

Reproducibilidad intercíclica de la hormona anti-mülleriana y su correlación con folículos antrales, FSH y estradiol

Irma Ré, Idelma Serpa, Anabella Lima, Carla López, Sergio Gersevich, Fernanda All, Gustavo Botti, Carlos Morente

PROAR – Programa de Asistencia Reproductiva de Rosario. Rosario, Santa Fe, Argentina.

Reproducción 2009; 24:128-134

Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio fue comparar la reproducibilidad intercíclica de la hormona anti-mülleriana (HAM), recuento de folículos antrales (FA), hormona folículo estimulante (FSH) y estradiol (E2) en dos ciclos menstruales consecutivos y establecer la correlación existente entre estas variables en ambos ciclos. **Diseño:** Estudio prospectivo de cohorte. **Métodos:** Se estudiaron 30 mujeres de parejas infértiles que realizaron tratamientos de alta complejidad en PROAR (Programa de Asistencia Reproductiva de Rosario) entre julio de 2007 y enero de 2008. Se tomaron muestras de sangre en dos ciclos menstruales consecutivos para realizar las determinaciones séricas de HAM, FSH, E2 y se realizaron ecografías transvaginales para el recuento de folículos antrales (4-10mm) en fase folicular temprana (día 2-4). **Resultados:** La mayor reproducibilidad intercíclica se encontró para la HAM (CCI=0,90; $P < 0,0001$) y en menor proporción para FSH (CCI=0,64; $P < 0,0001$). La reproducibilidad para FA fue débil (CCI=0,32; $P = 0,04$) y no se halló correlación intercíclica para el E2. La HAM se correlacionó fuertemente y en forma positiva con el número de FA ($r = 0,77$; $P < 0,0001$ y $r = 0,79$; $P < 0,0001$, respectivamente para cada ciclo), mientras que se encontró una correlación moderada y negativa con la FSH ($-0,61$; $P = 0,002$ y $-0,58$; $P = 0,007$). No hubo correlación estadísticamente significativa entre HAM y E2 ($r = 0,07$; $P = 0,8$ y $r = -0,02$; $P = 0,9$). **Conclusión:** Se encontró una mejor reproducibilidad intercíclica en los valores de HAM en comparación con los marcadores habituales del status folicular. Esta evidencia respalda su rol como promisorio marcador de la reserva ovárica.

Correspondencia: Irma Ré
E-mail: reirma@hotmail.com

Palabras clave: Hormona Anti-Mülleriana, folículos antrales, variabilidad interciclica, reserva ovárica.

Anti-müllerian hormone intercycle reproducibility and its relationship with follicle-stimulating hormone, estradiol and early follicular counts

Summary

Objective: Our aim was to compare the intercycle reproducibility of serum anti-müllerian hormone (AMH) measurements with that of antral follicle counts (AF), FSH and Estradiol (E2), in two consecutive menstrual cycles and to compare the relationship between these markers or ovarian follicles status. **Methods:** A total of 30 infertile women were studied prospectively in PROAR (Programa de Asistencia Reproductiva de Rosario - Program of Reproductive Assistance) from July 2007 to January 2008. On early follicular phase of menstrual cycle (days 2 to 4) serum levels of AMH, E2 and FSH were measured and the number of early antral follicles (4-10mm in diameter) was estimated by intravaginal ultrasound scan. **Results:** Serum AMH showed significantly higher reproducibility (ICC=0.90, $P < 0.0001$) than FSH levels (ICC=0.64, $P < 0.0001$). Early follicular count showed a weak reproducibility (ICC=0.32, $P = 0.04$) and E2 levels did not show any correlation cycle by cycle. Serum AMH levels were positively and strongly correlated with AF count ($r = 0.77$, $P < 0.0001$ and $r = 0.79$, $P < 0.0001$ for each cycle respectively). The relationship between AMH and FSH levels was moderate and negative ($r = -0.61$, $P = 0.002$ and -0.58 , $P = 0.0007$). There was not any correlation between AMH measurement and E2 levels ($r = 0.07$, $P = 0.8$

and $r=-0.02$, $P=0.9$). **Conclusions:** Serum levels of AMH showed a superior consistency cycle to cycle compared with other markers of ovarian follicular status. This evidence supports its role as a promising marker of ovarian follicular status.

Key words: Antimüllerian hormone, antral follicles, intercycle variability, reproducibility, ovarian reserve.

Introducción

La hormona anti-mülleriana (HAM) es una glicoproteína perteneciente a la superfamilia del factor transformador del crecimiento β (*Transforming Growth Factor Beta* - TGF- β) (Cate y col, 1986; Pepinsky y col, 1998). El gen de la HAM se localiza en el brazo corto del cromosoma 19 (19p 13.3) (Al-Qantani y col, 2005). Se la ha identificado como factor de regresión de los conductos müllerianos durante el desarrollo fetal (Behringer y col, 1994) y de allí su denominación. En mujeres, la producción de esta hormona es detectable en forma variable al momento del nacimiento (Rajpert-De Meyts y col, 1999) y alcanza valores elevados en la pubertad (Hudson y col, 1990). Durante la vida adulta continúa su producción por parte de las células de la granulosa de los folículos ováricos tempranos (Vigier y col, 1984). Su rol en la fisiología femenina no está del todo comprendido aún. Estudios en roedores sugieren que la HAM reduce la actividad aromataza y el número de receptores de LH en las células de la granulosa, estimuladas previamente por la FSH (Josso y col, 1998) y favorece, además, la producción de testosterona en las células de la teca (Ingraham y col, 2000). La HAM participa en forma directa e indirecta en varias fases de la foliculogénesis, desde el folículo primordial al folículo antral temprano, (Durlinger y col, 2001 y 2002), probablemente a través de su receptor específico Tipo II, el cual se expresa en las células de la granulosa (Visser y col, 2006). Este patrón de expresión sugiere que la HAM jugaría un rol importante en el reclutamiento inicial y en la selección del folículo dominante (Visser y col, 2006). Su producción disminuye al final del proceso de maduración folicular y durante el proceso de luteinización (Baarends y

col, 1995). Además, los niveles séricos de HAM declinan a medida que aumenta la edad de la mujer (de Vet y col, 2002) y durante el desarrollo folicular en la hiperestimulación ovárica controlada (Feyereisen y col, 2006; Fanchin y col, 2005). Estos hallazgos sugieren que los niveles séricos de HAM serían representativos del *pool* de folículos ováricos (La Marca y col, 2006) y reflejarían la actividad de aquellos folículos con poca o ninguna influencia hormonal de la transición lúteo-folicular, folículos pre-antrales y antrales tempranos, a diferencia de los otros marcadores hormonales de la reserva folicular ovárica como los niveles séricos de FSH, E2 y de inhibina B. Estos dos últimos son producidos por folículos antrales tempranos en respuesta a la FSH. Un marcador cuantitativo de la reserva ovárica es el recuento de FA, visibles por ultrasonido al inicio de la fase folicular (Scheffer y col, 2003). Se ha demostrado que existe una importante correlación entre los valores de HAM y el número de folículos antrales en el día 3 del ciclo menstrual y que a su vez esta relación es mayor que con otros marcadores de reserva ovárica como FSH, E2, inhibina B (Fanchin y col, 2003). La producción de HAM por parte de los folículos pre-antrales y antrales tempranos, con poca o ninguna influencia a la acción de la FSH, reduciría la variabilidad intercíclica de sus niveles. Esta hipótesis fue demostrada mediante un estudio en el que se encontró una menor variabilidad ciclo a ciclo de los niveles de HAM en comparación con inhibina B, E2, FSH y recuento de folículos antrales (Fanchin y col, 2005). Además, se comprobó no sólo la alta reproducibilidad intercíclica de la HAM, sino también su superioridad como marcador de la reserva ovárica en pacientes con ciclo cortos, marcador clínico de envejecimiento ovárico (Cedrin-Durnerin y col, 2008). Por otro lado, varios investigadores encontraron una gran correlación entre los valores de HAM y el número de ovocitos recuperados en mujeres que realizaron tratamientos de fertilización asistida de alta complejidad (FAAC), confirmando la relevancia de los valores de HAM como predictor de la respuesta ovárica en pacientes sometidas a FAAC (Seifer

y col y van Rooij y col, 2002; Eldar-Geva y col; Tremellen y col, 2005). A su vez, se halló cierto valor en la medición de HAM como predictor de embarazo en pacientes que realizaron ciclos de fertilización *in vitro* (FIV) (Hazout y col, 2005).

En el presente estudio comparamos la reproducibilidad intercíclica de la hormona anti-mülleriana (HAM), recuento de folículos antrales (FA), hormona folículo estimulante (FSH) y estradiol (E2) en dos ciclos menstruales consecutivos y evaluamos la correlación existente entre estas variables en ambos ciclos.

Material y métodos

Pacientes

Se estudiaron en forma prospectiva 30 mujeres de parejas infértiles en tratamiento de fertilización asistida de alta complejidad en PROAR (Programa de Asistencia Reproductiva de Rosario) entre julio de 2007 y enero de 2008. La selección se llevó a cabo según los siguientes criterios de inclusión: edad menor de 40 años, ciclos menstruales regulares (25-35 días), presencia de ambos ovarios y ausencia de administración de preparados hormonales en el ciclo previo. Se obtuvo el consentimiento informado de cada una de las pacientes.

Protocolo de estudio

En fase folicular temprana (días 2-4) de dos ciclos menstruales consecutivos se tomaron muestras de sangre por venopunción a cada paciente para la determinación sérica de HAM, FSH y E2. Las muestras fueron extraídas aproximadamente entre las 8 y 9 horas de la mañana, se centrifugaron a 1700 rpm, se separó el suero y posteriormente fueron conservadas a -20°C hasta su utilización. Las determinaciones de FSH y E2 fueron realizadas mediante EQLIA (Enzyme-Linked Quimioluminiscent Immunosorbent Assay), utilizando INMULITE (DPC, Los Ángeles CA). Para el E2 la sensibilidad funcional fue 15 pg/ml y el coeficiente de variación intraensayo menor a 8%. Para FSH la sensibilidad funcional fue de 0,1 mUI/ml y el coeficiente de variación intraensayo fue menor a 5%.

Los niveles de AMH fueron determinados mediante ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, DSL Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Texas, USA) con una sensibilidad analítica de 0,05 ng/ml y un coeficiente de variación intraensayo menor al 5 %.

El mismo día de la obtención de la muestra de sangre, se les realizó en forma indistinta por dos profesionales una ecografía ginecológica con transductor intravaginal de 9 MHz (ATL HDI P50) y se evaluó el número y tamaño de los folículos en ambos ovarios. Se consideraron aquellos que medían entre 4 y 10mm (folículos antrales).

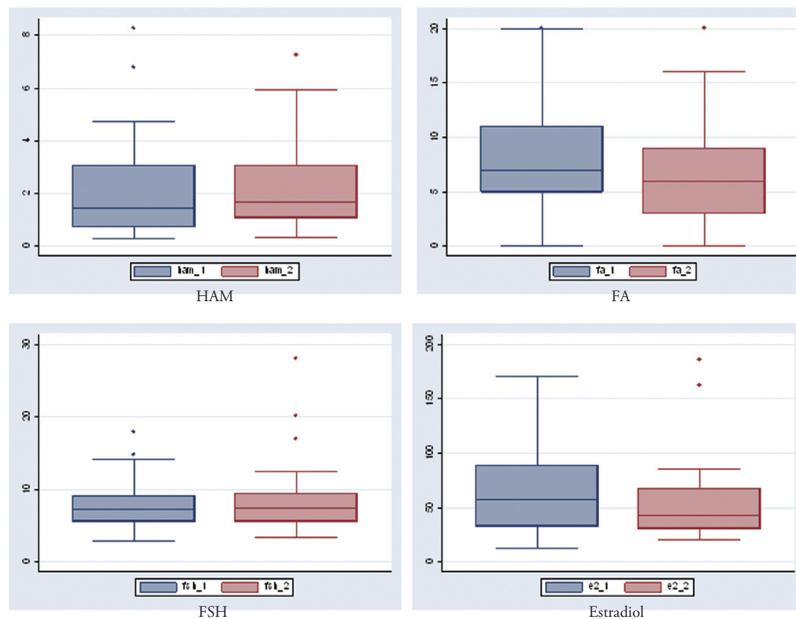
Análisis estadístico

Se calcularon los coeficientes de correlación intraclase (CCI) en dos ciclos subsiguientes para HAM, FSH, E2, recuento de FA y el coeficiente de correlación (r) entre estos marcadores de reserva ovárica. Los valores se presentaron con mediana y rango intercuartil o promedio y desvío estándar según la distribución de la variable analizada. El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico STATA 8.0. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

El promedio de edad fue 34,5 años (DS=3,3). La duración del ciclo menstrual fue en promedio de 28,5 días (DS=2,03). Los valores séricos hormonales y el recuento de FA en cada ciclo están representados en la Figura 1. La mediana para los valores de HAM fue 1,43 ng/ml (rango intercuartil: 0,73-3,08) en el primer ciclo y 1,68 ng/ml (rango intercuartil: 1,06-3,07) para el segundo ciclo. La mediana para los niveles séricos de FSH fue 7,31 mUI/ml (rango intercuartil: 5,61-9,11) para el primer ciclo y 7,39 mUI/ml (rango intercuartil: 5,53-9,5) para el segundo ciclo. La mediana para los valores de E2 fue 32,8ng/ml (rango intercuartil: 19-76) y 31,7 (rango intercuartil: 19-76), respectivamente para cada ciclo. La mediana para el recuento de FA fue 7 (rango intercuartil: 5-11) y 6 (rango intercuartil: 3-9) para cada ciclo respectivamente.

Figura 1. Representación gráfica de los valores séricos de HAM, FSH, E2 y recuento de FA (4-10mm) en el día 3 de dos ciclos consecutivos. Las líneas horizontales dentro de las cajas representan los valores para la mediana. Por encima y por debajo de los límites de la caja se representan los cuartiles 25 y 75 respectivamente.



En fase folicular temprana la HAM se correlacionó fuertemente y en forma positiva con el número de FA ($r=0,77$ y $r=0,79$, respectivamente para cada ciclo), ambas estadísticamente significativas ($P=<0,0001$ y $P=<0,0001$) (Figura 2). La FSH presentó una correlación moderada y negativa respecto a la HAM en los dos ciclos ($r= -0,61$ y $r= -0,58$). Esta correlación

entre ambas hormonas fue estadísticamente significativa tanto en el primero como en el segundo ciclo ($P=0,004$ y $P=0,007$, respectivamente) (Figura 3). No hubo correlación entre HAM y E2 ($r=0,07$ y $r=-0,02$ para cada ciclo) y estos resultados no fueron estadísticamente significativos ($P=0,8$ y $P=0,9$; respectivamente) (Figura 4).

Figura 2. Correlación entre HAM y FA en el día 3 de dos ciclos menstruales consecutivos. Se observa una fuerte correlación entre ambos marcadores ($r=0,77$; $r=0,79$) estadísticamente significativa ($P=<0,0001$ y $P=<0,0001$).

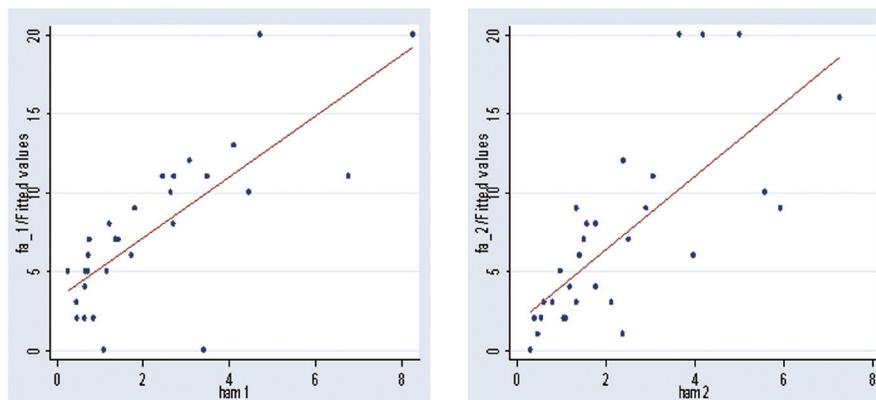


Figura 3. Correlación entre HAM y FSH para los dos ciclos consecutivos analizados ($r=-0,61$ y $r=-0,58$). Esta asociación fue negativa, moderada y estadísticamente significativa ($P=0,004$ y $P=0,007$).

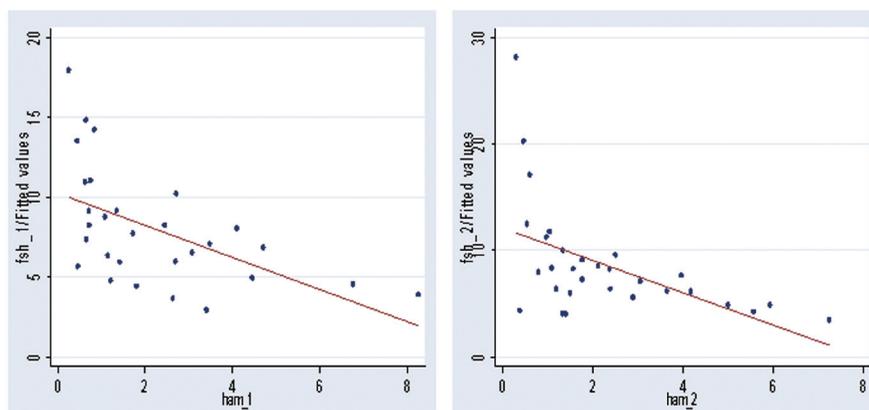
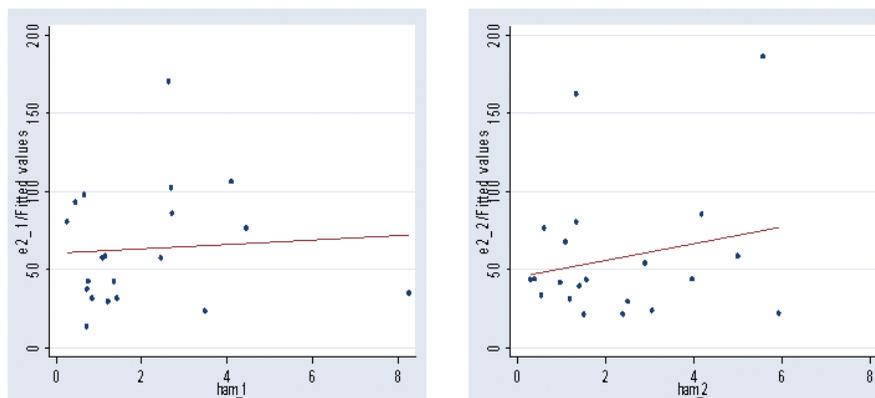


Figura 4. Correlación entre HAM y E2 en el día 3 de los dos ciclos menstruales analizados: $r=0,07$; $P=0,8$ en el primer ciclo y $r=-0,02$; $P=0,9$ en el segundo ciclo.



Al evaluar la reproducibilidad de los niveles hormonales y el recuento de FA en dos ciclos consecutivos se encontró una alta reproducibilidad intercíclica para la HAM (CCI=0,90), estadísticamente significativa ($P<0,0001$). La FSH presentó una mediana reproducibilidad intercíclica (CCI =0,64) y estadísticamente significativa ($P<0,0001$). La reproducibilidad intercíclica para el recuento de FA fue débil (CCI=0,32; $P=0,004$) y no se halló reproducibilidad intercíclica para el E2 (CCI=<0,0001; no estadísticamente significativo). Estos valores se encuentran expresados en la Tabla 1.

Tabla 1. Reproducibilidad intercíclica de los niveles hormonales y el recuento de FA.

Parámetros	CCI	Valor de P
HAM	0,90	< 0,0001
FSH	0,64	< 0,0001
E2	<0,0001	NS
FA	0,32	0,004

Discusión

Los resultados del presente trabajo concuerdan con estudios previos (Fanchin y col, 2003;

Cedrin-Durnerin y col, 2008) al demostrar que el nivel sérico de HAM, medido en el día 3 del ciclo menstrual, es mejor predictor de la reserva ovárica en comparación con los otros marcadores hormonales habituales como el estradiol y la FSH. El motivo por el cual se produce este fenómeno podría ser la singularidad biológica que presenta la HAM y que no comparte con las demás hormonas. Esto es, la HAM es producida por folículos pequeños, disminuye con la maduración folicular y es presumiblemente independiente de la FSH. En contraposición, los valores de E2 dependen de la actividad de las células de la granulosa, representada en parte por el número y tamaño folicular y por la acción de la FSH. Si bien se conoce que la FSH ejerce cierta influencia sobre la HAM, este estudio demuestra una asociación negativa débil. A su vez, la HAM es secretada por folículos independientes de la FSH, reflejando el *pool* de folículos antrales sin depender del crecimiento folicular ni del patrón hormonal. A medida que los folículos van madurando pierden la capacidad de expresar HAM y sus valores no se correlacionan con el desarrollo folicular, sino con el *pool* de folículos que van a ser reclutados.

En este trabajo demostramos que los niveles séricos de la HAM se correlacionan en forma significativa con el recuento de FA y que esta asociación es más notable que la que presenta la HAM con FSH y E2. Por otro lado la HAM, al no estar influenciada por la dinámica hormonal de la transición lúteo-folicular, es un marcador altamente reproducible entre un ciclo y otro. Se ha demostrado en sucesivos estudios que el recuento de FA, realizado en fase folicular temprana, es un marcador útil para predecir la respuesta ovárica en cada ciclo individual, pero es conocido que el *status* ovárico varía en ciclos subsecuentes. La HAM es un marcador estable de la reserva ovárica y por ésto sus niveles séricos pueden ser medidos en cualquier momento del ciclo. Esto convierte a la HAM en una herramienta útil para evaluar la reserva ovárica en el manejo diario del consultorio. Se necesitan más estudios para convalidar los resultados del presente trabajo y para reafirmar la utilidad clínica de la medición de la HAM. Además, serían de utilidad estudios bien definidos en la población general como prueba definitiva de su valor pronóstico de la reserva folicular.

Referencias

- Al-Qahtani A, Muttukrishna S, Appasamy M, Johns J, Cranfield M, Visser JA, Themmen AP, Groome NP. Development of a sensitive enzyme immunoassay for anti-müllerian hormone and the evaluation of potential clinical applications in males and females. *Clin Endocrinol* 2005;63:267-273.
- Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, vanLeeuwen EC, Themmen AP, Grootegoed JA. Antimüllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 1995;136:4951-4562.
- Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Müllerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994;79:415-425.
- Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP. Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 1986;45:685-698.
- Cedrin-Durnerin I, Creux H, Pasquier M, Snaifer E, Coussieu C, Hugues JN. Inter-cycle variability of AMH, FSH, E2 and Antral Follicle Count in patients with shortened cycle length. (Artículo en proceso).
- De Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone serum levels: A putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002;77:978-985.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen A. Anti-müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001;142:4891-4899.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002;143:1076-1084.
- Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, Gal M, Zylber-Haran E, Margalioth EJ. Dynamic assays of inhibin B, anti-müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod* 2005;20:3178-3183.
- Fanchin R, SchonaEuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003;18:323-327.
- Fanchin R, SchonaEuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Serum anti-müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 2003;18:328-332.

- Fanchin R, Taieb J, Lozano DH, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod* 2005;20:923-927.
- Feyereisen E, Mendez Lozano D, Taieb J, Hesters L, Frydman R, Fanchin R. Anti-müllerian hormone: clinical insights into a promising biomarker or ovarian status. *Reprod Biomed Online* 2006;12:695-703.
- Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Serum antimüllerian hormone / müllerianinhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril* 2004; 82:1323-1329.
- Hudson PL, Douglas I, Donahoe PK, Cate RL, Epstein J, Pepinsky RB, MacLaughlin DT. An immunoassay to detect human müllerian inhibiting substance in males and females during normal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:16-22.
- Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, Mellon SH, McGee E, Nachtigal MW, Visser JA. Autocrine and paracrine müllerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Prog Horm Res* 2000;55:53-67.
- Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R, Xavier F. The role of anti-müllerian hormone in gonadal development. *Mol Cell Endocrinol* 1998;145: 3-7.
- La Marca A, Volpe A. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol* 2006;64:603-610.
- Pepinsky RB, Sinclair LK, Chow EP, Mattaliano RJ, Manganaro TF, Donahoe PK, Cate RL. Proteolytic processing of müllerian inhibiting substance produces a transforming growth factor- β -like fragment. *J Biol Chem* 1988;263:18961-18964.
- Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol. Metab* 1999;84:3836-3844.
- Scheffer GJ, Broekmans FJ, Looman CW, Blankenstein M, Fauser BC, teJong FH, teVelde ER. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod* 2003;18:700-706.
- Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM. Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2002; 77:468-471.
- Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN. Antimüllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Australian New Zealand Journ Obstet Gynecol* 2005; 45:20-24.
- Van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, Themmen APN. Serum anti-müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002;17: 3065-3071.
- Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of anti-müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 1984;114:1315-1320.
- Visser JA, de Jong FH, Laven A. Anti-müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 2006;131(1):1-9.