

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e

Obstetrícia

**Correlação entre diâmetro folicular e resposta à estimulação
ovariana controlada para Fertilização in vitro**

Camila Karsburg Bessow

Porto Alegre, 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e

Obstetrícia

**Correlação entre diâmetro folicular e resposta à estimulação
ovariana controlada para Fertilização in vitro**

Camila Karsburg Bessow

Orientador: Prof. Dr. João Sabino
Lahorgue da Cunha Filho

Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção
do título de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde: Ginecologia e
Obstetrícia, Faculdade de
Medicina, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2018

Bessow, Camila Karsburg

Correlação entre diâmetro folicular e resposta à estimulação ovariana controlada para fertilização in vitro / Camila Karsburg Bessow. -- 2018.

53 f.

Orientador: João Sabino Lahorgue Cunha Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. follicular output rate. 2. estimulação ovariana controlada. 3. responsividade ovariana. 4. fertilização in vitro. 5. diâmetro folicular. I. Cunha Filho, João Sabino Lahorgue, orient. II. Título.

Agradecimentos

Agradeço à Deus, primeiramente.

Aos meus pais, Beatriz e Darcy (*in memoriam*), que me deram a vida, os melhores exemplos de caráter e trabalho e me incentivaram sempre a estudar e buscar o meu melhor. À minha mãe, especialmente, por ser tão presente e amorosa.

Ao meu noivo Luciano, pelo amor, felicidade e companheirismo de todos os dias.

À Dra Rafaela Donato, pela grande amizade e por ser minha companheira de estudos e de pós graduação.

À toda equipe do Centro de Reprodução Insemine, especialmente Dra Vanessa Genro, Dra Rita Chapon e Dra Tatiane Souza, pela colaboração na coleta de dados. Agradeço também a todos os professores e demais alunos deste Programa de Pós Graduação com quem tive contato durante os últimos dois anos.

Ao meu professor orientador, Dr João Sabino, pelo incansável estímulo ao ensino e à pesquisa e por ter me apresentado à reprodução humana, área que me encanta pela sua complexidade e importância na vida das pessoas.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO.....	12
REVISÃO DA LITERATURA	
1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES.....	14
2. MAPA CONCEITUAL ESQUEMÁTICO.....	15
3. INDUÇÃO DA OVULAÇÃO NA FIV.....	16
4. RESERVA OVARIANA	19
5. FOLLICULAR OUTPUT RATE (FORT)	21
6. RESPONSABILIDADE OVARIANA E DIÂMETRO FOLICULAR	23
JUSTIFICATIVA	24
HIPÓTESES	25
OBJETIVOS	
PRINCIPAL	26
SECUNDÁRIOS	26
REFERÊNCIAS	27
ARTIGO	32
CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
PERSPECTIVAS	49
ANEXOS	51

Lista de Abreviaturas

AFC – Contagem de Folículos antrais / Antral Follicle Count

AFC6 – Contagem de Folículos antrais de 2-6mm

AFC>6 – Contagem de Folículos antrais de 6-10mm

AMH – Anti-Mullerian Hormone

BMI – Body Mass Index

COH - Controlled Ovarian Hyperstimulation

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EOC – Estimulação Ovariana Controlada

FIV – Fertilização in vitro

FORT – Follicular Output Rate

FSH – Hormônio Folículo Estimulante / Follicle-Stimulating Hormone

GnRH – Hormônio liberador de Gonadotrofina

HAM – Hormônio Anti-Mülleriano

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

hMG – Gonadotrofina menopáusica humana

ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozoides

IMC – Índice de Massa Corporal

IVF - In Vitro Fertilization

LH - Hormônio Luteinizante

OMS – Organização Mundial de Saúde

PFC - Preovulatory Follicles

TGF-beta - Fator de Transformação do Crescimento beta

TRA – Tratamentos de Reprodução Assistida

Lista de Figuras

Figura 1. Esquematização gráfica do Mapa conceitual.

Figura 2. Exemplos do cálculo do FORT.

Figuras do Artigo:

Tabela 1. Characteristics and stimulation outcomes from 92 IFV cycles.

Tabela 2. Spearman's Correlation Coefficients among variables and FORT.

Tabela 3. Multiple linear regression analysis among FORT and the variables.

Figura 1. Scatter chart between FORT and AFC6.

Resumo e Palavras-chave

Introdução: A contagem de folículos antrais(AFC) é marcador de reserva e também preditor de resposta ovariana na fertilização in vitro (FIV), importante para prognóstico e individualização do tratamento do casal infértil. A proporção de folículos que foram responsivos ao Hormônio Folículo-Estimulante (FSH) exógeno durante a estimulação ovariana controlada (EOC) é medida através do FORT (Follicular Output Rate), que se relaciona positivamente com desfechos na FIV. Entretanto, o papel dos diferentes diâmetros de folículos antrais no contexto da resposta ovariana ainda é tema pouco explorado.

Objetivo: avaliar o impacto do diâmetro folicular na responsividade ovariana. Para isso, a coorte folicular foi dividida em dois grupos: folículos antrais de 2-6 mm e de 6-10 mm, e esses grupos foram correlacionados com o FORT e outros preditores conhecidos de resposta ovariana. **Métodos:** Foram incluídas mulheres com idade de 18 a 45 anos, com ciclos menstruais regulares e sem anormalidades em ambos os ovários, submetidas à estimulação ovariana controlada para FIV com protocolo com antagonista de GnRH. Foram calculados o FORT, a contagem total de folículos antrais (AFC), número de folículos de 2-6mm (AFC6), número de folículos acima de 6mm (AFC>6), além das características demográficas, hormonais e em relação aos desfechos do tratamento de FIV. Foi realizada correlação entre FORT e AFC6, AFC>6 e demais variáveis possíveis preditoras de resposta ovariana. **Resultados:** A média de idade foi de 36,03 anos (DP± 3,87 anos), a mediana do FORT foi de

40,00%, a mediana da AFC total foi de 9 folículos e a mediana da AFC6 foi de 6 folículos. Houve correlação negativa significativa entre FORT e AFC total ($r = -0,229$, $P= 0,028$) e entre FORT e AFC6 ($r = -0,262$, $P= 0,012$), mas não entre FORT e AFC>6 ($r= -0,051$, $P= 0,628$). Em uma análise multivariada, após controlarmos para idade, AFC>6 e AMH, permaneceu a relação significativa entre o FORT e AFC6 ($P= 0,003$). **Conclusão:** A correlação inversa entre o FORT e os folículos de diâmetro de até 6 mm indica que esses folículos foram menos responsivos ao FSH exógeno, sugerindo o comportamento biológico distinto entre os diâmetros foliculares diferentes e a necessidade de reavaliação da definição de contagem de folículos antrais para uma melhor predição de resposta ovariana.

Palavras-chave: follicular output rate / estimulação ovariana controlada / diâmetro de folículo antral / responsividade ovariana

Abstract and Keywords

Introduction: The antral follicle count (AFC) is a marker of ovarian reserve and also a predictor for in vitro fertilization (IVF) ovarian responsiveness, important for prognosis and treatment individualization. Follicular Output Rate (FORT) evaluates the proportion of follicles that were responsive to exogenous Follicle Stimulating Hormone (FSH), during controlled ovarian stimulation(COH), and is positively related to IVF outcomes. **Objective:** to evaluate if the size of follicular cohort could be a predictor variable for ovarian responsiveness. Therefore, we divided the pool of antral follicles in two groups: 2-6 mm and bigger than 6 mm, and correlate them with FORT and other predictors of ovarian response. **Methods:** Women with 18 to 45 years of age were included, with regular cycles and without morphological abnormality in both ovaries, who underwent controlled ovarian stimulation with antagonist protocol for IVF, and calculate the FORT, total Antral Follicle Count (AFC), the number of follicles ≤ 6 mm (AFC6) and ≥ 6 mm (AFC>6) and other demographic and hormonal features. Correlation was performed between FORT and AFC6, AFC>6 and other variables that could possibly predict ovarian response. **Results:** The mean age (\pm SD) of the women was 36.03 years (\pm 3.87 years), the median FORT was 40.00%, the median total AFC was 9 follicles and the median AFC6 was 6 follicles. We found negative statistically significant correlations between the FORT and total AFC ($r = -0.229$; $P= 0.028$) and between the FORT and AFC6 ($r = -0.262$; $P= 0.012$) but not between the FORT and AFC>6 ($r= -0.051$; $P= 0.628$). In the linear regression, after adjusting for the variables of age, AFC > 6 and AMH, there was still a

significant relationship between the FORT and AFC6 ($P= 0.003$). **Conclusion:** The inverse correlation between FORT and AFC6 indicates that those follicles were less responsive to the exogenous FSH, pointing out the distinct biological behavior among the different antral follicle sizes and the need of a better definition for the antral follicle count in order to improve its capacity of ovarian response prediction.

Keywords: follicular output rate / FORT / controlled ovarian hyperstimulation / antral follicle size / ovarian responsiveness

Introdução

A infertilidade é definida como a ausência de gestação após 12 meses em um casal com prática regular de atividade sexual na ausência de contracepção (1). A incapacidade de gestar é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma questão de saúde pública, sendo capaz de gerar estresse físico e emocional, discriminação e gastos elevados com os tratamentos de reprodução assistida (2). É uma condição que afeta entre 8 a 12% dos casais em idade reprodutiva e tem na fertilização in vitro (FIV) um dos seus principais tratamentos (2, 3).

Uma das peças-chave para o sucesso da FIV é a resposta ao estímulo ovariano controlado. A indução da ovulação tem como objetivo mimetizar e maximizar a etapa fisiológica do ciclo ovariano no intuito de se obter um número considerável de oócitos para fertilização. Dentre as técnicas de indução da ovulação, a estimulação ovariana controlada (EOC) com gonadotrofinas exógenas em combinação com a fertilização in vitro foi um dos maiores avanços no tratamento de casais inférteis nas últimas décadas (4).

O recrutamento e o desenvolvimento folicular em resposta à EOC é etapa fundamental do tratamento de reprodução assistida. A predição dessa resposta ovariana é realizada através de testes de reserva ovariana, que indicam prognóstico e permitem a individualização do tratamento. Tanto uma resposta ovariana exagerada, com risco de síndrome do hiperestímulo ovariano, quanto uma resposta diminuída, podem reduzir as chances de gestação do casal infértil (5).

A reserva ovariana tem mecanismos complexos e recebe influência da idade, de fatores genéticos e ambientais. Diversos marcadores de reserva ovariana tem sido estudados nas últimas décadas, sem que exista um marcador ideal. A contagem de folículos antrais (AFC) e o Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) são considerados atualmente os melhores marcadores de reserva ovariana (6,7,8).

A responsividade ovariana é um dos parâmetros mais estudados em reprodução assistida e tradicionalmente tem sido avaliada como o número de oócitos recuperados na punção ovariana após estímulo com gonadotrofinas. Entretanto, essa medida não avalia propriamente a responsividade ovariana ao estímulo exógeno, pois não leva em consideração o número de folículos antrais presentes antes do início da estimulação. O FORT avalia a proporção de folículos que foram responsivos ao FSH exógeno, já que depende do número de folículos antrais e do número de folículos pré-ovulatórios, e se correlacionou positivamente à taxa de gestação em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (9). Ainda, talvez não apenas a contagem de folículos antrais seja importante, mas também o seu diâmetro.

A função endócrina do folículo parece se relacionar ao seu tamanho, como evidenciado em estudo que relatou produção de AMH por apenas alguns estágios de folículos ovarianos (10) e pela observação de que a quantidade de folículos maiores e menores varia de forma diferente com o aumento da idade da mulher (11)

Revisão da Literatura

1. Estratégia de Busca

A revisão da literatura foi concentrada nos trabalhos em língua inglesa, ou que apresentavam resumo em língua inglesa e que contivessem informações sobre o tema abordado. Essa associação se deu pelo uso das palavras-chave, apresentadas na tabela abaixo. Artigos duplicados foram excluídos na estratégia de busca.

Os estudos foram selecionados nas bases de dados eletrônicos das instituições: PUBMED e SCIELO. Inicialmente foram selecionados os artigos com as palavras-chaves e os demais foram selecionados a partir das referências dos artigos da primeira busca e por serem considerados relevantes sobre o tema em estudo. Ao final da revisão, foram selecionadas 31 referências.

Tabela 1. Estratégias para localizar e selecionar artigos

PALAVRAS-CHAVE	PUBMED	SCIELO
Fertilization in vitro	42900	38919
Antral Follicle Size	4210	3450
Ovarian reserve	3230	2786
Follicular output rate	65	84
Ovarian response AND Antral Follicle Size	670	568

Ovarian response AND Follicular output rate	9	12
---	---	----

2. Mapa conceitual esquemático

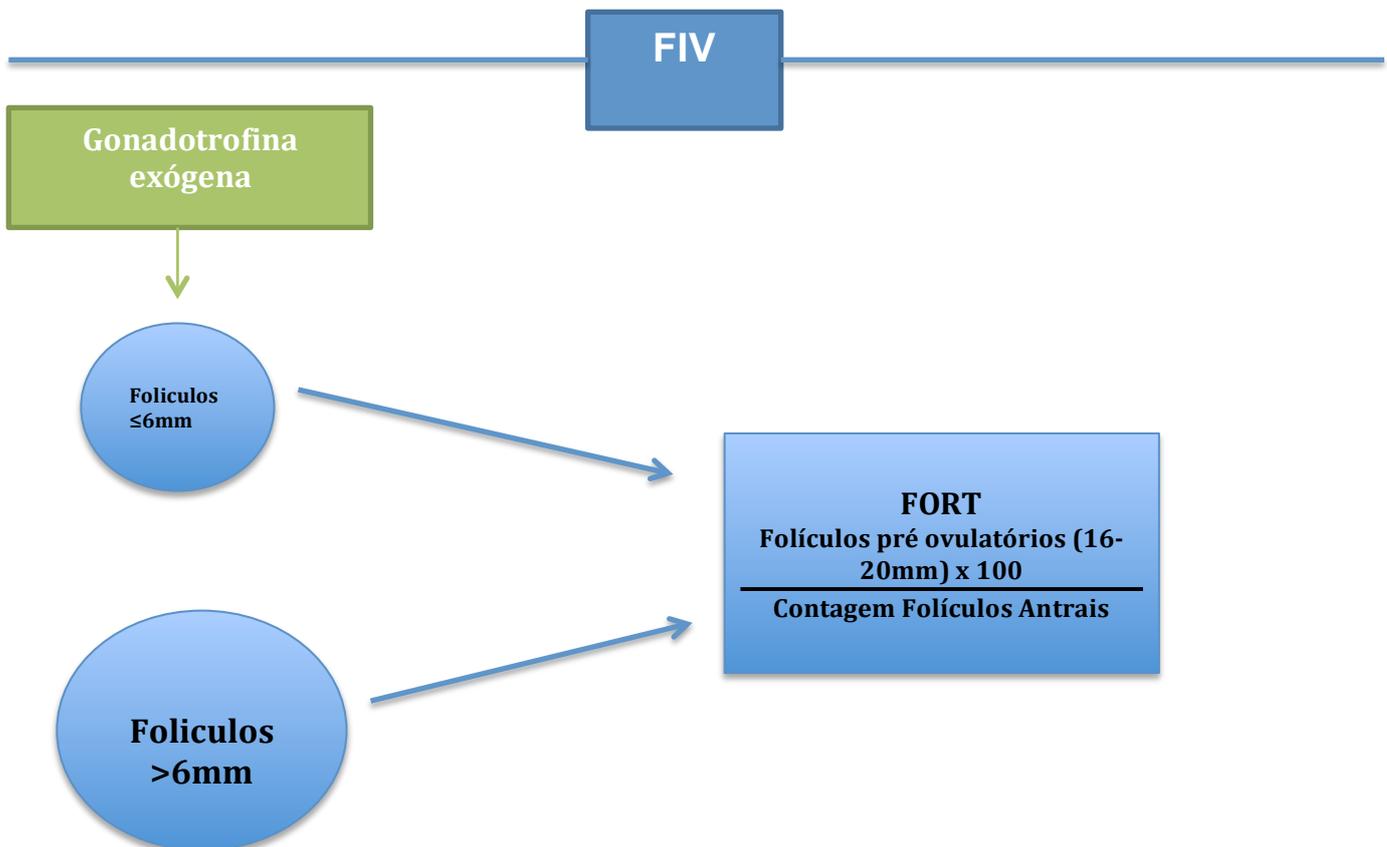


Figura 1. Esquematização gráfica do Mapa conceitual.

O mapa conceitual esquematizado acima demonstra o objetivo desse estudo, que é avaliar o impacto dos diferentes diâmetros de folículos antrais - imediatamente antes do início da administração de gonadotrofinas exógenas para o tratamento de fertilização in vitro, sobre a responsividade ovariana, expressa nesse estudo através do FORT (Follicular Output RaTe), que é a razão entre o número de folículos pré ovulatórios e o número de folículos antrais, expresso em porcentagem.

3. Indução da Ovulação na FIV

A estimulação ovariana controlada (EOC) é a primeira etapa do tratamento de Fertilização in vitro, e consiste na administração de gonadotrofinas exógenas, por via subcutânea, com acompanhamento ecográfico regular para verificação da resposta ovariana e ajuste de dose quando necessário. O objetivo da EOC é o recrutamento e desenvolvimento de múltiplos folículos, diferentemente de um ciclo ovariano normal, em que geralmente apenas um folículo cresce, torna-se o dominante e posteriormente ovulatório (4).

Com o avançar das técnicas de FIV nas últimas décadas, diversas gonadotrofinas exógenas estão disponíveis no mercado: hMG (gonadotrofina menopáusicas humana), FSH-recombinante, FSH-urinário (urofolitropina), FSH-altamente purificado e alfacorifolitropina. As diferenças entre essas gonadotrofinas estão em sua composição e forma de administração. A molécula de hMG é extraída a partir da urina de mulheres menopausadas, e contém igual proporção entre Hormônio Luteinizante (LH) e FSH; As moléculas de FSH-recombinante, FSH-urinário e FSH-altamente purificado foram desenvolvidas a partir de técnicas de DNA recombinante, com individualização do FSH e retirada das outras substâncias presentes na urina ou no plasma humano. Uma das formulações mais recentes, a alfacorifolitropina, criada pela adição do peptídeo carboxiterminal do hCG ao FSH, possibilitou maior biodisponibilidade da medicação, com dose única equivalente a 7 dias de administração das outras drogas, ou seja, é necessário apenas uma dose injetável da alfacorifolitropina na primeira

semana de tratamento, o que torna essa medicação atrativa à paciente (12; 13).

O crescimento de diversos folículos no mesmo ciclo durante a EOC pode gerar prematuramente um aumento expressivo nos níveis de estradiol e consequentemente estimular o pico de LH e a ovulação prematura desses oócitos. No passado, essa foi uma das principais causas das altas taxas de cancelamento de ciclos de FIV (14). Com o advento dos análogos do GnRH e sua utilização para bloqueio do pico prematuro de LH, as taxas de sucesso da FIV cresceram consideravelmente. Tanto agonistas quanto antagonistas do GnRH podem ser utilizados com esse propósito, mas nos protocolos atuais na maioria das clínicas no mundo todo há preferência pelo uso do antagonista do GnRH, pelas suas vantagens em relação ao agonista: menor tempo de tratamento, menor dose de gonadotrofina a ser utilizada, menor risco de síndrome de hiperestímulo ovariano, com taxas semelhantes de gravidez e nascidos-vivos (15). Essas diferenças se devem aos diferentes mecanismos de ação dos análogos; enquanto o agonista necessita ser administrado pelo menos 2 semanas antes do início da EOC, pois age inicialmente como estimulante do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (efeito *flare-up*), para depois promover dessensibilização dos receptores de GnRH e supressão hormonal; o antagonista promove bloqueio imediato (nas primeiras 6h após a administração) do GnRH e só precisa ser iniciado a partir do sexto dia de estimulação (protocolo fixo) ou quando há sinais de aumento da produção de estrogênio endógena (um folículo acima de 14mm ou pelo menos 2 folículos acima de 12mm na ecografia, o chamado protocolo flexível) (15).

No momento em que dois ou mais folículos atingem diâmetro médio de 17mm ou mais (considerados folículos pré-ovulatórios), há indicação de maturação final e indução da ovulação, através da administração subcutânea de hCG (gonadotrofina coriônica humana) e 36h após é realizada a punção ovariana para extração dos oócitos (16). No mesmo dia é realizada a coleta de espermatozoides e a fertilização in vitro dos gametas, que pode ser realizada por meio de fertilização convencional ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). A transferência de embrião/embriões é realizada entre o segundo e o quinto dia de desenvolvimento embrionário, dependendo da qualidade e da quantidade de embriões disponíveis e da idade da mulher no momento da transferência, conforme lei de cada país.

A fase lútea deve ser suplementada com progesterona exógena pelo menos até o resultado do beta-hCG, e em caso de gestação, durante todo o primeiro trimestre (17). Gestação clínica é definida pela evidência de embrião intrauterino com presença de batimentos cardíacos após 5-6 semanas do tratamento.

Portanto, para obtenção da gestação, é fundamental que a fase de estimulação ovariana transcorra a fim de atingir o potencial biológico máximo de cada paciente, sem que ocorram complicações. Sabe-se que o número de oócitos maduros coletados após estímulo ovariano correlaciona-se com taxas de gestação (18).

4. Reserva Ovariana

O número de folículos primordiais presentes nos ovários representam a reserva ovariana de cada mulher, mas não é possível medir diretamente a quantidade de folículos primordiais remanescentes. Portanto, outros testes avaliam de forma indireta a reserva ovariana (19).

A idade feminina é um dos fatores mais importantes relacionados ao prognóstico do tratamento, pois tem relação tanto com a quantidade quanto com a qualidade dos folículos (20). Com as mudanças na sociedade das últimas décadas e o desejo de adiamento da gestação por parte da mulher, cada vez mais casais farão uso de tratamentos de reprodução assistida (TRA), em idade mais avançada. Entretanto, a idade feminina é apenas um dos fatores que influenciam a resposta ovariana, visto que mulheres na mesma faixa etária podem apresentar resultados muito distintos quando submetem-se à TRA. Portanto, é imprescindível a avaliação da reserva ovariana, que fornece prognóstico em relação à resposta à FIV e também auxilia na tomada de decisão em relação à dose e ao tipo de gonadotrofina a ser utilizada, ou seja, na individualização do tratamento (19).

Diversos testes com o objetivo de avaliar a reserva ovariana já foram propostos, embora ainda não exista um teste ideal. Atualmente, a contagem de folículos antrais (AFC) e o Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) são considerados os melhores preditores, e avaliam indiretamente a reserva ovariana de forma quantitativa (21).

A contagem de folículos antrais é uma estimativa da contagem de folículos primordiais, e é realizada por meio da soma do número de folículos

presentes em cada ovário no início da fase folicular do ciclo menstrual, visualizados na ecografia transvaginal. Apesar de ser uma avaliação operador-dependente, estudos já demonstraram que não há variação significativa na avaliação entre operadores diferentes e nem variação significativa entre ciclos menstruais diferentes (22). Mesmo estando amplamente difundida como avaliação de reserva ovariana nas últimas décadas, a AFC ainda não tem consenso em relação à definição dos diâmetros foliculares utilizados. Alguns autores consideram a AFC como o número de folículos de 2-5 mm, enquanto que outros definem a AFC como o número de folículos de 3-8 mm ou entre 2-10 mm de diâmetro médio (23, 24).

O AMH é uma glicoproteína pertencente à família do fator de transformação do crescimento beta (TGF-beta), produzido principalmente pelas células da granulosa de folículos pré antrais e antrais de até 4 -6 mm de diâmetro e seus níveis séricos se correlacionam fortemente com a contagem de folículos antrais (10). Além disso, parece não haver diferença interciclo e pode ser coletado em qualquer momento do ciclo. Os níveis de AMH são quase indetectáveis ao nascimento, atingem os maiores valores após a puberdade e depois decrescem progressivamente com o aumento da idade, até que tornam-se indetectáveis com a menopausa. A ação do AMH não é completamente entendida, mas postula-se que ele iniba o recrutamento inicial de folículos, talvez pela redução da sensibilidade desses folículos ao FSH, ou seja, esse hormônio participa da coordenação do desenvolvimento folicular. Diferentes estudos já demonstraram que o AMH é bom preditor da resposta ovariana em ciclos de FIV, apesar de haver resultados conflitantes em relação à predição de gestação clínica e nascidos-vivos (21, 25).

5. Follicular Output RaTe (FORT)

Os mecanismos que regulam a sensibilidade folicular ao FSH exógeno ainda não são completamente entendidos, mas postula-se que células da granulosa com adequado número e função de seus receptores de FSH também sejam capazes de executar apropriadamente as funções de transdução de sinais, estereidogênese e diferenciação necessárias para o desenvolvimento folicular e posterior fertilização pelo gameta masculino. Portanto, pacientes com maior proporção de folículos responsivos ao FSH devem ter maior chance de tornarem-se grávidas após tratamentos de reprodução assistida (9).

A relação entre responsividade folicular ao FSH e chance de gestação foi evidenciada através do FORT, que é calculado pelo divisão do número de folículos pré-ovulatórios (16-22 mm) no dia do hCG pelo número de folículos antrais (2-10 mm) x 100 (Exemplo do cálculo na Figura 2). Em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, após estratificação do FORT em 3 categorias (< 42%, 42-58% e > 58%), houve taxa de gestação significativamente maior nos grupos com FORT mais altos em relação ao grupo com FORT <42% (9).

A relação entre o FORT e alguns polimorfismos frequentes do receptor do FSH também já foi analisada, e a comparação entre portadoras dos polimorfismos em relação ao grupo controle não demonstrou redução do FORT nessas pacientes (26).

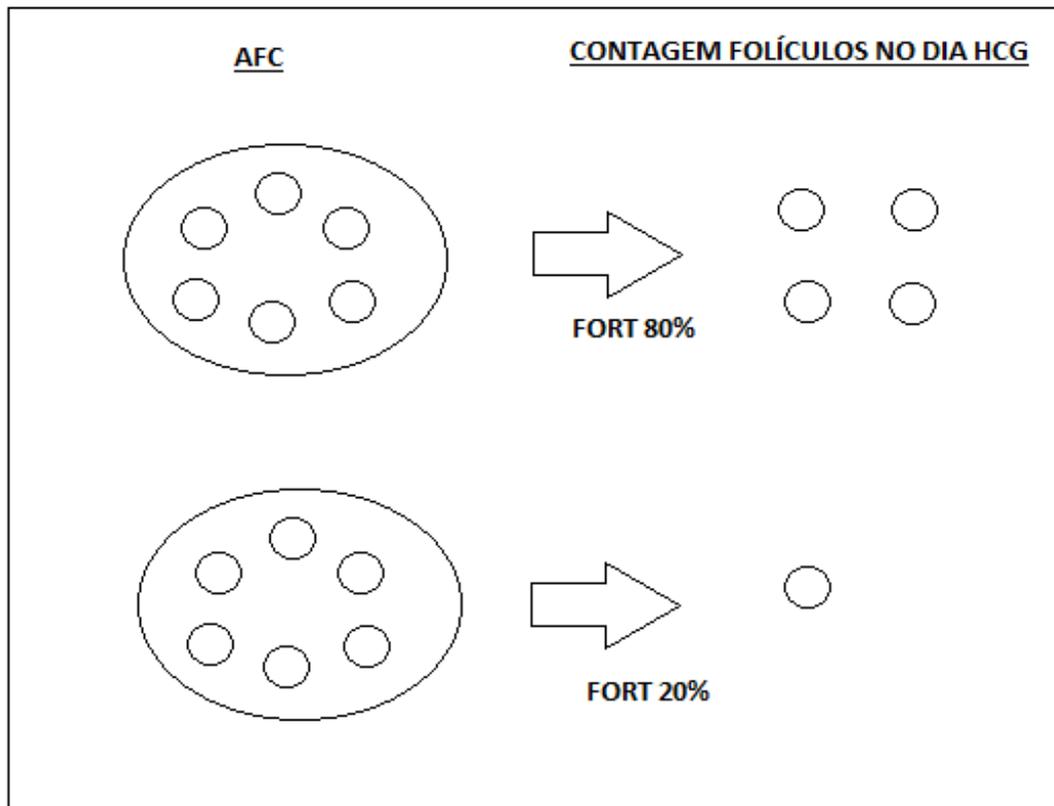


Figura 2. Exemplos do cálculo do FORT.

A estimativa da resposta ovariana é cada vez mais importante durante os TRA, pois com o aumento da idade da mulher há progressivamente maior chance de haver diminuição da reserva ovariana e baixa resposta à estimulação com gonadotrofinas exógenas. Em 2016, o grupo POSEIDON (Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number) propôs uma nova estratificação das pacientes com diminuição da reserva ovariana ou expectativa de baixa resposta, separando-as em quatro grupos – de acordo com a idade, AFC e AMH. Além disso, esse grupo propôs estratégias de manejo para cada grupo de pacientes, no intuito de melhorar os desfechos reprodutivos e individualizar cada vez mais as condutas na reprodução assistida (27).

6. Responsividade Ovariana e Diâmetro Folicular

Avaliar a responsividade ovariana apenas pelo número de oócitos obtidos ao final da EOC - medida muito utilizada em diversos estudos - não indica a quantidade de folículos que responderam à estimulação com FSH exógeno (28). Portanto, a medida da responsividade folicular pelo FORT parece ser mais fidedigna, pois avalia a proporção de folículos que efetivamente responderam ao estímulo hormonal.

Enquanto que a contagem de folículos antrais é muito estudada, o impacto desse diâmetro folicular nos desfechos reprodutivos tem sido pouco explorado na literatura, apesar de sabermos que folículos de tamanhos diferentes têm funções distintas. Por exemplo, Hadasma et al demonstrou que o número de folículos antrais de 2-6mm declina com a idade, enquanto que o número de folículos de 7-10mm se mantém estável com o aumento da idade, sugerindo que os folículos de menor diâmetro representem a capacidade funcional do ovário (11).

Outro estudo, que utilizou ultrassonografia com análise automatizada em 4 dimensões para identificar folículos com diâmetros de < 2 mm até 10 mm, demonstrou correlação significativa entre folículos de até 8 mm e o AMH, com maiores índices de correlação dos folículos de 2 até 6 mm. Os folículos de menor diâmetro também se correlacionaram com o número de oócitos maduros recuperados após a punção ovariana (29).

Em mulheres saudáveis e sem infertilidade de 20 a 40 anos, foi observado que a presença de folículos antrais de 8-10 mm se associaram negativamente aos níveis de AMH e que a quantidade desses folículos aumentou com o aumento da idade, o que é consistente com o encurtamento

da fase folicular causado pelo recrutamento folicular precoce FSH-dependente e aumento dos níveis de estradiol comuns em mulheres em idade mais avançada, sendo uma das manifestações iniciais de depleção da função ovariana (30).

Outra evidência de que o diâmetro folicular é uma medida importante nos TRA é de que durante o EOC para FIV, a heterogeneidade da coorte folicular pode ser deletéria para o sucesso do tratamento, já que os folículos de diâmetros diferentes não atingirão maturação oocitária de forma coordenada. O crescimento multifolicular assincrônico ainda não é completamente entendido, mas o aumento do FSH na transição lúteo-folicular parece ser um dos fatores implicados, já que leva ao recrutamento folicular, ainda na fase lútea, daqueles folículos com maior capacidade de responder ao estímulo do FSH em níveis baixos. Por essa hipótese, a supressão do FSH na fase lútea poderia prevenir essa heterogeneidade folicular. Estudo prévio demonstrou que a administração de estradiol na fase lútea é capaz de reduzir a discrepância de diâmetro entre os folículos durante a EOC para FIV, com consequente maior número de folículos maduros e de embriões (31).

Justificativa

Apesar de diversos estudos avaliarem a contagem do número de folículos antrais como preditor de resposta ovariana, existe pouco na literatura sobre a relevância do diâmetro folicular nesse contexto. Estudo anterior demonstrou que o número de folículos antrais de 2-6mm declina com a idade, enquanto que o número de folículos de 7-10mm se mantém estável com o

aumento da idade, o que sugere que os folículos de menor diâmetro representem a capacidade funcional do ovário, embora outros estudos tenham resultados divergentes (11,30). Então, o objetivo principal deste estudo é avaliar, do ponto de vista fisiológico, se existe algum elemento dentro da coorte folicular (diâmetro folicular) que relaciona-se mais com o desenvolvimento (resposta ovariana) após estímulo controlado com uso de gonadotrofina exógena, medida através do FORT.

Hipóteses

Hipótese Nula

Os diferentes diâmetros de folículos antrais não se correlacionam com a responsividade folicular, medida através do FORT, durante a estimulação ovariana controlada para fertilização in vitro.

Hipótese Alternativa

Os diferentes diâmetros de folículos antrais se correlacionam com a responsividade folicular, medida através do FORT, durante a estimulação ovariana controlada para fertilização in vitro.

Objetivos

Objetivo Principal

- Correlacionar os dois grupos de diâmetros foliculares (2-6mm e 6,1-10mm) ao FORT.

Objetivos Secundários

- Correlacionar o FORT à outros fatores que podem influenciar a resposta folicular, como a AFC total, AMH, FSH, IMC e idade.

Referências

1. Lindsay, T.J & Vitrikas, K. R. Evaluation and treatment of infertility. *Am. Fam. Physician* **91**, 308-314 (2015).
2. Datta, J. Et al. Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 woman and men. *Hum. Reprod.* **31**, 2108-2118 (2016).
3. Inhorn, M.C. & Patrizio, P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive Technologies and global movements in the 21st century. **21**, 411-426 (2015).
4. Fauser, B. C. J. M. & Van Heusden, A. M. Manipulation of human ovarian function: Physiological concepts and clinical consequences. *Endocr. Rev.* (1997).
5. La Marca, A. & Sunkara, S. K. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: From theory to practice. *Hum. Reprod. Update* **20**, 124–140 (2014).
6. Hansen, K. R., Hodnett, G. M., Knowlton, N. & Craig, L. B. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil. Steril.* **95**, 170–175 (2011).
7. Moro, F. et al. Anti-Mullerian hormone concentrations and antral follicle counts for the prediction of pregnancy outcomes after intrauterine insemination. *Int J. Gynecol. Obstet.* **133**, 64-68 (2016).
8. Alson, S.S.E., Bungum, L.J., Giwercman, A. & Henic, E. Anti-mullerian hormone leves are associated with live birth rates in ART, but the predictive

ability of anti-mullerian hormone is modest. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **225**, 199-204 (2018).

9. Gallot, V. *et al.* Antral follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone administration assessed by the Follicular Output RaTe (FORT) may predict in vitro fertilization-embryo transfer outcome. *Hum. Reprod.* **27**, 1066–1072 (2012).

10. Weenen, C. *et al.* Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: Potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol. Hum. Reprod.* **10**, 77–83 (2004).

11. Haadsma, M. L. *et al.* The number of small antral follicles (2-6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum. Reprod.* **22**, 1925–1931 (2007).

12. Devroey P, Boostanfar R, Koper NP, Mannaerts BMJL, IJzerman-Boon PC, Fauser BC, on behalf of the ENGAGE Investigators. A double-blind, non-inferiority RCT comparing corifollitropin alfa and recombinant FSH during the first seven days of ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol. *Hum Reprod*; **24(12)**: 3063–3072 (2009).

13. Fauser BC, Mannaerts BM, Devroey P, Leader A, Boime I, Baird DT. Advances in recombinant DNA technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. *Hum Reprod Update* ; **15(3)**: 309-21 (2009).

14. Pelinck, M. J., Hoek, A., Simons, A. H. M. & Heineman, M. J. Efficacy of natural cycle IVF: A review of the literature. *Human Reproduction Update* **8**, 129–139 (2002).

15. Hg, A. *et al.* Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology (Review). *Cochrane* (2016).
16. Morley L, Tang T, Yasmin E, *et al.* Timing of human chorionic gonadotrophin (hCG) hormone administration in IVF protocols using GnRH antagonists: a randomized controlled trial. *Hum Fertil* ;**15**:134–139 (2012).
17. Shapiro D, Boostanfar R, Silverberg K, Yanushpolsky EH. Examining the evidence: progesterone supplementation during fresh and frozen embryo transfer. *Reprod Biomed Online*; **29**:S1-14 (2014).
18. Sunkara, S. K. *et al.* Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: An analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum. Reprod.***26**,1768–1774 (2011).
19. Broekmans, F. J., Kwee, J., Hendriks, D. J., Mol, B. W. & Lambalk, C. B. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum. Reprod. Update* **12**, 685–718 (2006).
20. Broekmans, F. J., Soules, M. R. & Fauser, B. C. Ovarian aging: Mechanisms and clinical consequences. *Endocr. Rev.* **30**, 465–493 (2009).
21. La Marca, A. & Sunkara, S. K. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: From theory to practice. *Hum. Reprod. Update* **20**, 124–140 (2014).
22. Hansen, K. R., Morris, J. L., Thyer, A. C. & Soules, M. R. Reproductive aging and variability in the ovarian antral follicle count: Application in the clinical setting. *Fertil. Steril.* (2003).
23. Scheffer, G. J. *et al.* The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum. Reprod.* **18**, 700–706 (2003).

24. Laszlo, F. *et al.* Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: A prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil. Steril.* **77**, 328–336 (2002).
25. Nardo, L. G. *et al.* Circulating basal anti-Müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* **92**, 1586–1593 (2009).
26. Genro, V. K., Matte, U., De Conto, E., Cunha-Filho, J. S. & Fanchin, R. Frequent polymorphisms of FSH receptor do not influence antral follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone administration as assessed by the Follicular Output RaTe (FORT). *J. Assist. Reprod. Genet.* **29**, 657–663 (2012).
27. Humaidan, P., Alviggi, C., Fischer, R. & Esteves, S. C. The novel POSEIDON stratification of ‘Low prognosis patients in Assisted Reproductive Technology’ and its proposed marker of successful outcome. *F1000Research* **5**, 2911 (2016).
28. Selcuk, S., Bilgic, B. E., Kilicci, C., Kucukbas, M. & Cam, C. Comparison of ovarian responsiveness tests with outcome of assisted reproductive technology – a retrospective analysis. (2018).
29. Jayaprakasan, K. *et al.* The cohort of antral follicles measuring 2-6 mm reflects the quantitative status of ovarian reserve as assessed by serum levels of anti-Müllerian hormone and response to controlled ovarian stimulation. *Fertil. Steril.* **94**, 1775–1781 (2010).
30. Bentzen, J. G. *et al.* Ovarian antral follicle subclasses and anti-Müllerian hormone during normal reproductive aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 1602–1611 (2013).

31. Fanchin, R. *et al.* Luteal estradiol pre-treatment coordinates follicular growth during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists. *Hum.Reprod.*(2003).

Artigo

Antral follicle responsiveness after controlled ovarian stimulation assessed by the follicular Output RaTe (FORT) is correlated with antral follicles with a diameter smaller than 6mm

Abstract

Introduction: The antral follicle count (AFC) is a marker of ovarian reserve and also a predictor for in vitro fertilization (IVF) ovarian responsiveness, important for prognosis and treatment individualization. Follicular Output RaTe (FORT) evaluates the proportion of follicles responsive to exogenous follicle stimulating hormone (FSH) during controlled ovarian stimulation, and it is positively related to the outcomes of IVF. Our objective was to evaluate whether the diameter of the follicular cohort could be a predictor variable for ovarian responsiveness. Therefore, we divided the pool of antral follicles into two groups, those up to 6 mm and those greater than 6 mm, and analysed their correlations with the FORT. *Methods:* We studied 92 patients (age range: 26 to 45 years) who had regular cycles and no morphological abnormality in either ovary and who underwent controlled ovarian stimulation with antagonist protocol for IVF. We calculated the FORT, total antral follicle count (AFC) and numbers of follicles that were ≤ 6 mm (AFC6) and > 6 mm (AFC 6,1-10mm). *Results:* The mean age (\pm SD) of the women was 36.03 years (± 3.87 years), the median FORT was 40.00%, the median total AFC was 9.00 follicles and the median AFC6 was 6.00 follicles. We found correlation between the FORT and total AFC ($r = -0.229$, $P 0.028$) and between the FORT and AFC6 ($r = -0.262$, $P 0.012$) but not between the FORT and AFC >6 ($r = -0.051$, $P 0.628$). In the multivariable linear

regression, after adjusting for the variables of age, AFC > 6 and AMH, we found a significant relationship between the FORT and AFC6 ($P= 0.003$).

Conclusions: The inverse correlation between FORT and AFC6 suggests that those follicles were less responsive to the exogenous FSH, pointing out the distinct biological behavior among the different antral follicle sizes and the need of a better definition for the antral follicle count in order to improve its capacity of ovarian response prediction.

Keywords: follicular output rate; FORT; controlled ovarian hyperstimulation; antral follicle size; ovarian responsiveness.

Introduction

Follicular recruitment and development in response to controlled ovarian hyperstimulation (COH) with gonadotropins are essential in the treatment of infertility with assisted reproductive techniques (1). The prediction of this ovarian response, which is evaluated through the ovarian reserve, is fundamental for both prognosis and treatment individualization.

Treatment individualization entails selecting the best GnRH analogue protocol and the best initial gonadotropin dose to achieve the ideal ovarian response because both low and hyper-responses are known to potentially lead to cycle cancellation and increased costs (2). While a low ovarian response may decrease the chance of pregnancy, an exaggerated response presents the risk for the development of ovarian hyperstimulation syndrome (3, 4, 5).

Ovarian reserve has complex mechanisms that can be influenced by age, genetics and environmental factors (6). Several markers of ovarian reserve have been studied in the last few decades, but an ideal marker still has not been established. Response prediction through ovarian reserve testing is superior to that through chronological age alone. The antral follicle count (AFC) and anti-Müllerian hormone (AMH) are currently considered to have the best sensitivity and specificity to predict the ovarian response, despite them having 10%-20% false-positive rates (7). Since ovarian responsiveness seems to be influenced by many factors, nomograms, based mostly on the age and AMH, AFC and day 3 FSH levels of women, were developed in the past few years to determine the individualized FSH starting dose in IVF cycles to reduce costs and improve the chances of pregnancy (8, 9).

Ovarian responsiveness is one of the most commonly studied parameters in clinical research concerning IVF treatment (10). Traditionally, the number of oocytes retrieved is the main outcome measure of ovarian responsiveness to gonadotrophin stimulation (5). However, the number of pre-ovulatory follicles obtained at the end of COH is not a reliable reflection of the antral follicle sensitivity to FSH, and it is strongly correlated with the number of antral follicles before ovarian stimulation (11). Although, maybe not only the number of antral follicles, but also their size is important. The Follicular Output RaTe (FORT) evaluates the proportion of follicles that were responsive to FSH and is calculated by dividing the number of preovulatory follicles (16-20 mm) × 100 by the antral follicle count (3-8 mm), and it is known to be correlated to the outcomes of IVF, including pregnancy rates (12).

The distinction of various size categories may be relevant since several studies show that the endocrine function of a follicle is related to its size. (13, 14). A previous study reported that pregnant patients had the highest numbers of antral follicles between 5 and 10 mm. (15). Another study demonstrated that the number of follicles of 2-6 mm declines with age but that the number of follicles of 7-10 mm remains stable, suggesting that follicles smaller than 6 mm may represent the functional capacity of the ovary (14). Mechanisms of the sensitivity of antral follicles to FSH remain to be completely elucidated. However, an adequate responsiveness to FSH is a characteristic of healthy and differentiated granulosa cells (16,17).

The main objective of this study was to evaluate whether the pool of follicles up to 6 mm or larger than 6 mm correlates better with the ovarian response to the controlled stimulus, evaluated through the FORT.

The secondary objectives of this study were to evaluate the correlation among the FORT and other factors that can influence ovarian responsiveness, such as age, body mass index (BMI), and the levels of AMH and FSH.

Materials and Methods

Subjects

We prospectively studied 92 patients, ranging from 26 to 45 years of age, who underwent COH for IVF + embryo transfer (ET) from January 2015 to August 2017. All of the patients met the following inclusion criteria: 1) both ovaries were present, morphological abnormalities (such as cysts, endometriomas, etc.) were absent, and transvaginal ultrasound scans having adequate visualization; 2) regular menstrual cycles lasting between 25 and 35 days. The exclusion criteria were: 1) current or past diseases affecting the

ovaries or those affecting the secretion, clearance, or excretion of gonadotropin or sex steroids; 2) clinical and/or biological signs of hyperandrogenism; 3) diagnosis of polycystic ovarian syndrome.

Local institutional review board approvals for the use of clinical data for research studies were obtained (project number: 18-0159).

COH and IVF-ET Protocol

Patients were submitted to COH with a flexible GnRH antagonist protocol (18). In brief, between day 1 and day 3 of the menstrual cycle, the gonadotropin, either Elonva 100 IU or Elonva 150 IU (Alfacorifolitropina, Merck & Co), was administered. The choice of the gonadotropin dose was decided based on patient's weight: 100 IU was selected for patients weighing less than or equal to 60 kg, and 150 IU was selected for patients weighing greater than 60 kg. According to the follicular response and after the seventh day of the COH, Menopur (human menotropin gonadotropin, hMG, Ferring) was used if necessary (75–300 IU). GnRH antagonist (Orgalutran 0,25 mg, Schering Plough) was started when a follicle reached 12 mm. Human chorionic gonadotropin (hCG) was administered as soon as ≥ 2 preovulatory follicles (16-22 mm in diameter) were observed. Oocytes were retrieved by transvaginal ultrasound-guided aspiration 36 hours after hCG administration. The luteal phase was supported with 600 mg/day micronized progesterone administered continuously by the vaginal route, starting on the evening of the embryo transfer. The embryo(s) transfer was performed on day 2, 3 or 5, depending on embryo development. Clinical pregnancy was defined as the

presence of an intrauterine embryo with cardiac activity at around 6 weeks after treatment.

FORT calculation

The calculation of the FORT is also explained elsewhere (12). The FORT was calculated by using the ratio between the number of preovulatory follicles (PFC) on hCG day 100 and the number of AFC at baseline. The choice of considering only the 16-22 mm follicles for the calculation of the FORT was determined in a previous investigation by our group (13) and represented a methodological attempt for discriminating the follicles that were the most FSH-responsive among the cohort of small antral follicles.

Ultrasound Measures

The antral follicular size and count assessments were performed with a 5 - 6 MHz transvaginal probe Famio 5 (Toshiba, Japan) prior to gonadotropin administration on menstrual days 1-3. The antral follicle count was defined as the number of follicles with a diameter of 2-10 mm. The follicular size was given as the mean of the two largest diameters in the same plane and perpendicular to each other. In this paper, our baseline AFC count was divided into follicles with a diameter of 6mm or less and those with a diameter greater than 6 mm. The follicles with a diameter of 6 mm or less are represented by AFC₆, and the follicles with a diameter larger than 6 mm and up to 10 mm were represented by AFC > 6.

Statistics

The measure of central tendency used for parametric data was the mean, and the measure of variability used was the standard deviation (SD).

The median and the minimum and maximum values were used when normality could not be ascertained. The Gaussian distribution was assessed by the Shapiro-Wilk test. Moreover, we performed a multivariable analysis considering FORT as a dependent variable and AFC, AFC6, AFC > 6, AMH, BMI, FSH and age as independent variables. The relationship between two continuous variables was assessed by a correlation analysis when they were independent from each other and by simple regression when there was a dependent relationship between the variables. Spearman's test was used to determine if the correlation coefficients (r) were significantly different from zero. Considering a correlation coefficient of > 0.3 and a power of 80%, the sample size calculation was 85 patients. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. The data were analysed with SPSS 18.0 [SPSS Inc., released 2009, PASW Statistics for Windows, version 18.0, Chicago].

Results

The study population consisted of 92 women. The characteristics and reproductive outcomes of the patients are shown in Table 1. At the time of inclusion, the age of the women was 36.03 ± 3.87 years (mean \pm SD). At baseline, the AFC median was 9.00 follicles (range: 1-26 follicles), AFC6 median was 6.00 follicles (range: 0-25 follicles) and AFC > 6 median was 2.00 follicles (range: 0-12 follicles). Overall, the median FORT was 40.00 % (range: 10 % – 100 %). A median of 5.00 oocytes (range: 0-30 oocytes) were retrieved. The median AMH level was 1.69 ng/dL (range: 0.09 - 16.50 ng/dL), and the median FSH level was 6.95 ng/dL (range: 1.50 - 12.50 ng/dL). The median BMI was 22.40 kg/m² (range: 19.00 - 31.20 kg/m²).

The indications for IVF-ET were male factor (30.4%), tubal factor (27.2%), multiple causes (19.5%), endometriosis (18.5%) and unexplained infertility (4.3%).

In relation to the gonadotropin dose that was administered at the beginning of the cycle, 75 (81.5%) of the women received the 150 IU dose of Elonva, and 17 (18.5%) received the 100 IU dose of Elonva. After the seventh day of the Elonva administration, 35% of the women needed an additional dose of hMG. The clinical pregnancy rate was 21 of the 84 who performed embryo transfer (25%).

We analysed the correlation between the FORT and the size of the follicular pool in our main objective, and we also analysed the correlation between the FORT and other predictors of follicular responsiveness as secondary objectives. The FORT and total AFC and the FORT and AFC6 were inversely correlated at a $P= 0.05$ level of significance ($r = - 0.229$ and $r = - 0.262$, respectively). There was no correlation between the FORT and AFC > 6 ($r= - 0.051$, $P= 0.628$).

As expected, according to our previous study, there was no significant correlation between FORT and age, FORT and BMI, or FORT and FSH ($r=0.085$, $P 0.420$; $r= -0.156$, $P 0.161$; $r= 0.019$, $P 0.871$, respectively). FORT and number of mature oocytes (MII) were significantly correlated ($r= 0.270$, $P 0.011$). Table 2 shows the Spearman's correlation coefficients and P values of the analyses.

To verify whether the relationship between the AFC6 and FORT was independent, we performed a linear regression, adjusting for the remaining variables (age, AFC > 6, and AMH), and we found a significant relationship

between the two variables ($P=0.003$), shown in table 3. The Figure 1 shows the scatter chart between FORT and AFC6, demonstrating the inverse relation of those two parameters.

Discussion

The present investigation aimed to verify whether the responsiveness of antral follicles to gonadotropin is correlated with the size of those follicles. Previous studies have demonstrated that the number of antral follicles up to 6 mm declines with age, differently from the follicles with a diameter greater than 7 mm. Therefore, suggesting that the number of small antral follicles represents the functional ovarian reserve, we divided the total antral follicle count of our cohort in two groups: the follicles with a diameter of 6 mm or less and the follicles with a diameter > 6 mm to compare their responsiveness (14, 19).

The FORT was positively related to the outcomes of IVF, including pregnancy, in normo-cycling women (12,13), and it can be considered a qualitative marker of follicular responsiveness. Despite several studies having demonstrated a significant predictive value for the antral follicle count in the ovarian response rate and pregnancy rates of patients undergoing IVF treatment (20, 21), there are very few reports in the literature about the predictive value of the antral follicle size in ovarian responsiveness, and none of them have used the FORT as the measure of responsiveness.

We demonstrated that the AFC6 had a significant negative correlation with the FORT, but there was no correlation between FORT and AFC >6 . From those results, we can suppose that the bigger the number of smaller antral

follicles, the lower their sensitivity to exogenous FSH, maybe because of the inhibitory effect of the AMH over those follicles. Also, the absence of correlation between FORT and AFC>6 indicates that those follicles could be already atresic, which agrees with findings of another study (22).

The findings of our paper are different from the results of Haadsma et al., which show that the follicles under 6 mm are the ones correlated with ovarian responsiveness, but the differential of our study is that we used a better parameter of ovarian response, the FORT, while their study used the clomiphene citrate challenge and inhibin B tests, both of which are no longer used because of their low accuracy in predicting the ovarian response or other reproductive outcomes (23).

The antral follicle count has been used for predicting the ovarian response and for creating an individualized dose adjustment, but a recent multicentre prospective cohort study with two embedded randomized clinical trials failed to demonstrate better live birth rates from an individualized FSH strategy compared to that from a standard FSH strategy based on the AFC results (24). Perhaps, if only the small antral follicles had been used, the outcome results would have been different.

Results from a study by Lai et al. suggest that the antral follicular size could be a better predictive marker than the basal FSH concentration and BMI during IVF treatment (1). The same study, in order to assess the impact of antral follicle size on the IVF outcomes, categorized patients into four groups according to the antral follicle size (2-6 mm, 6-7 mm, 7-8 mm and 8-10 mm) and showed that those with an antral follicle size of 6-7 mm had significantly higher AFC, oocyte retrieval and fertilization, and grade I/II embryos compared

with the other groups. In addition, there was lower transfer cycle cancellation rate in the group with the antral follicle size of 6-7 mm, despite there being no differences in the implantation rates and clinical pregnancy rates among the groups, probably due to the sample size (1).

Some limitations of this study need to be highlighted, such as the absence of the power to correlate the antral follicle size with the main outcomes of interest in human reproduction, the pregnancy and live birth rates, and the fact that an interobserver difference in ultrasound measures can exist, especially because we used manual bidimensional ultrasound equipment. Additionally, studies with novel ultrasound technologies and among other populations, such as those of polycystic ovaries patients and those with different IVF stimulation protocols, are necessary to endorse the use of the antral follicle size as a predictor of ovarian responsiveness (25).

In light of the lack of evidence about the rule of follicular size over the COH, this is one more indication of its importance, and additional clinical and basic studies are needed to challenge the present results.

In conclusion, the present findings indicate that ovarian responsiveness, herein represented by the FORT, is inversely correlated with smaller antral follicles, which may express the pool of follicles that are less susceptible to FSH stimulation, in a prospective cohort of normo-cycling women. This is a pioneer result that should be verified in a clinical trial and could provide additional information about the prediction of ovarian responsiveness and a more individualized treatment for patients starting COH.

Figures

Table 1. Characteristics and stimulation outcomes from 92 IFV cycles

	Mean \pm SD	Median	Range	Normal distribution
Age (yr)	36.03 \pm 3.87			Yes
BMI (kg/m ²)		22.40	19-31.20	No
FORT (%)		40.00	10-100	No
AMH (ng/mL)		1.69	0.09-16.50	No
Basal FSH (IU/L)		6.95	1.50-12.30	No
Total AFC		9.00	2-25	No
AFC ₆		6.00	0-25	No
AFC>6		2.00	0-12	No
No. of oocytes retrieved		5.00	0-30	No
No. of MII oocytes		4.50	0-28	No
No. of embryos		3.00	0-24	No

IVF, in vitro fertilization; SD, standard deviation; BMI, body mass index; FORT, Follicular Output Rate; AMH, anti-Müllerian hormone; FSH, Follicle-stimulation hormone; AFC, antral follicle count; AFC₆, Antral follicle count up to 6mm; AFC>6, antral follicle count over 6mm; MII, metafase II.

Table 2. Spearman's Correlation Coefficients among variables and FORT

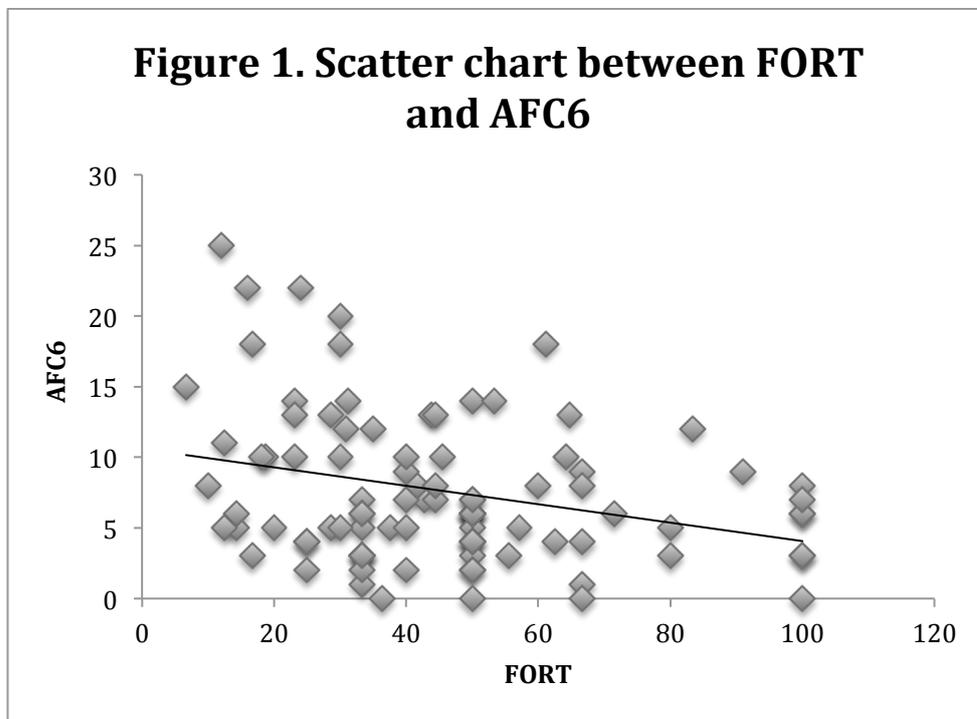
Variable	R	P value
Age	0.085	0.420
BMI	-0.156	0.161
AFC	-0.229	0.028*
AFC ₆	-0.262	0.012*
AFC>6	-0.051	0.628
AMH	-0.137	0.225
FSH	0.019	0.871

FORT, Follicular Output Rate; BMI, body mass index; AFC, antral follicle count; AFC₆, antral follicle count up to 6mm; AFC>6, antral follicle count over 6mm; AMH, anti-Müllerian hormone; FSH, Follicle-stimulation hormone; * Indicates the correlations with statistical significance.

Table 3. Multiple linear regression analysis among FORT and the variables

	β -coefficient	95% Confidence Interval		P-value
Age	0.226	-1.196	1.647	0.752
AMH	0.680	-1.303	2.662	0.494
AFC6	-1.718	-2.859	-0.577	0.004 *
AFC>6	0.010	-2.106	2.126	0.992

FORT, Follicular Output RaTe; AMH, anti-Müllerian hormone; AFC6, Antral follicle count up to 6mm; AFC>6, antral follicle count over 6mm. * Indicates the correlation with statistical significance.



References

1. Lai, Q. *et al.* The significance of antral follicle size prior to stimulation in predicting ovarian response in a multiple dose GnRH antagonist protocol. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **6**,258–266 (2013).
2. La Marca, A. & Sunkara, S. K. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: From theory to practice. *Hum. Reprod. Update* **20**,124–140 (2014).
3. van der Gaast, M. H. *et al.* Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reprod. Biomed. Online* **13**,476–480 (2006).
4. Aboulghar, M. A. & Mansour, R. T. Ovarian hyperstimulation syndrome: Classifications and critical analysis of preventive measures. *Hum. Reprod. Update* **9**,275–289 (2003).
5. Sunkara, S. K. *et al.* Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: An analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum. Reprod.* **26**,1768–1774 (2011).
6. Tal, R., Seifer, D. B., Tal, R. & Seifer, D. B. Potential mechanisms for racial and ethnic differences in antimüllerian hormone and ovarian reserve. *Int. J. Endocrinol.* **2013**,818912 (2013).
7. Broekmans, F. J., Kwee, J., Hendriks, D. J., Mol, B. W. & Lambalk, C. B. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum. Reprod. Update* **12**,685–718 (2006).
8. Lensen, S. F. *et al.* Individualised gonadotropin dose selection using markers of ovarian reserve for women undergoing in vitro fertilisation plus intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI). *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2018**, (2018).

9. Nyboe Andersen, A. *et al.* Individualized versus conventional ovarian stimulation for in vitro fertilization: a multicenter, randomized, controlled, assessor-blinded, phase 3 noninferiority trial. *Fertil. Steril.***107**,387–396.e4 (2017).
10. Li, H. W. R., Lee, V. C. Y., Ho, P. C. & Ng, E. H. Y. Ovarian sensitivity index is a better measure of ovarian responsiveness to gonadotrophin stimulation than the number of oocytes during in-vitro fertilization treatment. *J. Assist. Reprod. Genet.***31**,199–203 (2014).
11. Tomás, C., Nuojua-Huttunen, S. & Martikainen, H. Pretreatment transvaginal ultrasound examination predicts ovarian responsiveness to gonadotrophins in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.***12**,220–223 (1997).
12. Gallot, V. *et al.* Antral follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone administration assessed by the Follicular Output RaTe (FORT) may predict in vitro fertilization-embryo transfer outcome. *Hum. Reprod.***27**,1066–1072 (2012).
13. Genro, V. K. *et al.* Serum anti-Müllerian hormone levels are negatively related to Follicular Output RaTe (FORT) in normo-cycling women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Hum. Reprod.***26**,671–677 (2011).
14. Haadsma, M. L. *et al.* The number of small antral follicles (2-6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum. Reprod.***22**,1925–1931 (2007).
15. Pohl, M. *et al.* Number and size of antral follicles as predictive factors in vitro fertilization and embryo transfer. *J. Assist. Reprod. Genet.***17**,315–318 (2000).

16. Yamoto, M., Shima, K. & Nakano, R. Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Horm. Res.***37**,5–11 (1992).
17. Gougeon, A. Régulation de l'initiation de la croissance folliculaire. *Gynecol. Obstet. Fertil.***39**,511–513 (2011).
18. Olivennes, F. *et al.* Safety and efficacy of a 3 mg dose of the GnRH antagonist cetrorelix in preventing premature LH surges: Report of two large multicentre, multinational, phase IIIb clinical experiences. *Reprod. Biomed. Online*(2003).
19. Scheffer, G. J. *et al.* Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil. Steril.***72**,845–851 (1999).
20. Ashrafi, M. *et al.* Predictive values of anti-müllerian hormone, antral follicle count and ovarian response prediction index (ORPI) for assisted reproductive technology outcomes. *J. Obstet. Gynaecol. (Lahore)*. **37**, 82–88 (2017)
21. Broer, S. L., Mol, B. W. J., Hendriks, D. & Broekmans, F. J. M. The role of anti-müllerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil. Steril.* 91, 705–714 (2009)
22. Jayaprakasan, K. *et al.* The cohort of antral follicles measuring 2-6 mm reflects the quantitative status of ovarian reserve as assessed by serum levels of anti-Müllerian hormone and response to controlled ovarian stimulation. *Fertil. Steril.* **94**, 1775–1781 (2010).

23. Maheshwari, A., Gibreel, A., Bhattacharya, S. & Johnson, N. P. Dynamic tests of ovarian reserve: a systematic review of diagnostic accuracy. *Reprod. Biomed. Online* **18**,717–734 (2009).
24. van Tilborg, T. C. *et al.* Individualized FSH dosing based on ovarian reserve testing in women starting IVF/ICSI: a multicentre trial and cost-effectiveness analysis. *Hum. Reprod.* **32**, 2485–2495 (2017).
25. Peres Fagundes, P. A. *et al.* Evaluation of three-dimensional SonoAVC ultrasound for antral follicle count in infertile women: Its agreement with conventional two-dimensional ultrasound and serum levels of anti-Müllerian hormone. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **15**, 1–7 (2017).

Considerações Finais

A predição da resposta ovariana na FIV é um parâmetro cada vez mais importante na reprodução assistida, pois permite ao médico estimar o prognóstico do casal infértil antes da realização do tratamento e também programar uma abordagem individualizada em relação ao tipo de medicação e à dose a ser utilizada na estimulação ovariana controlada. Os testes de reserva ovariana atualmente mais utilizados, a contagem de folículos antrais e o Hormônio Anti-Mulleriano, ainda tem limitações na predição da responsividade ovariana. Outro parâmetro vem sendo utilizado para avaliar a responsividade folicular ao estímulo com gonadotrofinas exógenas, o FORT,

calculado através da divisão entre o número de folículos pré-ovulatórios e o número de folículos antrais observados no ciclo de FIV. Em estudo prévio, o FORT foi significativamente mais alto em mulheres que engravidaram, em relação às mulheres que não tiveram gestação.

No presente estudo, relatamos a correlação negativa entre os folículos de diâmetro de até 6 mm e o FORT, medida que representa a responsividade folicular ao estímulo com gonadotrofinas exógenas. Esse achado sugere que tais folículos antrais possam estar em estágio de baixa sensibilidade ao FSH ou alguns até mesmo em processo de atresia, e infelizmente a ecografia não consegue distinguir esses diferentes momentos do folículo. Novas técnicas devem ser desenvolvidas no intuito de diferenciar o estágio folicular com precisão e melhorar a capacidade de predição de resposta ovariana e gestação da contagem de folículos antrais. Além disso, não houve correlação significativa entre o FORT e as demais variáveis avaliadas (AFC>6, idade, IMC, AMH e FSH), sugerindo que a responsividade folicular tenha padrão muito mais complexo e individualizado do que os preditores atualmente conhecidos.

Perspectivas

A avaliação do diâmetro de folículo antral como um parâmetro relevante na resposta ovariana é um tema relativamente novo na reprodução humana, que evoluiu graças à melhoria das técnicas de ultrassonografia, que são atualmente capazes de diferenciar milímetros de forma acurada e alguns

equipamentos até de forma automática. A ultrassonografia tridimensional tem ganhado espaço nos últimos anos e já demonstrou benefício na correta identificação dos folículos antrais, com menor variação entre observadores diferentes em relação à ecografia bidimensional. Além disso, técnicas automáticas ao invés das manuais devem consolidar ainda mais o valor preditivo da contagem de folículos antrais.

Esse foi o único estudo que utilizou o FORT como medida de responsividade folicular e o correlacionou com o diâmetro folicular. Portanto, estudos subsequentes são necessários para ratificar nossos achados, tanto com um tamanho amostral maior, capaz de avaliar também taxas de gestação e de nascidos vivos com poder suficiente, quando para populações diferentes, como a das pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos.

A reserva ovariana, atualmente avaliada principalmente através da contagem de folículos antrais e do Hormônio Anti-Mulleriano, apesar da boa correlação com a resposta à FIV, ainda tem resultados conflitantes no que diz respeito à predição de gestação e de nascidos vivos, que são os desfechos de maior relevância clínica. Portanto, a busca pelo aperfeiçoamento desses fatores preditivos é de grande importância, já que permitirá a individualização do prognóstico reprodutivo e do tipo de tratamento que melhor adequar-se-á às necessidades dos pacientes.

Anexos

Anexo 1. Instrumento de Pesquisa

Prontuário da paciente:	
Idade	
Data de nascimento	____/____/____
Peso	
Estatura	
IMC	
FORT	____ %
Causa Infertilidade	<input type="checkbox"/> Fator tubário <input type="checkbox"/> Fator masculino <input type="checkbox"/> Endometriose <input type="checkbox"/> Inexplicada <input type="checkbox"/> Múltiplas causas
AFC	Total ____ AFC6 ____ AFC>6 ____
AMH	
FSH	

Dose Elonva	<input type="checkbox"/> 100 <input type="checkbox"/> 150
hMG adicional	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Nº oócitos recuperados	
Nº oócitos em MII	
Nº embriões	
Beta-HCG	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo
Gestação Clínica	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: Correlação entre tamanho folicular e resposta à estimulação ovariana controlada na Fertilização in vitro

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é associar fatores relacionados com resposta à estimulação ovariana controlada para fertilização in vitro.

Esta pesquisa está sendo realizada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Se você aceitar participar da pesquisa, não será realizado nenhum procedimento envolvendo sua participação, apenas acesso aos dados de seu prontuário no Centro de Reprodução Humana Insemine.

Mesmo não tendo benefícios diretos em participar, indiretamente você estará contribuindo para a compreensão do fenômeno estudado e para a produção de conhecimento científico. Não são conhecidos riscos pela participação nessa pesquisa.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, João Sabino Lahorgue da Cunha Filho, pelo e-mail jfilho@hcpa.edu.br ou telefone (51) 999762821, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.