

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

RESERVA OVARIANA EM PACIENTES INFÉRTEIS COM ENDOMETRIOSE
MÍNIMA E LEVE

Autora: Nadiane Albuquerque Lemos

Orientadores: Prof. Dr. Eduardo Pandolfi Passos

Prof. Dr. João Sabino L. Cunha-Filho

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre, 2006

**Este trabalho é dedicado as minhas filhas, o melhor da vida, Ana Luísa e
Maria Augusta, ao Cristiano e aos meus pais Elza e Antonio Carlos.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho e, em especial:

- Ao professor e amigo Eduardo P. Passos, pelas oportunidades e responsabilidade na minha formação;

- Ao amigo e professor Dr. João Sabino L. Cunha-Filho, pela confiança e credibilidade, pela correção e apoio irrestritos;

- Ao Prof. Fernando Freitas, pelas oportunidades e apoio;

- A Dra. Andréa Facin pelo trabalho e contribuição sem o qual inviabilizaria a execução deste trabalho;

- Aos colegas Dr. Cristiano Salazar e Carlos Augusto Bastos

- A Dra. Daniela Vettori e Dra. Elisangela Arbo pela brilhante colaboração

- A enf. Suzana Zachia

- Ao colega Eduardo Weiler pelo trabalho e dedicação

- A bolsista Virgínia Rosa

- Aos farmacêuticos bioquímicos Rossana Scalco e Luiz Werres Junior

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
Aspectos gerais da endometriose	7
Aspectos hormonais na endometriose	8
Endometriose e reprodução assistida	10
Endometriose e ambiente folicular	11
Reserva ovariana.....	13
Coorte folicular.....	16
4. REFERÊNCIAS	19
5. OBJETIVOS	28
6. ARTIGO - VERSÃO EM INGLÊS	29
7. ARTIGO - VERSÃO EM PORTUGUÊS	51
8. CONCLUSÕES	69
9. PERSPECTIVAS	70
11. ANEXOS.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

FSH	hormônio folículo estimulante
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
HAM	hormônio anti-mulleriano
HCG	gonadotrofina coriônica humana
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	proteína carreadora de IGF
IMC	índice de massa corporal
LH	hormônio luteinizante
kg	quilograma
m²	metro-quadrado
ml	mililitro
UI	unidades internacionais
ng	nanograma
pg	picograma
rpm	rotações por minuto
TRH	hormônio tireotrófico

INTRODUÇÃO

A endometriose associa-se à infertilidade por diferentes mecanismos; alterações imunológicas, anatômicas, uterinas, endometriais, entre outras.

O nosso grupo de estudos, que pertence ao diretório de pesquisa em Reprodução Humana da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, tem como linha de investigação alterações ovulatórias em pacientes com endometriose e infertilidade.

Já demonstramos que este grupo de mulheres tem secreção e controle da prolactina alterada (CUNHA-FILHO et al., 2001, 2002), assim como anormalidades da fase lútea (CUNHA-FILHO et al., 2003a) evidenciada pela disfunção na secreção de esteróides ovarianos (estrogênio e progesterona) e concentração folicular de fatores de crescimento modulada de forma anômala (CUNHA-FILHO et al., 2003b).

Várias questões e hipóteses já foram levantadas a partir destes estudos. Com o objetivo de elucidar alterações foliculares e hormonais envolvidas na sub-fertilidade das mulheres com endometriose e a proposição de tratamentos mais racionais e acessíveis propomos a realização desta pesquisa.

REVISÃO DA LITERATURA

Aspectos gerais da endometriose

A endometriose, tecido glandular e estroma endometriais fora da cavidade uterina, (OLIVE & SCHWARTZ, 1993; KONINCKX, 1994; NISOLLE & DONNEZ, 1997) foi descrita pela primeira vez em 1860 por Rokitansky. Em 1927, SAMPSON foi o primeiro a caracterizar a endometriose como uma patologia responsável por alterações na pelve feminina. Já, LEYENDECKER, 1998, discute a endometriose como doença da unidade endometrial-subendometrial. A etiopatogenia da endometriose está baseada em teorias, as mais conhecidas; da metaplasia celômica, dos implantes ectópicos e da indução de células multipotenciais.

Estima-se que 10% a 15% da população feminina apresenta endometriose (MUSE & WILSON, 1982; BANCROFT, WILLIAMS, ELSTEIN, 1989; OLIVE & SCHWARTZ, 1993), uma patologia de importância clínica ginecológica e na medicina reprodutiva sendo foco de constantes pesquisas (LEYENDECKER et al. 1999). A associação entre endometriose e infertilidade é bem estabelecida, mulheres com endometriose tem 20 vezes mais chances de serem inférteis (MUSE, 1982, BARACAT, 1995, KONINCKX, 1994). Trinta a sessenta por cento das pacientes com endometriose apresentam infertilidade associada (KISTNER, 1975; OLIVE & SCHWARTZ, 1993; BANCROFT, WILLIAMS, ELSTEIN, 1989; KONINCKX, 1994).

A endometriose foi o principal achado laparoscópico em pacientes com dor pélvica e o segundo diagnóstico entre as com infertilidade no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (PALMA DIAS et al., 1995).

Pacientes com infertilidade e endometriose moderada ou severa, segundo a classificação da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM, 1995) (Classificação em Anexo), apresentam um substrato anatômico para sua incapacidade de gestar, tem uma apresentação mais evidente desta patologia. Para a etiologia da infertilidade de pacientes com endometriose mínima ou leve são propostos vários mecanismos, sem ter, até o momento, uma definição clara a respeito (MUSE & WILSON, 1982; OLIVE & HANEY, 1986; CANDIANI et al., 1991; INOUE et al., 1992; OLIVE & SCHWARTZ, 1993; SHAW et al., 1995).

Aspectos hormonais na endometriose

Alterações hormonais foram descritas por vários autores em diferentes estudos, tentando relacionar as alterações existentes e a incapacidade de gestar das pacientes com endometriose. Foram encontradas anormalidades na secreção de progesterona, estradiol, prolactina e na função lútea das pacientes inférteis com endometriose, porém os achados são conflitantes. A endometriose também foi associada com anovulação (SOULES et al., 1976; DMOWSKI, RAO, SCOMMEGNA, 1980). Comparando pacientes com e sem endometriose observou-se uma prevalência superior de folículo não roto entre pacientes com endometriose (MIO et al., 1992). Pacientes com endometriose teriam secreção anômala de hormônio Luteinizante (LH) (CHEENSMAN et al, 1982 e 1983; PITTAWAY et al., 1983; RÖMBERG, KAUPPILA, RAJANIEMI, 1984 e AYERS, BIRENBAUM, MENON, 1987), enquanto outros autores não verificaram diferença significativa na prevalência de insuficiência lútea e endometriose (MATORRAS et .al., 1995). A alteração na secreção de estradiol e progesterona pode ser alguma das alterações hormonais de pacientes com endometriose mínima (TUMMON et al., 1988; BARRY-KINSELLA et

al., 1993).

Autores relacionam aspectos hormonais das pacientes com endometriose a segunda fase de seu ciclo, que foi menor em relação ao grupo controle e a secreção de progesterona ocorreu apenas dois dias após a secreção máxima de LH. Quando da realização da biópsia de endométrio, nestas pacientes, cerca de 25% das pacientes com endometriose apresentaram endométrio fora de fase e em apenas 21% a identificação característica de ovulação foi feita por ocasião da laparoscopia, contra 94% do grupo controle. Os autores concluíram que as pacientes com endometriose apresentam alterações da secreção de progesterona com provável anormalidade ovulatória. Contudo, as medidas séricas de progesterona total, estradiol e LH não foram diferentes entre os grupos (BROSENS, KONINCKX, 1994).

A presença da associação entre endometriose, hiperprolactinemia e insuficiência lútea foi descrita como possível causa de infertilidade no grupo de paciente sem dano tubário, por uma disfunção ovulatória (CUNHA-FILHO et al., 2001). Estes estudos apontam que pacientes com endometriose mínima e leve apresentam alterações na fase folicular precoce caracterizada pela diminuição dos níveis séricos de estradiol bem como pela prevalência de hiperprolactinemia e insuficiência lútea. Além disso, estas pacientes têm uma alteração na secreção de prolactina após estímulo com hormônio tireotrófico (TRH), com deficiência da fase lútea (CUNHA-FILHO et al., 2001, 2002, 2003).

Endometriose e reprodução assistida

Pacientes com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida apresentam diferente resposta ao tratamento dependendo da severidade da endometriose (DOKRAS et al.,1999).

Em ciclos estimulados, avaliando-se pacientes com endometriose, concentração sérica de esteróides e qualidade do embrião, a taxa de implantação embrionária foi menor neste grupo de pacientes com diminuição da taxa de fertilização, levantando a controvérsia das possíveis causas desta redução, a qualidade do embrião ou o seu ambiente. Analisando o embrião de pacientes submetidas à fertilização in vitro com e sem endometriose, ocorreu uma diferença significativa no número de blastômeros, que foi menor nas pacientes com endometriose quando comparadas aos seus controles, o que pode sugerir alterações oocitárias, resultando em embriões com menor habilidade de divisão celular (PELLICER et al., 1998).

Recentemente, em meta-análise demonstrou-se que pacientes com endometriose têm uma diminuição de 20% na chance de gravidez após fertilização in vitro se comparadas ao grupo de mulheres sem esta patologia. Em análise multivariada foi demonstrada uma diminuição nas taxas de fertilização, implantação e diminuição de oócitos. E, ainda, descrevem que as pacientes com endometriose severa tem chance menor de gestar que as com endometriose mínima. As pacientes com endometriose e infertilidade tem uma resposta pior às técnicas de reprodução assistida. Os autores concluem que esta diminuição é em decorrência de alterações oocitárias e do desenvolvimento embrionário (BARNHART, 2002).

Endometriose e ambiente folicular

Em estudo avaliando a qualidade do ambiente folicular e o desenvolvimento embrionário em pacientes com endometriose, foi observado que alterações no fluido folicular destas pacientes estão associadas à infertilidade deste grupo, estes autores também evidenciaram alterações oocitárias e embrionárias com conseqüente diminuição na capacidade de implantação (GARRIDO et al, 2000). A concentração folicular de estradiol estaria associada a marcador da qualidade oocitária em pacientes com endometriose (WUNDER et al., 2005).

As diferenças encontradas nos níveis de proteína carreadora de IGF (IGFBP-1) no fluido folicular de pacientes inférteis com endometriose moderada e severa (LEMOS, 2002; CUNHA-FILHO et al., 2003) reforçam a idéia da associação destes marcadores a função reprodutiva (JONES & CLEMMOS,1995; GIUDICE et al.1990; KAWANO et al., 1997; ADASHI,1995; YOSHIMURA,1998). As pacientes com endometriose moderada e severa apresentaram níveis de IGFBP-1 menor quando comparadas aos demais grupos, podendo esta diminuição estar associada a função parácrina destes marcadores neste grupo de pacientes.

Na literatura, estudos relatam o papel do sistema fatores de crescimento-proteínas carreadoras (IGF-IGFBP) na fisiologia ovariana (CUNHA-FILHO et al., 2005), os IGF-1 estimulam a maturaridade de folículos/oócitos in vitro e as IGFBP-1 inibem a indução da ovulação e maturação de oócitos por neutralizarem os IGF-1 (ADASHI,1995; YOSHIMURA,1998).

Os níveis de IGF-1 no líquido peritoneal são maiores em pacientes com

endometriose e a proporção de IGFBP-2 e 3 menor (KIM et al.,2000). Os níveis séricos de IGF-1 são superiores aos de pacientes submetidas à esterilização tubária (GURGAN et al.,1999), estes achados podem ser associados ao desenvolvimento de endométrio ectópico e infertilidade em pacientes com endometriose.

As IGFBPs são descritas como moduladoras do efeito dos IGFs na ação ovariana. A expressão de IGFBPs ocorre através do hormônio folículo estimulante (FSH) e dos IGFs. As IGFBPs são descritas como moduladoras do efeito dos IGFs na ação ovariana (YEN et al.,1999). Analisando o fator de diferenciação de crescimento-9 (GDF-9), proteína óssea morfogenética-15 (BMP-15), IGFBP-4 e proteína plasmática associada à gestação-A (PAPP-A), os autores encontraram que a expressão das concentrações de GDF-9 e da BMP-15 estão envolvidas na função ovariana e são obrigatórios para a foliculogênese humana. A PAPP-A é um marcador do folículo dominante e produto do corpo lúteo, com atividade reguladora de FSH na foliculogênese e na luteogênese (ERICKSON et al., 2001).

Em estudo avaliando a concentração de hormônios esteróides (Estradiol e Progesterona), PAPP-A, IGFBP-4 e leptina no fluido folicular de pacientes inférteis com e sem endometriose, a concentração de estradiol foi significativamente maior no grupo de pacientes sem endometriose, os demais marcadores não apresentaram diferenças entre os grupos (WUNDER et al, 2005). Os níveis de PAPP-A foram significativamente maiores em pacientes com endometriose quando avaliadas concentrações no fluido peritoneal, e o grau de elevação, foi associado à extensão da doença (ARICI et al, 2003).

Reserva ovariana

A avaliação da reserva ovariana, com o objetivo de determinar o prognóstico reprodutivo, tem como parâmetros a coorte folicular (folículos antrais) e concentração sérica hormonal (VELDE *et. al.*, 1998, VISSER *et al.*, 2006).

A dinâmica folicular e o desenvolvimento oocitário têm sido exaustivamente estudados, GOUGEON em 1986 propôs uma classificação do complexo folicular que engloba as células da granulosa e o diâmetro folicular médio, dividindo os folículos em oito classes, dando uma idéia da dinâmica do desenvolvimento oocitário e do processo de atresia.

Para compreensão do processo de *recrutamento* (que ocorre durante a fase lútea final), *seleção* (folicular inicial), *dominância* (folicular média) e *maturação oocitária* (folicular tardia) é fundamental o entendimento da secreção das gonadotrofinas, esteróides e peptídeos ovarianos (GOUGEON, 1986).

As inibinas, peptídeos produzidos e secretados pelas células da granulosa do ovário, são proteínas heterodiméricas com sub-unidades α ligada a sub-unidades β_a ou β_b , caracterizando a inibina A ou B, respectivamente. Estas proteínas têm como principal característica a inibição da secreção do FSH e são secretadas de forma contínua e regular durante o ciclo menstrual. Na primeira fase do ciclo, a inibina B é secretada de pelo folículo dominante com objetivo de inibir o FSH, facilitando a atresia dos demais folículos (GROOME, 1996, LAVEN & FAUSER, 2004).

No início da fase folicular, as células da granulosa irão produzir estradiol e inibina B e alguns fatores de crescimento, como o IGF-1 e o IGF-2. Quando um folículo adquirir aproximadamente 7-10 mm, este será mais sensível ao estímulo de FSH e inibirá o crescimento dos demais, teremos então a dominância folicular. Tal fenômeno ocorre, aproximadamente, no meio da fase folicular, o folículo amadurecerá as custas do FSH e de fatores parácrinos e autócrinos, até a sua maturação final que ocorre após o pico de LH pela ação do estradiol (FAUSER & HEUSDEN, 1997, YEN, 1999).

No processo reprodutivo, vários fatores e seqüências fisiológicas são fundamentais para seu êxito: hipotálamo, com adequada liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH); a hipófise, liberando FSH e LH e o ovário que, além de responder aos estímulos externos, deve secretar, de forma correta e coordenada, não somente os hormônios esteróides (estrógeno e progesterona), mas, também, fatores locais de auto-regulação (IGFs e prostaglandinas) e de regulação central (inibinas e ativinas) (GROOME, 1996, YEN, 1999).

O hormônio antimulleriano (HAM) é um fator de crescimento, que no ovário se expressa através dos folículos primordiais inibidos pela resposta ao FSH, nas células da granulosa (VISSER et al, 2006). A concentração de HAM em folículos pré-antrais e precoces (MULDERS et al., 2004), (ELDAR-GEVA et al., 2005, FANCHIN et al., 2005, VISSER & THEMME, 2005) e a inibina B podem servir como marcadores da reserva ovariana e estão associados com o número de folículos selecionáveis (VISSER et al, 2006, LAVEN & FAUSER, 2004). Recentemente, foi descrita a sensibilidade da concentração de HAM durante a fase folicular precoce, refletindo o número de folículos precoces (FANCHIN et al., 2003). Estudos relacionando a

concentração de HAM e reserva ovariana de pacientes pré e pós-menopáusicas, relatam uma diminuição deste hormônio com a idade, estando correlacionado ao número de folículos pré-antrais e idade das pacientes e, menos a concentração de FSH (FANCHIN et al.,2005). Quando avaliada a concentração do HAM, produzida pelo ovário, durante ciclo menstrual normal, este apresenta um potencial no papel da regulação parácrina da ovulação (COOK et al., 2000).

Em estudo comparando inibina B com marcadores convencionais da reserva ovariana em reprodução assistida, os autores concluem que a inibina B apresenta alta sensibilidade e especificidade como marcador da reserva ovariana (FICICIOGLU et al., 2003).

Outro autores consideram o HAM como melhor marcador de reserva ovariana que o FSH (TREMELLEN et al., 2005). A concentração de HAM é aumentada em pacientes em idade fértil e diminuída em ciclos anovulatórios (MULDERS et al., 2004). Conseqüentemente, aquelas mulheres com alterações hormonais envolvendo estes peptídeos terão um prognóstico reprodutivo comprometido. Estudo avaliando a resposta a técnicas reprodutivas a marcadores de reserva ovariana, os autores acreditam que o HAM é bom marcador da resposta à técnica (MUTTUKRISHNA et al., 2005).

Coorte Folicular

O conhecimento da dinâmica do crescimento e atresia folicular e dos fatores de regulação do ciclo menstrual da mulher são necessários para aplicação de protocolos de indução da ovulação (FAUSER & HEUSDEN, 1997).

Os oócitos são detectados na vida fetal ocorrendo depleção durante o desenvolvimento. Ao nascer, estão presentes na mulher um milhão de folículos primordiais, na menacme, aproximadamente, meio milhão, que constituem a reserva ovariana e iniciam processo de diminuição a partir dos trinta e cinco anos de idade. Os ciclos espontâneos ou medicados tem além das gonadotrofinas (LH e FSH) vários fatores produzidos no folículo e dependentes do oócito que irão regular o crescimento e a atresia folicular (FAUSER & HEUSDEN, 1997).

Os folículos primordiais são continuamente estimulados, mas a maioria após leve crescimento, aproximadamente 1 mm, sofre atresia. Os folículos antrais (classe 2 de Gougeon) com 2 a 4 mm podem ser visualizados pelo exame de ultra-sonografia, representam os folículos selecionáveis, sendo, ainda neste momento, FSH independente (FAUSER & HEUSDEN, 1997).

Vários autores sugerem que a contagem dos folículos selecionáveis pela ecografia no início da fase folicular possa servir como teste de reserva ovariana independente de outros parâmetros; principalmente em ciclos induzidos para reprodução assistida. Em recente meta-análise, avaliando o número de folículos selecionáveis e a dosagem sérica de FSH, em pacientes submetidas a FIV como avaliação de reserva ovariana foi concluído que a coorte folicular é essencial na

avaliação da resposta ovariana a FIV, devendo ser considerada como parâmetro inicial da reserva ovariana (HENDRIKS et al., 2005).

No seguimento do ciclo menstrual, em consequência da elevação do FSH, enquanto a concentração de estrogênio é baixa, ocorre o recrutamento folicular; quando um grupo de folículos inicia crescimento, destes apenas um sofre maturação e rotura. O crescimento folicular é um processo longo, o folículo ovulatório é originário da diferenciação da coorte folicular, cujo crescimento é dependente de vários fatores (GOUGEON, 1986, FAUSER & HEUSDEN, 1997).

A concentração de HAM está envolvida na foliculogênese e por sua expressão ocorrer através dos folículos pré-antrais se destaca quando comparado a outros marcadores da reserva ovariana, sendo um promissor marcador (FANCHIN et al.,2003). Em estudo correlacionando as concentrações séricas de HAM, inibina B , estradiol, FSH e LH no terceiro dia do ciclo menstrual e número de folículos pré-antrais, acompanhando o diâmetro folicular por ultra-sonografia (2 a 10mm), os níveis séricos de HAM foram mais fortemente relacionados com contagem folicular, sugerindo este hormônio como potencial marcador da reserva ovariana (FANCHIN et al.,2003).

A avaliação do crescimento folicular e níveis hormonais no terceiro dia do ciclo menstrual são utilizados para medir o “status” ovariano. Em estudo comparando o número de folículos pré-antrais ao ultra-som e níveis séricos de estradiol, inibina B e FSH em pacientes inférteis que receberam 17-beta-estradiol do vigésimo dia do ciclo anterior até o primeiro dia do ciclo em análise e seus controles, nos três dias após o

uso do hormônio e no terceiro dia das pacientes do grupo controle, foi observada correlação hormonal-folicular na terceira medida e no terceiro dia, sendo a correlação mais evidente entre FSH, inibina B e contagem folicular mensurados na terceira medida das pacientes em estudo (FANCHIN et al., 2003).

As alterações de regulação hormonal são evidentes em pacientes inférteis com endometriose, assim como as alterações de fertilização e qualidade oocitária. Alterações da ovulação decorrentes da reserva ovariana e do desenvolvimento folicular podem ser responsáveis pelo prognóstico da função reprodutiva de pacientes com endometriose. A literatura, até o presente momento, é deficitária em estudos analisando a reserva ovariana de pacientes inférteis com endometriose, propomos, então o presente estudo.

REFERÊNCIAS

ADASHI, E.Y. - Insulin-like growth factors as determinants of follicular fate. **J Soc Gynecol Invest**; 2:721–6, 1995.

AYERS, J.W.T.; BIRENBAUM, D.L.; MENON, K.M.J. - Luteal phase dysfunction in endometriosis: elevated progesterone levels in peripheral and ovarian veins during the follicular phase. **Fertil. Steril.**, **47 (6)**: 925-929, 1987.2.

BANCROFT, K.; WILLIAMS, C.A.V.; ELSTEIN, M. - Minimal/mild endometriosis and infertility. A review. **Brit. J. Obstet. Gynaecol.**, **96**:454-60, 1989.

BARNHART, K.; DUNSMOOR-SU, R.; COUTIFARIS, C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. **Fertil Steril.**, 77(6):1148-55, 2002.

BARACAT, E.C.; LIMA, G.R.- Ginecologia Endócrina. **Editora Atheneu**, 1995.

BARRY-KINSELLA, C. ; SHARMA, S.C.; COTTELL, E.; HARRISON, R.F. - Mid to late luteal phase steroids in minimal stage endometriosis and unexplained infertility. - **Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.**, **54**: 113-118, 1994.

BROSENS, I.A.; KONINCKX, P.R.; CORVELEYN, P.A. - A study of plasma progesterone, oestradiol-17B, prolactin and LH levels, and of the luteal phase appearance of the ovaries in patients with endometriosis and infertility. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **85**: 246-250, 1978.6.

CAHILL, D.J.; WARDLE, P.G.; MAILE, L.A.; HARLOW, C.R.; HULL, M.G.R. - Pituitary- ovarian dysfunction as a cause for endometriosis-associated and unexplained infertility. **Hum. Reprod.** **10**: 3142-3146, 1995.

CAHILL, D.J. & HULL, M.G.R. - Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. **Human Reproduction Update**, **6 (1)**: 56-66, 2000.15.

CANDIANI, G.B.; VERCELLINI, P.; FEDELE, L.; COLOMBO, CANDIANI, M. - Mild endometriosis and infertility: a critical review of epidemiologic data, diagnostic pitfalls, and classification limits. **Obstet. Gynecol. Surv.**, **46 (6)**: 374-382, 1991.

CHEESMAN, K.L.; BEM-NUN, I.; CHATTERTON, R.T.; COHEN, M.R. - Relationship of luteinizing hormone, pregnanediol-3-glucuronide, and estriol-16-glucuronide in urine of infertile women with endometriosis. **Fertil. Steril.**, **38 (5)**: 542-548, 1982.

CHEESMAN, K.L.; CHEESMAN, S.D.; CHATTERTON, R.T.; COHEN, M.R. - Alterations in progesterone metabolism and luteal function in infertile women with endometriosis. **Fertil. Steril.**, **40 (5)**: 590-595, 1983.

COOK, L.C.; SIOW, Y. TAYLOR, S.; FALLAT, M.E. – Serum müllerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. **Fertil. Steril.**, **73 (4)** 859-861, 2000.

CUNHA-FILHO, J.S.L.; GROSS, J.L.; LEMOS, N.A.; BRANDELLI, A.; CASTILLOS, M.; PASSOS, E.P. - Hyperprolactinemia and Luteal Insufficiency in Infertile Patient with Mild and Minimal Endometriosis. **Horm. Metab. Res.** **33**: 216-220, 2001.

CUNHA-FILHO, J.S.L.; GROSS, J.L.; LEMOS, N.A.; DIAS, E.C.; VETTORI, D.; SOUZA, A.C, et al. Prolactin and growth hormone secretion after thyrotrophic - releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis. **Human Reprod**; 17(4):960-5, 2002.

CUNHA-FILHO, J.S.L.; SOUZA, C.; ALBUQUERQUE, L.; GIUGLIANI,C.; FREITAS, F.; PASSOS, E.P. Physiopatological aspect of corpus luteum defect of infertile patient with endometriosis. **J Assist Reprod Genet.**, 2003a.

CUNHA-FILHO, J.S.; LEMOS, N.A.; FREITAS, F.M.; KIEFER, K.; FALLER,M.;PASSOS,E.P. Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1

and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis. **Hum Reprod.**,18(2):423-8, 2003b.

CUNHA-FILHO JS, LEMOS NA, FREITAS FM, FACIN AC, GEWHER-FILHO PE, PASSOS EP. Insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-1 and 3 in the follicular fluid of infertile patients submitted to in vitro fertilization. **J Assist Reprod Genet.** May;22(5):207-11-2005.

DOKRAS, A; OLIVE, DL. - Endometriosis and Assisted Reproductive Technologies. **Clin. Obstet Gynecol.**, 42(3): 687-93, 1999.

DMOWISKI et al., - The luteinized unrupture follicle syndrome and endometriosis. **Fertil. Steril.**; 33(1):30-4, 1980.

ELDAR-GEVA T, MARGALIOTH EJ, GAL M, BEN-CHETRIT A, ALGUR N, ZYLBER-HARAN E, BROOKS B, HUERTA M, SPITZ IM. Serum anti-Mullerian hormone levels during controlled ovarian hyperstimulation in women with polycystic ovaries with and without hyperandrogenism. **Hum Reprod.** Jul;20(7):1814-9. Epub Mar312005.

ERICKSON GF, SHIMASAKI S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertil Steril**;76:943-9 2001.

FANCHIN R, CUNHA-FILHO JS, SCHONAUER LM, RIGHINI C, DE ZIEGLER D, FRYDMAN R.- Luteal estradiol administration strengthens the relationship between day 3 follicle-stimulating hormone and inhibin B levels and ovarian follicular status. **Fertil Steril.** Mar; 79(3):585-9, 2003.

FANCHIN R, TAIEB J, LOZANO DH, DUCOT B, FRYDMAN R, BOUYER J. High reproducibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. **Hum Reprod.** Apr;20(4):923-7. Epub Jan 7, 2005.

FANCHIN R, LOZANO DH, 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.** Dec;20(3):747-751, 2005.

FANCHIN R, SCHONÄUR LM, RIGHINI C, FRYDMAN R, TAIEB J. – Serum anti-mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. **Hum Reprod.** 18(2):328-332, 2003.

FAUSER BC, VAN HEUSDEN AM.- Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. **Endocr Rev.** Feb;18(1):71-106,1997.

FICICIOGLU C, KUTLU T, DEMIRBASOGLU S, MULAYIM B.The role of inhibin B as a basal determinant of ovarian reserve **GynecolEndocrinol.**Aug; 17(4):287-93, 2003.

GARRIDO, N.; NAVARRO, J.; REMOHÍ, J.; SIMÓN, C.; PELLICER,A. - Follicular Hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. **Human Reproduction Update, 6 (1):** 67-74, 2000.

GIUDICE, L.C.; FARRELL, E.M.; PHAM, H.; ROSENFELD, R.G. - Identification of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 (IGFBP-3) and IGFBP-2 in Human Follicular Fluid. **J Clin Endocrinol Metab, 71 (5):** 1330-38, 1990.

GURGON, T.; BUCKULMEZ, O.; YARALI, H.; TANIR, M.; AKYLDIZ, S. - Serum and peritoneal fluid levels of IGF I and II and insulin-like growth binding protein-3 in endometriosis. **J Reprod Med;**44:450–4, 1999.

GOUGEON A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. **Hum Reprod ;**1(2):81-71986.

GROOME NP, ILLINGWORTH PJ, O'BRIEN M, PAI R, RODGER FE, MATHER JP, MCNEILLY AS. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab.** Apr; 81(4):1401-51996.

HENDRIKS DJ, MOL BW, BANCSI LF, TE VELDE ER, BROEKMANS FJ. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone levels **FertilSteril** Feb; 83(2):291-301, 2005.

INOUE, M.; YOSHIMUNE, K.; HONDA, I.; AWAJI, H.; AKIZAKU, F. - The impact of endometriosis on the reproductive outcome of infertile patients. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **167**:278-82, 1992.16. JANSEN, R.P.S. - Minimal endometriosis and reduced fecund ability: prospective evidence from an artificial insemination by donor program. **Fertil. Steril.**, **46 (1)**: 141-143, 1986.

JONES, J.I.; CLEMMONS, D.R. - Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions. **Endocrine Reviews**, **16 (1)**: 3-34, 1995.

KAWANO, Y.; NARAHARA,H.; MATSUI, N.; NASU, K.; MIYAMURA, K.; MIYAKAWA, I. - Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-I in Human Follicular Fluid: A Marker for oocyte Maturation. **Gynecol. Obstet. Invest.** , **44**: 145-48, 1997.

KIM JG, SUH CS, KIM SH, CHOI YM, MOON SY, LEE JY. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and IGFBP-3 protease activity in the peritoneal fluid of patients with and without endometriosis. **Fertil Steril**;73:996–1000, 2000.

KISTNER et al. - Management of endometriosis in infertile patients. **Fertil. Steril.**;26(12):1151-66, 1975.

KONINCKX, P.R.; IDE, P.; VANDENBROUCKE, W.; BROSENS, I.A. - News aspects of the pathophysiology of endometriosis and associated infertility. **J. Reprod. Med.**, **24 (6)**: 257-260, 1980.

KONINCKX, P.R. - Is mild endometriosis a disease? **Hum. Reprod.**, **9**:2202-11, 1994.

KUBOTA, T.; KAMADA, S.; OHARA, M.; TAGUCHI, M.; SAKAMOTO, S.; LEYENDECKER, G.; KUNZ, G.; NOE, M.; HERBERTZ, M.; MALL, G.;- Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. **Human Reprod. Up date**, **4 (5)**: 752-762, 1998.

LEMOES, N.A. - Avaliação de Igf-1 (Insulin-like Growth Factor-1), Igfbp-1 e Igfbp-3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 e 3), no fluido folicular de pacientes inférteis com endometriose - Dissertação de mestrado da UFRGS, 2002.

LAVEN JS, FAUSER BC. Inhibins and adult ovarian function **Mol Cell Endocrinol.** Oct 15;225(1-2):37-44 2004.

MATORRAS, R.; RODRÍGUEZ, F.; PÉREZ, C.; PIJOAN, J.L.; NEYRO, J.L.; RODRÍGUEZ-ESCUADERO, F.J. - Infertile woman with and without endometriosis: a case control study of luteal phase and other infertility conditions. **Acta Obst. Gynec. Scand.**, **75**: 826-831, 1996.

MIO, Y.; TODA, T.; HARADA, T.; TERAKAWA, N.- Luteinized unruptured follicle in the early stages of endometriosis as a cause of unexplained infertility. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **167**:271-3, 1992.

MULDERS AG, LAVEN JS, EIJKEMANS MJ, DE JONG FH, THEMME AP, FAUSER BC. Changes in anti-Müllerian hormone serum concentrations over time suggest delayed ovarian ageing in normogonadotrophic anovulatory infertility. **Hum Reprod.** 2004 Sep;19(9):2036-42. Epub 2004 Jun 24.

MUSE, K.N.; WILSON, E.A. - How does mild endometriosis cause infertility?. **Fertil. Steril.**, **38**: 145-152, 1982.

MUTTUKRISHNA S, SUHARJONO H, MCGARRIGLE H, SATHANANDAN M. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? **BJOG**. Nov;111(11):1248-53 2004.

NISOLLE, M. & DONNEZ, J.- Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertil. Steril.**, **68**:585-596, 1997.

OLIVE, D.L.; SCHWARTZ, L.B. - Endometriosis. **N. Engl. J. Med.** **328**:1759-1767, 1993.

OLIVE, D.L.; HANEY, A .F. - Endometriosis- Associated infertility: A critical review of therapeutic approaches. **Obstet. Gynecol. Surv.**, **41**:538-55, 1986.26.

PALMA DIAS, R.; BRUGNARA, L.; BRUGNARA, L.; CAVAGNOLI, G.; CÉSAR, C.P.; FRONZA, R.; GUGEL, F.; FREITAS, F.; RAMOS, J.G.; PASSOS, E.P.- Indicações e achados diagnósticos em laparoscopias ginecológicas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Rev. ATM** **95/1**, 1:11-16, 1995.

PELLICER, A.; ALBERT, C.; GARRIDO, N.; NAVARRO, J.; REMOHÍ, J.; SIMÓN, C. – The pathophysiology of endometriosis associated infertility: Follicular environment and embryo quality. **J. Reproduction and Fertility Supplement** **55**: 109-119, 1998.

PITTAWAY, D.E.; MAXSON, W.; DANIELL, J.; HERBERT, C.; WENTZ, A.C. - Luteal phase defects in infertility patients with endometriosis. **Fertil. Steril.**, **39**: 712-713, 1983.30.

RÖNNBERG, L.; KAUPPILA, A .; RAJANIEMI, H. - Luteinizing hormone receptor disorder in endometriosis. **Fertil. Steril.**, **42 (1)**: 64-68, 1984.

SALMASSI A, SCHMUTZLER AG, SCHAEFER S, KOCH K, HEDDERICH J, JONAT W, METTLER L. Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? **HumReprod.** Sep;20(9):2434-40, 2005.

SAMPSON, J.A. - Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into peritoneal cavity. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 14:422-35, 1927.

SHAW, R.W. - Endometriosis, current understanding and management. 2 ed. Glasgow, Blackwell Science Ltda., 1995. 302p.

SOULES, M.R.; MALINAK, L.R.; BURY, R.; POINDEXTER, A - Endometriosis and ovulation: A coexisting problem in the infertile female. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 125 (3): 412-417, 1976.

The American Fertility Society. **Revised American Fertility Society classification of endometriosis.** **Fertil. Steril.**, 43:351-2, 1985.

TREMELLEN KP, KOLO M, GILMORE A, LEKAMGE DN. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian reserve. **Hum Reprod.** Apr;20(4):923-7 Epub Jan 7 2005.

TUMMON, I.S.; MACLIN, V.M.; RADWANSKA, E.; BINOR, Z.; DMOWSKI, W.P. - Occult ovulatory dysfunction in women with minimal endometriosis or unexplained infertility. **Fertil. Steril.**, 50 (5): 716-720, 1988.

VISSER JA, DE JONG FH, LAVEN JS, THEMME AP. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. **Reproduction**, 131:1-9, 2006.

VISSER JA, THEMME AP. - Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis **AustNZJ Obstet Gynaecol**; Feb; 45(1):20-4, 2005.

YEN, S.S.C.; JAFFE, R.B.; BARBIERI, R.L. - Reproductive Endocrinology. 4th Edition. **W.B. SAUNDERS COMPANY**, 1999.

WUNDER DM, MUELLER MD, BIRKHAUSER MH, BERSINGER NA. Steroids and protein markers in the follicular fluid as indicators of oocyte quality in patients with and without endometriosis. **J Assist Reprod Genet.** 2005 Jun; 22(6):257-64.

YOSHIMURA, Y. - Insulin-like growth factors and ovarian physiology. **J Obstet Gynaecol Res**;24:305–23, 1998.

OBJETIVOS

Principal:

- AVALIAR A RESERVA OVARIANA DE MULHERES INFÉRTEIS COM ENDOMETRIOSE MÍNIMA E LEVE

Secundários:

- COMPARAR OS NÍVEIS SÉRICOS DE ESTRADIOL, FSH E FAM EM MULHERES INFÉRTEIS COM ENDOMETRIOSE MÍNIMA OU LEVE E OBSTRUÇÃO TUBÁRIA.

- COMPARAR A COORTE FOLICULAR (DIÂMETRO MÉDIO E DESVIO PADRÃO) EM MULHERES INFÉRTEIS COM ENDOMETRIOSE MÍNIMA OU LEVE E OBSTRUÇÃO TUBÁRIA.

- COMPARAR O NÚMERO DE FOLÍCULOS SELECIONÁVEIS EM MULHERES INFÉRTEIS COM ENDOMETRIOSE MÍNIMA OU LEVE E OBSTRUÇÃO TUBÁRIA.

ARTIGO: VERSÃO INGLÊS

Decreased anti-mullerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis

Nadiane Albuquerque Lemos¹; Fernando Monteiro Freitas¹; Elisangela Arbo¹,
Rossana Scalco², Eduardo Weiler¹; Virgínia Rosa¹; Eduardo Pandolfi Passos¹; João
Sabino L. Cunha-Filho¹.

¹ Obstetrics and Gynecology Department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

² Bioquímico Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Financial support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico (CNPq), Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de
Porto Alegre; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Correspondence:

Dra. Nadiane Albuquerque Lemos

End.: Ramiro Barcelos, 2350 sala 1124

CEP: 90035-003 Porto Alegre-RS-Brazil

Fone: 51.33168117

e-mail: nadianelemos@yahoo.com.br

ABSTRACT

Objective: To assess the ovarian reserve of infertile patients with endometriosis through hormonal dosages and follicular cohort.

Design: Cross-sectional prospective study.

Setting: Assisted Reproduction Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Patients: Thirty four patients submitted to Infertility investigation between March 2004 and December 2005.

Interventions: Patients were divided into two groups: group I, minimal/mild endometriosis (n=17) and group II, tubal obstruction (n=17). We collected all blood samples in cycle day-3 to measure serum estradiol, FSH and anti-mullerian hormone levels. In the same day all patients were submitted to transvaginal ultrasound to determine the ovarian follicular cohort.

Results: Age and BMI were not different between the groups. The groups were similar in terms of serum estradiol and FSH. However, infertile patients with endometriosis have a decreased serum anti-mullerian hormone (1.26 ± 0.7) compared to the control group (2.02 ± 0.72), $P=0.004$. The analysis of follicular cohort showed that the number of selectable follicles were similar, but the follicular diameter was different, $P=0.001$.

Conclusion: We clearly demonstrated, for the first time, that minimal/mild endometriosis is associated with a decrease in the follicular ovarian reserve as measured by anti-mullerian hormone. In addition, the follicular cohort of these patients is heterogeneous in comparison to the follicular cohort of infertile patients due to tubal cause. Our data is the first direct evidence showing an important role of endometriosis

in the follicular status and ovarian reserve which could explain the sub-fertility in this group of patient.

Keywords: FSH, estradiol, AMH, selectable follicles, endometriosis, infertility

INTRODUCTION

Endometriosis is a prevalent disease usually associated with sub-fertility (Kistner, 1975; Muse, 1982; Koninckx, 1994). Moreover, even using assisted reproductive techniques infertile patients with endometriosis have a poorer prognosis compared to tubal obstruction (Barnhart et al., 2002).

Patients with minimal and mild endometriosis are related to sub-fertility due to several mechanisms, including some hormonal/ovarian dysfunctions.

We demonstrate that patients with minimal/mild endometriosis presented altered prolactin secretion after thyrotrophic-releasing hormone administration, with a higher prevalence of defects in the luteal phase. In addition, we also demonstrate that endometriosis is associated with a decreased IGFBP-1 in follicular fluid (Cunha-Filho *et al.*, 2003, Cunha-Filho *et al.*, 2002, Cunha-Filho *et al.*, 2001).

To assess an ovarian reserve, classically, early follicular phase serum levels of FSH, inhibin B and estradiol have been measured. Inhibin B is predominantly produced by early healthy antral follicles during the luteo-follicular transition of the menstrual cycle (Laven and Fauser, 2004). Inhibin B is predominantly produced by early healthy antral follicles during the luteo-follicular transition of the menstrual cycle. High inhibin B concentrations during the early follicular phase are responsible for the decline in FSH serum levels closing the FSH window and assuring single dominant follicle selection in the human. Early follicular phase inhibin B levels decrease over time, reflecting the

recruitment of a diminished cohort of follicles with ovarian ageing. Hence, inhibin B is a predictor of poor response in IVF (Laven and Fauser, 2004).

In addition, the assessment of the number of antral follicles by ultrasonography may also predict the number of retrieved oocytes after controlled ovarian hyperstimulation (Velde *et al.*, 1998, Visser *et al.*, 2006). Early antral follicles were counted at ultrasound and may represent an alternative test of ovarian follicular status (Fanchin, 2003). A recent meta-analysis concluded antral follicle count might be considered the test of first choice in the assessment of ovarian reserve prior to IVF (Hendriks, 2005).

AMH is produced by small early antral follicles and is strongly connected to ovarian reserve and reproductive outcomes. In vivo and in vitro studies showed that AMH has an inhibitory effect on primordial follicle recruitment and it decreases the sensitivity of follicles for the FSH-dependent selection for dominance. Besides its functional role in the ovary, AMH serum level serves as an excellent candidate marker of ovarian reserve (Eldar-Geva *et al.*, 2005, Fanchin *et al.*, 2005, Visser and Themmen, 2005). Plasma AMH assessments are superior to FSH in identifying women with reduced ovarian reserve. AMH assessment should be considered as a useful adjunct to FSH/estradiol levels and antral follicle count when estimating ovarian reserve (Tremellen *et al.*, 2005) and AMH has been shown to be a useful marker for ovarian ageing (Mulders *et al.*, 2004). AMH is the best single marker of ovarian response to gonadotrophin stimulation (Muttukrishna *et al.*, 2004).

Others authors concluded that serum AMH measurements on cycle day 3 is a better predictor of the number of early antral follicles than conventional hormone measurements. Those investigators included future clinical applications of AMH measurements in evaluating the fertility potential of women and monitoring infertility treatments (Fanchin et al., 2005).

The aim of our study is to elucidate the effect of minimal/mild endometriosis in follicular cohort and ovarian reserve, measuring serum estradiol, FSH and AMH levels and the number of selectable follicles on cycle day-3.

MATERIALS AND METHODS

Design

We performed a cross-sectional prospective study.

Subjects

Patients were divided into two groups: group I (study group) patients with minimal or mild endometriosis (n=17); group II, patients with tubal obstruction (controls) (n=17).

All patients were undergoing routine exploration and laparoscopy for investigation of infertility; the procedure was always performed by the same investigator. Endometriosis staging was performed according to the classification of

The American Society for Reproductive Medicine (1985). All patients have regular menses, normal sperm analysis, TSH and PRL into normal range and BMI < 27 Kg/m².

The following exclusion criteria were established: 1) patients with previous endocrine disorders; 2) cases in which the cause for infertility was other than endometriosis (except for patients with tubal obstruction, in the control group).

Measurements

We collected all blood samples on cycle day-3 to measure serum estradiol, FSH and AMH. In the same day all patients were submitted to transvaginal ultrasound to determine the ovarian follicular cohort, measuring number and diameter of all selectable follicles. The plasma was centrifuged at 2500 rpm and frozen at -80 °C for posterior analysis. Patients were informed about the procedures and spontaneously signed an informed consent form. The research project was approved by the Ethics Committee and registered at the Graduate Research Group of the hospital.

Serum analysis was performed at the radioimmunoassay laboratory of Hospital de Clínicas the Porto Alegre, Brazil, with specific kits.

Serum FSH and estradiol levels were determined using electrochemiluminescence detection (Systems Elecsys®, Roche) and serum AMH were determined using an ultra sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ACTIVE®, DSL, Texas, USA). The respective coefficients of variability were: For AMH, functional sensitivity was 0.2 ng/ml and intra-assay and inter-assay CV were 4

and 8% respectively. For estradiol, functional sensitivity was 15 pg/ml and intra-assay and inter-assay CV were 5%. For FSH, functional sensitivity was 0.1 mIU/ml and intra-assay and inter-assay CV were 3 and 5% respectively.

Statistics

The two-tailed student t test was used to analyze continuous data, whereas chi-square or Fisher's exact test were used for categorical data. *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

The power calculation before this study protocol required the inclusion of 30 patients for a $P\beta=80\%$, considering mean follicular diameter as the primary endpoint.

RESULTS

Clinical characteristics from both groups were similar. The mean age for the study group were 29 ± 5 and 30.7 ± 3.6 for the control group, $P=0.227$. Moreover, body mass index (22.2 ± 2 and 22 ± 2.4 , $P=0.472$) were also similar between the groups.

Table I shows data related to the analysis of blood samples in cycle day-3 to measure serum estradiol and FSH. Moreover, the transvaginal ultrasound to determine the number and diameter of all selectable follicles are shown in Table II. The groups were similar in terms of serum estradiol (85,5 and 81 CI 95%) $P=0.09$ and FSH (5.2 ± 1.8 and 4.9 ± 1 IU/ml) $P=0.245$. In addition, the number of selectable follicles were similar (10 ± 4 and 10 ± 6) $P=0.210$, but the follicular diameter was different (5.7 ± 2.4 and 4.6 ± 1.5) $P=0.001$. Furthermore, using the Levene's test to compare its standard deviation, the groups were discrepant, showing a heterogeneous follicular cohort, ($P=0.001$).

Figure 1 shows that infertile patients with endometriosis have a decreased serum anti-mullerian hormone (1.26 ± 0.7 ng/ml) compared to the control group (2.02 ± 0.72 ng/ml), $P=0.004$.

DISCUSSION

All groups were comparables in terms of age, BMI, day-3 oestradiol and FSH. However, infertile patients with minimal and mild endometriosis have lower serum AMH levels on day-3. In addition, these patients have also the follicular cohort more heterogeneous and its follicular diameter are larger than infertile patients with tubal obstruction. Our research demonstrated that, instead of these hormonal abnormalities, the number of selectable follicles was not modified by the presence of endometriosis.

The difference found in serum anti-mullerian hormone (AMH) levels reinforce the idea that infertile patients with minimal/mild endometriosis have their ovarian reserve altered.

Minimal and mild endometriosis is related to sub-fertility due to several mechanisms, including some hormonal/ovarian dysfunctions. Those patients can present an altered LH and prolactin secretion, reduced ability of the pre-ovulatory follicle, an oocyte dysfunction, and an altered luteal function (Cahill and Hull, 2000; Cunha-Filho *et al.*, 2002). Other group of researchers showed that endometriosis could affect the reproductive outcome resulting in low quality embryos, with reduced implantation rates (Garrido *et al.*, 2000). The heterogeneous follicular cohort demonstrated in this study reinforces these hypotheses, that endometriosis could be linked to an altered ovarian milieu and, consequently, the follicular development.

Throughout life, follicles leave the primordial follicle pool to enter the growing pool. The majority of these growing follicles will be lost as a result of atresia, unless

they are rescued by FSH after puberty. Among the cohort of rescued follicles, only one follicle is selected to become the dominant follicle, which will ovulate under the influence of LH. To assess an individual's ovarian reserve, early follicular phase serum levels of FSH, inhibin B and estradiol have been measured, because a different factors relation of the pituitary-gonadal axis to their serum levels are not independent of each other. However, assessment of the number of antral follicles by ultrasonography, the antral follicle count, and best predicts the quantitative aspect of ovarian but requires an additional transvaginal ultrasound (Visser et al., 2006). Therefore, AMH may represent a more independent and reliable marker of early antral follicle activity than inhibin B and estradiol, and FSH on cycle day 3 (Fanchin, 2005). Plasma AMH assessments are superior to FSH in identifying women with reduced ovarian reserve (Mulders et al., 2004).

The study evaluated basal and dynamic hormonal markers FSH, inhibin B, estradiol and AMH during the follicular phase and luteal phase of the menstrual cycle and ultrasonic ovarian morphology as predictors of IVF outcome only AMH showed a significant difference between pregnant and non-pregnant women at both cycle phases (Eldar et al, 2005). Studied to compare the intercycle reproducibility of AMH measurements with that of other markers of ovarian follicular status is in keeping with its peculiar production by follicles at several developmental stages, suggest AMH a marker of ovarian fertility potential (Fanchin, 2005). AMH assessment should be considered as a useful adjunct to FSH/estradiol levels and antral follicle count when estimating ovarian reserve (Tremellen et al., 2005). In recent observation indicate AMH can be used as a marker for ovarian ageing (Rooij et al., 2002). AMH as a marker for

ovarian ageing and as a marker of ovarian hyperstimulation of FIV (Peñarrubia et al., 2005).

AMH is the best single marker of ovarian response to gonadotrophin stimulation (Muttukrishna et al., 2004). Inhibin B is predominantly produced by early healthy antral follicles during the luteo-follicular transition of the menstrual cycle (Laven and Fauser, 2004). High inhibin B concentrations during the early follicular phase are responsible for the decline in FSH serum levels closing the FSH window and assuring single dominant follicle selection in the human. Early follicular phase inhibin B levels decrease over time, reflecting the recruitment of a diminished cohort of follicles with ovarian ageing. Hence, inhibin B is a predictor of poor response in IVF (Laven and Fauser, 2004). In study compared serum AMH, inhibin B, estradiol and FSH measurements and early antral follicle on infertile women concluded of AMH is marker of ovarian fertility potential (Fanchin et al., 2005). Other author investigate this measurement for ovarian menopausal and concluded of AMH may be a novel marker for ovarian ageing (Vet et al., 2002)

AMH produced by growing pre-antral and early antral ovarian follicles (Mulders et al., 2004), is expressed in pre- and small-antral follicles (Eldar-Geva et al., 2005). A different produce to AMH from patients with endometriosis disease was associate with follicular cohort. A concentration of AMH levels were more robustly correlated with the number of early antral follicles than inhibin B, E₂, FSH and LH on cycle day 3. This suggests that AMH may reflect ovarian follicular status better than the usual hormone markers (Fanchin, 2003).

Serum AMH levels decline gradually during multiple follicular maturation, reflecting the reduction in the number of small antral follicles due to controlled ovarian

hyperstimulation. AMH is preferentially and constantly secreted by small antral follicles during controlled ovarian hyperstimulation support to the hypothesis that differentiation of granulosa cells during follicular growth is likely to alter their of expressing AMH (Fanchin, 2003). The of AMH serum level increase in polycystic ovary syndrome, AMH could be a good predictor of ovarian stimulation (PIGNY et al., 2006) . The present study demonstrated that patients with minimal/mild endometriosis presented the follicular cohort heterogeneous.

In conclusion, patients with minimal/mild endometriosis presented a decreased level of serum AMH. Moreover, the follicular cohort in those patients were heterogeneous compared to infertile patients with tubal obstruction, this finding may be associated with a poorer results in terms of controlled ovarian hyperstimulation. Our data is the first direct evidence showing an important role of endometriosis in the follicular status and ovarian reserve which could explain the sub-fertility in this group of patient.

Acknowledgments

We are grateful for the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), as well as for the editorial support provided by the Graduate Research Group at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

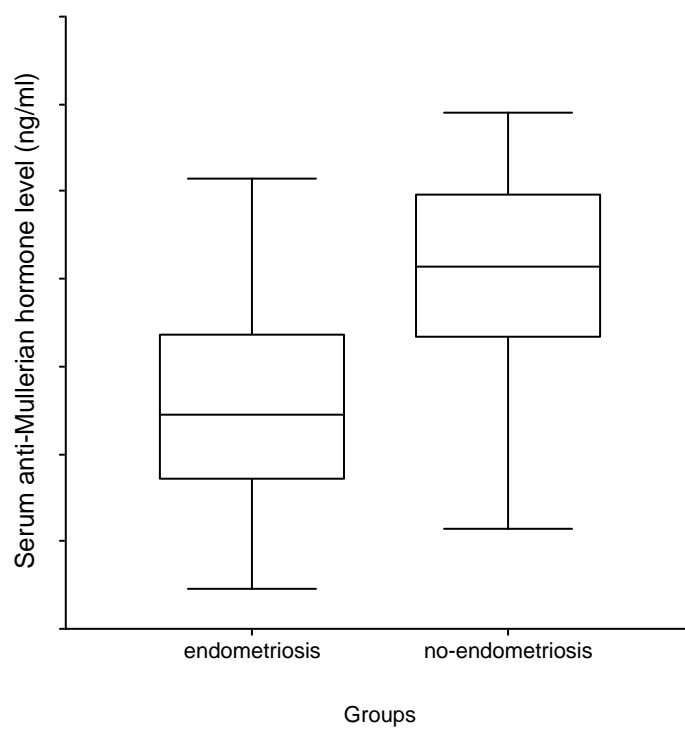
Table I. Serum levels of Estradiol (values are expressed as medians and 95% confidence intervals) and FSH (values are expressed as mean and std. deviation)

	Group I	Group II	Statistics
	(n=17)	(n=17)	P
Estradiol (pg/ml)	85.5 (73.3-137)	81 (65-137)	0.09
FSH (IU/ml)	5.23 ± 1.8	4.88 ± 1	0.245

Table II. Number of selectable follicles and follicular diameter: t-test (values are expressed as mean and std. deviation)

	<i>Group I</i> (n=17)	<i>Group II</i> (n=17)	Statistics <i>P</i>
Number of selectable follicles	10 ± 4	10 ± 6	0.210
Follicular diameter (mm)	5.7 ± 2.4	4.6 ± 1.5	0.001

Figure 1. Serum anti-Mullerian level (ng/ml) comparison between infertile patients with minimal/mild endometriosis and infertile patients with tubal obstruction (without endometriosis). The box represents the interquartile range which contains the 50% of values. The whiskers are lines that extend from the box to the highest and lowest values, excluding outliers. A line across the box indicates the median. ($P=0.004$)



REFERENCES

BARNHART, K.; DUNSMOOR-SU, R.; COUTIFARIS, C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. **Fertil Steril.**, 77(6):1148-55, 2002.

CAHILL, D.J. & HULL, M.G.R. - Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. **Human Reproduction Update**, 6 (1): 56-66, 2000.15.

CUNHA-FILHO, J.S.L.; GROSS, J.L.; LEMOS, N.A.; BRANDELLI, A.; CASTILLOS, M.; PASSOS, E.P. - Hyperprolactinemia and Luteal Insufficiency in Infertile Patient with Mild and Minimal Endometriosis. **Horm. Metab. Res.** 33: 216-220, 2001.

CUNHA-FILHO, J.S.L.; GROSS, J.L.; LEMOS, N.A.; DIAS, E.C.; VETTORI, D.; SOUZA, A.C. Prolactin and growth hormone secretion after thyrotrophic - releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis. **Human Reprod**; 17(4):960-5, 2002.

CUNHA-FILHO, J.S.L.; SOUZA, C.; ALBUQUERQUE, L.; GIUGLIANI,C.; FREITAS, F.; PASSOS, E.P. Physiopatological aspect of corpus luteum defect of infertile patient with endometriosis. **J Assist Reprod Genet.**, 2003a.

CUNHA-FILHO, J.S.; LEMOS, N.A.; FREITAS, F.M.; KIEFER, K.; FALLER,M.;PASSOS,E.P. Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis. **Hum Reprod.**,18(2):423-8, 2003b.

ELDAR-GEVA T, MARGALIOTH EJ, GAL M, BEN-CHETRIT A, ALGUR N, ZYLBER-HARAN E, BROOKS B, HUERTA M, SPITZ IM. Serum anti-Mullerian hormone levels during controlled ovarian hyper stimulation in women with polycystic

ovaries with and without hyperandrogenism. **Hum Reprod.** Jul;20(7):1814-9. Epub Mar312005.

ERICKSON GF, SHIMASAKI S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertil Steril**; 76:943 –9 2001.

FANCHIN R, CUNHA-FILHO JS, SCHONAUER LM, RIGHINI C, DE ZIEGLER D, FRYDMAN R.- Luteal estradiol administration strengthens the relationship between day 3 follicle-stimulating hormone and inhibin B levels and ovarian follicular status. **FertilSteril.**Mar; 79(3):585-9, 2003.

FANCHIN R, TAIEB J, LOZANO DH, DUCOT B, FRYDMAN R, BOUYER J. High reproducibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. **Hum Reprod.** Apr;20(4):923-7. Epub Jan 7, 2005.

FANCHIN R, LOZANO DH, 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.** Dec;20(3):747-751, 2005.

FANCHIN R, SCHONÄUR LM, RIGHINI C, FRYDMAN R, TAIEB J. – Serum anti-mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. **Hum Reprod.** 18(2):328-332, 2003.

FANCHIN R, SCHONÄUR LM, RIGHINI C, FRYDMAN R, TAIEB J. – Serum anti-mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. **Hum Reprod.** 18(2):323-327, 2003.

GARRIDO, N.; NAVARRO, J.; REMOHÍ, J.; SIMÓN, C.; PELLICER, A. - Follicular Hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. **Human Reproduction Update, 6 (1):** 67-74, 2000.

GOUGEON A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from

preliminary results. **Hum Reprod** ;1(2):81-71986.

GROOME NP, ILLINGWORTH PJ, O'BRIEN M, PAI R, RODGER FE, MATHER JP, MCNEILLY AS. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab.** Apr; 81(4):1401-51996.

HENDRIKS DJ, MOL BW, BANCSI LF, TE VELDE ER, BROEKMANS FJ. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone levels **FertilSteril** Feb; 83(2):291-301, 2005.

KISTNER et al. - Management of endometriosis in infertile patients. **Fertil. Steril.**;26(12):1151-66, 1975.

KONINCKX, P.R.; IDE, P.; VANDENBROUCKE, W.; BROSENS, I.A. - News aspects of the pathophysiology of endometriosis and associated infertility. **J. Reprod. Med.**, **24 (6)**: 257-260, 1980.

KONINCKX, P.R. - Is mild endometriosis a disease? **Hum. Reprod.**, **9**:2202-11, 1994.

LAVEN JS, FAUSER BC. Inhibins and adult ovarian function **Mol Cell Endocrinol.** Oct 15;225(1-2):37-44 2004.

MULDERS AG, LAVEN JS, EIJKEMANS MJ, DE JONG FH, THEMME AP, FAUSER BC. Changes in anti-Mullerian hormone serum concentrations over time suggest delayed ovarian ageing in normogonadotrophic anovulatory infertility. **Hum Reprod.** 2004 Sep;19(9):2036-42. Epub 2004 Jun 24.

MUSE, K.N.; WILSON, E.A. - How does mild endometriosis cause infertility?. **Fertil. Steril.**, **38**: 145-152, 1982.

MUSE, K.N.; WILSON, E.A.; JAWAD, M.J. - Prolactin hyperstimulation in response to thyrotrophic-releasing hormone in patients with endometriosis. **Fertil. Steril.**, **38**: 419-422, 1982.

MUTTUKRISHNA S, SUHARJONO H, MCGARRIGLE H, SATHANANDAN M. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? **BJOG**. Nov; 111(11):1248-53 2004.

PEÑARRUBIA J, FÁBREGUES F, MANAU D, CREUS M, GEMMA C, 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 gonadotropin hormone agonist – gonadotropin treatment. **Hum. Reprod.** 20(4) 915-922, 2005.

PIGNY P, MERLEN E, ROBERT Y, CORTET-RUDELLI, DECANter C, JONARD S, DEWAILLY D. – Elevated Serum Level of Anti-Mullerian Hormone in Patients with Polycystic Ovary Syndrome: Relationship to the Ovarian Follicle Excess and to the Follicular Arrest. **J Clin Endocrinol Metab.** 88(12):5957-5962, 2006.

ROOIJ IAJV, BROEKMANS FJM, VELDE EJM, VELDE ER, FAUSER BCJM, BANESI LFJM, JONG FH, THEMME – Serum anti-müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. **Hum. Reprod.** 17(12) 3065-3071, 2003.

TREMELLEN KP, KOLO M, GILMORE A, LEKAMGE DN. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian reserve. **Hum Reprod.** Apr; 20(4):923-7 Epub Jan 7 2005.

VELDE ER, SCHEFFER GJ, DORLAN M, BROEKMANS FJ, FAUSER BC. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Molec and Cell Endocrinology** 145 67-73, 1998a.

VELDE ER, DORLAN M, BROKMANS FJ. Age at menopause as a as marker of reproductive ageing. **Maturitas** 30 119-125, 1998b.

VET A, LAVEN JSE, JONG FH, THEMME APN, FAUSER BC. – Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. **Fertil. Steril.**, 77(2): 357-362, 2002.

VISSER JA, DE JONG FH, LAVEN JS, THEMME AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. **Reproduction**, 131-1-9, 2006.

VISSER JA, THEMME AP.-Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis **AustNZJObstetGynaecol**;Feb;45(1):20-4,2005.

WARDLE, P.G.; MITCHELL, J.D.; MCLAUGHLIN, E.A.; RAY, B.D.; MCDERMOTT, A.; HULL, M.G.R. - Endometriosis and ovulatory disorder: reduced fertilization in vitro compared with tubal and unexplained infertility. **Lancet**, ii 236-9, 1985.

ARTIGO: VERSÃO PORTUGUÊS:

Hormônio Anti-Muleriano e Reserva Ovariana em Pacientes Inférteis com Endometriose Mínima e Leve

Nadiane Albuquerque Lemos¹; Fernando Monteiro Freitas¹; Elisangela Arbo¹, Rossana Scalco², Eduardo Weiler¹; Virgínia Rosa¹; Eduardo Pandolfi Passos¹. João Sabino L. Cunha-Filho¹.

¹ Setor de Reprodução Assistida, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

² Unidade de bioquímica e imunoenaios, serviço de patologia clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Correspondencia:

Dra. Nadiane Albuquerque Lemos

End.: Ramiro Barcelos, 2350 sala 1124

CEP: 90035-003 Porto Alegre-RS-Brasil

Fone: 51.33168117

RESUMO

Objetivos: Avaliar a reserva ovariana de pacientes inférteis com endometriose mínima e leve através da concentração de Estradiol, FSH, HAM e coorte folicular.

Delineamento: Estudo Transversal

Local de Realização: Setor de Reprodução Assistida-Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Pacientes: Foram alocadas 34 pacientes inférteis com endometriose mínima e leve e de causa tubária.

Metodologia: As pacientes foram divididas em dois grupos, o grupo I formado por 17 pacientes inférteis com endometriose mínima e leve (grupo em estudo) e o grupo II por 17 pacientes inférteis de causa tubária (grupo controle). As pacientes realizaram coletas de plasma no terceiro dia do ciclo menstrual para avaliar a reserva ovariana e ultra-sonografia para avaliar o número de folículos selecionáveis e o diâmetro dos mesmos.

Resultados: A idade e o IMC entre os grupos não apresentou diferenças significativas. Da mesma forma, a concentração de Estradiol e FSH também foi similar entre os grupos. Entretanto as pacientes com endometriose apresentaram uma concentração diminuída de FAM ($1,26 \pm 0,7$) comparada ao grupo controle ($2,02 \pm 0,72$), $P=0,004$. O número de folículos selecionáveis foi semelhante entre os grupos, todavia o diâmetro folicular foi diferente entre os grupos $P=0,001$.

Conclusão: Neste estudo foi demonstrado que pacientes com endometriose mínima e leve tem uma diminuição da reserva ovariana quando medida a concentração de HAM. Além deste fator estas pacientes apresentam uma heterogeneidade folicular quando comparadas a pacientes com obstrução tubária.

Evidenciando, neste estudo, a associação do “status” folicular e a reserva ovariana com a sub-fertilidade das pacientes com endometriose.

Palavras chave: FSH, estradiol, HAM, folículos selecionáveis, endometriose e infertilidade

INTRODUÇÃO

A endometriose tem alta prevalência na população feminina e esta associada a sub-fertilidade destas pacientes (Kistner, 1975; Muse, 1982; Koninckx, 1994). Pacientes com endometriose quando submetidas a técnicas de reprodução assistida tem menos chance de gestação que as demais (Barnhart et al., 2002).

Para a etiologia da sub-fertilidade de pacientes com endometriose mínima ou leve são propostos vários mecanismos, incluindo alterações hormonais e ovarianas.

Alterações hormonais foram descritas por vários autores em diferentes estudos, tentando relacionar as alterações existentes e a incapacidade de gestar das pacientes com endometriose. A presença da associação entre endometriose, hiperprolactinemia e insuficiência lútea recentemente foi descrita como possível causa de infertilidade no grupo de paciente sem dano tubário, por uma disfunção ovulatória. As diferenças encontradas nos níveis de IGFBP-1 no fluido folicular de pacientes inférteis com endometriose moderada e severa (Cunha-Filho et al., 2001, Cunha-Filho et al., 2002, Cunha-Filho et al., 2003)

A avaliação da reserva ovariana tem como parâmetros a coorte folicular (folículos antrais) e concentração hormonal (Velde et. al., 1998, Visser et al., 2006).

Os níveis séricos de Estradiol, FSH e inibina B avaliam a reserva ovariana na fase folicular precoce e o controle por ultra-sonografia dos folículos antrais é o melhor fator preceptivo da reserva ovariana quantitativamente (Visser et al., 2006).

O hormônio antimulleriano (HAM) é um fator de crescimento, que no ovário se expressa através dos folículos primordiais inibidos pela resposta ao FSH, nas células da granulosa (Visser et al, 2006)O fator anti-muleriano (FAM) (Eldar-Geva et al., 2005, Fanchin et al., 2005, Visser e Themmen, 2005) pode servir como marcador da reserva ovariana e esta associado ao número de folículos selecionáveis. Autores consideram (Tremellen et al.,2005) o FAM como melhor marcador de reserva ovariana que o FSH. A concentração de FAM é aumentada em pacientes em idade fértil com ciclos anovulatórios (Mulders et al., 2004). Conseqüentemente, mulheres com alterações hormonais envolvendo estes peptídeos terão um prognóstico reprodutivo comprometido.

Para elucidar o comprometimento da coorte folicular e a reserva ovariana na endometriose mínima e leve, este estudo visa avaliar a concentração de Estradiol, FSH, HAM e dados de ultra-sonografia no terceiro dia do ciclo menstrual destas pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

População em estudo:

Foi realizado um estudo transversal onde foram alocadas 34 pacientes inférteis com endometriose mínima e leve e de causa tubária no período de março de 2004 a dezembro de 2005, do setor de reprodução assistida do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A amostra foi composta por pacientes com ciclo menstrual regular, espermograma normal, concentração de TSH e Prolactina normal e índice de massa corporal $IMC < 27 \text{ Kg/m}^2$. As pacientes foram divididas em dois grupos, o grupo I formado por 17 pacientes inférteis com endometriose mínima e leve (grupo em estudo) e o grupo II por 17 pacientes inférteis de causa tubária (grupo controle).

A endometriose foi diagnosticada segundo padrão-ouro, que consta da visualização de focos de endometriose pela laparoscopia e, a classificação adotada, da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva. A obstrução tubária, (obstrução tubária bilateral total) diagnosticada pela dosagem de Clamídia no soro, histerossanpingografia e laparoscopia diagnóstica. Todas as pacientes foram informadas dos procedimentos e assinaram termo de consentimento pós-informado de livre e espontânea vontade. O projeto de pesquisa foi previamente submetido à Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre **(02329)**.

Foram excluídas as pacientes com distúrbio endócrino prévio ou com outra causa para infertilidade que não endometriose, exceto obstrução tubária (grupo controle).

Protocolo de Pesquisa

Coleta de dados seguiu o protocolo de pesquisa padronizado, preenchido por pesquisadores previamente treinados. O mesmo protocolo já foi testado em estudos anteriores do Setor de Reprodução Humana do HCPA, sendo incluídos os fatores deste estudo. As pacientes foram submetidas à investigação de rotina para o casal infértil.

Ultra-sonografias

As pacientes foram submetidas a ultra-sonografias transvaginal no terceiro dia do ciclo menstrual, realizada por examinador cego para os grupos, as pacientes ficaram em posição ginecológica e utilizando um transdutor transvaginal de 7,5 MHz (Ecógrafo da marca Kratz, Áustria). Foram mensurados, através de ultra-sonografias o número de folículos selecionáveis e o diâmetro folicular.

Dosagem sérica

As pacientes realizaram coletas de plasma no terceiro dia do ciclo menstrual para avaliar a reserva ovariana. O plasma foi centrifugado a 2500 rpm e congelados a -80°C para posterior análise mediante respectivos kits, de *FSH*, estradiol e HAM. Testes de eletroquimioluminescência para Estradiol (pg/ml) e para FSH (UI/ml) da Roche® foram realizados e ELISA para HAM-DSL-10-14400 ACTIVE® ELISA MIS/AMH (DSL, Texas,USA). Coeficientes de variação, HAM 0,02 ng/ml (CV:4-8%), Estradiol, 15pg/ml (CV:5%) FSH, 0.1UI/ml (CV: 3-5%).

Análise Estatística

Foram verificada homocedasticidade da amostra e, realizado teste t de student para as variáveis contínuas e qui-quadrado ou Exato de Fisher par as variáveis categóricas. O programa estatístico SPSS 14.0 utilizado e a análise dos dados considerada estatisticamente significativa quando $P > 0,05$. Poder da amostra de 80%.

RESULTADOS

As características clínicas entre os grupos, casos e controles, idade (29 ± 5 e 30.7 ± 3.6), $P=0.227$ e IMC (22.2 ± 2 and 22 ± 2.4) $P=0.472$ foram similares.

A tabela I apresenta os dados das dosagens séricas no terceiro dia do ciclo menstrual, Estradiol e FSH e a tabela II os achados da ultra-sonografia. Os grupos são semelhantes para concentração de Estradiol ($85,5$ e 81 IC 95%) $P=0.09$ e FSH (5.2 ± 1.8 e 4.9 ± 1 UI/ml) $P=0.245$. Também o número de folículos selecionáveis foi similar entre os grupos (10 ± 4 e 10 ± 6), porém o diâmetro folicular foi diferente entre os grupos (5.7 ± 2.4 e 4.6 ± 1.5) $P=0.001$. Usando teste de Levene para comparação da discrepância entre os grupos, observa-se uma heterogeneidade da coorte folicular ($P=0.001$).

Pacientes com endometriose apresentam uma diminuição da concentração sérica de HAM ($1.26\pm 0.7\text{ng/ml}$) quando comparadas aos controles ($2.02\pm 0.72\text{ng/ml}$), $P=0.004$.

DISCUSSÃO

As características clínicas entre os grupos quanto a idade e IMC não apresentou diferenças significativas. A concentração sérica de Estradiol e FSH também foi semelhante nos grupos.

A análise da coorte folicular revelou que o número de folículos selecionáveis não foi diferente entre os grupos, todavia o diâmetro folicular diferiu, as pacientes com endometriose mínima e leve tem uma discrepância e heterogenicidade folicular quando comparadas as pacientes com dano tubário.

As diferenças encontradas na concentração sérica do HAM reforçam a idéia que pacientes com endometriose mínima/leve tem reserva ovariana alterada. Os resultados encontrados indicam que a dosagem do HAM pode ser marcador de reserva ovariana (Visser et al., 2006) neste grupo de pacientes.

Pacientes com endometriose mínima e leve tem associação com sub-infertilidade através de vários mecanismos, incluindo alterações hormonais e disfunção ovulatória. A associação com disfunção pituitária-ovariana sugere alteração na função folicular, com LH (hormônio luteinizante) e prolactina alterados, uma capacidade reduzida do folículo pré-ovulatório, com redução da habilidade de fertilização do oócito e distúrbio da função lútea (Cahill & Hull, 2000; Cunha-Filho et al, 2002). Modificações

em oócitos, resultam em embriões de baixa qualidade com redução na capacidade de implantação (Garrido et al. 2000). A apresentação heterogênea do diâmetro folicular das pacientes com endometriose deste estudo reforça a associação à qualidade dos folículos de pacientes com endometriose mínima e leve.

No início da fase folicular as células da granulosa irão produzir estradiol e inibina B e alguns fatores de crescimento, como o IGF-1 e o IGF-2. Quando um folículo adquirir aproximadamente 7-10 mm, este será mais sensível ao estímulo de FSH e inibirá o crescimento dos demais, teremos então a dominância folicular. Tal fenômeno ocorre, aproximadamente, no meio da fase folicular, o folículo amadurecerá as custas do FSH e de fatores parácrinos e autócrinos, até a sua maturação final que ocorre após o pico de LH (mediado pela alteração na pulsatilidade do GnRH hipotalâmico) pela ação do estradiol (Groome, 1996).

O HAM é produzido pelo folículos pré-antrais e precoces (Mulders et al.,2004), sua expressão ocorre pelos pré-antrais e pequenos (Eldar-Geva et al., 2005). A diferença encontrada na produção de HAM deste estudo pelas pacientes com endometriose deve estar associada à coorte folicular apresentada por estas pacientes. O hormônio antimulleriano (HAM) é um fator de crescimento, que no ovário se expressa através dos folículos primordiais inibidos pela resposta ao FSH, nas células da granulosa (Visser et al, 2006).

A concentração sérica de HAM em folículos pré-antrais e precoces (Mulders et al., 2004), (Eldar-Geva et al., 2005, Fanchin et al., 2005, Visser e Themmen, 2005) e a inibina B podem servir como marcadores da reserva ovariana e estão associados com

o número de folículos selecionáveis (Visser et al, 2006, Laven & Fauser, 2004).

Em estudo avaliando marcadores de reserva ovariana; FSH, inibina B, estradiol e HAM durante a fase lútea e folicular do ciclo menstrual e a morfologia ovariana por ultra-sonografia em ciclos de Fertilização in vitro, encontrou diferença apenas na concentração de HAM entre as pacientes que gestaram ou não em ambas fases do ciclo (Eldar et al, 2005). Estudos comparando HAM com outros marcadores da reserva ovariana, revelam que o HAM é potente marcador para fertilidade (Fanchin, 2005).

Este estudo demonstrou que endometriose mínima/leve esta associada com comprometimento da reserva ovariana medida pela concentração sérica de HAM. Também, que a coorte folicular das pacientes com endometriose foi heterogênia, com maior discrepância entre os folículos quando comparadas a pacientes com dano tubário. A diminuição da concentração de HAM associa-se as características foliculares, que influenciam na produção deste hormônio.

Concluindo, as pacientes com endometriose mínima e leve tem uma diminuição da reserva ovariana quando medida a concentração de HAM. Estas pacientes apresentam uma heterogeneidade folicular quando comparadas a pacientes com obstrução tubária. Evidenciando, neste estudo, a associação do “status” folicular e a reserva ovariana com a sub-fertilidade das pacientes com endometriose.

Agradecimentos:

Agradecemos o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); e Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), bem como ao suporte para editoração, proporcionado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

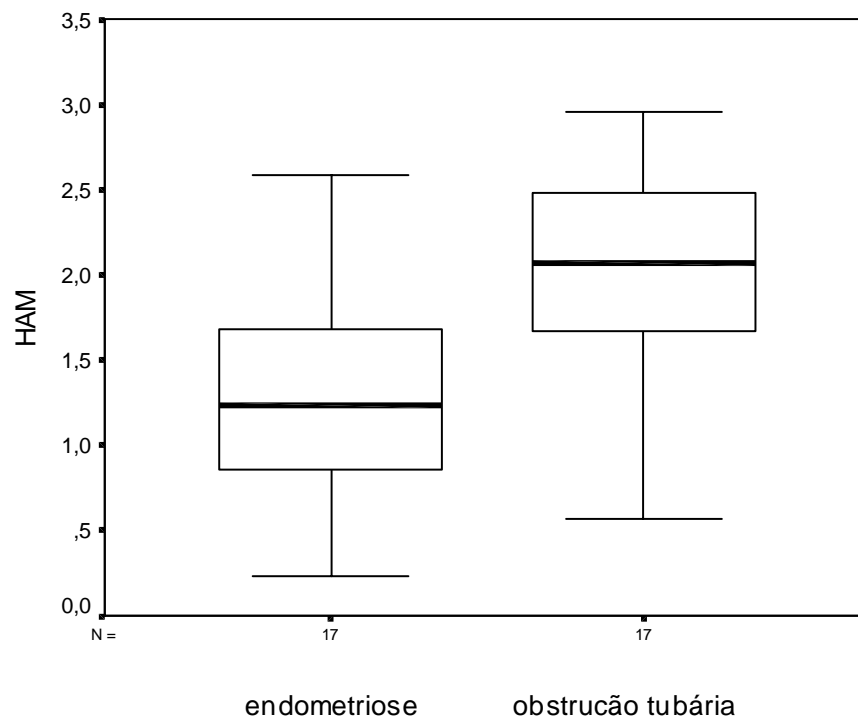
Tabela I. Estradiol (Valores expressos em mediana e IC 95%) e FSH (valores expressos em média e desvio padrão).

	Grupo I	Grupo II	Estatística
	(n=17)	(n=17)	P
Estradiol (pg/ml)	85.5 (73.3-137)	81 (65-137)	0.09
FSH (IU/ml)	5.23 ± 1.8	4.88 ± 1	0.245

Tabela II. Avaliação folicular: teste t (valores expressos em média e desvio padrão).

	Grupo I	Grupo II	Estatística
	(n=17)	(n=17)	P
Número de folículos selecionáveis	10 ± 4	10 ± 6	0.210
Diâmetro folicular (mm)	5.7 ± 2.4	4.6 ± 1.5	0.001

Figura 1. Comparação da concentração sérica de HAM (ng/ml) entre pacientes inférteis com endometriose mínima e leve e obstrução tubária. Onde estão representadas os valores em interquartil (50%), sendo a linha transversa indicativa da média ($P=0.004$).



REFERÊNCIAS

BARNHART, K.; DUNSMOOR-SU, R.; COUTIFARIS, C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. **Fertil Steril.**, 77(6):1148-55, 2002.

CAHILL, D.J. & HULL, M.G.R. - Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. **Human Reproduction Update**, 6 (1): 56-66, 2000.15.

CUNHA-FILHO, J.S.L.; GROSS, J.L.; LEMOS, N.A.; BRANDELLI, A.; CASTILLOS, M.; PASSOS, E.P. - Hyperprolactinemia and Luteal Insufficiency in Infertile Patient with Mild and Minimal Endometriosis. **Horm. Metab. Res.** 33: 216-220, 2001.

CUNHA-FILHO, J.S.L.; GROSS, J.L.; LEMOS, N.A.; DIAS, E.C.; VETTORI, D.; SOUZA, A.C, et al. Prolactin and growth hormone secretion after thyrotrophic - releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis. **Human Reprod**; 17(4):960-5, 2002.

CUNHA-FILHO, J.S.L.; SOUZA, C.; ALBUQUERQUE, L.; GIUGLIANI,C.; FREITAS, F.; PASSOS, E.P.Physiopatological aspect of corpus luteum defect of infertile patient with endometriosis. **J Assist Reprod Genet.**, 2003a.

CUNHA-FILHO, J.S.; LEMOS, N.A.; FREITAS, F.M.; KIEFER, K.; FALLER,M.;PASSOS,E.P.Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis. **Hum Reprod.**,18(2):423-8, 2003b.

ELDAR-GEVA T, MARGALIOTH EJ, GAL M, BEN-CHETRIT A, ALGUR N, ZYLBER-HARAN E, BROOKS B, HUERTA M, SPITZ IM. Serum anti-Mullerian hormone levels during controlled ovarian hyperstimulation in women with polycystic

ovaries with and without hyperandrogenism. **Hum Reprod.** Jul;20(7):1814-9. Epub Mar312005.

ERICKSON GF, SHIMASAKI S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertil Steril**;76:943 –9 2001.

FANCHIN R, TAIEB J, LOZANO DH, DUCOT B, FRYDMAN R, BOUYER J. High reproducibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. **Hum Reprod.** Apr;20(4):923-7. Epub Jan 7, 2005.

GARRIDO, N.; NAVARRO, J.; REMOHÍ, J.; SIMÓN, C.; PELLICER, A. - Follicular Hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. **Human Reproduction Update, 6 (1):** 67-74, 2000.

GROOME NP, ILLINGWORTH PJ, O'BRIEN M, PAI R, RODGER FE, MATHER JP, MCNEILLY AS. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab.** Apr; 81(4):1401-51996.

KISTNER et al. - Management of endometriosis in infertile patients. **Fertil. Steril.**;26(12):1151-66, 1975.

KONINCKX, P.R.; IDE, P.; VANDENBROUCKE, W.; BROSENS, I.A. - News aspects of the pathophysiology of endometriosis and associated infertility. **J. Reprod. Med., 24 (6):** 257-260, 1980.

KONINCKX, P.R. - Is mild endometriosis a disease? **Hum. Reprod., 9:**2202-11, 1994.

LAVEN JS, FAUSER BC. Inhibins and adult ovarian function **Mol Cell Endocrinol.** Oct 15;225(1-2):37-44 2004.

MULDERS AG, LAVEN JS, EIJKEMANS MJ, DE JONG FH, THEM MEN AP, FAUSER BC.Changes in anti-Mullerian hormone serum concentrations over time suggest delayed ovarian ageing in normogonadotrophic anovulatory infertility. **Hum Reprod.** 2004 Sep;19(9):2036-42. Epub 2004 Jun 24.

MUSE, K.N.; WILSON, E.A. - How does mild endometriosis cause infertility?. **Fertil. Steril., 38:** 145-152, 1982.

MUSE, K.N.; WILSON, E.A.; JAWAD, M.J. - Prolactin hyperstimulation in response to thyrotrophic-releasing hormone in patients with endometriosis. **Fertil. Steril., 38:** 419-422, 1982.

MUTTUKRISHNA S, SUHARJONO H, MCGARRIGLE H, SATHANANDAN M. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSIpatients?**BJOG.**Nov;111(11):1248-532004.

TREMELLEN KP, KOLO M, GILMORE A, LEKAMGE DN. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian reserve. **Hum Reprod.**Apr;20(4):923-7EpubJan72005.

VISSER JA, DE JONG FH, LAVEN JS, THEM MEN AP.Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. **Reproduction,** 131-1-9, 2006.

VISSER JA, THEM MEN AP.-Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis **AustNZJ ObstetGynaecol;**Feb;45(1):20-4,2005.

WARDLE, P.G.; MITCHELL, J.D.; MCLAUGHLIN, E.A.; RAY, B.D.; MCDERMOTT, A.; HULL, M.G.R.- Endometriosis and ovulatory disorder: reduced fertilization in viro compared with tubal and unexplained infertility. **Lancet, ii** 236-9, 1985.

CONCLUSÕES

- Pacientes inférteis com endometriose mínima e leve tem uma diminuição da reserva ovariana quando medida a concentração de HAM comparadas a pacientes com obstrução tubária.

- O diâmetro folicular médio das pacientes com endometriose mínima e leve é maior quando comparado as pacientes com obstrução tubária.

- A coorte folicular de pacientes com endometriose mínima e leve é heterogênea se comparada à coorte folicular de pacientes sem endometriose.

- O número de folículos selecionáveis de pacientes com endometriose mínima e leve não difere das pacientes com obstrução tubária.

- A reserva ovariana medida pelos níveis séricos de FSH e estradiol, no terceiro dia do ciclo menstrual não foi diferente entre pacientes com endometriose mínima e leve e sem endometriose.

PRESPECTIVAS

Nosso grupo segue a linha de pesquisa em Reprodução Humana – Endometriose, com as seguintes hipóteses a serem elucidadas:

- Fatores de crescimento do desenvolvimento folicular GDF-9 e BMP15. Desenvolver estudos que avaliam o envolvimento destes fatores na dinâmica folicular e associação ao prognóstico reprodutivo das pacientes.

- Estudo do pleiomorfismo de receptor de FSH. Estudos que possam avaliar a resposta ao FSH, fatores dependentes e ou associados à ação do FSH. Avaliação a resposta a técnicas de reprodução.

ANEXOS

PROTOCOLO DE PESQUISA

NOME:

REGISTRO:

IDADE:

PESO:

ALTURA:

IMC (KG/m²):

GRUPO:

CAUSA TUBÁRIA ()

ENDOMETRIOSE: I () II () III () IV ()

OUTRAS:

DOSAGENS:

FSH:

Estradiol:

HAM:

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Gostaríamos de convidá-la para participar do estudo "**Reserva ovariana em mulheres inférteis com endometriose**", tendo como objetivo principal a realização de um trabalho científico para a avaliação do efeito da endometriose na sua fertilidade.

A realização de laparoscopia faz parte de sua investigação de infertilidade de rotina a chance de ocorrer alguma complicação é de 3 para 1033 exames realizados (BATEMAN et al., 1996). A senhora receberá uma avaliação pré-operatória cuidadosa antes de submeter-se à laparoscopia sob anestesia geral.

A senhora realizará dosagens de sangue no terceiro dia do ciclo menstrual e realizará ecografia neste dia.

O risco da senhora é o risco de uma punção venosa, para coleta de sangue.

Eu, _____, fui informada dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvida, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disto, sei que novas informações, obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face de estas informações.

O profissional _____, certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Fui informada que caso existam danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

ASSINATURA DA PACIENTE:

ASSINATURA DO INVESTIGADOR:

NOME DOS PESQUISADORES: João Sabino Cunha Filho/Nadiane Lemos

TELEFONE PARA CONTATO E DÚVIDAS: 33168117/99330030