.08-0.47) and 0.11 (0.06-0.15), P=0.04 (figure 1). The power of our data in detect such difference between AMH levels was great than 80%. Although AMH levels showed a non parametric disposition, with heterogeneous values, almost all the patients had AMH serum levels lowered after OCP intake (figure 2), and the same occurred for the FSH and estradiol levels.

The number of antral follicles measured in both moments did not differ (15.8 ± 4.7 before and 16.6 ± 3.6 after, P=0.44), although after inter-cycle FSH inhibition the follicles presented significant lower diameters (4.4 ± 1.7 mm before versus 3.5 ± 1.2 mm after, P<0.001), with lower variance (Levene's test for equality of variances F=32.212, P<0.001). In the spontaneous cycle, the number of follicles per patient with mean diameter between 2 and 4 mm was lower than after inter-cycle FSH inhibition (see table 1), the contrary occurring with the number of follicles great than 4 mm of mean diameter (data not shown).

Ovarian volume also diminished after OCP use (mean volume of 5.78 ± 2.86 cc before and 4.37 ± 1.85 cc after its use *P*=0.002), reflecting the smaller follicular diameter. The percentage variation (Δ%) of all these variables after OCP use, comparing to the spontaneous cycle, are also shown at table 1.

The decreases of AMH, FSH, estradiol and follicle mean diameter were analyzed through correlation tests (scatter plots shown at figures 3A and 3B). Although all these variables showed decreased levels at the OCP administration, no correlation was found between AMH levels decrease and the others variables.

DISCUSSION

We have performed the inter-cycle FSH down-regulation with short administration of an OCP in the late luteal phase of menstrual cycle, as noticed by the drop of FSH and estradiol levels. As a consequence, a more homogeneous follicular cohort has surged, with lower mean diameter and also with smaller variance among the follicles diameters. We also analyzed the effect of FSH suppression on AMH serum levels and surprising, AMH serum levels have diminished after OCP use. This was the first *in vivo* study that focused on FSH influence over AMH secretion, through manipulation of FSH secretion by the pituitary reached by OCP administration in the late luteal phase. We have studied the very specific moment of follicular recruitment, when in the spontaneous cycle the follicles are being stimulated by FSH. Since we have inhibited FSH secretion, and the follicles were less stimulated, AMH secretion was also lowered.

As already assessed by Fanchin et al, 2003d, (6) the luteal FSH suppression is important tool that should be used in the assisted reproduction set, in order to attempt better reproductive outcomes. With follicular cohort homogenization, follicles are able to respond to exogenous stimulation in a more uniform manner. The inhibition of FSH in the late luteal phase augments the number of growing follicles, retrieved oocytes and available embryos in COH cycles with GnRH antagonists (6, 23). Also the use of OCP have been studied, and the results have shown that when pre-treated with OCP before COH, the patients required less amount of gonadotrophins, with more oocytes retrieved and less cysts formation (24). The effects on antral follicle cohort, however, have not been noticed. Now we can affirm that the benefic effect of OCP administration prior to COH is due to follicular growth arrest and homogenization.

Nevertheless, the most remarkable finding of our study was that the inter-cycle FSH inhibition resulted in a lower AMH serum levels. AMH is known as an important

paracrine growth factor, secreted by granulosa cells of ovarian follicles. Some studies relate its serum levels to ovarian status and follicular reserve (13, 19, 21, 25). Through immunohistochemistry studies with human ovarian tissue, it is known that primordial follicles and antral follicles with a diameter of 8 mm or greater do not express AMH. The highest expression (and secretion) occurs in the preantral and small antral follicles (until 4 mm of diameter), when almost all granulosa cells express AMH (26), what makes AMH a product essentially from the small antral follicles.

However, the physiologic interaction between AMH and FSH has not been completely solved. Some studies suggest that AMH inhibits initial follicular growth (27) and also the follicular growth induced by FSH (7, 9, 11, 12), making the granulosa cells less sensible to FSH stimulus. This is important for the follicular recruitment process, since follicles that express less AMH are those who show more proliferating granulosa cells (7). Other studies, however, have shown that AMH could enhance follicular growth induced by FSH *in vitro*, especially of primordial and small antral ones (17, 28), what makes this subject a controversy in the current literature. It has been also demonstrated that FSH induces activation of AMH gene transcription in Sertoli cells (29), through adenylate cyclase, cAMP and protein kinase A, in a non classical cAMP-response, what points to a physiological, intracellular, interaction between both hormones. Moreover in male, prepubertal testis secretion of AMH is stimulated by recombinant FSH administration, and suppressed by concomitant FSH and hCG administration (30).

Our study brings some important evidence to clarify the AMH-FSH interaction. We have performed an *in vivo* study, with female luteal phase manipulation, controlled by their previous spontaneous cycle. When FSH secretion was inhibited, as we have performed, once follicular growth was less stimulated and granulosa cells proliferation was also inhibited, AMH secretion was consequently lower. However, although AMH serum levels have dropped after OCP use and FSH inhibition, we have failed in demonstrate any

significant correlation between AMH and FSH levels, what suggests that the drop of AMH levels was not a direct response to FSH levels, but both hormones are probably indirectly related.

Some authors have shown a negative correlation between AMH follicular levels and estradiol and also with inhibin (31), suggesting that the secretion of AMH are complexly regulated by many other growth factors and hormones, not analyzed by the present study. When AMH expression has been analyzed in ovarian tissue of rats, it was found a simultaneous presence of entirely morphologically comparable preantral and antral follicle cohort with the exception of their different levels of AMH expression (10). This heterogeneous AMH expression could explain why some follicles are sensible to FSH stimulation and others are not, possibly determining those follicles that would be recruited at a cycle and those that would become atretic. When the same animals were treated with GnRH antagonists, the cultures of their preantral follicles cells showed decreased AMH expression, indicating that gonadotrophins were somehow required for the AMH expression (10).

It is already well established that patients with polycystic ovaries have higher levels of AMH than normoovulatory women (20, 25), reflecting directly the great number of initial antral follicles (with 2-5 mm) verified at the ultrasonographic scan and that lead to the polycystic ovarian aspect of the syndrome. However, Stubbs et al., 2005, verified that AMH expression is contradictorily reduced during the initial stages of follicular development in polycystic ovaries, suggesting that a lower expression of AMH is responsible for the higher proportion of follicles that initiates the growing process in this syndrome (32).

The most remarkable clinical application of AMH knowledge is that its serum levels are strong and positively related with the ovarian reserve and the number of oocytes retrieved after COH (13, 21, 25, 33-37). On the other hand, patients with lower response to

ovarian stimulation have lower basal levels of AMH (18, 35, 37). AMH levels decline along with COH, after exogenous FSH administration, probably due to the regression and atresia of the small follicles or the increase in inhibin B and estradiol levels (19, 38). In COH cycles with exogenous FSH administration, AMH levels have strong positive correlation with the number of follicles that achieve sensibility to FSH at each day of stimulation and start to develop, suggesting that AMH is secreted by follicles that are able to respond positively to FSH stimulation (37). At the present time, the assisted reproduction centers worldwide are introducing AMH dosages at their routine of ovarian reserve evaluation (39).

Taking all these information together, it seems that, as soon as the small follicles are recruited for growth, what occur under FSH stimulus, AMH expression is increased, perhaps in an attempt to avoid multiple follicle growth. This could explain why, in our study, the FSH inhibition in luteal-follicular transition, just when follicular recruitment was taking part, resulted in an inhibition of AMH secretion.

Our results are in agreement with several studies that have already shown that AMH secretion is not directly FSH dependent; these studies have shown that AMH serum levels remain constant along the spontaneous menstrual cycle, with no significant variation (14-16). However, our study was designed to evaluate the effect of OCP administration on FSH secretion, and its consequently possible control of AMH secretion, controlled by the same patients spontaneous cycle. We utilized the same design used by several investigators to accomplish the physiological aspects of AMH secretion (13, 18, 19, 36, 38).

The lower levels of AMH but not a different number of antral follicles verified in our study, after FSH down-regulation, could be also explained by a diminished secretion of AMH by preantral follicles, which are not measurable through the ultrasonographic scan. Another important point that deserves our attention was the presence of a progestagen in the OCP administrated to our patients, what could have produced a direct effect on

follicular AMH secretion. Analyzing the follicular fluid of patients who undergone IVF, Fanchin et al, 2005 (40), have demonstrated that the fluid collected from large follicles had smaller levels of AMH and higher levels of progesterone than that colleted from smaller follicles. They have found a significant negative correlation between the levels of progesterone and AMH in the follicular fluid, suggesting that luteinization has a negative effect on the AMH production by granulosa cells. Additionally, OCP administration during the late luteal phase, just when the corpora lutea initiates is dismissing, could maintain, until the follicular phase, an hormonal environment more similar to that found in the luteal phase, with high serum levels of progesterone and low levels of gonadotrophins.

In conclusion, our study gives support to the concept that AMH secretion is FSH-independently. The effects of inter-cycle FSH inhibition with the short term OCP luteal administration were evident, causing follicular diameters homogenization. The lowering in AMH levels verified, although occurring simultaneously with FSH secretion inhibition, was not probably a direct effect of FSH, but represents the arrest on follicular development, inputted by the OCP administration and the consequently less FSH stimulation over granulosa cells. Probably there should have some other growth factors and peptides that are implicated on AMH regulation, which should be more extensively studied.

REFERENCES

1. Fauser BCJM, van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. Endocrine Rev 18(1): 71-106, 1997.
2. Gougeon A. Caractères quantitatifs et qualitatifs de la population folliculaire dans l'ovaire humain adulte. Contracep Fertil Sexual, 12(3):527-35, 1986.
3. Mais V, Cetel NS, Muse KN, Quigley ME, Reid QR, Yen SSC. Hormonal dynamics during luteal-follicular transition. J Clin Endocrinol Metab 64(6):1109-14, 1987.
4. Taymor ML. The regulation of follicle growth: some clinical implications in reproductive endocrinology. Fertil Steril 65(2):235-47, 1996.
5. Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schonauer LM, Kadoch IJ, Cohen-Bacri P, Frydman R. Coordination of early antral follicles by luteal administration provides a basis for alternative controlled ovarian hyperstimulation regimens. Fertil Steril 79(2):316-21, 2003.
6. Fanchin R, Salomon L, Castelo-Branco A, Olivennes F, Frydman N, Frydman R. Luteal estradiol pre-treatment coordinates follicular growth during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists. Hum Reprod 18(12):2698-703, 2003d.
7. Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN. Regulation of ovarian function: the role of anti-müllerian hormone. Reproduction 124:601-9, 2002.
8. Josso N and di Clemente N. Trandsduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF-β family. Trends Endocrinol Metab 1492):91-7, 2003.
9. Visser JA, De Jong FH, Laven JSE, Themmen APN. Anti-mullerian hormone: a new marker for ovarian function. Reproduction 131:1-9, 2006.
10. Baarends WM, Uilenbroek JTJ, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leewen ECM, Themmen APN, Grootegoed JA. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal

development, the estrous cycle, and gonadotrophin-induced follicle growth. Endocrinology 136(11):4951-62, 2005.

11. Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JTJ, Grootegoed JA, Themmen APN. Anti-mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. Endocrinology 143(3):1076-84, 2002b.
12. Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, KArels B, Kumar TR, Matxuk MM, Rose UM, De Jong FH, Uilembroek JTJ, Grootegoed JA, Themmen APN. Anti-mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. Endocrinology 142(11:4891-99, 2001.
13. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. Human Reprod 18(2):323-7, 2003b.
14. Hahenkamp WJK, Looman CWN, Themmen APN, de Jong FH, te Velde ER, Broekmans FJM. Anti-müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. J Endocrinol Metab 91(10):4057-63, 2006.
15. Mendez-Lozano DH, Taieb J, Fewereisen E, Alby C, Frydman R, Fanchin R. Detailed dynamics of serum anti-müllerian hormone (AMH) levels during the menstrual cycle and its antral follicle correlates. Fertil Steril 86(S2):S2, 2006.
16. La Marca A, Stabile G, Cardusi Artenisio A, Volpe A. FERUM anti-mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. Hum Reprod 21(12):3103-7, 2006.
17. McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJW. Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. Biol Reprod 64:293-8, 2001.

18. Van Rooij IAJ, Broekmans FJM, te Velde ER, Fauser BCJM Bancsi LFJMM, de Jong FH, Themmen APN. Serum anti-müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. Human Reprod 17(12):3065-71, 2002.
19. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Serum anti-mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. Hum Reprod 18(2):328-32, 2003c.
20. Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated serum level of anti-müllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. J Clin Endocrinol Metab 88(12):5957-62, 2003.
21. Fanchin R, Louafi N, Méndez Lozano DH, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Per-follicle measurements indicate that anti-müllerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. Fertil Steril 84(1):167-73, 2005.
22. Cunha-Filho JS, Lemos N, Freitas F, Arbo E, Souza CA, Salazar C, Facin A, Rosa V, Weiller E, Passos EP. Decreased anti-müllerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. Hum Reprod 21(S1):i45-6, 2006.
23. Fanchin R, Castelo-Branco A, Kadoch IJ, Hosny G, Bagirova M, Frydman R. Premenstrual administration of gonadotrophin-releasing hormone antagonist coordinates early antral follicle sizes and sets up the basis for an innovative concept of controlled ovarian hyperstimulation. Fertil Steril 81(6):1554-9, 2004.
24. Gonen Y, Jacobson W, Casper RF. Gonadotropin suppression with oral contraceptives before in vitro fertilization. Fertil Steril 53(2):283-7, 1990.

25. Laven JSE, Mulders AGMGJ, Visser JA, Themmen AP, De Jong FH, Fauser BCJM. Anti-müllerian hormone serum concentration in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. J Clin Endocrinol Metabol 89(1):318-23, 2004.
26. Weenen C, Laven JSE, von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BCJM, Themmen APN. Anti-müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. Mol Human Reprod 10(2):77-83, 2004.
27. Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen APX, Hovatta O. Anti-müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles *in vitro*. Hum Reprod 21(9):2223-7, 2006.
28. Schmidt KLT, Kryger-Baggesen N, Byskov AG, Andersen AY. Anti-Müllerian hormone initiates growth of human primordial follicles in vitro. Mol Cell Endocrinol 234:87-93, 2005.
29. Lukas-Croisier C, Lasala C, Nicaud J, Bedecarrás P, Kumar TR, Duterte M, Matzuk MM, Picard JY, Josso N, Rey R. Follicle-stimulating hormone increases testicular anti-mullerian hormone (AMH) production through sertolli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH gene. Mol Endocrinol 17(4):550-61, 2003.
30. Young J, Chanson P, Salenave S, Nöel M, Brailly S, O'Flaherty M, Schaison G, Rey R. Testicular anti-müllerian hormone secretion is stimulated by recombinant human FSH in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 90(2):724-8, 2005.
31. 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 91(10):4064-9, 2006.

32. Stubbs SA, Hardy K, da Silva-Buttkus P, Stark J, Webber LJ, Flanagan AM, Themmen APN, Visser JÁ, Groome NP, Franks S. Anti-müllerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab 90(10):5536-43, 2005.
33. de Vet A, Laven JSE, de Jong FH, Themmen APN, Fauser BCJM. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. Fertil Steril 77(2):357-62, 2002
34. Seifer DB, McLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM. Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. Fertil Steril 77(3):468-71, 2002.
35. Peñarrubia J, Fábregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, Carmona F, Vanrell JA, Balasch J. Basal and stimulation day 5 anti-Müllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. Hum Reprod 20(4):915-22, 2005.
36. Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, Gal M, Zylber-Haran E, Margalioth EJ. Dynamics assays of inhibin B, anti-müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. Human Reprod 20(11):3178-83, 2005.
37. Fleming R, Deshpande N, Traynor I, Yates RWS. Dynamics of FSH-induced follicular growth in subfertile women: relationship with age, insulin resistance, oocyte yield and anti-mullerian hormone. Human Reprod 21(6):1436-41, 2006.
38. La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamar, LF, Orvieto R, Levratti P, Volpe A. Anti-müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. Hum Reprod 19(12):2738-41, 2004.

39. Al-Qahtani A, Groome NP. Editorial: Anti-müllerian hormone: Cinderela finds new admirers. J Clin Endocrinol Metab 91(10):3760:2, 2006.

40. Fanchin R, Lozano DHM, Louafi N, Frydman NA, Frydman R, Taieb J. Dynamics of serum anti-Mullerian hormone levels during the luteal phase of controlled ovarian hyperstimulation. Hum Reprod 20(3):747-51, 2005b.

Table 1: Hormonal and follicular measures in a spontaneous menstrual cycle and after intercycle FSH inhibition with the use of OCP in the late luteal phase.

	3rd day of a spontaneous cycle	3rd day of a cycle after OCP use in luteal phase	*P*	Δ%
FSH (um/mL)	5.47 (4.81-9.24)	1.99 (0.97-2.33)	0.001	-68.29
Estradiol (pg/mL)	36.17 (26.81-47.6)	8.98 (6.04-16.1)	0.001	-69.09
AMH (ng/mL)	3.02 (1.21-6.4)	2.22 (0.9-3.11)	0.04	-15.44
Number of antral follicles	15.8 ± 4.7	16.6 ± 3.6	0.44	11.60
Number of antral follicles with 2-4 mm	7.9 ± 4.3	12.8 ± 4.7	0.001	63.62
Mean follicular diameter (mm)	4.4 ± 1.7	3.5 ± 1.2	<0.001	-20.44

Data are displayed as median (interquartille range) or mean ± standard deviation. Δ% represents the mean percentual variation after late luteal phase OCP administration.

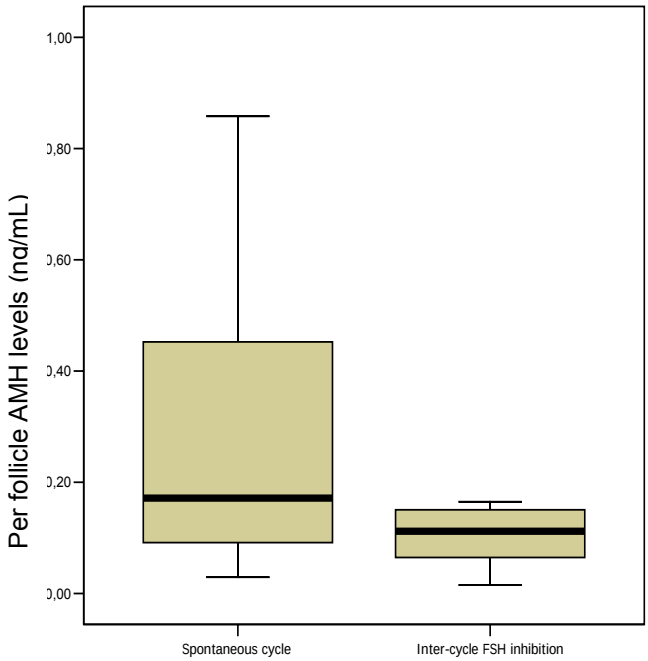

Figure 1: Per follicle levels of AMH (AMH/number of follicles) at the third day of a spontaneous menstrual cycle and after inter-cycle FSH inhibition with the use of luteal OCP. Central horizontal lines indicate the median; additional horizontal lines represent the 10th, 25th, 75th and the 90th centiles.

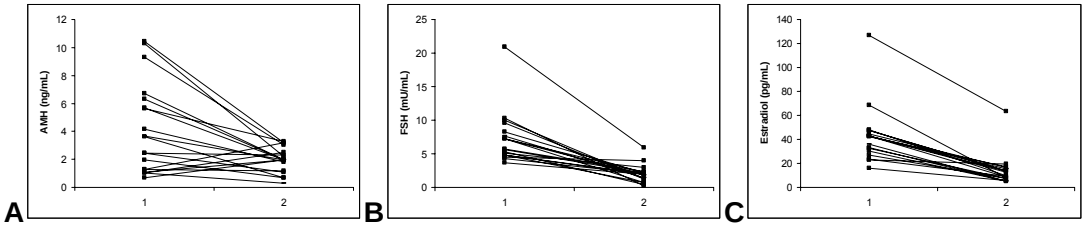

Figure 2: Individual anti-mullerian hormone, FSH, and estradiol serum levels before (1) and after (2) use of OCP in the late luteal phase to pituitary down-regulation.

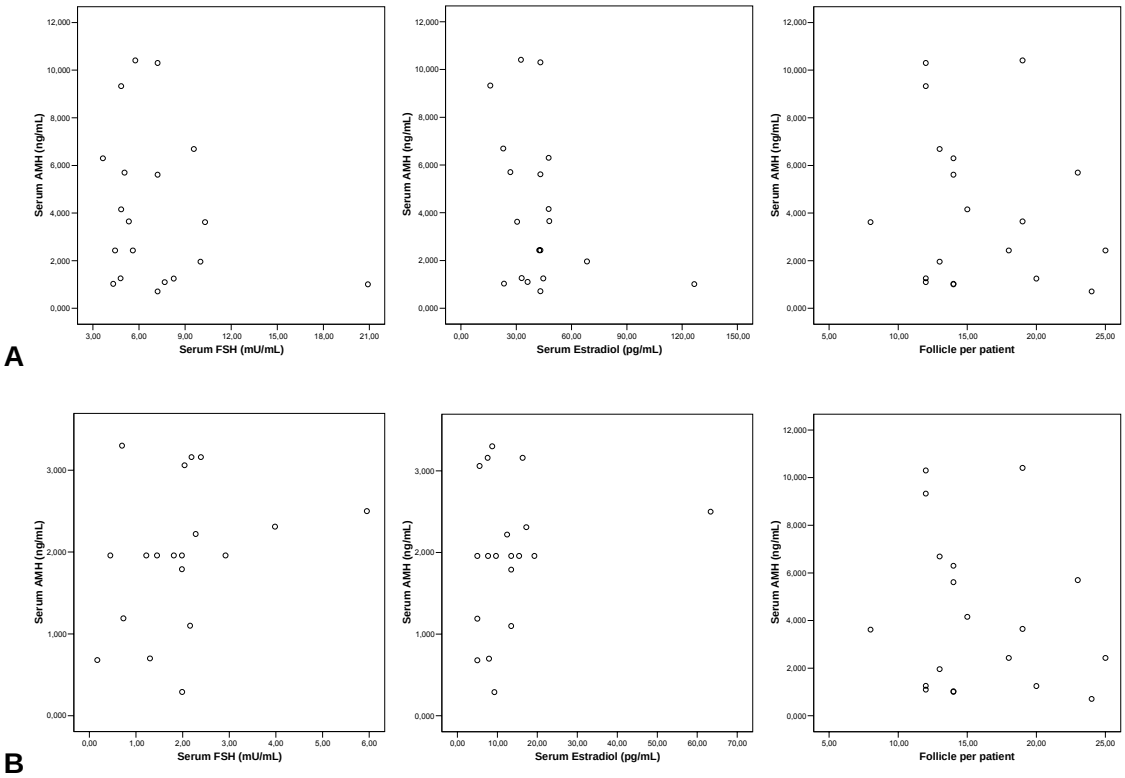

Figure 3: A: Scatterplots of AMH by FSH, estradiol serum levels and follicle number measured per patient, spontaneous menstrual cycle (Sperman's rho coefficients are respectively -0.193, -0.293, -0.146, *P*>0.05). B: Scatterplots of AMH by FSH, estradiol and follicle number per patient, after late luteal phase OCP administration (Sperman's rho coefficients are respectively 0.404, 0.235, 0.360, *P*>0.05).

8. ARTIGO (versão em português)

Níveis séricos do hormônio anti-mülleriano e características da coorte folicular após o bloqueio hipofisário na fase lútea com o uso de anticoncepcional oral

Autores: Arbo E[1], Vetori DV[2], Jimenez MF[3], Freitas FM[4], Lemos N[5], Cunha-Filho JS[6]

Filiações dos autores:

1- M.D., Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2- M.D., Universidade Federal do Rio Grande do Sul

3- M.D., Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

4- M.D., PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

5- M.D., PhD, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

6- M.D., PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Palavras-chave: **AMH, follicular cohort, FSH down-regulation, OCP**

RESUMO:

Objetivo: avaliar o efeito da supressão do FSH na fase lútea tardia do ciclo menstrual com anticoncepcional oral (ACO) sobre os níveis do hormônio anti-mülleriano (HAM) e sobre a coorte folicular ovariana (principalmente seu número, diâmetros e homogeneidade)

Delineamento: estudo clínico prospectivo.

Metodologia: foram incluídas no estudo 20 mulheres normoovulatórias, selecionadas no Ambulatório do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que tinham como causa de infertilidade obstrução tubária bilateral ou infertilidade de causa masculina. No terceiro dia de um ciclo menstrual espontâneo foram realizadas ecografia transvaginal e coleta de sangue para as dosagens hormonais. A partir do vigésimo dia desde ciclo menstrual as pacientes ingeriram diariamente um ACO contendo 0,03 mg de etinil estradiol e 0,15 mg de desogestrel. No terceiro dia do ciclo seguinte, as medidas foram repetidas. Os dados com distribuição normal foram analisados com o teste t de Student para medidas repetidas e os dados não paramétricos pelo teste de Wilcoxon para postos. O nível de significância considerado foi de 0,05.

Resultados: a média de idade das pacientes foi de 29 anos, variando entre 23 a 35 anos. Após o uso do ACO os níveis de FSH e estradiol foram significativamente reduzidos (P<0,001). O número de folículos antrais medidos nos dois momentos não diferiu (15,8 $\pm$ 4,7 antes e 16,6 $\pm$ 3,6 após o uso do ACO), embora após o uso do ACO os folículos apresentaram diâmetros significativamente menores (médias de 4,4 $\pm$ 1,7 antes e de 3,5 $\pm$ 1,2 após, P<0,001). Os níveis do HAM foram significativamente reduzidos após o bloqueio hipofisário, com respectivas medianas (intervalo interquartil) de 3,02 ng/mL (1,21 – 6,39) antes do uso do ACO e 2,22 ng/mL (0,9 – 3,11) após, P=0,04. Não encontramos correlação entre os níveis de HAM e de FSH.

Conclusão: o uso de ACO na fase lútea tardia foi eficaz em inibir a secreção hipofisária de FSH, o que levou a uma coorte folicular mais homogênea, com folículos de menor diâmetro. A diminuição dos níveis do HAM verificados após o uso do ACO não teve correlação com a inibição do FSH.

INTRODUÇÃO

A transição da fase lútea à fase folicular é caracterizada pelo aumento paulatino nos níveis de FSH, o que ocorre simultaneamente com a degeneração do corpo lúteo (1). O crescimento folicular até a fase pré-antral ocorre independente do estímulo do FSH (1-2). Quando os níveis de FSH começam a aumentar, na fase lútea tardia, o recrutamento folicular subseqüente se dá de forma irregular, com o crescimento de folículos de diferentes tamanhos (1-4). Durante ciclos de estimulação ovariana, a inibição dos níveis de FSH na fase lútea tardia com o uso de estradiol foi associada ao surgimento de uma coorte folicular mais homogênea, com impactos positivos sobre desfechos reprodutivos (5-6).

O hormônio anti-mülleriano (HAM) é uma glicoproteína dimérica, da família dos fatores transformadores de crescimento β (*transforming growth factor β* - TGFβ), e é considerado um fator de crescimento e de diferenciação ovariano (7-8). No sexo feminino, o HAM é produzido pelas células da granulosa dos folículos ovarianos ao longo de toda vida reprodutiva, até a menopausa (7-9). Através de estudos com roedores, se sabe que o HAM é expresso principalmente pelas células da granulosa de folículos antrais iniciais e de folículos pré-antrais, e esta expressão é mais intensa nas células da granulosa que circundam o oócito e a cavidade antral (10). Folículos que se encontram em estágio mais avançado de desenvolvimento e aqueles folículos em atresia, assim como os folículos primordiais, não expressam o HAM (10-11). Este padrão específico de expressão sugere que o HAM exerce suas principais ações durante as fases iniciais do crescimento e diferenciação folicular, com uma ação inibitória do recrutamento folicular durante o ciclo menstrual (11-12).

As interações fisiológicas entre o FSH e o HAM ainda não estão bem estabelecidas. Em ciclos espontâneos, os níveis de HAM e de FSH têm uma correlação

inversa, mas como ambos os níveis hormonais estão relacionados ao número de folículos antrais encontrados, esta relação é descrita como indireta (13). Em estudos de ciclos espontâneos, se verificou que os níveis do HAM permanecem constantes ao longo do ciclo, principalmente devido à sua secreção pela população de folículos pré-antrais e antrais iniciais, que também é constante ao longo do ciclo (14-16). Estudos *in vitro* mostram que o HAM inibe o crescimento folicular induzido pelo FSH, principalmente através de uma diminuição na proliferação das células da granulosa, e também através de uma menor atividade da enzima aromatase (11-12), embora outro estudo tenha mostrado resultado contrário (17).

Em mulheres, alguns estudos mostraram uma correlação inversa entre os níveis de FSH e HAM durante a fase folicular (13, 18-21), e em mulheres com endometriose mínima e leve os níveis do HAM são menores, refletindo a sua coorte folicular mais heterogênea (22). Embora de uma maneira geral seja assumido que o FSH aja como um regulador negativo da síntese ovariana de HAM, nenhum destes estudos explicou a possível interação entre estes dois hormônios.

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da supressão do FSH na fase lútea tardia em mulheres normo-ovulatórias sobre a coorte folicular e sobre os níveis do hormônio anti-mülleriano.

METODOLOGIA

Delineamento:

Foi realizado um estudo clínico prospectivo.

Pacientes:

Vinte mulheres normo-ovulatórias foram selecionadas do ambulatório do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com infertilidade de

origem tubária ou masculina. Elas deveriam cumprir os seguintes critérios de inclusão: ciclos menstruais regulares, com duração entre 28 a 34 dias; presença de ambos os ovários; ausência de qualquer anormalidade ovariana ou endocrinológica; índice de massa corporal entre 18 a 25 kg/ m^2; ausência de qualquer terapia hormonal nos últimos três meses; concordância em participar do estudo e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA e pelo Grupo de Pesquisas e Pós-graduação do HCPA.

Protocolo do estudo:

As pacientes foram submetidas a exame ecográfico realizado por um examinador (EA) no terceiro dia de um ciclo menstrual espontâneo, e na mesma ocasião foi coletada amostra de sangue das pacientes, através de venopunção periférica para posterior análise hormonal. A partir do vigésimo dia deste mesmo ciclo menstrual, elas ingeriram diariamente uma pílula anticoncepcional, a qual continha 30 µg de etinil estradiol e 0,15 mg de desogestrel. No terceiro dia do próximo ciclo menstrual, ou após 14 dias se o sangramento menstrual não ocorria, novo exame ecográfico era realizado, com coleta de nova amostra sanguínea. O objetivo dos exames ecográficos foi analisar as medidas ovarianas para posterior cálculo do volume ovariano utilizando-se a fórmula da elipse [(л/6) x largura x altura x profundidade], assim como avaliar o número e o diâmetro médio de todos os folículos ovarianos (média de dois diâmetros ortogonais). Todos os folículos antrais ovarianos entre 2 a 10 mm de diâmetro médio foram incluídos na análise. Para os exames ecográficos utilizoou-se um aparelho provido com transdutor vaginal de 11 MHz, equipado com sistema de harmônica (Aloka SSD 1700, Dyna View, Aloka Co., Ltd.), conforme já descrito (5-6).

Análises homonais

As amostras de sangue foram centrifugadas e o soro separado e criopreservado para posterior análise (a -80 ^{o}C). As dosagens de FSH e estradiol foram realizadas utilizando-se imunoensaio de quimioluminescência (analisador IMMULITE 2000 - Euro/DPC, Llanberis, Inglaterra e analisador Elecsys 1010 – Roche, Mannheim, Alemanha, respectivamente). Os limites para detecção para o FSH é de 0,1 mUI/mL, com variabilidade intra-ensaio de 2,1 a 10%. O limite de detecção para o estradiol é de 12 pg/mL, com variabilidade intra-ensaio de 1,6 a 5,7%. As dosagens do hormônio anti-mülleriano foram realizadas através de ensaio imunoenzimático (ELISA) (DSL-10-14400, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, USA). O limite de detecção é de 0,017 ng/mL, com variabilidade intra-ensaio de 2,4 a 4,6% e inter-ensaio de 4,8 a 8,0%.

Análise estatística

A tabulação dos dados e análise estatística foram realizadas utilizando-se o programa estatísco SPSS, versão 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL.). Para os dados com distribuição normal utilizou-se para descrição dos valores média $\pm$ desvio padrão e para os dados não paramétricos, mediana e intervalo interquartil. Devido ao delineamento do tipo antes-depois do presente estudo, os dados de cada participante obtidos no terceiro dia de um ciclo espontâneo foram comparados com dados da mesma participante no terceiro dia do ciclo seguinte, utilizando-se estatísticas para amostras repetidas. As comparações entre as variáveis com distribuição normal foram realizadas utilizando-se o teste t de Student para medidas repetidas e para as variáveis não parmétricas o teste de Wilcoxon para comparação entre postos. A homogeneidade entre as coortes foliculares foi analisadas pelo teste de Levene para homogeneidade de variâncias. Também foram realizadas testes de correlação entre as variáveis. A amostra foi calculada para detectar uma diferença de pelo menos 1 ng/mL nos níveis séricos do HAM, com um poder >80%, com

nível de significância bilateral de 0,05. O valor de *P* quando <0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

A idade média das vinte pacientes incluídas no estudo foi de 29,1 ± 4,11 anos (variando entre 23 a 35 anos). O índice de massa corporal médio foi de 22,6 ± 2,9 kg/m^2. Como causa da infertilidade, 52% das pacientes tinham obstrução tubária e 48% tinham infertilidade de causa masculina.

Após a administração na fase lútea do ACO, a secreção hipofisária de FSH foi significativamente reduzida, assim como a secreção ovariana de estradiol. As medianas (intervalo interquartil) de FSH foram 5,47 (4,81 – 9,24) mU/mL antes e 1,99 (0,97 – 2,33) mU/mL após o uso do ACO (*P*<0,001); os níveis de estradiol foram 36,17 (26,81 – 47,6) pg/mL e 8,98 (6,04 – 16,1) pg/mL, respectivamente (*P*<0,001).

Os níveis do HAM também foram significativamente reduzidos após o uso do ACO, com medianas (intervalo interquartil) de 3,02 (1,21 – 6,39) ng/mL antes e 2,22 (0,9 – 3,11) ng/mL após (*P*=0,04) (tabela 1). Também a relação entre os níveis de HAM e o número de folículos por paciente foi significativamente menor após na segunda medida – medianas (intervalo interquartil) de 0,17 (0,08 – 0,47) e 0,11 (0,06 – 0,15) ng/mL/folículo, *P*=0,04 (figura 1). O poder do nosso estudo em detectar as diferenças entre os níveis de HAM nos dois momentos foi maior que 80%. Embora os níveis do HAM apresentaram-se de maneira não paramétrica, com valores heterogêneos, a maioria das pacientes apresentou queda nos seus valores após o uso do ACO (figura 2), o mesmo se aplicando para os níveis de estradiol e de FSH.

O número de folículos antrais medidos em ambos os momentos não foram diferiram estatisticamente (15,8 ± 4,7 antes e 16,6 ± 3,6 após, *P*=0,44), embora após o bloqueio hipofisário do FSH os folículos apresentaram diâmetros significativamente menores (4,4 ± 1,7 mm antes e 3,5 ± 1,2 mm após, *P*<0,001), com menor variância entre seus diâmetros médios (teste de Levene para igualdade entre as variâncias com valor de

F=32,212, p<0,001). No ciclo espontâneo, o número de folículos por paciente com diâmetro médio entre 2 e 4 mm foi menor que após a inibição interciclo do FSH (conforme demonstrado na tabela 1), e o contrário ocorreu com folículos maiores de 4 mm. O volume ovariano também diminuiu após o uso do ACO, refletindo o menor diâmetro folicular (diâmetro médio de 5,78 ± 2,86 cm^3 antes e 4,37 ± 1,85 cm^3, *P*=0,002). O percentual da variação (Δ%) das variáveis analisadas após o uso do ACO, comparando-as com o ciclo espontâneo, também está demonstrado na tabela 1.

A diminuição dos níveis séricos do HAM, FSH e estradiol e o diâmetro folicular médio foram analisados através de testes de correlação (plotados nas figuras 3A e 3B). Embora estas variáveis decresceram após o uso do ACO, não encontramos correlação estatisticamente significativa entre o HAM e as demais variáveis.

DISCUSSÃO

Nós realizamos no presente estudo o bloqueio hipofisário de FSH com o uso de ACO na fase lútea tardia do ciclo menstrual, conforme demonstrado na queda dos níveis de FSH e de estradiol. Como conseqüência, a coorte folicular tornou-se mais homogênea, com menores diâmetros foliculares médios e menor variância entre estes diâmetros. Neste estudo, também analisamos os efeitos da supressão do FSH sobre os níveis do HAM e surpreendentemente este níveis declinaram após o uso do ACO. Este foi o primeiro estudo *in vivo* que objetivou a análise do efeito do FSH sobre a secreção do HAM, através da manipulação da secreção de FSH pela hipófise alcançada com a administração de ACO na fase lútea tardia. Nós demonstramos que a secreção do HAM possivelmente ocorra principalmente quando os folículos são estimulados pelo FSH. Como inibimos a estimulação ovariana com a diminuição dos níveis de FSH, a secreção do HAM também foi diminuída.

Conforme já descrito por Fanchin e colaboradores, 2003 (6), a supressão de FSH na fase lútea é uma importante ferramenta no âmbito da reprodução assistida, através de seu impacto sobre a coorte folicular. Como na hiperestimulação ovariana o objetivo principal é promover o crescimento folicular múltiplo, a inibição do FSH na fase lútea reflete-se em uma coorte folicular mais homogênea, que torna-se capaz de responder mais uniformemente ao estímulo hormonal exógeno, aumentando o número de folículos em crescimento, o número de oócitos recuperados e o número de embriões em ciclos de hiperestímulo utilizando-se antagonistas do GnRH (6, 23). Também o uso empírico do ACO previamente à estimulação ovariana foi testado, e os resultados mostram que quando tratadas com ACO, as pacientes necessitam de menores doses de gonadotrofinas, com maior número de oócitos recuperados e menos formação de cistos (24). Os efeitos sobre a coorte de folículos antrais, no entanto, não foi avaliada. Agora

podemos afirmar que o efeito benéfico do uso do ACO antes da estimulação ovariana é devido à parada do crescimento folicular e sua homogeneização.

O achado mais relevante no nosso estudo, no entanto, foi a diminuição dos níveis de HAM secretados pelos ovários após o bloqueio inter-ciclo do FSH. O HAM é conhecido pela sua importante atividade parácrina como fator de crescimento ovariano, e é secretado pelas células da granulosa dos folículos ovarianos. Alguns estudos relacionam seus níveis séricos à reserva ovariana (13, 19, 21, 25). Através de estudos de imuno-histoquímica com tecido ovariano humano, se descobriu que os folículos primordiais e folículos maiores que 8 mm de diâmetro médio não expressam HAM. A maior expressão foi verificada nos folículos pré-antrais e antrais iniciais, até 4 mm de diâmetro médio, quando praticamente todas as células da granulosa o expressam (26).

No entanto, a interação fisiológica entre o HAM e o FSH não foi ainda completamente elucidada. Alguns estudos sugerem que o HAM inibe o crescimento folicular inicial (27) e também o crescimento folicular induzido pelo FSH (7, 9, 11,12), tornando as células da granulosa menos sensíveis do estímulo do FSH. Este padrão é importante para o processo de recrutamento folicular, pois os folículos que expressam o HAM com menor intensidade são aqueles que possuem maior proliferação das células da granulosa (7). Outros estudos, no entanto, mostram dados diferentes, em que o HAM potencializaria o crescimento folicular *in vitro* induzido pelo FSH, especialmente dos folículos primordiais e antrais iniciais (17, 28), o que torna este ponto controverso na literatura. Também já foi demonstrado que o FSH induz a ativação do gene transcritor do HAM nas células de Setroli (29), através da adenilato ciclase, cAMP e proteíno-quinase A, em uma via não clássica de resposta do AMPc, o que aponta para uma interação fisiológica, intracelular entre os dois hormônios. Além disto, no sexo masculino, a secreção pré-púbere do HAM é estimulada pela administração de FSH, e suprimida pela administração concomitante de FSH e hCG (30).

O nosso estudo traz algumas evidências importantes para ajudar a elucidar a interação entre o HAM e o FSH. Nós realizamos um estudo *in vivo*, com a manipulação da fase lútea, em que houve controle com o ciclo espontâneo das pacientes. Quando a secreção de FSH foi inibida, o crescimento folicular foi menos estimulado e a proliferação das células da granulosa daqueles folículos em crescimento também foi presumivelmente inibida, o que se refletiu na menor secreção de HAM. No entanto, embora os níveis do HAM tenham diminuído após o uso do ACO, não conseguimos mostrar correlação significativa entre os níveis deste com o FSH, o que sugere que a diminuição nos níveis séricos do HAM não ocorreu em resposta aos níveis de FSH, mas que ambos os hormônios estão indiretamente relacionados.

Alguns autores encontraram uma correlação negativa entre os níveis do HAM no líquido folicular e do estradiol e inibina (31), sugerindo que a secreção do HAM é regulada por mecanismos complexos, como outros fatores de crescimento e homonais, não analisados no presente estudo. Quando a secreção de HAM foi analisada em tecido ovariano de roedores, encontrou-se uma coorte de folículos morfologicamente idênticos entre si, que apresentavam, porém, diferentes níveis de expressão do HAM (10). Esta expressão heterogênea do HAM poderia explicar porque alguns folículos são mais sensíveis ao estímulo do FSH que outros, determinando quais folículos serão recrutados e quais não o serão, tornando-se atrésicos. Quando os mesmos animais foram tratados com antagonista do GnRH, a cultura de células de folículos pré-antrais mostraram uma diminuição da expressão do HAM, indicando que as gonadotrofinas são necessárias para a expressão do HAM (10).

Já está bem estabelecido que pacientes com ovários policísticos têm níveis mais altos de HAM que mulheres normoovulatórias (20,25), refletindo diretamente o grande número de folículos antrais iniciais (entre 2-5 mm) verificados através de exame ultrassonográfico e que levam ao aspecto ovariano típico da síndrome. No entanto,

Stubbs e colaboradores, 2005, verificaram que a expressão do HAM pelas células da granulosa é contraditoriamente reduzida nos estágios iniciais do desenvolvimento folicular, sugerindo que a menor expressão do HAM é responsável pela alta proporção de folículos que entram em crescimento nesta síndrome (32).

O aspecto mais relevante e de aplicação clínica do uso do HAM é o fato de que seus níveis mostram associação positiva com a reserva ovariana e com o número de oócitos recuperados após hiper-estímulo ovariano (13, 21, 25, 33-37). Por outro lado, pacientes com resposta insatisfatória ao estímulo ovariano apresentam menores níveis basais de HAM (18, 35, 37). Os níveis de HAM declinam ao longo do hiper-estímulo ovariano, após a administração de FSH, provavelmente devido à regressão e atresia dos folículos de menor tamanho ou devido ao aumento dos níveis de inibina B e de estradiol (19, 38). Quando se utiliza FSH exógeno para estimulação ovariana, os níveis de HAM apresentam forte correlação positiva com o número de folículos que atingem sensibilidade ao FSH a cada dia da estimulação, sugerindo que o HAM é secretado pro folículos que são capazes de responder positivamente ao estímulo do FSH (37). Atualmente, centros de reprodução assistida de vários locais têm incorporado a dosagem de HAM na sua rotina de avaliação de reserva ovariana (39).

Tomando todas estas informações conjuntamente, nos parece que a partir do momento em que os folículos antrais iniciais são recrutados para o crescimento através do estímulo do FSH, a expressão do HAM é ativada, talvez numa tentativa de evitar o crescimento folicular e evitar a ovulação múltipla. Isto poderia explicar porque, no nosso estudo, a inibição do FSH na transição lúteo-folicular, no momento em que o crescimento folicular vai se tornar mais intenso, resultou em uma menor secreção de HAM.

Os nossos resultados concordam com a literatura em que os níveis séricos de HAM não são diretamente regulados pelo FSH; muitos estudos mostraram que os níveis de HAM são constantes ao longo de um ciclo menstrual espontâneo, não flutuando

significativamente (14-16). No entanto, o nosso estudo foi delineado para avaliar o efeito do ACO na secreção de FSH, e, consequentemente o seu possível controle sobre a secreção do HAM, quando comparado a um ciclo espontâneo da mesma paciente. Utilizamos para isto, o mesmo delineamento (ensaio clínico do tipo antes e depois) utilizado por outros estudos que descrevem aspectos fisiológicos da secreção do HAM (13, 18, 19, 36, 38).

Os níveis menores de HAM verificados no nosso estudo também podem ser explicados pela sua menor secreção pelos folículos pré-antrais, os quais não foram ecograficamente mensurados. Outro ponto que merece atenção é a presença de um progestágeno na formulação do ACO utilizada, o que poderia produzir um efeito direto na secreção de HAM. Analisando o fluido folicular de pacientes que se submeteram a fertilização *in vitro*, Fanchin e colaboradores, 2005 (40) demonstraram que o fluido coletado de folículos maiores apresentou maiores níveis de progesterona que os menores. Eles encontraram uma correlação negativa entre os níveis de progesterona e de HAM no fluido folicular, sugerindo que a luteinização teria um impacto negativo sobre a atividade das células da granulosa em produzir o HAM. Desta forma, o uso do ACO com combinação hormonal durante a fase lútea tardia, no momento em que o corpo lúteo começa a diminuir sua atividade e produção de progesterona, poderia manter um ambiente ovariano similar àquele da fase lútea, com maiores níveis de progesterona e menores níveis de gonadotrofinas.

Em conclusão, o recrutamento e o crescimento folicular são processos complexos e intrincados, que dependem de uma variedade de fatores de crescimento e interações hormonais. Os efeitos da inibição do FSH na fase lútea tardia foram evidentes, refletidos em uma coorte folicular mais homogênea e menor secreção de HAM. A diminuição nos níveis do HAM verificada, embora tenha ocorrido simultaneamente com a inibição da secreção de FSH, provavelmente não sofreu influência direta dos níveis de FSH, mas

possivelmente representa a parada do crescimento folicular, imposta pela administração do ACO e a conseqüente menor estimulação das células da granulosa pelo FSH. Provavelmente existem outros fatores de crescimento e peptídeos (como GDF-9, BMP-15, inibinas...) que também estão implicados no processo de regulação da secreção folicular do HAM, os quais devem ser mais extensivamente estudados.

REFERÊNCIAS

1. Fauser BCJM, van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. Endocrine Rev 18(1): 71-106, 1997.
2. Gougeon A. Caractères quantitatifs et qualitatifs de la population folliculaire dans l'ovaire humain adulte. Contracep Fertil Sexual, 12(3):527-35, 1986.
3. Mais V, Cetel NS, Muse KN, Quigley ME, Reid QR, Yen SSC. Hormonal dynamics during luteal-follicular transition. J Clin Endocrinol Metab 64(6):1109-14, 1987.
4. Taymor ML. The regulation of follicle growth: some clinical implications in reproductive endocrinology. Fertil Steril 65(2):235-47, 1996.
5. Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schonauer LM, Kadoch IJ, Cohen-Bacri P, Frydman R. Coordination of early antral follicles by luteal administration provides a basis for alternative controlled ovarian hyperstimulation regimens. Fertil Steril 79(2):316-21, 2003.
6. Fanchin R, Salomon L, Castelo-Branco A, Olivennes F, Frydman N, Frydman R. Luteal estradiol pre-treatment coordinates follicular growth during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists. Hum Reprod 18(12):2698-703, 2003d.
7. Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN. Regulation of ovarian function: the role of anti-müllerian hormone. Reproduction 124:601-9, 2002.
8. Josso N and di Clemente N. Trandsduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF-β family. Trends Endocrinol Metab 1492):91-7, 2003.
9. Visser JA, De Jong FH, Laven JSE, Themmen APN. Anti-mullerian hormone: a new marker for ovarian function. Reproduction 131:1-9, 2006.
10. Baarends WM, Uilenbroek JTJ, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leewen ECM, Themmen APN, Grootegoed JA. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal

development, the estrous cycle, and gonadotrophin-induced follicle growth. Endocrinology 136(11):4951-62, 2005.

11. Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JTJ, Grootegoed JA, Themmen APN. Anti-mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. Endocrinology 143(3):1076-84, 2002b.
12. Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, KArels B, Kumar TR, Matxuk MM, Rose UM, De Jong FH, Uilembroek JTJ, Grootegoed JA, Themmen APN. Anti-mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. Endocrinology 142(11:4891-99, 2001.
13. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. Human Reprod 18(2):323-7, 2003b.
14. Hahenkamp WJK, Looman CWN, Themmen APN, de Jong FH, te Velde ER, Broekmans FJM. Anti-müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. J Endocrinol Metab 91(10):4057-63, 2006.
15. Mendez-Lozano DH, Taieb J, Fewereisen E, Alby C, Frydman R, Fanchin R. Detailed dynamics of serum anti-müllerian hormone (AMH) levels during the menstrual cycle and its antral follicle correlates. Fertil Steril 86(S2):S2, 2006.
16. La Marca A, Stabile G, Cardusi Artenisio A, Volpe A. FERUM anti-mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. Hum Reprod 21(12):3103-7, 2006.
17. McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJW. Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. Biol Reprod 64:293-8, 2001.

18. Van Rooij IAJ, Broekmans FJM, te Velde ER, Fauser BCJM Bancsi LFJMM, de Jong FH, Themmen APN. Serum anti-müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. Human Reprod 17(12):3065-71, 2002.
19. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Serum anti-mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. Hum Reprod 18(2):328-32, 2003c.
20. Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated serum level of anti-müllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. J Clin Endocrinol Metab 88(12):5957-62, 2003.
21. Fanchin R, Louafi N, Méndez Lozano DH, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Per-follicle measurements indicate that anti-müllerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. Fertil Steril 84(1):167-73, 2005.
22. Cunha-Filho JS, Lemos N, Freitas F, Arbo E, Souza CA, Salazar C, Facin A, Rosa V, Weiller E, Passos EP. Decreased anti-müllerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. Hum Reprod 21(S1):i45-6, 2006.
23. Fanchin R, Castelo-Branco A, Kadoch IJ, Hosny G, Bagirova M, Frydman R. Premenstrual administration of gonadotrophin-releasing hormone antagonist coordinates early antral follicle sizes and sets up the basis for an innovative concept of controlled ovarian hyperstimulation. Fertil Steril 81(6):1554-9, 2004.
24. Gonen Y, Jacobson W, Casper RF. Gonadotropin suppression with oral contraceptives before in vitro fertilization. Fertil Steril 53(2):283-7, 1990.

25. Laven JSE, Mulders AGMGJ, Visser JA, Themmen AP, De Jong FH, Fauser BCJM. Anti-müllerian hormone serum concentration in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. J Clin Endocrinol Metabol 89(1):318-23, 2004.
26. Weenen C, Laven JSE, von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BCJM, Themmen APN. Anti-müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. Mol Human Reprod 10(2):77-83, 2004.
27. Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen APX, Hovatta O. Anti-müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles *in vitro*. Hum Reprod 21(9):2223-7, 2006.
28. Schmidt KLT, Kryger-Baggesen N, Byskov AG, Andersen AY. Anti-Müllerian hormone initiates growth of human primordial follicles in vitro. Mol Cell Endocrinol 234:87-93, 2005.
29. Lukas-Croisier C, Lasala C, Nicaud J, Bedecarrás P, Kumar TR, Duterte M, Matzuk MM, Picard JY, Josso N, Rey R. Follicle-stimulating hormone increases testicular anti-mullerian hormone (AMH) production through sertolli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH gene. Mol Endocrinol 17(4):550-61, 2003.
30. Young J, Chanson P, Salenave S, Nöel M, Brailly S, O'Flaherty M, Schaison G, Rey R. Testicular anti-müllerian hormone secretion is stimulated by recombinant human FSH in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 90(2):724-8, 2005.
31. 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 91(10):4064-9, 2006.

32. Stubbs SA, Hardy K, da Silva-Buttkus P, Stark J, Webber LJ, Flanagan AM, Themmen APN, Visser JÁ, Groome NP, Franks S. Anti-müllerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human polycystic ovaries. J Clin Endocrinol Metab 90(10):5536-43, 2005.
33. de Vet A, Laven JSE, de Jong FH, Themmen APN, Fauser BCJM. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. Fertil Steril 77(2):357-62, 2002
34. Seifer DB, McLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM. Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. Fertil Steril 77(3):468-71, 2002.
35. Peñarrubia J, Fábregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, Carmona F, Vanrell JA, Balasch J. Basal and stimulation day 5 anti-Müllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. Hum Reprod 20(4):915-22, 2005.
36. Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, Gal M, Zylber-Haran E, Margalioth EJ. Dynamics assays of inhibin B, anti-müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. Human Reprod 20(11):3178-83, 2005.
37. Fleming R, Deshpande N, Traynor I, Yates RWS. Dynamics of FSH-induced follicular growth in subfertile women: relationship with age, insulin resistance, oocyte yield and anti-mullerian hormone. Human Reprod 21(6):1436-41, 2006.
38. La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamar, LF, Orvieto R, Levratti P, Volpe A. Anti-müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. Hum Reprod 19(12):2738-41, 2004.

39. Al-Qahtani A, Groome NP. Editorial: Anti-müllerian hormone: Cinderela finds new admirers. J Clin Endocrinol Metab 91(10):3760:2, 2006.

40. Fanchin R, Lozano DHM, Louafi N, Frydman NA, Frydman R, Taieb J. Dynamics of serum anti-Mullerian hormone levels during the luteal phase of controlled ovarian hyperstimulation. Hum Reprod 20(3):747-51, 2005b.

Tabela 1: Níveis de hormônio anti-mülleriano por folículo medido (HAM/número de folículos), no terceiro dia de um ciclo menstrual espontâneo e após a inibição inter-ciclo do FSH após o uso de anticoncepcional na fase lútea tardia.

	3º dia de um ciclo menstrual espontâneo	Após o uso de ACO na fase lútea tardia	*P*	Δ%
FSH (mU/mL)	5,47 (4,81-9,24)	1,99 (0,97-2,33)	0,001	-68,29
Estradiol (pg/mL)	36,17 (26,81-47,6)	8,98 (6,04-16,1)	0,001	-69,09
HAM (ng/mL)	3,02 (1,21-6,4)	2,22 (0,9-3,11)	0,04	-15,44
Número de folículos antrais	15,8 ± 4,7	16,6 ± 3,6	0,44	11,60
Número de folículos antrais entre 2 e 4 mm	7,9 ± 4,3	12,8 ± 4,7	0,001	63,62
Diâmetro follicular médio (mm)	4,4 ± 1,7	3,5 ± 1,2	<0,001	-20,44

Os dados estão dispostos como mediana (intervalo interquartil) ou como média ± desvio-padrão. Δ% representa o percentual de variação após o uso do ACO.

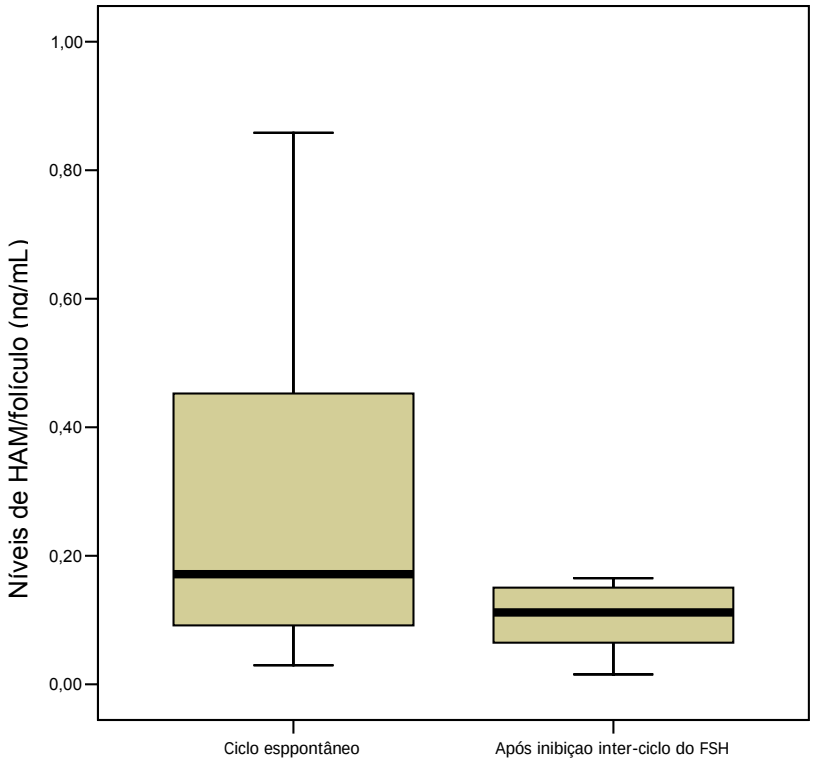

Figura 1: Níveis de hormônio anti-mülleriano por folículo medido (HAM/número de folículos), comparando-se o terceiro dia de um ciclo menstrual espontâneo e após a inibição do FSH após o uso de anticoncepcional na fase lútea tardia. As linhas centrais indicam a mediana; as demais linhas horizontais representam os percentis 10, 25, 75 e 90.

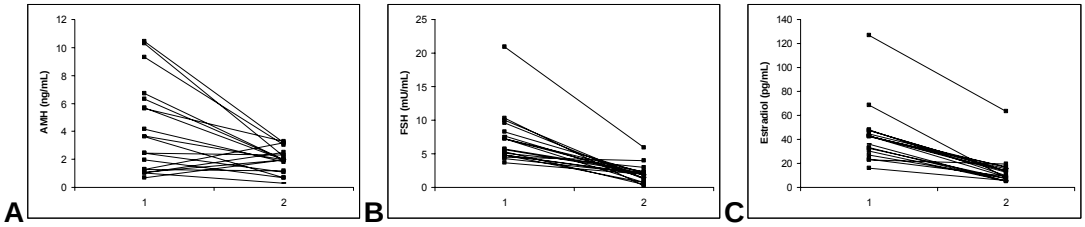

Figura 2: Níveis séricos individuais do HAM, FSH e estradiol antes (1) e após (2) o uso do ACO na fase lutea tardia para inibição hipofisária.

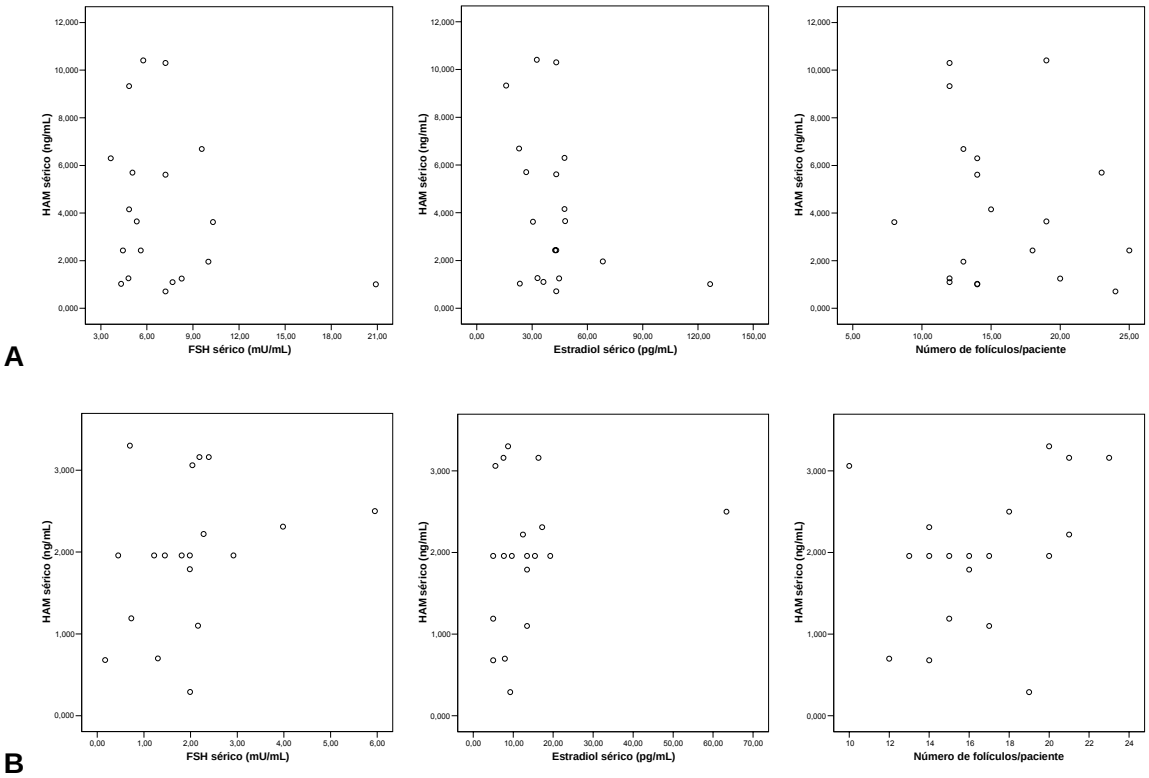

Figure 3: A: Gráficos de correlação dos níveis séricos de HAM pelo FSH, estradiol e número de folículos, em um ciclo menstrual espontâneo (coeficientes de Sperman rho foram respectivamente -0.193, -0,293, -0,146, *P*>0,05). B: Gráficos de correlação dos níveis séricos de HAM pelo FSH, estradiol e número de folículos, após a administração na fase lútea de ACO (coeficientes de Sperman rho foram respectivamente 0,404, 0,235, 0,360, *P*>0,05).

9. CONCLUSÕES

O uso de anticoncepcional oral na fase lútea tardia, por curto período de tempo, tem efeito supressor sobre a secreção hipofisária de FSH e consequentemente sobre a produção ovariana de estradiol.

No ovário, a supressão do FSH na fase lútea tardia não causou alteração no número de folículos antrais mensuráveis através de ecografia, porém os diâmetros médios foliculares foram significativamente reduzidos, como conseqüência direta da ausência de estimulação do FSH.

O bloqueio inter-ciclo do FSH com o uso do anticoncepcional oral refletiu-se no surgimento de uma coorte folicular mais homogênea, com diâmetros foliculares apresentando menor variabilidade.

Com a presença de folículos de menores tamanhos obtivemos um menor volume ovariano após o uso do ACO.

Após o uso do ACO na transição lúteo-folicular, os níveis séricos de HAM diminuíram.

Não houve correlação entre a diminuição dos níveis séricos do FSH e do HAM, sugerindo que este último realmente é independente daquela gonadotrofina.

10. PERSPECTIVAS

O nosso estudo demonstrou a diminuição dos níveis de HAM após o uso de ACO na transição lúteo-folicular. O HAM tem sido cada vez mais difundido como marcador de reserva ovariana, e os fatores reguladores de sua secreção ainda são desconhecidos em sua grande maioria. Embora não tenhamos encontrado correlação entre os níveis de HAM e de FSH, a continuidade dos estudos dos fatores reguladores da secreção de HAM é imperiosa.

Um próximo tópico de pesquisa será o estudo dos níveis do HAM e do FSH em pacientes com diferentes perfis genéticos do receptor folicular para o FSH. O gene do receptor do FSH apresenta diferentes polimorfismos (pequenas variações na sua seqüência de aminoácidos), os quais podem se refletir em diferentes respostas ovarianas ao estímulo do FSH, inclusive sobre a secreção folicular do HAM.

11. ANEXOS

11.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Porto Alegre, ____/____/____

Eu, _____

Recebi todas as informações de forma clara e objetiva para participar do projeto de pesquisa **"*Comparação entre duas doses de anticoncepcional oral, usadas na transição lúteo-folicular para homogeneização da coorte folicular*"**.

Este estudo visa estudar diferentes doses de um composto que existe nos comprimidos que eu tomarei no desenvolvimento de meus folículos ovarianos (estruturas que contém meus óvulos). Serei sorteada para tomar uma das duas doses diferentes e que não comprometem meu futuro reprodutivo. Os riscos deste estudo são os riscos de usar pílula anticoncepcional por poucos dias, como dor nos seios, sangramento vaginal ou dor de cabeça.

Também concordo em realizar exame de sangue, que será coletado no dia da realização das ecografias, através da punção de uma veia. A ecografia será realizada duas vezes, por via transvaginal, e é um exame sem efeitos colaterais, exceto leve desconforto durante a sua realização.

Meus benefícios serão indiretos, uma vez que esta pesquisa poderá ajudar mulheres inférteis na sua indução da ovulação. O meu tratamento não será diferente porque estou participando deste estudo, e em qualquer momento poderei solicitar mais informações à equipe médica e, quando eu quiser, poderei sair desta pesquisa sem prejuízo ao meu tratamento futuro no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Assinatura da paciente:

Assinatura do investigador:

Telefone do Hospital de Clínicas (Serviço de Ginecologia) para dúvidas: 3316-8117 (pesquisador: João Sabino Cunha Filho) ou 9166-9541 (pesquisadora: Elisangela Arbo)

11.2 FICHA DE COLETA DE DADOS

FICHA DE COLETA DE DADOS

Nome: _____

Prontuário: _____

1° CICLO: Data da menstruação: ___/___/___

Data da 1ª ecografia: ___/___/___

	OVÁRIO DIREITO	OVÁRIO ESQUERDO
ENDOMÉTRIO - TAMANHO		
NO. FOLÍCULOS		
TAMANHO FOLÍCULOS		

2° CICLO:

Data do início da medicação: ___/___/___

Data da 2ª ecografia: ___/___/___

	OVÁRIO DIREITO	OVÁRIO ESQUERDO
ENDOMÉTRIO - TAMANHO		
NO. FOLÍCULOS		
TAMANHO FOLÍCULOS		

Idade:____

Fator: ___masculino ___tubário

Peso:____ Altura:_____ IMC:____

Raça: ___B ___P ___M

Número de dias de uso da medicação: ____

Dosagens Hormonais:

1° ciclo: HAM____ FSH____ Inibina B____

2° ciclo: HAM____ FSH____ InibinaB____