

## Studio della riserva ovarica

Filippo Ubaldi, Massimo Salvatori

Il patrimonio follicolare della donna, come è noto (1) va incontro ad una fisiologica quanto inarrestabile riduzione nel corso degli anni. Ciascuna donna riceve il proprio patrimonio di follicoli durante la vita fetale.

Al quarto mese di vita endouterina le ovaie contengono circa 6-7 milioni di ovociti circondati da un unico strato di cellule della granulosa che costituiscono il pool dei follicoli primordiali. A causa della repentina perdita di follicoli primordiali che si manifesta per apoptosi nella seconda metà della vita fetale, alla nascita rimangono solo 1-2 milioni di follicoli primordiali (2). Dopo la nascita, la perdita di follicoli rallenta, tanto che al menarca sono ancora presenti dai 300 000 ai 400 000 follicoli primordiali (3). Durante il periodo riproduttivo, il continuo e graduale declino di questo numero fa sì che alla menopausa rimangano meno di 1000 follicoli, ormai irresponsivi (4).

In particolare, la riduzione di numero dei follicoli primordiali segue una curva 'a due tempi': infatti, è più lenta fino al momento in cui la popolazione è di circa 25.000 unità, poi diventa notevolmente più rapida e porta in poco più di dieci anni alla quasi scomparsa (1000 follicoli circa) del patrimonio follicolare che si traduce per la donna nell'inizio della menopausa. Il momento di passaggio tra le due curve corrisponde, al 50° percentile della sua distribuzione gaussiana, all'età di 37,5 anni e, come già detto, condiziona da una parte la successiva (circa 10 anni dopo) insorgenza della menopausa e dall'altra coincide con una sostanzialmente riduzione della fertilità della donna.

Inoltre, al 5° percentile della sua curva di distribuzione l'età di insorgenza della menopausa corrisponde a 45 anni. Studi epidemiologici mettono in evidenza che circa il 10% della popolazione generale entra effettivamente in menopausa attorno a questa età. Ebbene, in queste donne che entreranno in menopausa all'età di 45 anni, l'accelerazione del decadimento numerico dei follicoli (ossia, il momento in cui l'ovaio avrà una popolazione di soli 25.000 follicoli primordiali) si verificherà non più a 37,5 anni ma molto prima, già a 32-33 anni. Queste donne, pertanto, sperimenteranno una ipofertilità già a 32-33 anni, altrimenti inspiegata. La letteratura si è recentemente interessata al problema, ed è stato addirittura proposto, per queste donne (ricordiamolo, 10% della popolazione!) il termine di "early ovarian aging" (5): in queste pazienti, oltre una ipofertilità, c'è un aumento di abortività spontanea, un aumento della incidenza di gemelli monozigoti, una scarsa risposta ad una stimolazione dell'ovulazione multipla.

La tendenza, in atto già da tempo nelle società occidentali per motivi sociali ed economici, a ritardare il momento in cui viene ricercata una gravidanza,

espone sempre di più la donna al rischio di trovarsi ad avere, al momento della ricerca di un figlio, una quantità ridotta di patrimonio follicolare, cioè appunto, una bassa riserva ovarica.

La riserva ovarica, quindi, è la quantità di patrimonio follicolare (ovocitario) residuo, presente nell'ovaio in quel momento in cui noi lo stiamo in qualche modo valutando.

Il fisiopatologo della riproduzione ha in determinate occasioni (e vedremo quali) la necessità di documentarsi circa lo stato della riserva ovarica della paziente che ha davanti, poiché una sua riduzione comporta problemi di due differenti ordini di grandezza, ma entrambi di segno negativo per il buon esito nella applicazione di tecniche di riproduzione assistita:

1. problemi quantitativi: nei cicli di fecondazione assistita, infatti, una riduzione della riserva si accompagna ad un aumento del tasso di cancellazioni dei cicli, ad una più frequente bassa risposta ovarica e quindi ad una riduzione dei tassi di gravidanza per ciclo (6);
2. problemi qualitativi: i follicoli contenenti gli ovociti di migliore qualità sono reclutati e selezionati all'interno dell'ovaio per primi, in età più giovane, così che nel tempo si verifica da una parte una riduzione del numero dei follicoli e dall'altra un aumento percentuale di follicoli contenenti ovociti di "peggiore qualità" ossia affetti da aneuploidie, che se fecondati, genereranno quindi embrioni aneuploidi. (7)

Questo è pertanto un parametro di cruciale importanza nella medicina e biologia della riproduzione

A questo punto apparirà chiaro quando dover studiare nella donna la sua riserva ovarica: in ogni caso – indipendentemente dall'età – in cui dobbiamo indurre farmacologicamente una induzione della crescita follicolare multipla.

La conoscenza della riserva ovarica, infatti, con tutte le problematiche di quantità e di qualità che comporta e che abbiamo sopra ricordato, da un lato ci permetterà di avere un 'counseling' adeguato con la paziente, informandola preventivamente del livello di probabilità ad esempio, di cancellazione di un ciclo; dall'altro, e soprattutto, ci permetterà di stabilire il tipo di protocollo di stimolazione e il dosaggio di farmaci adatto a quel caso, ci permetterà quindi di 'personalizzare' la terapia, ottimizzando i risultati.

### **Valutazione sierica dell'FSH basale (3° gg ciclo)**

Il primo marker di riserva ovarica proposto in letteratura e' stata la misurazione sierica di FSH in fase follicolare precoce (2°-3° gg del ciclo). Analizzando retrospettivamente oltre 700 cicli di fecondazione in-vitro, il gruppo di Norfolk riferì - era il 1989 (8) - che i livelli basali di FSH erano buoni marcatori di risposta ovarica alla stimolazione. Tali autori suddividendo i valori basali di FSH in tre gruppi, <15 UI/L, tra 15 e 25 UI/L e >25 UI/L, configuravano tre distinte categorie di donne in cui, a parità di dose di gonadotropine impiegate, di giorni di stimolazione oltre che di età (circa 35 anni), si avevano differenti risposte dell'ovaio, con un numero medio di follicoli massimo nel primo gruppo e minimo nell'ultimo, a cui corrispondeva un differente numero di embrioni ed una riduzione dei tassi di gravidanza evolutiva con un aumento dei tassi di aborto nelle pazienti con valori di FSH sierici basali piu' alti.

Ancora oggi manca una spiegazione fisiopatologica definitiva del fenomeno clinico-biologico osservato. Si parla, genericamente, di una modulazione del freno inibitorio (estradiolo/inibina) dell'ovaio sulla produzione ipofisaria di FSH. In sostanza, con la riduzione della riserva ovarica si avrebbe la riduzione del freno inibitorio ovarico sull'ipofisi. E' di fondamentale importanza associare al dosaggio di FSH basale anche il dosaggio di E2 basale poiché se questo risulta essere alterato, come si verifica in presenza di un residuo cistico funzionale, il valore dell'FSH sierico non esprime più il suo rapporto con la riserva ovarica.

Sono passati più di 20 anni da questa prima segnalazione, e sul ruolo dell'FSH sierico basale si è detto di tutto, e l'opposto di tutto. Certo, nel frattempo sono cambiati anche i metodi di dosaggio, per cui si è valutato che il 15 UI/L di Norfolk corrisponde a 9.5 UI/L degli attuali sistemi EIA. Si è visto e riportato che i valori di sierici di FSH sembrano essere sovrapponibili tra il 2° ed il 5° giorno del ciclo ovarico (9); che esiste una variabilità interciclica (cioè da un ciclo all'altro, nella stessa donna), tanto minore quanto più bassi sono i livelli sierici di FSH (10); che c'è un problema di accuratezza nella determinazione, per cui a seconda del Laboratorio possiamo trovare refertati valori di FSH differenti tra di loro fino al 30% (11); che la presenza di un solo ovaio invece che di due non cambia i termini del problema.

Indispensabile, quindi, a questo punto, riportare i risultati di due studi uno di revisione sistematica della letteratura e l'altro di meta-analisi.

Nella revisione della letteratura di Buckman et al (12) gli autori concludono:

1. che l'FSH sierico basale è un buon marcatore della riserva ovarica;
2. che non ha alcun potere predittivo sulla probabilità di una

- gravidanza in una popolazione generale;
3. che i problemi di accuratezza nella determinazione sono tali per cui ciascun centro dovrebbe validare i propri parametri di riferimento.

Nella meta-analisi di Bancsi et al (13) gli autori analizzano tutto quello pubblicato in letteratura dal 1989 al 1999 (843 studi) per valutare quanto l'FSH sierico basale sia utile per predire, all'interno di un ciclo di fecondazione in-vitro, una bassa risposta alla stimolazione ovarica ed il fallimento clinico, cioè la non-gravidanza:

1. l'FSH sierico basale ha un moderato potere predittivo sulla bassa risposta ovarica ed è decisamente basso per il parametro non-gravidanza;
2. quanto all'efficacia clinica, cioè alla possibilità che il valore sierico di FSH basale possa identificare con certezza che la bassa risposta o la non-gravidanza si realizzi con una probabilità sostanzialmente differente da quella 'attesa' (bassa risposta, probabilità 20-40%, non-gravidanza, probabilità 70-95%, ovviamente a seconda dell'età delle pazienti), questa si ha solo nei casi in cui l'FSH presenta valori decisamente alti (15-20 UI/L degli attuali sistemi EIA).

Pertanto gli autori concludono "...basal serum FSH should not be regarded as a useful test in the prediction of IVF outcome" ...the development of better tests to assess ovarian reserve remains of importance"

Il ruolo dell'FSH sierico basale potrebbe essere così riassunto:

1. scarso valore clinico "assoluto" nella popolazione generale
2. e' molto 'pericoloso' dare valore clinico a concentrazioni 'borderline' come 10-15 UI/L. Tuttavia, quando il valore supera ripetutamente 15 UI/L, e' indicativo, indipendentemente dall'età, di una importante riduzione della riserva ovarica, condizione imminente ad una transizione menopausale (14)
3. è indispensabile, al fine di una corretta valutazione della riserva ovarica, associare sempre altri markers della stessa.

### **Valutazione sierica dell'E2 basale**

Alcuni lavori riportano che la presenza di valori sierici elevati basali di questo ormone sarebbero testimonianza e prova indiretta di fugaci innalzamenti dell'FSH basale e quindi di un più precoce reclutamento follicolare. In un certo senso, perciò, l'aumento dell'estradiolo basale sarebbe un marker della riserva ovarica simile all'FSH basale ma più precoce che permette di sospettare una riduzione della riserva ovarica ancora prima che si innalzino i livelli sierici basali di FSH (15). Questa ipotesi è

supportata da uno studio nel quale si è visto che valori di estradiolo superiori a 60 pg/mL sono associati ad una percentuale più alta di cicli cancellati e di cicli con basso recupero di ovociti se paragonati a valori più bassi, portando alla conclusione che l'estradiolo basale può essere un importante indicatore prognostico (16). Tuttavia, a causa della mancanza di un cut-off con alta sensibilità e specificità, questo marker non dovrebbe essere utilizzato per discriminare le pazienti che si sottopongono a cicli di procreazione assistita. Quindi il ruolo di questo marker è unicamente quello di pronosticare in modo neanche troppo preciso la risposta ovarica alle gonadotropine esogene e può essere utilizzato solamente per il counselling delle coppie sub-fertili candidate a tecniche di fecondazione assistita.

### **Valutazione sierica dell'inibina B**

Molte speranze aveva sollevato la determinazione sierica dell'inibina B (12) che, come è noto, viene prodotta dalla coorte di follicoli reclutati in fase follicolare precoce, per cui valori sufficientemente bassi avrebbero potuto essere suggestivi di una riserva ovarica bassa.

Con i dati che abbiamo oggi a disposizione, possiamo concludere con dicendo che la determinazione sierica dell'inibina B è più un monitoraggio (peraltro costoso) della crescita follicolare che un test di riserva ovarica (17).

Tuttavia, più recentemente, è stata posta attenzione alla capacità predittiva della riserva ovarica delle variazioni dinamiche della inibina B durante la stimolazione con FSH (18-19). In particolare un incremento <300 pg/ml tra due determinazioni eseguite il 6° e l'8° gg di stimolazione con FSH è fortemente predittivo di cancellazione per "poor response" (20)

Probabilmente l'inibina B è un indicatore dell'attività ovarica più che della riserva ovarica grazie al legame diretto con il numero di follicoli in crescita ed è per di più influenzata dalla diminuzione della funzione ovarica che si verifica durante le fasi tardive dell'invecchiamento ovarico e durante il ciclo mestruale

### **Valutazione sierica dell'ormone anti-mulleriano (AMH)**

Grande interesse sta suscitando negli ultimi anni l'importanza dell'ormone anti-mulleriano (AMH) nello studio della riserva ovarica. Tale ormone è una glicoproteina dimerica della famiglia TGF- $\beta$  secreto esclusivamente dalle cellule della granulosa dei follicoli preantrali primari e secondari e dei piccoli follicoli antrali (2-6mm di diametro) (21-22). Esso controlla la transizione dei follicoli primordiali in primari e la sua secrezione è modulata dagli "Oocyte Secreted Factors" (OSFs) in particolare il GDF9 e il BMP15.

La differente espressione di tali OSFs potrebbe modulare la velocità di consumo follicolare come dimostrato nell'animale da esperimento (22).

Proprio perchè viene prodotto da follicoli la cui transizione è ormono-indipendente e quindi non influenzata dalle diverse fasi del ciclo ovarico, la sua determinazione può essere eseguita in qualunque momento del ciclo ed inoltre il suo valore predittivo sulla riserva ovarica ha una maggiore costanza interciclica rispetto agli altri markers (23).

Recenti Studi isotologici hanno dimostrato come i livelli di AMH siano direttamente correlati con la quantità di follicoli primordiali presenti nell'ovaio in un dato momento (24)

Da un punto di vista clinico, l'AMH correla con il numero di follicoli antrali e degli ovociti recuperati dopo prelievo ovocitario e con i valori basali di E2, FSH ed inibina (25). I cut-off riportati in letteratura variano tra 0,4 e 1,2 ng/ml al di sotto dei quali la poor response è predetta con performance più che accettabile (26). Per valori di AMH più bassi (<0,2-0,3 ng/ml) è invece verosimile una assente risposta ovarica all'FSH con conseguente cancellazione del ciclo. Rappresenta inoltre il miglior marker endocrino per valutare la riduzione della capacità riproduttiva associata all'aumento dell'età (27)

L'AMH è in grado di predire meglio rispetto agli altri markers biochimici l'entità della risposta ovarica distinguendo le risposte scarse da quelle normali. Tale valore predittivo è comparabile solo a quello della conta dei follicoli antrali (28) rispetto alla quale tuttavia è molto più efficace nell'individuare l'iper-risposta (29). Per tali motivi, questo ormone può essere utilizzato per personalizzare le strategie di trattamento di stimolazione ovarica al fine di ridurre i rischi clinici ottimizzando i tassi di gravidanza (29)

### **Valutazione dei tests dinamici**

La caratteristica comune di questi tests, e quella di stimolare acutamente in qualche modo l'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio e di misurare, subito prima e subito dopo, un marcatore endocrino della risposta alla stimolazione. Così, se è impiegato il citrato di clomifene, si misura l'FSH (clomiphene citrate challenge test, 31); se si impiega un GnRH-analogo, sempre l'FSH (30); se si utilizza FSH, il marcatore è rappresentato dall'estradiolo (33).

La già citata review di Buckman (12) mette in rilievo che il test al citrato di clomifene è quello maggiormente sperimentato, l'unico test di riserva ovarica che possa dare informazioni, oltre che sulla riserva come tale, anche sulla fertilità naturale.

Col test al citrato di clomifene, 100 mg del prodotto vengono assunti dalla donna dal 5° al 9° giorno del ciclo, e si misura l'FSH sierico in condizioni basali e al 10° giorno. Anche se la letteratura riporta varie modalità possibili di decodificazione dei risultati, il concetto è che il secondo valore dovrebbe essere più basso del primo (e il primo essere, a sua volta, nella norma).

Il Gonadotropin analogue stimulation test (GAST) è basato sull'induzione del picco di FSH, LH ed estradiolo (flare up) che si verifica circa 24 ore dopo la somministrazione di un analogo del GnRH e che è seguita da una più o meno prolungata inibizione ipofisaria. I livelli di estradiolo e inibina B sembrano riflettere l'integrità del patrimonio follicolare (30).

Ad ogni modo, il valore del GAST per la valutazione della riserva ovarica è controverso. Hendriks ha valutato 57 donne candidate a fecondazione in vitro e, sebbene abbia identificato un valore del test predittivo della riserva ovarica e della probabilità di gravidanza, non ha trovato un'utilità maggiore rispetto ad altri indicatori come l'inibina B basale o la conta dei follicoli antrali (31). L'accuratezza del GAST nel predire la risposta follicolare è simile a quella ottenuta dalla conta dei follicoli antrali (32). In conclusione, l'uso di questo test è questionabile soprattutto per gli alti costi e per il rischio di una stimolazione esogena, non fornendo informazioni attendibili sulla probabilità di ottenere la gravidanza.

L'Exogenous FSH ovarian reserve test (EFORT) si esegue somministrando 300 UI di FSH il terzo giorno del ciclo, previa misurazione di estradiolo e inibina B. Dopo 24 ore dalla somministrazione di FSH, estradiolo e inibina B vengono nuovamente misurati e il loro aumento risulta indicativo delle condizioni del patrimonio follicolare (33).

L'aumento dell'estradiolo e dell'inibina B dopo l'EFORT sembra essere il valore che permette di predire con più accuratezza il numero di follicoli che possono crescere con la stimolazione ovarica

L'EFORT è stato poi valutato nella predizione della poor response ed i risultati indicano una buona sensibilità con un'area sotto la curva di 0.86 (34).

È probabile che il test di stimolazione con FSH esogeno può migliorare la predizione della risposta ovarica se paragonato agli indicatori ormonali misurati in condizioni basali. Ad ogni modo il suo uso routinario prevede alti costi e possibili effetti collaterali derivanti dalla stimolazione esogena non fornendo informazioni aggiuntive sulla probabilità di ottenere la gravidanza. Pertanto questo test deve essere riservato a casi eccezionali nei quali il rischio di iperstimolazione ovarica sia molto remoto.

La complessità (e i costi) di questi tests, tuttavia, non hanno comunque permesso, perlomeno per il momento, una diffusione capillare di applicazione, così che l'esperienza resta confinata a quei pochi centri che riferiscono un uso sufficientemente esteso (12).

### **Valutazione degli ultrasuoni e della conta dei follicoli antrali (AFC)**

L'ecografia transvaginale, tradizionale e tridimensionale, è entrata in tempi più recenti ma prepotentemente nella valutazione della riserva ovarica. Volume ovarico e numero di follicoli antrali, misurati in condizioni basali, costituiscono un eccellente parametro di valutazione diretta della riserva (12-35-36). Anzi, è stato del tutto recentemente riportato che la

valutazione ecografica basale del numero dei follicoli antrali sarebbe il parametro più strettamente correlato all'età anagrafica (36) ed inoltre indipendentemente all'età anagrafica il numero dei piccoli follicoli antrali (2-6 mm) correla con gli altri test di riserva ovarica indicando che il pool di tali follicoli rappresenta la riserva ovarica funzionale (37) suggerendo quindi che questa misura possa costituire un marcatore della fertilità naturale

Studi istologici condotti recentemente hanno dimostrato come la performance dell'AFC nella valutazione della quantità di follicoli primordiali presenti in un dato momento nell'ovaio sia sovrapponibile a quello dell'AMH (24).

Inoltre, l'importanza dell'AFC come valore predittivo di risposta ovarica e soprattutto come mezzo per personalizzare il tipo di stimolazione ormonale, è legata al fatto che essa riflette direttamente il pool dei follicoli antrali precoci mensilmente reclutati e sensibili alla stimolazione gonadotropinica. L'AFC infatti, insieme alla determinazione dell'AMH rappresentano i migliori markers predittivi della risposta ovarica (37) anche se a tutt'oggi, a differenza dell'AMH, non è stata codificata una correlazione tra numero di follicoli e dosaggio gonadotropinico iniziale (23).

Kurjak et al., (37) hanno riportato che in caso di volume ovarico totale  $< 7 \text{ cm}^3$  o di numero di follicoli antrali  $< 5$ , non si è mai osservata gravidanza (limite della ricerca: solo 11 donne) in un programma di fecondazione in-vitro nonostante un numero 'sufficiente' anche se ridotto di ovociti (media, 4) e un tasso di fecondazione ridotto ma mediamente del 66%; in questo gruppo, l'età media delle donne era mediamente ridotta (39-40 anni).

E forse ancora presto per una codificazione definitiva di valori-soglia sia per il parametro di riserva ovarica 'volume ovarico' che per quello 'numero di follicoli antrali'. Tuttavia, una buona riserva ovarica solitamente è presente se la somma del volume delle due ovaie è superiore a  $6 \text{ cm}^3$ , e se la somma del numero dei follicoli antrali è uguale o superiore a 7.

### **Valutazione clinica complessiva**

Da quanto appena esposto, appare evidente che una buona misurazione della riserva ovarica si realizza mediante l'impiego combinato dell'AFC, del dosaggio dell'AMH, e delle concentrazioni di E2 e FSH basale.

Certamente, occorre sufficiente prudenza clinica per trasferire i dati derivanti da questi accertamenti alla donna che abbiamo davanti come paziente, ma è altrettanto certo che con dati di questo tipo e con sufficiente esperienza possiamo pensare di ottimizzare sia il nostro 'counseling' che la nostra terapia farmacologica.



## **Età della donna e riserva ovarica**

In questa trattazione è rimasta esclusa, per il momento, una valutazione molto importante (forse la più importante) come quella della età anagrafica della donna sia nel predire la riserva ovarica ma soprattutto la possibilità di una gravidanza a termine. Ma tutta una serie di dati, biologici e clinici (38-40), orientano sul fatto che dopo i 38-40 anni si ha per la donna una riduzione della qualità ovocitaria che appare indipendente dalla riserva ovarica e che sembra legata a fenomeni di accumulo di danni sull'ovocita, danni derivanti da stress ossidativo o da effetto termico. Di questo argomento non ci soffermiamo a parlare in questa sede. Ci interessa, invece, entrare nell'intimo del rapporto tra il parametro 'età della donna' e quello 'riserva ovarica'.

La relazione tra età della donna e riserva ovarica è stata ben sintetizzata in un lavoro recente di van Rooij e collaboratori (41) relativo a pazienti sottoposte a fecondazione in-vitro. Gli autori, infatti, hanno evidenziato come l'età anagrafica sia associata ad una più bassa probabilità di impianto per causa di una ridotta qualità ovocitaria mentre un incremento dei valori basali di FSH (e cioè una riduzione della riserva ovarica) sia associato ad una più probabile cancellazione del ciclo per scarsa risposta alla stimolazione. In pratica, una donna giovane con valori alti di FSH ha una più elevata probabilità di cancellazione del ciclo per scarsa risposta ma nel caso questo non si verifichi, avrà possibilità non significativamente inferiori di gravidanza rispetto ad una donna coetanea con valori sierici basali di FSH normali.

In sintesi, come ha aggiunto Toner (42): l'età della donna indica la qualità ovocitaria mentre i valori basali di FSH e più in generale riserva ovarica indica la quantità ovocitaria.

Tutto questo non è senza importanti implicazioni cliniche. Infatti, è evidente che il nostro 'counselling' davanti alla singola paziente che dovrà essere sottoposta a trattamento di riproduzione medicalmente assistita sarà sostanzialmente differente a seconda della modalità con la quale saranno combinati i due parametri età/riserva ovarica. Così, ad esempio, per una donna di età superiore a 38-40 anni, non incoraggeremo al proseguimento delle procedure in presenza di una riserva ovarica scarsa, mentre potremo procedere utilizzando protocolli di stimolazione particolari se i tests di riserva ovarica avranno dato un buon esito. Per una donna di età più giovane, infine, la conoscenza della riserva sarà finalizzata alla scelta del tipo di stimolazione e della dose dei farmaci, poiché in caso di riserva ovarica ridotta avremo davanti una paziente 'candidata naturale' ad essere una bassa risponditrice ma con una prognosi di gravidanza ancora accettabile.

## Bibliografia

- 1) te Velde ER, Dorland M, Broekmans FJ. Age at menopause as a marker of reproductive ageing. *Maturitas* 30:119-125,1998.
- 2) Markström E, Svensson ECh, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 2002 ;123:23-30.
- 3) te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*. 2002;8:141-54
- 4) Faddy MJ. Follicle dynamics during ovarian ageing. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;163:43-8.
- 5) Nikolaou D and Templeton A. Early ovarian ageing: a hypothesis. *Human Reproduction* 18:1137-1139, 2003.
- 6) Jenkins JM, Davies DW, Devonport H, Anthony FW, Gadd SC, Watson RH. Comparison of "poor" responders with "good" responders using a standard buserelin/ human menopausal gonadotrophin regime for in-vitro fertilization. *Human Reproduction* 6:918-921, 1991.
- 7) Freeman S, Yang Q, Allran K, Taft L and Sherman S. Women with a reduced ovarian complement may have an increased risk for a child with Down's Syndrome. *Am J Hum Genet* 66:1680-1683, 2000.
- 8) Scott RT, Toner JP, Muasher SJ, Oehninger S, Robinson S, Rosenwaks Z. Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertility and Sterility* 51:651-654, 1989.
- 9) Hansen LM, Batzer FR, Gutman JN. Evaluating ovarian reserve: follicle stimulating hormone and oestradiol variability during cycle days 2-5. *Human Reproduction* 11:486-489, 1996.
- 10) Scott RT, Hofman GE, Oehninger S. Intercycle variability of day 3 follicle-stimulating hormone levels and its effect on stimulation quality in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 54:297-302, 1990.
- 11) Taieb J, Olivennes F, Birr AS, Benattar C, Righini C, Frydman R and Lindenbaum A. Comparison of day 3 FSH serum values as determined by six different immunoassays. *Human Reproduction* 17:926-928, 2002.
- 12) Bukman A and Heineman MJ. Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Human Reproduction Update* 7:581-590, 2001.
- 13) Bancsi LF, Broekmans FJ, Mol BW, Habbema JD and te Velde ER. Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertility and Sterility* 79:1091-1100, 2003.
- 14) te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*. 2002 Mar-Apr;8(2):141-54.
- 15) Smotrich DB, Widra EA, Gindorff PR. Prognostic value of day 3

estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertility and Sterility* 64:1136-1140, 1995.

- 16) Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC and Dunselman GA Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998; 69:1010–1014
- 17) Yong PY, Baird DT, Thong KJ, McNeilly AS, Anderson RA. Prospective analysis of the relationship between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulation. *Human Reproduction* 18:35-44, 2003.
- 18) van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Fauser BJ, Themmen AP, te Velde ER Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study *Fertil Steril*. 2005 Apr;83(4):979-87
- 19) Decanter C, Pigny P, Lefebvre C, Thomas P, Leroy M, Dewailly D. Serum inhibin B during controlled ovarian hyperstimulation: an additional criterion for deciding whether to proceed with egg retrieval. *Fertil Steril*. 2009 Jun;91(6):2419-25
- 20) Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999 Dec;140(12):5789-96
- 21) Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*. 2002 Nov;124(5):601-9.
- 22) McNatty KP, Juengel JL, Wilson T, Galloway SM, Davis GH, Hudson NL, Moeller CL, Cranfield M, Reader KL, Laitinen MP, Groome NP, Sawyer HR, Ritvos O. Oocyte-derived growth factors and ovulation rate in sheep *Reprod Suppl*. 2003;61:339-51.
- 23) van Disseldorp J, Lambalk CB, Kwee J, Looman CW, Eijkemans MJ, Fauser BC, Broekmans FJ Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Mullerian hormone and antral follicle counts. *Hum Reprod*. 2010 Jan;25(1):221-7.
- 24) Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil Steril*. 2010 May 25. [Epub ahead of print]
- 25) Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod*. 2003 Feb;18(2):328-32.
- 26) La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Arsenio AC, Stabile G, Volpe A. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod*

Update. 2009 Sep 30. [Epub ahead of print]

- 27) van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, Themmen AP. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2002 Dec;17(12):3065-71
- 28) Broer SL, Mol BW, Hendriks D, Broekmans FJ. The role of antimüllerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril*. 2009 Mar;91(3):705-14.
- 29) Nardo LG, Gelbaya TA, Wilkinson H, Roberts SA, Yates A, Pemberton P, Laing I. Circulating basal anti-Müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2009 Nov;92(5):1586-93.
- 30) Ranieri DM, Quinn F, Makhlof A, Khadum I, Ghutmi W, McGarrigle H, Davies M and Serhal P Simultaneous evaluation of basal follicle-stimulating hormone and 17 beta-estradiol response to gonadotropin-releasing hormone analogue stimulation: an improved predictor of ovarian reserve. *Fertil Steril* 1998; 70,227–233
- 31) Hendriks DJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, de Jong FH, Looman CW and te Velde ER Repeated clomiphene citrate challenge testing in the prediction of outcome in IVF: a comparison with basal markers for ovarian reserve. *Hum Reprod* 2005; 20,163–169
- 32) Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*. 2006;12:685-718.
- 33) Fanchin R, de Ziegler D, Olivennes F, Taieb J, Dzik A and Frydman R Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable screening test for detecting ‘poor responders’ in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1994; 9:1607–1611
- 34) Kwee J, Schats R, McDonnell J, Schoemaker J, Lambalk CB. The clomiphene citrate challenge test versus the exogenous follicle-stimulating hormone ovarian reserve test as a single test for identification of low responders and hyperresponders to in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2006;85:1714-22.
- 35) Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D, Vujisic S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertility and Sterility* 79:190-197, 2003.
- 36) Scheffer GJ, Broekmans FJM, Looman CWN, Blankenstein M, Fauser BCJM, de Jong FH, te Velde ER. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Human Reproduction* 18:700-706, 2003.
- 37) Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EM, Groenewoud ER, Heineman MJ, Hoek A. The number of small antral follicles (2-6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum Reprod*. 2007 Jul;22(7):1925-31.
- 38) Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling.

Human Reproduction 11:2217-2222, 1996.

- 39) Volarcik K, Sheean L, Goldfarb J, Woods L, Abdul-Karim FW, Hunt P. The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. Human Reproduction 13:154-160, 1998.
- 40) Osmanagaoglu K, Tournaye H, Kolibianakis E, Camus M, Van Steirteghem A and Devroey P. Cumulative delivery rate after ICSI in women aged >37 years. Human Reproduction 17:940-944, 2002.
- 41) Van Rooij IA, Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. Fertility and Sterility 79:482-488, 2003.
- 42) Toner JP. Age = egg quality, FSH level = egg quantity. Fertility and Sterility 79:491,2003.