

JULIANO BRUM SCHEFFER<sup>1</sup>  
DANIEL MÉNDEZ LOZANO<sup>1</sup>  
RENÉ FRYDMAN<sup>2</sup>  
RENATO FANCHINI<sup>3</sup>

# Relação entre os níveis séricos do hormônio anti-Mülleriano, inibina B, estradiol e hormônio folículo estimulante no terceiro dia e o status folicular ovariano

*Relationship of serum anti-Müllerian hormone, inhibin B, estradiol and FSH on day 3 with ovarian follicular status*

## Artigos originais

### Palavras-chaves

Folículo ovariano  
Estradiol/análise  
Hormônio folículo estimulante  
Inibinas/análise  
Hormônios testiculares/análise

### Keywords

Ovarian follicle  
Estradiol/analysis  
Follicle stimulating hormone  
Inhibins/analysis  
Testicular hormones/analysis

## Resumo

**OBJETIVO:** examinar a hipótese de que o nível sérico do hormônio anti-Mülleriano (HAM) reflete o *status* folicular ovariano. **MÉTODOS:** Desenho: estudo prospectivo. Pacientes: foram incluídas 101 candidatas à FIV-TE submetidas à estimulação ovariana controlada com agonista de GnRH e FSH. Depois de atingir a supressão da hipófise e antes da administração de FSH (dia basal), os níveis séricos de HAM, inibina B e FSH foram avaliados. O número de folículos antrais foi determinado pela ultra-sonografia (dia basal) (folículo antral precoce; 3-10 mm). **RESULTADOS:** as médias do nível sérico de HAM, inibina B, E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> e FSH (dia basal) foram 3,4±0,14 ng/mL, 89±4,8 pg/mL, 34±2,7 pg/mL, 0,22±0,23 ng/mL e 6,6±0,1 mIU/mL, respectivamente, e a média do número de folículos antrais precoces foi 17±0,39. O nível sérico do HAM foi negativamente correlacionado com a idade (r= -0,19, p<0,04) e positivamente correlacionado com o número de folículos antrais precoces (r=0,65, p<0,0001), mas isto não se aplicou aos níveis séricos de inibina B, E<sub>2</sub> e FSH. **CONCLUSÕES:** esse dado demonstra a associação do HAM com a quantidade de folículo antral, sendo aquele, portanto, um provável biomarcador do *status* folicular ovariano.

## Abstract

**PURPOSE:** to examine the hypothesis that serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels reflect the ovarian follicular *status*. **METHODS:** Design: prospective study. Patients: we studied 101 IVF-ET candidates undergoing controlled ovarian hyperstimulation with GnRH agonist and FSH. After the achievement of pituitary suppression and before FSH administration (baseline), serum AMH, inhibin B, and FSH levels were measured. The number of antral follicles was determined by ultrasound at baseline (early antral follicles; 3-10 mm). **RESULTS:** at baseline, median serum levels of AMH, inhibin B, E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> and FSH were 3.42±0.14 ng/mL, 89±4.8 pg/mL, 34±2.7 pg/mL, 0.22±0.23 ng/mL and 6.6±0.1 mIU/mL, respectively, and the mean number of early antral follicles was 17±0.39. Serum levels of AMH were negatively correlated with age (r=-0.19, p<0.04), and positively correlated with number of antral follicles (r=0.65, p<0.0001), but this did not apply to serum levels of either inhibin B, E<sub>2</sub> or FSH. **CONCLUSIONS:** the data demonstrate an association between AMH and antral follicular counts. Therefore, AMH is probable a biomarker of ovarian follicular *status*.

### Correspondência:

Juliano Scheffer  
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia e Medicina  
da Reprodução, Hôpital Antoine Béclère – 157  
Rue de la Porte de Trivaux, 92141 – Clamart – France  
Fone: 33 0 0145374465  
E-mail: julianoscheffer@hotmail.com

### Recebido

13/02/2007

### Aceito com modificações

21/03/2007

Serviço de Reprodução Humana Assistida do Hôpital Antoine Béclère, Clamart, França.

<sup>1</sup> Interno do Serviço de Reprodução Humana do Hôpital Antoine Béclère – Clamart, França.

<sup>2</sup> Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hôpital Antoine Béclère – Clamart, França.

<sup>3</sup> Chefe do Serviço de Reprodução Humana do Hôpital Antoine Béclère, Clamart – França.

## Introdução

A medida direta do pool dos folículos primordiais é impossível. Entretanto, o número dos folículos primordiais é refletido indiretamente pelo número dos folículos em crescimento<sup>1</sup>. Então, um fator primariamente secretado pelos folículos em crescimento refletirá o tamanho do pool dos folículos primordiais. Desde que o hormônio anti-Mülleriano (HAM) é expressado pelos folículos em crescimento até a dominância<sup>2,3</sup>, e pode ser detectado no sangue<sup>4,5</sup>, ele é um candidato promissor.

Em mulheres adultas, o papel fisiológico do HAM, um peptídeo que é produzido exclusivamente pelas células da granulosa dos folículos ovarianos<sup>6</sup>, ainda é mal estabelecido. As pesquisas científicas sugerem a participação do HAM no controle do crescimento do folículo primordial a primário em ratos<sup>2,3,7</sup>. Além disso, evidências indicam que o HAM está implicado também no regulamento da resposta do folículo antral precoce ao hormônio folículo estimulante (FSH).

Os dados obtidos de pesquisas em ovários adultos indicam que o HAM está provavelmente envolvido na regulação da esteroidogênese folicular. As experiências conduzidas em animais sugerem que o HAM reduz a atividade da aromatase e o número dos receptores do hormônio luteinizante nas células da granulosa estimuladas pelo FSH<sup>8</sup>, e influencia também a produção de testosterona pelas células da teca<sup>9</sup>. Em adição, evidência crescente indica que o HAM é principalmente expressado nos folículos pré-antral e antral precoce<sup>10</sup> e tem papéis diretos ou indiretos em várias fases da foliculogênese, do primordial<sup>2,3</sup> aos estágios foliculares sensíveis ao FSH<sup>11,12</sup>, provavelmente via receptor tipo II que é expressado nas células da granulosa e da teca.

Em mulheres regularmente ovulatórias, os níveis séricos do HAM medidos no dia 3 do ciclo menstrual foram associados positivamente à resposta ovariana a estimulação controlada<sup>13-16</sup>. A relação quantitativa entre o HAM e a resposta ovariana à estimulação controlada pode meramente resultar da correlação positiva que existe entre níveis periféricos de HAM e o número dos folículos antrais precoces no dia 3<sup>17-22</sup>.

A evidência clínica está de acordo com a hipótese de que o HAM pode ser um parâmetro preditivo mais sensível do *status* ovariano do que os marcadores usuais. Alguns investigadores<sup>17,23</sup> demonstraram que a concentração sérica do HAM no dia 3 do ciclo diminui progressivamente com a idade e se torna indetectável após a menopausa. Isto sugere que a con-

centração periférica do HAM é um parâmetro valioso para monitorar a relativa exaustão folicular devido ao envelhecimento ovariano.

Desta forma, o objetivo de nosso estudo foi demonstrar o valor do HAM como indicador do *status* folicular ovariano.

## Métodos

Nós estudamos prospectivamente 101 mulheres inférteis com idade entre 21 e 41 anos. Todas se adequaram aos seguintes critérios de inclusão: ambos ovários os presentes, desprovidos de anormalidades morfológicas e adequadamente visualizados pela ultra-sonografia; ciclos menstruais regulares com duração entre 25 e 35 dias; nenhuma doença em curso ou passada que afete os ovários ou a secreção, excreção e clearance de gonadotrofinas e esteróides sexuais; nenhum sinal clínico de hiperandrogenismo; índice de massa corporal entre 18-25 kg/m<sup>2</sup>; número de folículos antrais precoces (3-10 mm de diâmetro) <24; sem endometriose. A infertilidade era devida a anormalidade espermática (54%), anormalidade nas tubas (29%), ou inexplicada (17%). O consentimento informado foi obtido de todas as mulheres e a investigação foi aprovada pela Comissão de Ética da nossa instituição.

### Protocolo de estimulação ovariana controlada

Todas as mulheres receberam agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas, triptorelin (3 mg/dia im, Decapeptyl, Beaufour Ipsen Pharma, Paris, France) no primeiro dia do ciclo. Três semanas depois, a dessensibilização da hipófise foi confirmada pela detecção de baixo nível sérico de estradiol e gonadotrofinas. As pacientes também foram submetidas ao exame ultra-sonográfico convencional para excluir cistos ovarianos e também verificar se a espessura endometrial era <5 mm. Terapia com FSH recombinante (Gonal-F, Serono Pharmaceuticals, Boulogne, France) foi iniciada com a dose de 225 UI/dia e continuada até o dia da administração do hCG (gonadotrophine chorionique "endo", Organon Pharmaceuticals, Saint-Denis, France, 10,000 UI, im). Depois do sexto dia de terapia de FSH recombinante, a dose diária de FSH foi ajustada de acordo com o número dos folículos em crescimento. Administração de hCG foi realizada quando pelo menos quatro folículos apresentavam diâmetro maior que 16 mm e o nível de E<sub>2</sub> por folículo maduro (≥16 mm de diâmetro) foi >200 pg/mL. Mulheres que não apresentassem esses critérios tiveram o seu ciclo de

estimulação cancelado. Os oócitos foram obtidos 36 horas depois da administração do hCG pela aspiração folicular guiada pela ultra-sonografia transvaginal. Todos os embriões foram transferidos dois dias depois da punção folicular utilizando o cateter Frydman (CCD Laboratories, Paris, France). A fase lútea foi auxiliada com progesterona micronizada ( $P_4$ ) (Estima, Effik Pharmaceuticals, Bièvres, France, 600 mg/dia) administrada diariamente por via vaginal, iniciada na noite da transferência embrionária.

### ■ Avaliação hormonal e folicular

Para o propósito desse estudo, nós consideramos a amostra de sangue como dia basal no dia em que a dessensibilização da hipófise foi confirmada. Todas as amostras de sangue foram obtidas por punções venosas e o plasma foi separado e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para subsequente análise. O nível sérico do HAM foi determinado usando método enzimático de imunoluminescência segunda geração (ELISA referência A16507; Immunotech Beckman Coulter Laboratories, Villepinte, France). Os coeficientes de variação intra e interensaio (CV) foram  $<6$  e  $<10\%$ , respectivamente, e o limite mínimo de detecção foi  $0,13$  ng/mL e o máximo foi  $21$  ng/mL para HAM. Os níveis séricos de FSH,  $E_2$  e  $P_4$  foram determinados por sistema de multianálise automatizado usando a técnica de quimioluminescência (Advia-Centaur, Bayer Diagnostics, Puteaux, France). Para FSH, a sensibilidade funcional foi  $0,1$  mUI/mL e os CV foram  $3$  e  $5\%$ , respectivamente. Para  $E_2$ , o limite mínimo de detecção foi  $15$  pg/mL e máximo de  $1,000$  pg/mL, com CV de  $8$  e  $9\%$ , respectivamente. Para  $P_4$ , o limite mínimo de

detecção foi  $0,1$  ng/mL, e máximo de  $60$  ng/mL, e os CV foram  $8$  e  $9\%$ , respectivamente. O nível sérico de inibina B foi determinado usando método enzimático de imunoluminescência ELISA (Serotec, Varilhes, France) como descrito previamente<sup>24</sup>. Para inibina B, a sensibilidade funcional foi  $15$  pg/mL e intra e inter CV foram  $<6$  e  $<9\%$ , respectivamente.

O exame ultra-sonográfico do ovário foi realizado usando a sonda multi-freqüência transvaginal  $5.0-9.0$  MHz (Voluson 730 Expert, General Electric Medical Systems, Paris, France) com o objetivo de avaliar o número e o tamanho dos folículos antrais. Determinamos o número e o diâmetro médio de todos os folículos entre  $3$  e  $10$  mm de ambos os ovários.

### ■ Análise estatística

As medidas de tendência central e variabilidade foram respectivamente a média e o desvio padrão da média quando a distribuição dos dados era normal, e a mediana e os limites mínimos e máximos quando a normalidade não poderia ser averiguada. A relação entre duas variáveis contínuas foi avaliada pela correlação quando elas eram independentes entre si e pela regressão simples quando havia dependência entre elas. O teste de Spearman foi usado para determinar se os coeficientes de correlação ( $r$ ) foram significativamente diferentes de zero. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## Resultados

A mediana da idade das participantes foi  $34$  anos (variando entre  $21$  e  $41$ ), o índice de massa corporal foi  $21,3$  kg/m<sup>2</sup> (variando entre  $18$  e  $25$ ), e a duração do ciclo menstrual foi  $28$  dias (variando entre  $25$  e  $35$ ).

No dia considerado para as avaliações basais, as médias do nível sérico de HAM, inibina B,  $E_2$ ,  $P_4$  e FSH foram  $3,4 \pm 0,14$  ng/mL,  $89 \pm 4,8$  pg/mL,  $34 \pm 2,7$  pg/mL,  $0,22 \pm 0,23$  ng/mL e  $6,6 \pm 0,1$  mUI/mL, respectivamente, e a média do número de folículos antrais precoces foi  $17 \pm 0,39$ .

O nível sérico do HAM foi negativamente correlacionado com a idade ( $r = -0,19$ ,  $p < 0,04$ ), mas isto não ocorreu com os níveis séricos de inibina B,  $E_2$  e FSH ( $r = -0,06$ ,  $p = 0,51$ ,  $r = 0,04$ ,  $p = 0,63$ ,  $r = 0,17$ ,  $p = 0,08$ , respectivamente), conforme Tabela 1.

O nível sérico do HAM foi positivamente correlacionado com o número de folículos antrais ( $r = 0,65$ ,  $p < 0,0001$ ), mas isto não aos níveis séricos de inibina B,  $E_2$  e FSH ( $r = 0,13$ ,  $p = 0,17$ ;  $r = -0,002$ ,  $p = 0,98$ ;  $r = 0,08$ ,  $p = 0,41$ , respectivamente), conforme Tabela 2.

**Tabela 1 - Correlação entre os níveis séricos dos hormônios (dia basal) e a idade.**

Hormônio	Média e desvio padrão	r	p
HAM	$3,42 \pm 0,14$ ng/mL	-0,19	$<0,04$
Inibina B	$89 \pm 4,8$ pg/mL	-0,06	0,51
$E_2$	$34 \pm 2,7$ pg/mL	0,04	0,63
FSH	$6,6 \pm 0,1$ mUI/mL	0,17	0,08

HAM=hormônio anti-Mulleriano;  $E_2$ =estradiol; FSH=Hormônio foliculo estimulante; r=coeficiente de correlação (teste de Spearman);  $p < 0,05$ =significância estatística.

**Tabela 2 - Correlação entre os níveis séricos dos hormônios (dia basal) e o número de folículos antrais.**

Hormônio	Média e desvio padrão	r	p
HAM	$3,42 \pm 0,14$ ng/mL	0,65	$<0,0001$
Inibina B	$89 \pm 4,8$ pg/mL	0,13	0,7
$E_2$	$34 \pm 2,7$ pg/mL	-0,002	0,98
FSH	$6,6 \pm 0,1$ mUI/mL	0,08	0,41

HAM=hormônio anti-Mulleriano;  $E_2$ =estradiol; FSH=hormônio foliculo estimulante; r=coeficiente de correlação (teste de Spearman);  $p < 0,05$ =significância estatística.

Em concordância, o nível sérico do HAM não mostrou correlação com inibina B ( $r=0,17$ ,  $p=0,07$ ),  $E_2$  ( $r=-0,12$ ,  $p=0,22$ ) e FSH ( $r=0,06$ ,  $p=0,55$ ).

## Discussão

O conceito do envelhecimento reprodutivo sugere que o declínio do pool do oócito/folículo determina a perda da fertilidade feminina dependente da idade<sup>25</sup>. A idade cronológica no estágio final do envelhecimento reprodutivo (isto é, a ocorrência da menopausa) mostra uma variação individual considerável; isto se deve mais provavelmente ao *status* do pool do oócito/folículo em uma mesma idade. Por não ser praticável, a avaliação direta do pool do oócito/folículo, os marcadores endocrinológicos e ultra-sonográficos são usados como uma medida indireta do pool do oócito/folículo.

O resultado da investigação atual foi que o HAM se correlacionou com o número de folículos antrais precoces, mas isto não se aplicou aos níveis séricos da inibina B,  $E_2$  ou FSH. As razões para este fenômeno podem ser relacionadas ao regulamento diferente do HAM em comparação a inibina B,  $E_2$  e FSH. Durante a transição da fase folicular a luteal, a secreção de inibina B<sup>26</sup> e  $E_2$ <sup>27</sup> pelos folículos antrais precoces modula sua própria estimulação pelo FSH. Isto implica que os níveis de inibina B e  $E_2$  dependem não somente do volume das células da granulosa, representado pelo número e pelo tamanho folicular, mas também da sua estimulação pelo FSH. Embora pouco se saiba sobre os efeitos de FSH na expressão do HAM durante a fase folicular precoce, pode-se presumir que o HAM é menos sensível ao FSH do que a inibina B e  $E_2$ . Certamente, o HAM é secretado pelos folículos que são menos sensíveis ao FSH, como os folículos pré-antrais<sup>10</sup>. Conseqüentemente, o HAM pode representar um marcador mais independente e de confiança da atividade do folículo antral do que a inibina B,  $E_2$  e FSH no dia 3 do ciclo. Em contraste ao número de folículos antrais e à inibina B<sup>1,28</sup>, o HAM não pode somente refletir o número de folículos antrais precoces, mas também os outros estágios precoces de desenvolvimento folicular, como demonstrado nos estudos em animais e humanos<sup>2,3,29</sup>.

Em mulheres jovens ovulatórias, as medidas dos hormônios na fase folicular precoce em intervalos de três anos revelaram que os níveis séricos do HAM declinam significativamente, visto que os níveis séricos de FSH e de inibina B e o número dos folículos antrais não mudam durante este intervalo<sup>17</sup>. Fanchin et al.<sup>20,21</sup> mostraram uma correlação mais forte entre níveis séri-

cos do HAM e a quantidade de folículo antral do que entre o HAM e níveis séricos de inibina B, FSH e  $E_2$  no dia 3 do ciclo. Nos estudos de van Rooij et al.<sup>23,30</sup>, em que diversos marcadores do envelhecimento foram medidos em mulheres em intervalos de quatro anos, os níveis séricos do HAM mostraram alta acurácia ( $ROC_{AUC}$  0,87) para prever a ocorrência da transição a menopausa dentro de quatro anos. Quando os níveis séricos da inibina B e a idade foram incluídos em um modelo multivariado, o  $ROC_{AUC}$  melhorou a 0,92. Além disso, comparado aos outros marcadores de reserva ovariana, somente o nível sérico do HAM mostrou um declínio longitudinal médio com o tempo. Então, estes dados sugerem fortemente que os níveis séricos de HAM podem ser usados como um marcador do envelhecimento ovariano.

Entre 40 e 45 anos, o FSH começa a aumentar substancialmente, e os níveis mais elevados desse hormônio, nesta fase, são vistos principalmente em mulheres com um ciclo irregular. Estas mudanças endocrinológicas parecem ocorrer somente quando os números dos folículos estão reduzidos fortemente<sup>25</sup> imediatamente antes ou durante a transição à menopausa. Mesmo em idades inferiores a 40 anos, um declínio significativo nos níveis de HAM pode ser visto, confirmando a ligação mais precoce do HAM com o avanço da idade<sup>17</sup>. Os níveis de FSH aumentam e os níveis de inibina B diminuem com o tempo, mas essas mudanças ocorrem somente em mulheres com mais de 40 anos. Os níveis séricos do HAM declinam em todas as idades, sendo o melhor marcador da perda gradual do número de folículos. Por causa da forte correlação entre o número de folículos antrais e o AFC e HAM, é plausível que ambos forneçam um excelente reflexo do declínio do pool folicular<sup>18,20,21</sup>.

Os níveis séricos do HAM podem ter um valor significativo na prática clínica. O HAM é um marcador preditivo da resposta ovariana em pacientes submetidas a fertilização *in vitro*, refletindo a reserva ovariana<sup>31</sup>. Com o número de folículos antrais, uma predição similar da resposta ovariana foi obtida<sup>18</sup>. Seria útil investigar se o HAM ou o número de folículos antrais poderiam se diferenciar no prognóstico das mulheres em idades avançadas submetidas a fertilização *in vitro*.

Em resumo, nós consideramos os níveis séricos do HAM o melhor marcador do *status* folicular ovariano. A medida do nível sérico do HAM no dia 3 do ciclo é melhor e mais fiel biomarcador do pool folicular que os outros convencionais, refletindo o número de folículos antrais precoces. As aplicações clínicas da medida do HAM parecem praticáveis e importantes.

## Referências

- Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril*. 1999;72(5):845-51.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2002;143(3):1076-84.
- Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction*. 2002;124(5):601-9.
- Hudson PL, Douglas I, Donahoe PK, Cate RL, Epstein J, Pepinsky RB, et al. An immunoassay to detect human mullerian inhibiting substance in males and females during normal development. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70(1):16-22.
- Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, et al. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metabol*. 1996;81(2):571-6.
- Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of anti-Mullerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology*. 1984;114(4):1315-20.
- Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*. 2004;10(2):77-83.
- Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R, Xavier F. The role of anti-Mullerian hormone in gonadal development. *Mol Cell Endocrinol*. 1998;145(1-2):3-7.
- Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, Mellon SH, McGee E, Nachtigal MW, et al. Autocrine and paracrine Mullerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Prog Horm Res*. 2000;55:53-67.
- Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, et al. Anti-mullerian hormone and anti-mullerian 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(11):4951-62.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001;142(11):4891-9.
- McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJ. Mullerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biol Reprod*. 2001;64(1):293-8.
- Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM. Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril*. 2002;77(3):468-71.
- Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG*. 2004;111(11):1248-53.
- Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Serum antimullerian hormone/mullerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril*. 2004;82(5):1323-9.
- Fanchin R, Louafi N, Mendez Lozano DH, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Per-follicle measurements indicate that anti-Mullerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may qualitatively reflect the ovarian follicular status. *Fertil Steril*. 2005;84(1):167-73.
- de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril*. 2002;77(2):357-62.
- van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, et al. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2002;17(12):3065-71.
- Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, et al. 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*. 2003;88(12):5957-62.
- Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod*. 2003;18(2):328-32.
- Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod*. 2003;18(2):323-7.
- 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*. 2005;20(4):923-7.
- van Rooij IA, Tonkelaar I, Broekmans FJ, Looman CW, Scheffer GJ, de Jong FH, et al. Anti-mullerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause*. 2004;11(6 Pt 1):601-6.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, et al. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(4):1401-5.
- te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*. 2002;8(2):141-54.
- Welt CK, Martin KA, Taylor AE, Lambert-Messerlian GM, Crowley WF Jr, Smith JA, et al. Frequency modulation of follicle-stimulating hormone (FSH) during the luteal-follicular transition: evidence for FSH control of inhibin B in normal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(8):2645-52.
- Mais V, Cetel NS, Muse KN, Quigley ME, Reid RL, Yen SS. Hormonal dynamics during luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;64(6):1109-14.
- Welt CK, McNicholl DJ, Taylor AE, Hall JE. Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(1):105-11.

29. Rey R, Sabourin JC, Venara M, Long WQ, Jaubert F, Zeller WP, et al. Anti-Müllerian hormone is a specific marker of sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors. *Hum Pathol.* 2000;31(10):1202-8.
30. van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, et al. Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril.* 2005;83(4):979-87.
31. Beckers NG, Macklon NS, Eijkemans MJ, Fauser BC. Women with regular menstrual cycles and a poor response to ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization exhibit follicular phase characteristics suggestive of ovarian aging. *Fertil Steril.* 2002;78(2):291-7.