

**LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA, PREDICTORA DE RESPUESTA OVÁRICA Y
EMBARAZO EN TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA
DE ALTA COMPLEJIDAD**

Cano N², Genesio K¹, Nievas MT¹, Battello N¹, Anduaga I¹, Avendaño C, Kiener O², de
Elías R², Andrada MC.²

¹Nascentis – Especialistas en Fertilidad, Córdoba

²Laboratorio Central Sanatorio Allende, Córdoba

Contacto: Natalia Cano laboratoriocano@hotmail.com

RESUMEN

La hormona antimülleriana (HAM) ha sido propuesta como biomarcador de reserva ovárica (RO) y predictor cuantitativo y cualitativo en tratamientos de reproducción asistida (TRA) de alta complejidad. El objetivo de este estudio fue evaluar HAM sérica en mujeres infértiles y su impacto en los resultados de los TRA. **Sujetos y métodos:** Se evaluaron retrospectivamente los niveles séricos de HAM en 96 mujeres infértiles antes de iniciar un TRA. Se excluyeron pacientes con síndrome de ovario poliquístico (criterios de Rotterdam) y con valores de HAM mayores a 6 ng/ml. Se analizaron valores de HAM, edad, número de ovocitos recuperados (OR) y número de ovocitos maduros en metafase II (ovocitos MII). Se correlacionaron niveles de HAM con edad, OR y ovocitos MII. Se valoró subunidad beta de gonadotrofina coriónica humana (hCG β) 14 días después de la transferencia embrionaria. Se compararon edad, OR, ovocitos MII y HAM entre pacientes con embarazo positivo y embarazo negativo. Se utilizaron correlación de Spearman y test U. **Resultados:** HAM correlacionó positivamente con OR y ovocitos MII ($r=0.657$ y $r=0,667$ respectivamente; $p<0,001$), pero no correlacionó con la edad. Las mujeres con embarazo positivo presentaron diferencias significativas en ovocitos MII y el valor de HAM respecto de las que no lograron embarazo ($7,4 \pm 4,7$ vs. $4,5 \pm 3,8$ y $2,89 \pm 1,69$ vs. $1,55 \pm 1,24$ ng/ml respectivamente, $p<0,05$). No hubo diferencias significativas en edad y OR entre ambos grupos ($p>0,05$). **Conclusión:** La utilización de biomarcadores precisos de respuesta ovárica y embarazos es de vital importancia para la decisión clínica de la mejor estrategia de estimulación y tratamiento en mujeres infértiles sometidas a TRA. Nuestros resultados muestran que la evaluación de HAM sérica es un buen predictor del número de ovocitos maduros recuperados y podría predecir probabilidades de embarazo en TRA. Sería necesario un estudio multicéntrico con mayor número de pacientes para poder establecer límites de corte.

Palabras clave: hormona antimülleriana, tratamientos de reproducción asistida, ovocitos recuperados, ovocitos maduros, tasa de embarazo.

Abreviaturas: **HAM**, hormona antimülleriana; **RO**, reserva ovárica; **TRA**, tratamientos de reproducción asistida; **OR**, ovocitos recuperados; **ovocitos MII**, ovocitos en metafase II; **FSH**; hormona folículo estimulante; **ROD**, reserva ovárica disminuida; **hCG**, gonadotropina coriónica humana; **hCG β** , subunidad beta de gonadotropina coriónica humana; **Emb**, embarazo; **No emb**, no embarazo; **FIV**, fertilización in vitro; **ICSI**, inyección intracitoplasmática de espermatozoides **ESHRE**, Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana.

INTRODUCCION

La hormona antimülleriana (HAM) es una glicoproteína miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Es producida por las células de la granulosa del ovario y secretada a sangre periférica. Desempeña un papel fundamental en la regulación del reclutamiento folicular y en el desarrollo de los ovocitos dentro del ovario. Ejerce un papel inhibitorio en el reclutamiento de los folículos primordiales, impidiendo la selección y el crecimiento folicular dependiente de la hormona folículo estimulante (FSH) (1,2).

En mujeres, los niveles más altos de HAM se observan después de la pubertad con valores máximos a los 24,5 años. Después de los 25 años los niveles descienden progresivamente hasta llegar a valores mínimos en la menopausia (3,4).

La variabilidad de HAM durante el ciclo menstrual es motivo de debate. Los estudios iniciales sugerían que la hormona no sufre variaciones significativas intraciclo ya que su producción es independiente de la secreción de gonadotrofinas endógenas (5). Sin embargo, publicaciones más recientes han demostrado fluctuaciones amplias durante el ciclo, aunque los resultados son conflictivos (6-8).

La llamada reserva ovárica (RO) o reserva ovárica funcional, se define como el pool de folículos maduros en crecimiento, después que son reclutados. La RO funcional representa sólo una parte minúscula de la RO total constituida por folículos primordiales en reposo que no han sido reclutados (9). La HAM es uno de los principales marcadores de RO, comparable con el recuento de folículos antrales (10). La RO, la calidad de los ovocitos y la respuesta de los ovarios a la estimulación por gonadotrofinas exógenas descienden de manera gradual con el envejecimiento. Los niveles séricos de HAM estiman la RO y la proximidad de la menopausia reflejando una declinación en la RO relacionada con el aumento en la edad (11). Un valor bajo o indetectable de HAM usualmente se encuentra en mujeres con RO disminuida (ROD) (12,13).

Los tratamientos de reproducción asistida (TRA) se utilizan cada vez con mayor frecuencia en el manejo de parejas con infertilidad. Se consideran de alta complejidad cuando la unión entre óvulo y espermatozoide tiene lugar en el laboratorio, mediante técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). En estos programas, se realiza la estimulación ovárica de las pacientes para lograr mayor número de ovocitos y, por consiguiente, de embriones en cultivo y así incrementar la posibilidad de embarazo. La inducción de la ovulación permite la maduración *in vivo* de ovocitos. Después de la estimulación hormonal, los ovocitos son recuperados mediante aspiración guiada por ecografía. Los ovocitos recuperados (OR) se encuentran en diferentes estadios de maduración y en su mayoría son ovocitos maduros detenidos en la etapa de metafase de la segunda división meiótica (MII). Sólo los ovocitos maduros tienen la capacidad o competencia para ser fertilizados. Profusa bibliografía muestra una fuerte correlación entre los niveles basales de HAM y el número de OR en mujeres bajo estimulación ovárica, por lo cual se la utiliza comúnmente como predictora de respuesta ovárica, y también ha sido propuesta como predictora de embarazo (14).

El envejecimiento ovárico se caracteriza por una disminución progresiva de la cantidad y calidad de los ovocitos. Debido a que algunas mujeres tienden a retrasar la procreación y la fertilidad decae con los años, conocer la RO se vuelve cada vez más importante. Los marcadores séricos de RO como FSH, estradiol, inhibina B, e incluso HAM, no predicen la calidad de los ovocitos, por lo cual las parejas infértiles no deberían ser excluidas de los TRA en base a los resultados de estos marcadores (15,16).

Los objetivos de este estudio fueron evaluar HAM sérica en mujeres infértiles, y analizar su impacto en los resultados de los TRA, relacionando sus niveles con otras variables biológicas de relevancia en reproducción como edad, el número de OR, el número de ovocitos MII y probabilidad de embarazo.

MATERIALES Y METODOS

Se incluyeron en el estudio 96 mujeres con edades entre 30 y 40 años que fueron atendidas en el Centro de Fertilidad Nascentis, de la ciudad de Córdoba. Todas eran eumenorreicas con ciclos de 28 ± 7 días. La extracción de sangre para la cuantificación de HAM se realizó en ayunas y sin tener en cuenta el día del ciclo menstrual. Las muestras de sangre se centrifugaron y los sueros obtenidos se remitieron al Laboratorio Central del Sanatorio Allende de Córdoba donde se mantuvieron congelados a -4°C hasta el momento de su análisis. La valoración de HAM se realizó mediante el inmunoensayo HAM Gen II Elisa (Beckman Coulter inc. USA).

Después de la extracción de sangre, las pacientes iniciaron un ciclo de alta complejidad, realizando la estimulación con gonadotrofinas hipofisarias en dosis entre 225 y 300 UI, dependiendo de la RO de la paciente, durante un periodo de 9 a 10 días. La estimulación ovárica se controló ecográficamente, observando el crecimiento folicular. Cuando los folículos alcanzaron un diámetro mayor a 18 mm se indujo la descarga ovulatoria con una inyección de gonadotrofina coriónica humana (hCG). La recuperación de ovocitos se realizó 36hs después de la administración de hCG mediante aspiración folicular guiada por ecografía transvaginal. En todos los casos se registró el número de ovocitos aspirados, detallando el número de ovocitos maduros. La maduración nuclear fue evaluada al microscopio. Los ovocitos maduros en MII poseen el corpúsculo polar extruido en el espacio perivitelino y se hallan rodeados por las células del cúmulus y líquido folicular viscoso. Se aspiraron 71 pacientes, 65 con ovocitos maduros en MII; 14 pacientes fueron canceladas por ausencia de embriones buenos y 57 fueron transferidas.

El dosaje de subunidad beta de gonadotrofina coriónica humana (hCG- β) se realizó 14 días después de la transferencia embrionaria. De las 57 pacientes transferidas, 12 lograron embarazo (Emb) y 45 no lo lograron (NoEmb). La determinación de hCG- β se

realizó en el Laboratorio Central del Sanatorio Allende de Córdoba en autoanalizador Modular E170, mediante electroquimioluminescencia (Cobas-Roche).

Se efectuó la comparación de edad, valores de HAM, número de OR y número de ovocitos MII entre pacientes Emb y NoEmb. Se correlacionaron los niveles de HAM con edad, OR y ovocitos MII. Fueron excluidas las pacientes con diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico (Criterios de Rotterdam Consenso 2003)(17) y aquellas con niveles de HAM mayores a 6 ng/ml.

Para la evaluación estadística se utilizaron test U y correlación de Spearman. Una $p < 0,05$ fue considerada significativa.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la comparación entre las pacientes Emb y NoEmb. Los niveles de HAM y el número de ovocitos MII fueron significativamente mayores en las pacientes Emb con respecto a las que no lograron embarazo, mientras que, el número de OR, que fue también más elevado en el grupo Emb, no tuvo diferencia significativa. Tampoco fue significativa la diferencia de edad entre Emb y NoEmb.

Tabla 1: Comparación de niveles de HAM, ovocitos recuperados, ovocitos MII y edad de las pacientes que se embarazaron y las que no lograron el embarazo.

	Emb (n=12)	NoEmb (n=45)	p
Edad (años)	35,92±2,46	37,09±3,11	0,12
HAM (ng/ml)	2,89±1,69	1,55±1,24	0,02
OR	8±5,37	5,62±4,42	0,16
Ovocitos MII	7,42±4,69	4,51±3,81	0,03

Emb: pacientes embarazadas; NoEmb: pacientes no embarazadas; HAM: hormona antimülleriana; OR: ovocitos recuperados; ovocitos MII: ovocitos en metafase II

HAM correlacionó positivamente con OR ($r=0,657$, $p<0,001$) y ovocitos MII ($r=0,667$, $p<0,001$) (Figuras I y II) y no correlacionó con la edad de las mujeres.

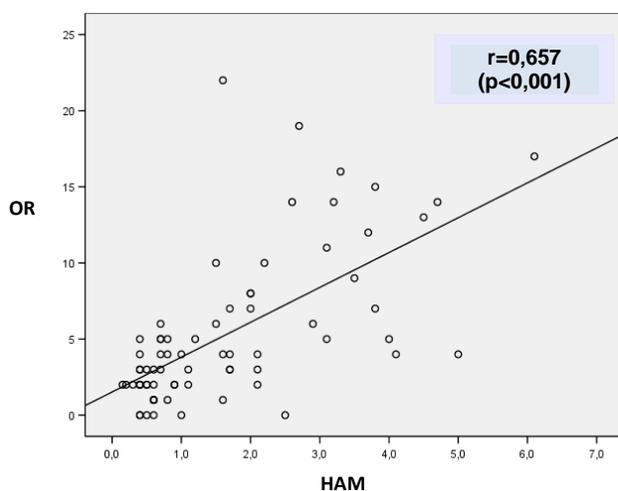


Figura I. Correlación entre hormona antimülleriana (HAM) y ovocitos recuperados (OR).

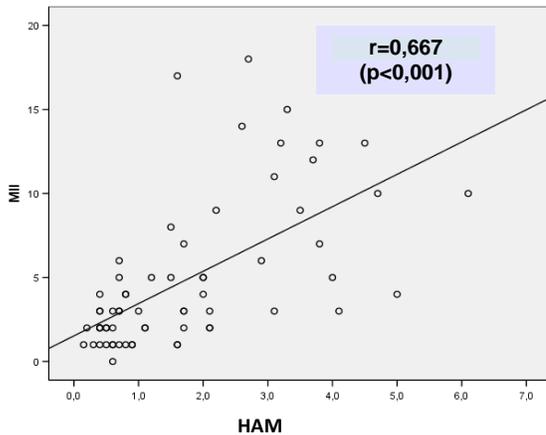


Figura 2. Correlación entre hormona antimülleriana (HAM) y ovocitos MII (MII).

DISCUSION

El objetivo del presente estudio fue evaluar los niveles de HAM en 57 mujeres infértiles, y analizar cuál era su impacto en los resultados de los TRA. Para ello, se compararon los valores séricos de HAM entre las pacientes que habían logrado el embarazo en TRA y las que no lo lograron, y se buscó establecer relaciones entre los valores de HAM y la edad de las pacientes, el número de OR, el número de ovocitos MII y la tasa de embarazo.

La tasa de gestación se ve limitada en la FIV por la edad materna. Los datos de la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana (ESHRE) del año 2006 mostraron que, en países europeos, las tasas de embarazo por ciclo disminuyen a medida que aumenta la edad de las pacientes, de 28,2% a 22,2% y 9,6% en mujeres <35 años, entre 35 y 39 años y ≥40 años respectivamente (18). Una tendencia parecida se observó en el análisis de datos provenientes de clínicas de fertilidad en los Estados Unidos, con tasas de embarazo por ciclo de 45,2% en mujeres <35 años, 37,7% en mujeres de 35 a 37 años y 23,5% de 38 a 40 años (19). Recientemente, un trabajo multicéntrico publicado en Alemania reportó una tasa de 25,9% de embarazos en mujeres de 36,5±4 años sometidas a TRA (20). Nuestro estudio, que incluyó mujeres entre 30 y 40 años, mostró una tasa de embarazo similar ya que se logró el embarazo en el 21% de las pacientes. La

edad de las mujeres que lograron embarazo fue ligeramente menor que la de pacientes NoEmb ($35,92 \pm 2,46$ años y $37,09 \pm 3,11$ años respectivamente), si bien esta diferencia no fue significativa.

El incremento en la edad femenina se asocia con niveles bajos de HAM. Un estudio reportó que mujeres con 39 años o más, tuvieron concentraciones de HAM dos veces más bajas que las mujeres de 29 años o más jóvenes (21). Recientemente, dos trabajos reportaron valores de referencia para HAM estableciendo rangos específicos por edades. Uno de ellos estudió una población de 1298 mujeres coreanas con ciclos menstruales regulares. Las pacientes tenían entre 20 y 50 años y fueron clasificadas en 6 categorías por edad. Los autores observaron que la concentración de HAM, valorada el día 3° del ciclo, disminuyó continuamente con el incremento de la edad (4). Otro estudio, quizás el más importante en cuanto al tamaño de la muestra, valoró HAM en el suero de 17120 mujeres en edad reproductiva, de 24 a 50 años (22). La declinación de los valores de HAM fue lineal y no bifásica, como había sido sugerida por otros investigadores y los niveles de HAM para categorías de edad equivalentes fueron más bajos que los publicados por Hee Yoo J y col. (4). Según estos últimos autores la diferencia se debió a que los valores séricos de HAM reportados por Seiffer DB y col. provenían de mujeres que se encontraban realizando estudios de fertilidad y no eran representativas de la población general. Las pacientes incluidas en nuestro trabajo tenían entre 30 y 40 años. Teniendo en cuenta que todas consultaron por problemas de fertilidad, observamos que las concentraciones de HAM de estas pacientes, fueron similares a las publicados por Seiffer DB y col. para el mismo rango de edad, y que la edad de las mujeres con niveles más altos de HAM fue ligeramente mayor que la de las pacientes con concentraciones menores de la hormona; sin embargo, no hallamos correlación entre los valores de HAM y la edad de las pacientes. Es probable que el número de muestras analizadas sea insuficiente para observar una declinación significativa de los niveles de HAM con la edad.

También se podría atribuir a la amplia variación en los valores de HAM dentro de cada año de edad descrita por Seiffer y col., y que permitió a estos autores sostener el concepto que los niveles de HAM reflejan la reserva folicular en forma relativamente independiente de la edad (22).

La evaluación de la RO tiene gran importancia en la infertilidad y los TRA. En los últimos años, diversos estudios han sugerido que HAM podría ser un posible marcador de la RO y reflejar la edad reproductiva en las pacientes. Si bien la variabilidad de HAM durante el ciclo menstrual es motivo de debate, tiene menos fluctuaciones intra-individuales que otros marcadores séricos, tanto intra-ciclos como inter-ciclos, por lo que la HAM surge como el mejor parámetro para medir la RO (5-8,10,15,23). La mayoría de los estudios han demostrado una asociación entre los niveles de HAM en fase folicular temprana y el número de OR en procedimientos de FIV, siendo el número de OR una buena medida para evaluar la respuesta ovárica a la estimulación hormonal. La HAM fue más específica que FSH como test de RO y particularmente útil en mujeres jóvenes en las que la RO disminuida es subestimada o en las que tienen un riesgo elevado de síndrome de hiperestimulación ovárica (24). Comparando mujeres con respuesta baja a la estimulación hormonal y mujeres con buena respuesta o respuesta normal, numerosos estudios revelaron que el indicador más sensible y específico de RO fue el nivel de HAM en el 3° día del ciclo menstrual (20,25-27). Sin embargo, Takahashi C y col., no encontraron correlación significativa entre HAM sérica y el número de OR. La diferencia con los otros estudios radica en que la valoración de HAM se realizó durante el tratamiento de FIV el mismo día que la recuperación de ovocitos (28). Nuestros resultados, en coincidencia con la mayoría de las publicaciones, mostraron buena correlación entre HAM y la cantidad de OR ($r=0,657$; $p<0,001$), superior a la reportada por Guerif F y col. ($r=0,32$; $p<0,0001$) (21). En las pacientes con niveles más altos de HAM se recuperó un mayor número de ovocitos. A pesar que la estabilidad de HAM durante el

ciclo menstrual ha sido cuestionada recientemente, es importante destacar que los valores de HAM de nuestras pacientes no siempre correspondieron a la fase folicular temprana y aún así tuvimos hallazgos similares a los de la mayoría de los estudios que analizaron HAM en el 3º día del ciclo.

En los procedimientos de FIV se realiza la recuperación de ovocitos y se evalúa su madurez. Los ovocitos que han completado su maduración nuclear (metafase II) y expelido un cuerpo polar son considerados maduros y en condiciones para ser fertilizados. Una compleja cascada de eventos durante el proceso de desarrollo folicular les proporciona a los ovocitos la capacidad de ser sometidos a una fertilización normal y el subsecuente desarrollo embrionario. Se ha sugerido que HAM podría ser predictivo de la calidad de los ovocitos en términos de la madurez nuclear. En nuestro trabajo, de las 71 pacientes que fueron aspiradas, 65 tenían ovocitos maduros en metafase II, coincidiendo los valores más altos de HAM con un mayor número de ovocitos maduros. Nuestros resultados muestran buena correlación entre los niveles de HAM y la cantidad de ovocitos maduros ($r=0,667$; $p<0,001$), en concordancia con la mayoría de los trabajos publicados que reportaron correlaciones variables de 0,33 a 0,80 (16,29-31), excepto un estudio en el que HAM correlacionó, aunque débilmente, con el número de OR ($r=0,32$; $p<0,0001$), pero no lo hizo con la tasa de ovocitos maduros (21).

Numerosos estudios han mostrado también buena correlación entre la tasa de embarazo clínico y la RO cuantitativa medida a través de los niveles HAM. La fuerza de esta asociación es modulada por la edad de la paciente. El éxito de los TRA está determinado conjuntamente por la interacción entre calidad y cantidad de ovocitos. El envejecimiento ovárico resulta de la declinación en la proporción de ovocitos competentes (calidad) y de la disminución en el número de ovocitos disponibles para ser reclutados (cantidad). Por lo tanto, un mayor número de OR por ciclo de FIV tiene más chance de obtener los ovocitos competentes que se requieren para lograr el embarazo. Hazout A y

col. hallaron una asociación fuerte entre los valores más altos de HAM en el día 3° del ciclo y una mayor tasa de embarazos clínicos (16). Otros autores encontraron estrecha relación de HAM con la calidad de ovocitos, el número de ovocitos maduros y la tasa de embarazos (30,32-35). Lehmann y col. demostraron que las pacientes con niveles de HAM $<0,46$ ng/ml (<percentil 25th) tenían una probabilidad de lograr embarazo 2 veces menor que la población de referencia comprendida entre los percentiles 25th y 75th, independientemente de la edad (31).

Sin embargo, existen discrepancias, y otros autores han sostenido que HAM no predice el embarazo. Entre ellos, Smeenk JM y col. concluyeron que HAM fue capaz de predecir el número de ovocitos y el número de embriones pero no la calidad embrionaria ni la chance de embarazo (36). En otro estudio se reportó que, en mujeres <40 años, la tasa de embarazo no fue significativamente diferente en presencia de niveles bajos, intermedios o altos de HAM (37). Wang atribuye estas discrepancias a la diferencia en el tamaño de los grupos estudiados y a la variabilidad de las edades de esas poblaciones. La tasa de embarazo de nuestras pacientes fue 21% y, como se mencionó anteriormente, estuvo cercana a las cifras publicadas por la mayoría de los autores en mujeres de edades similares. También encontramos asociación entre la proporción de mujeres con embarazo positivo y los niveles de HAM; la media de HAM de este grupo fue significativamente más elevada que la del grupo que no logró el embarazo ($2,89 \pm 1,69$ ng/ml vs $1,55 \pm 1,24$; $p=0,02$). Por lo tanto, estos resultados sugieren que HAM podría ser un buen predictor de embarazo en los tratamientos de reproducción asistida de nuestro centro de estudios.

Se ha intentado determinar cuál puede ser el valor mínimo de HAM en mujeres con ROD severa que permita lograr embarazo clínico, lo que es bastante difícil debido que estadísticamente es mucho más bajo el número de embarazos clínicos con éxito y

nacidos vivos en esta población de pacientes (9). Según la publicación de Gnoth C y col., valores de HAM $\leq 1,26$ ng/ml permitieron identificar mujeres con ROD, baja respuesta a la estimulación ovárica y menor probabilidad de embarazo clínico. Estos autores sugieren que cuando los niveles de HAM se hallan entre 0,5 y 1,26 ng/ml se debería realizar también el recuento de folículos antrales para aumentar la especificidad de HAM como predictor (38). Barad DH y col. demostraron que, con concentraciones de HAM $\leq 0,4$ ng/ml, la probabilidad de embarazo fue $< 5\%$, pero aumentó significativamente en mujeres que tenían niveles de HAM entre 0,41 y 0,80 ng/ml (39), y el estudio de Buyuk E y col., encontró que la tasa de embarazo clínico fue mayor en mujeres con niveles de HAM $\geq 0,6$ ng/ml (40). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones revelan que, a valores bajos, HAM conserva su cualidad de buen marcador cuantitativo de la RO, pero es pobre como marcador de la calidad de los ovocitos, perdiendo por lo tanto valor predictivo (14,21,39-41). Dado que el embarazo, en pacientes con ROD severa, puede ocurrir con niveles indetectables de HAM, no se deben usar líneas de corte extremadamente bajas para excluir parejas del tratamiento de FIV. Además, la HAM no debería ser el único criterio usado para determinar si las pacientes con ROD pueden tener acceso a los TRA.

CONCLUSION

La utilización de biomarcadores precisos de respuesta ovárica y embarazos en TRA es de vital importancia en la decisión clínica para elegir la mejor estrategia de estimulación y tratamiento en mujeres infértiles. Nuestros resultados muestran que la evaluación de HAM sérica es un buen predictor del número de OR, del número de ovocitos maduros y, además, podría predecir probabilidades de embarazo en tratamientos de reproducción asistida. Para poder establecer límites de corte de los valores de HAM, sería necesario realizar un estudio multicéntrico con mayor número de pacientes.

BIBLIOGRAFIA

1. Teixeira J, Maheswaran S and Donahoe P. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev.* 2001;22:657-74.
2. Hampl R, Snajderova M, Mardesic T. Antimüllerian hormone (AMH) not only a marker for prediction of ovarian reserve. *Physiol Res.* 2011;60:217-23.
3. Kelsey TW, Wright P, Nelson SM. A validated model of serum anti-Müllerian hormone from conception to menopause. *PLoS ONE.* 2011;6: e 22024.
4. Hee Yoo J, Ok Kim H, Woo Park C, Moon Yang K, Soo Kang. Age specific serum anti-Müllerian hormone levels in 1298 Korean women with regular menstruation. *Clin Exp Reprod Med.* 2011; 38:93-7.
5. La Marca A, G. Stabile, Artenisio AC, Volpe A. Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Human Reprod.* 2006;21:3103-7.
6. Overbeek A, Broekmans FJ, Hehenkamp WJ, Wijdeveld ME, van Disseldorp J, van Dulmen-den Broeder E, Lambalk CB. Intra-cycle fluctuations of anti-Müllerian hormone in normal women with a regular cycle: a re-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2012; 24:664-9.
7. Hadlow N, Longhurst K, McClements A, Natalwala J, Brown SJ, Matson PL. Variation in antimüllerian hormone concentration during the menstrual cycle may change the clinical classification of the ovarian response. *Fertil Steril.* 2013;99:1791-7.
8. Kissell KA, Danaher MR, Schisterman EF, Wactawski-Wende J, Ahrens KA, Schliep K, Perkins NJ, Sjaarda L, Weck J, Mumford SL. Biological variability in serum anti-Müllerian hormone throughout the menstrual cycle in ovulatory and sporadic anovulatory cycles in eumenorrheic women. *Hum Reprod.* 2014;29:1764-72.

9. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:23
10. 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;20:923-7.
11. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian Aging: Mechanisms and Clinical Consequences. *Endocr Rev*. 2009;30:465–93.
12. Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*. 2006;131:1–9.
13. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2015;103:e9-e17.
14. Kedem A, Haas J, Geva LL, Yerushalmi G, Gilboa Y, Kanety H, Hanochi M, Maman E, Hourvitz. Ongoing pregnancy rates in women with low and extremely low AMH levels. A multivariate analysis of 769 cycles. *PLoS One*. 2013;18:e81629.
15. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Arsenio AC, Stabile G, Volpe A. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update*. 2010;16:113-30.
16. Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Serum antimüllerian hormone/müllerian 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;82:1323–9.
17. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004;81:19-25.

18. de Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, Kupka M, Nygren KG, Nyboe Andersen A. Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2010;25:1851-62.
19. Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2010 Assisted Reproductive Technology Fertility Clinic Success Rates Report. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 2012.
20. Bühler K, Naether OGJ, Bilger W. A large, multicentre, observational, post-marketing surveillance study of the 2:1 formulation of follitropin alfa and lutropin alfa in routine clinical practice for assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12:6.
21. Guerif F, Lemseffer M, Couet M-, Gervereau O, Ract V, Royère D. Serum antimüllerian hormone is not predictive of oocyte quality in vitro fertilization. *Ann Endocrinol (Paris).* 2009;70:230-4.
22. Seifer DB, Baker VL, Leader B. Age-specific serum anti-Mullerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States. *Fertil Steril.* 2011; 95:747–50.
23. van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Fauser BJ, Themmen AP, te Velde ER. Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril.* 2005;83:979-87.
24. Barad DH, Weghofer A, Gleicher N. Utility of age-specific serum anti-Müllerian hormone concentrations. *Reproductive BioMedicine Online* 2011;22:284–91.

25. 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;77:468-71.
26. Fiçioğlu C, Kutlu T, Bağlam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2006;8:592-6.
27. Moawad A, Elmawgood HA, Shaeer M. Early follicular anti-müllerian hormone as a predictor of ovarian response during ICSI cycles. *Middle East Fertility Society Journal.* 2010;15:281–7.
28. Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2008;89:586-91.
29. Yassin MM, Sharif FK, Laqqan MM. Anti-müllerian hormone as a predictor of ovarian reserve and ovarian response in IVF women from Gaza strip. *Iran J Reprod Med.* 2013;11:261-6.
30. Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, Keefe DL, Blazar AS. Müllerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. *Hum Reprod.* 2006;21:159-63.
31. Lehmann P, Vélez MP, Saumet J, Lapensée L, Jamal W, Bissonnette F, Phillips S, Kadoch IJ. Anti-Müllerian hormone (AMH): a reliable biomarker of oocyte quality in IVF. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31:493-8.
32. Nelson SM, Yates RW, Fleming R. Serum anti-Müllerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles--implications for individualization of therapy. *Hum Reprod.* 2007;22:2414-21.

33. Blazar AS, Lambert-Messerlian G, Hackett R, Krotz S, Carson SA, Robins JC. Use of in-cycle antimüllerian hormone levels to predict cycle outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205:223.e1-5.
34. Wang JG, Douglas NC, Nakhuda GS, Choi JM, Park SJ, Thornton MH, Michael M Guarnaccia MM, Sauer MV. The association between anti-Müllerian hormone and IVF pregnancy outcomes is influenced by age. *Reproductive BioMedicine Online.* 2010;21:757–61.
35. Majumder K, Gelbaya TA, Laing I, Nardo LG. The use of anti-Müllerian hormone and antral follicle count to predict the potential of oocytes and embryos. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;150:166-70.
36. Smeenk JM, Sweep FC, Zielhuis GA, Kremer JA, Thomas CM, Braat DD. Antimüllerian hormone predicts ovarian responsiveness, but not embryo quality or pregnancy, after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2007;87:223-6.
37. Bhide P, Gudi A, Shah A, Timms P, Grayson K, Homburg R. Anti-Müllerian hormone as a predictor of pregnancy following IVF. *Reproductive BioMedicine Online.* 2013;26:247–52.
38. Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod.* 2008;23:1359-65.
39. Barad DH, Weghofer A, Gleicher N. How predictive of basic pregnancy potential are extremely low levels of anti-müllerian hormone (AMH)?. *Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine 2009.* *Fertil Steril.* 2009;92:S178-9.
40. Buyuk E, Seifer DB, Younger J, Grazi R, Lieman H. Random anti-Müllerian hormone (AMH) is a predictor of ovarian response in women with elevated baseline early follicular follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril.* 2011;95:2369-72.

41. Hussain M, Cahill DJ, Akande V, Gordon U. Outcome of Assisted Reproduction Treatment in Women with Extremely Low Antimullerian Hormone (AMH) Levels. *Open J Obstet Gynecol.* 2014;4:961-6.