

RESERVA OVARIANA: MÉTODOS DIAGNÓSTICOS E SUAS LIMITAÇÕES

OVARIAN RESERVE: DIAGNOSTIC METHODS AND THEIR LIMITATIONS

ANA CAROLINA SANTOS RIBEIRO MENDES¹, ANA LUIZA LIMA BARCELOS¹, NATÁLIA CORRÊA DA SILVA¹, POLYANA FERNANDES RUGGIO¹, JOSÉ HELVÉCIO KALIL DE SOUZA^{2*}

1. Acadêmico(a) do curso de graduação do curso de medicina da Faculdade de Minas-BH; 2. Médico, Doutor em Reprodução Humana, Coordenador do Núcleo de Saúde da Mulher e Professor Titular de Ginecologia da Faculdade de Minas (FAMINAS-BH).

* Faculdade de Minas (FAMINAS-BH) – Avenida Cristiano Machado, 12001, Vila Clóris, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 31744-007. jhkali@gmail.com

Recebido em 27/07/2020. Aceito para publicação em 01/09/2020

RESUMO

A reserva ovariana se reduz com o avanço da idade até se esgotar na menopausa. Para avaliar a reserva ovariana são utilizados testes laboratoriais e de imagem. O Hormônio Anti-Mulleriano (AMH) é um marcador amplamente utilizado por se relacionar de forma direta com a foliculogênese. Entretanto, as limitações do AMH são sugestivas de fraca correlação com a densidade dos folículos primordiais e primários. A contagem de folículos antrais é um exame de propensão semelhante ao AMH e também demonstra o declínio da reserva com o aumento da idade. Podem ser utilizadas técnicas 2D-US e 3D-US que apresentam limitações relativas de acordo com a habilidade do avaliador. Assim, na tentativa de estabelecer um método com menor tendência ao erro, outros marcadores da reserva ovariana podem ser associados.

PALAVRAS-CHAVE: Reserva ovariana, hormônio antimulleriano, contagem de folículos antrais.

ABSTRACT

An ovarian reserve decreases with advancing age until it runs out at menopause. To assess an ovarian reserve, laboratory tests are used. Anti-Mullerian Hormone (AMH) is a marker that is widely used because it relates directly to folliculogenesis. However, the limitations of AMH are suggestive of a weak correlation with the density of primordial and primary follicles. Antral follicle count is a test of similar propensity to AMH and demonstrates the decline in reserve with increasing age. The 2D-US and 3D-US techniques is used, and have relative limitations according to the evaluator's ability. Thus, in an attempt to establish a method with less tendency to error, other markers of the ovarian reserve can be associated.

KEYWORDS: Ovarian reserve, anti-mullerian hormone, antral follicle count.

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da idade cronológica, a fecundidade feminina começa a se reduzir tanto em qualidade, quanto em número de óvulos¹. Avaliando quantitativamente, a reserva folicular pode variar entre

as mulheres da mesma idade cronológica, visto que a doação inicial de folículos primordiais e a taxa de perda folicular são altamente variáveis entre os indivíduos².

Idade dos pacientes e outros testes de reserva ovariana (TROs), como nível basal de FSH, inibina basal B, nível basal de estradiol, teste de desafio com citrato de clomifeno (ccct), teste de desafio com agonista de GnRh (GAST), folículos antrais ovarianos (AFC) e nível sérico de hormônio anti-Mulleriano (AMH) auxiliam na avaliação da função ovariana².

Para avaliar de forma satisfatória a reserva ovariana o teste deve ser reproduzível, com variabilidade limitada entre ciclos e intra-ciclos e altamente específico para minimizar o risco de erroneamente caracterizar as mulheres como portadoras de uma reserva ovariana reduzida¹.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo baseado no método de revisão de literatura, foi realizada uma revisão por meio da base científica PubMed no mês de março de 2020 utilizando-se os seguintes descritores “*Ovarian reserve*”, “*Anti-Mullerian Hormone*” e “*Antral follicle count*” e foram obtidos 176 artigos. Os critérios de inclusão foram artigos publicados nos últimos 5 anos, na língua inglesa e que apresentavam estudos de maior relevância, reduzindo a amostra para 25 artigos. Após análise dos abstracts desses trabalhos, 17 foram utilizados para essa revisão. Foi utilizada também a base científica Medline usando os mesmos descritores supracitados e critérios, resultando na seleção de 2 artigos para elaboração desse trabalho.

3. DESENVOLVIMENTO

O estoque de folículos primordiais inativos no ovário é chamado de reserva ovariana. Essa se reduz gradualmente durante a vida reprodutiva da mulher, finalizando em uma falência ovariana, ou seja, no período conhecido como menopausa³.

Para auxiliar no diagnóstico da reserva ovariana diminuída (DOR), tem-se os testes laboratoriais. Entretanto, a interpretação desses pode ser complicada

devido a outros termos clínicos distintos, porém relacionados com a DOR: insuficiência ovariana primária (POI), má resposta ovariana (POR) e reserva funcional ovariana (FOR)^{4,5}.

A POF é diagnosticada quando a mulher apresenta níveis pós menopáusicos de FSH (>40 UI/L), quatro ou mais meses de amenorreia secundária e idade inferior a 40 anos. Na literatura não é incomum ver essa definição semelhante à definição da insuficiência ovariana primária, que é um termo sugerido para disfunção relacionada ao envelhecimento muito precoce dos ovários⁴.

Quando a mulher tem baixa resposta a estimulação ovariana por fertilização *in vitro*, tem-se então a má resposta ovariana ou POR. Essa será diagnosticada quando duas das três características a seguir estiverem presentes: I) um POR anterior com histórico de ciclo cancelado ou quatro oócitos recuperados após estimulação com gonadotrofina II) idade materna igual ou superior a 40 anos ou presença de qualquer outro fator de risco para POR e III) AFC inferior que cinco a sete folículos ou AMH abaixo de 0,5-1,1 ng/ml^{4,5}.

A reserva ovariana funcional trata-se de uma medida biológica de reserva ovariana. Esse se difere da reserva ovariana diminuída em relação a baixa contagem de folículos antrais e ou medidas hormonais de baixa reserva ovariana. Dessa forma, conclui-se que a DOR é o termo utilizado quando a FOR estiver diminuída⁴.

O micro-RNA (miRNA) foi identificado recentemente como potentes reguladores da expressão gênica que atuam através da modificação pós-transcricional do RNA mensageiro (mRNA) para ajustar a produção de proteínas envolvidas nas vias de sinalização celular. O micro-RNA tem papéis críticos em muitos processos e doenças celulares, incluindo proliferação celular e apoptose. No campo da reprodução, há uma crescente literatura demonstrando que o miRNA regula vias biologicamente importantes do crescimento folicular e da saúde dos ovócitos. Numerosos estudos examinaram os papéis do miRNA na biologia ovariana, e o foco principal da maioria desses estudos foram as células da granulosa, com isso, pesquisas comparando perfis de expressão de miRNA em células da granulosa humana, células cumulus, fluido folicular e oócitos sob condições variadas, como idade ou doença, descobriram que os perfis de expressão do miRNA variam em associação com essas alterações de estado, como por exemplo, 37 miRNA foram encontrados sobre-regulados no fluido folicular antral humano (FF) em comparação com o soro. A expressão do micro-RNA foi perfilada no fluido folicular de mulheres com síndrome do ovário policístico (SOP), e o padrão de expressão do miRNA foi associado à regulação da esteroidogênese. Oócitos de mulheres com SOP podem ter competência de desenvolvimento reduzida e seus perfis de expressão de miRNA os diferenciam dos oócitos de pacientes que não são SOP. Os perfis de expressão de micro-RNA têm o potencial de permitir a determinação de ambas as

causas subjacentes da insuficiência ovariana, bem como orientar futuras opções de tratamento em potencial para melhorar a reprodução de mulheres que sofrem de infertilidade. Um desses grupos de mulheres são mulheres jovens com reserva ovariana diminuída (DOR) de causas desconhecidas. Oócitos de mulheres jovens com reserva ovariana normal (NOR), mas a causa dessa qualidade mais baixa de oócitos é desconhecida. Como a comunicação entre o cumulus (CC) e a célula granulosa (GC) com o oócito em desenvolvimento é crítica, e o CC/GC cria o ambiente folicular no qual o oócito amadurece as diferenças na expressão gênica no CC e no GC podem ser indicativas das causas da qualidade reduzida do oócito⁶.

4. DISCUSSÃO

Envelhecimento

Quantitativamente, a reserva ovariana diminuída é considerada reflexo do envelhecimento ovariano, preditor claramente associado ao aumento das taxas de aneuploidia e aborto fetal^{1,4}. O envelhecimento ovariano é uma característica multifatorial governada por vários fatores, incluído genética, estilo de vida, médico e idiopático. A baixa reserva ovariana é indicada por baixo número e baixa qualidade de oócitos e embriões, resultando em má implantação e altas taxas de aborto. A contagem de AFC e os níveis de hormônio anti-mulleriano parecem ser os preditores mais confiáveis do envelhecimento ovariano⁷. A raça africana demonstra grandes rendimentos de ovócitos do que os caucasianos e asiáticos, com isso, os padrões de envelhecimento serão diferentes podendo afetar os resultados do tratamento de infertilidade, sendo uma variação específica do gene FMR1⁷.

Número de oócitos colhidos, número de oócitos da metáfase II e qualidade do embrião podem ser avaliados pela idade. Esse marcador está intimamente ligado à distúrbios na coesão da cromátide irmã, favorecendo a separação prematura das cromátides e a não disjunção na meiose feminina¹.

A reserva ovariana diminuída trata-se da redução fisiológica de oócitos tanto em relação a quantidade, quanto de qualidade nas mulheres com o avançar da idade, em torno de 40 anos. Entretanto, algumas mulheres podem tornar-se prematuramente inférteis ao experimentar a DOR muito mais cedo do que o desejado⁴.

O envelhecimento ovariano é uma questão séria e deve ser considerado antes de encaminhar um paciente para a técnica de reprodução assistida (TARV), pois nenhum dos protocolos de estimulação ou intervenções de TARV demonstrou ser convincentemente benéfico para mulheres com ovários envelhecidos⁷.

Hormônio anti-mulleriano

A substância inibidora Mulleriana (MIS), também conhecida como hormônio anti-mulleriano atua no desenvolvimento das gônadas e na diferenciação da crista urogenital. Sendo, portanto, já reconhecido seu papel na reprodução e diferenciação sexual. Em

indivíduos com sexo gonádico masculino, o AMH é produzido pelos testículos, causando regressão do ducto de Muller. Já no feto com sexo feminino, pode desempenhar um papel na montagem folicular precoce na gônada por células germinativas^{3,8}.

De forma contrária à maioria dos contraceptivos femininos, que têm como alvo os folículos maduros e interferem no eixo hipotálamo-hipófise-gônada, a MIS atua de forma direta no primeiro passo da foliculogênese, ou seja, no recrutamento folicular primordial. Essa etapa é independente de gonadotrofinas ou esteroide³.

O AMH exerce sua função biológica quando se liga ao receptor AMHR2 nas células da granulosa e teca. Cerra, Christian, et al. (2016) realizaram um estudo observacional prospectivo que investigou se polimorfismos do gene AMH (AMH c. 146G> T, p. (Ile49Ser)) e receptor AMHR2 (AMHR2 -482> G) estariam associados com a reserva ovariana e não houve relação significativa⁹.

A relação inversa entre o nível de AMH, a gravidade da endometriose e a resposta ovariana à estimulação foram observadas em um estudo feito com mulheres inférteis sem endometriose. Portanto, podemos utilizar a avaliação de AMH como marcador preditivo da resposta ovariana à estimulação em pacientes com endometriose, além de determinar a melhor abordagem para o tratamento individual, aumentando as chances de fertilidade¹⁰.

A hipótese de que grupos sanguíneos (A, B, AB, O) estivessem associados com a reserva ovariana surgiu ao Matalliotakis *et al.* (2009) demonstrarem maior incidência de endometriose em pacientes do tipo sanguíneo A. Entretanto, de acordo com Awartani & Khalid *et al.* (2016), em uma análise retrospectiva de prontuários essa relação pode ser diferente de acordo com etnias dos grupos populacionais analisados e não há associação entre tipo sanguíneo e reserva ovariana¹¹.

Contagem de folículos antrais

Atualmente, a contagem de folículos antrais (AFC) é também um método muito utilizado na predição da fecundabilidade natural e com tendência semelhante ao AMH¹².

As medidas de folículos antrais têm declínio com o aumento de idade, em avaliação tanto de mulheres férteis quanto inférteis com menos de 40 anos¹². No entanto, pode existir discordância entre valores de AMH e AFC. Um motivo sugerido para tal é a fraca correlação do AMH com a densidade dos folículos primordiais e primários. Em consequência disso, em situações de discordância entre níveis de AMH e AFC, o segundo deve ser o indicador escolhido para estimar a resposta ovariana e desenvolver adequado protocolo de conduta¹³.

Há uma escassez de estudos em pacientes férteis avaliando a reserva ovariana e seu declínio com o tempo. Entretanto, um estudo prospectivo observacional, realizado por meio de ultrassonografia transvaginal entre os dias 3 e 5 do ciclo menstrual

analisou a AFC em 100 pacientes por um ano. O resultado encontrado foi o declínio linear da AFC com a idade, fomentando que a idade das mulheres desempenha um papel importante na sua fertilidade e está relacionada a diminuição da qualidade e quantidade dos ovócitos.¹⁰ Além disso, mulheres portadoras de hipertensão arterial e diabetes melitus tipo 2 apresentaram significativamente menos folículos que as demais mulheres do estudo¹⁴.

A contagem de folículos antrais ovarianos também pode ser realizada utilizando sonda de ultrassom (US) com frequência ≥ 7 MHz, com US bidimensional (2D) em tempo real, cine-loops 2D-US armazenados e conjuntos de dados tridimensionais (3D) US¹⁵.

O 2D-US em tempo real é vantajoso, pois permite manobras adicionais para determinar se uma estrutura não produtora de eco é um folículo. Entretanto, pode demandar maior tempo para ser realizado, resultando maior desconforto para a paciente. Os cine-loops 2D-US têm as vantagens de ser efetuado em menor tempo e a possibilidade de outros observadores realizarem a contagem¹⁵.

Já a técnica 3D-US demanda que tanto o operador, quanto as máquinas com capacidade 3D passem por treinamento adicional para aquisição/análise, permitindo a mesma vantagem que o loop cine e eficiência de diferentes técnicas de imagem¹⁵.

Outros métodos preditores

Devido a precisão prognóstica limitada dos testes até então utilizados, novo método que estabeleça a reserva ovariana real foi buscado. Na Itália, um estudo combinou parâmetros clínicos, bioquímicos e 3D-ultrassonográficos para quantificar a reserva ovariana¹⁶.

O método baseia-se em um modelo estatístico que combina as medidas de hormônio anti-Mulleriano (AMH), hormônio folículo-estimulante (FSH), estradiol (E2), a contagem 3D de folículos antrais, volume ovariano, índice vascular (VI) e índice de fluxo (FI) entre os dias 1 e 4 do ciclo menstrual em uma equação denominada OvAge¹⁶. Ainda que seja necessária uma validação clínica, os dados encontrados indicam alta precisão estatística de modelo e potencial utilidade prática na quantificação da reserva ovariana¹⁶.

Limitações dos preditores

Embora não tenhamos ainda nenhuma medida perfeita para avaliação da reserva folicular, o nível de AMH e a idade produziram melhores valores preditivos. Observa-se maior necessidade de estudos que demonstrem com precisão os níveis de corte para cada marcador, além de encontrar marcadores mais fortemente correlacionados com o número e a qualidade óvulos¹. Outro fator adverso é o aumento do índice de massa corporal (IMC) na fertilidade, estudos relataram que mulheres com sobrepeso e obesas apresentaram uma AFC baixa estatisticamente significativa em comparação com mulheres com peso normal⁷.

O AMH e o AFC apresentam limitações na real

avaliação de reserva ovariana de pacientes com reserva moderada e diminuída, apesar de serem testes confiáveis. Um exemplo é que pacientes com níveis séricos indetectáveis de AMH podem ter cerca de 100 a 1000 folículos no ovário². Quando comparado o AMH com os níveis de FSH, observa-se que o primeiro é um biomarcador mais confiável da reserva ovariana¹⁷.

A vitamina D, desempenha importante função na conservação da saúde óssea, também tem sido relacionada à saúde reprodutiva e ciclo menstrual. Em um estudo realizado com mulheres de 35 a 44 anos, obteve a 25-hidroxivitamina D total (25 (OH) D) total plasmática com maior declínio, o qual foi correlato ao aumento de FSH. Outro estudo desempenhado com mulheres que estava tentando engravidar não associou a 25 (OH) D a biomarcadores de reserva ovariana. Foram encontrados alguns indicativos de que baixo 25 (OH) D (<30ng/ml) era referente a baixo AMH, porém isso precisa ser comprovado em estudos com maior predominância de baixo 25 (OH) D¹⁸.

Um estudo com 796 centros de fertilidade apresentou que 51% desses centros consideram o AMH como a melhor estratégia para avaliação da reserva ovariana, ao passo que 40% já relataram que o AFC foi o melhor teste para essa avaliação. Nesse mesmo estudo, apenas 6% acreditam que o FSH basal seja a melhor alternativa para investigação de DOR⁴.

Outro estudo transversal retrospectivo foi executado no *Australian Concept Infertility Medical Center* de janeiro de 2017 a agosto de 2017. Aproximadamente 120 casais que apresentaram-se a clínicas de infertilidade designadas para fertilização *in vitro* e injeções intracitoplasmáticas de espermatozoides (ICSI) com mulheres (25-45) tiveram FSH, AMH e AFC efetuados. Com isso, concluiu-se que o AMH e AFC estão associados com o número de folículos recuperados e o número de óocitos restaurados, visto que o FSH e a idade não estão muito associados com o total de folículos recuperados e o total de óocitos restaurados¹⁹.

Portanto, não há indícios de que um método se sobressaia em relação ao outro. Nesse caso o operador deve optar pelo melhor método de acordo com os recursos disponíveis, suas predileções e competências¹⁵. Por não ser incomum encontrar resultados conflitantes entre os testes, torna-se habitual recorrer a uma variedade de testes para avaliar a reserva folicular⁴.

5. CONCLUSÃO

A avaliação da reserva ovariana é uma etapa importante para mulheres que recorrem à reprodução assistida. Assim, existe grande interesse em um método diagnóstico que seja o mais fidedigno possível.

No momento atual, os métodos que mais se aproximam da real reserva ovariana são o nível sérico de AMH e AFC. Esses indicadores, geralmente, apontam resultados semelhantes. Contudo, pode haver discrepâncias entre os testes e nesses casos o avaliador pode-se valer de outros marcadores e experiência

clínica. Desse modo, torna-se mais evidente a necessidade de métodos de maior precisão.

6. REFERÊNCIAS

- [1] Scheffer JAB, Scheffer B, Scheffer R, Florencio F, Grynberg M, Lozano DM. Are age and anti-Müllerian hormone good predictors of ovarian reserve and response in women undergoing IVF? *JBRA Assist Reprod.* 2018; 22(3):215–220. Published 2018 Sep 1. doi:10.5935/1518-0557.20180043
- [2] S. Takae et al., “Accuracy and safety verification of ovarian reserve assessment technique for ovarian tissue transplantation using optical coherence tomography in mice ovary,” *Sci. Rep.* 2017; 7:43550.
- [3] Kano M , Sosulski AE , Zhang L , Saatcioglu HD , Wang D , Nagykerly N , Sabatini ME , Gao G , Donahoe PK , Pépin D . AMH/MIS as a contraceptive that protects the ovarian reserve during chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017; 114(9):E1688–E1697.
- [4] Pastore LM, Christianson MS, Stelling J., Kearns WG, Segars JH. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR. *J Assist Reprod Genet.* 2018; 35 (1):17–23.
- [5] Devine, Kate *et al.* Diminished ovarian reserve in the United States assisted reproductive technology population: diagnostic trends among 181,536 cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System. *Reserva. Fertility and Sterility.* 2015; 104(3):612-619.
- [6] Woo I, Christenson LK, Gunewardena S, et al. Micro-RNAs involved in cellular proliferation have altered expression profiles in granulosa of young women with diminished ovarian reserve. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2018; 35(10):1777-1786. DOI: 10.1007 / s10815-018-1239-9.
- [7] Jehan S, Syed S. Association of ovarian reserve with age, BMI and serum FSH level in subfertile women. *J Pak Med Assoc.* 2016; 66(4):409-13. PMID: 27122266.
- [8] Goswami M, Nikolaou D. Is AMH Level, Independent of Age, a Predictor of Live Birth in IVF? *J Hum Reprod. Sci.* 2017; 10 (1):24-30.
- [9] Cerra, Christian, et al. AMH type II receptor and AMH gene polymorphisms are not associated with ovarian reserve, response, or outcomes in ovarian stimulation. *Journal of assisted reproduction and genetics.* 2016; 33(8):1085-1091.
- [10] L Safdarian, Ghalandarpoor Attar SN, Aleyasin A, Aghahosseini M, Sarfjoo FS, Hosseinimousa S. Investigation anti-Mullerian hormone (AMH) and ovarian response in infertile women with endometriosis in IVF cycles. *Int J Reprod Biomed (Yazd).* 2018; 16(11): 719-722.
- [11] Awartani, Khalid, et al. Association of blood groups with ovarian reserve and outcome of *in vitro* fertilization treatment. *Annals of Saudi medicine.* 2016; 36(2):116-120.
- [12] Khan, Haroon Latif et al. Antral follicle count (AFC) and serum anti-Müllerian hormone (AMH) are the predictors of natural fecundability have similar trends irrespective of fertility status and menstrual characteristics among fertile and infertile women below the age of 40 years. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2019; 17(1):24-30.
- [13] Zhang, Yangyang et al. Discordance between antral follicle counts and anti-Müllerian hormone levels in

- women undergoing in vitro fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2019; 17(1):51.
- [14] Koyama K, Koyama T, Sugimoto M.J Repeatability of antral follicle count according parity in dairy cows. *Reprod Dev*. 2018 Dec 14; 64(6):535-539. Epub 2018 Oct 9
- [15] Tang R, Lin L, Guo Z, Hou H, Yu Q. Ovarian reserve evaluation in a woman with 45, X/47, XXX mosaicism: A case report and a review of literature. *Mol Genet Genomic Med*. 2019; 7(7):e00732. Doi:10.1002/mgg3.732
- [16] Venturella, Roberta et al. Ov Age: a new methodology to quantify ovarian reserve combining clinical, biochemical and 3D-ultrasonographic parameters. *Journal of ovarian research*. 2015; 8(1):21.
- [17] Shahrokh Tehraninezhad E, Mehrabi F, Taati R, Kalantar V, Azimineko E, Tarafdari A. Analysis of ovarian reserve markers (AMH, FSH, AFC) in different age strata in IVF / ICSI patients. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2016; 14 (8): 501–506.
- [18] Jukic AMZ, Baird DD, Wilcox AJ, Weinberg CR, Steiner AZ. 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)D) and biomarkers of ovarian reserve. *Menopause*. 2018; 25(7):811-816. doi:10.1097/GME.0000000000001075
- [19] Siddiqui QUA, Anjum S, Zahra F, Yousuf SM. Ovarian reserve parameters and response to controlled ovarian stimulation in infertile patients. *Pak J Med Sci*. 2019; 35(4):958-962. doi:10.12669/pjms.35.4.753.