

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Quantifying the intraindividual variation of antimullerian hormone in the ovarian cycle

Narelle Hadlow^{a,b,c}, Suzanne J. Brown^d, Afsana Habib^c, Robert Wardrop^a, John Joseph^a,
Melissa Gillett^c, Rhonda Maguire^a and Johan Conradie^c

^aDepartment of Biochemistry, PathWest Laboratory Medicine, Nedlands; ^bSchool of Pathology and Laboratory Medicine, University of Western Australia, Crawley; ^cWestern Diagnostic Pathology, Myaree; and ^dDepartment of Endocrinology, Sir Charles Gairdner Hospital, Nedlands, Western Australia, Australia.

RESUMEN ORIGINAL

Objective: To quantify intraindividual variability of antimullerian hormone (AMH) as analytical and biological coefficients of variation and assess the effects of variation on clinical classification.

Patient(s): Thirty-eight women referred by general practitioners.

Main Outcome Measure(s): Total intraindividual variability (CVW), analytical (CVA) and biological variability (CVD) for each woman and for AMH ranges: low (<5 pmol/L), reduced (5–10), moderate (>10–30) and high (>30 pmol/L), with calculation of proportion of women crossing clinical cutoffs and expected variability around each cutoff.

Result(s): Cycling women (n = 38) contributed 238 blood samples (average 6 samples each). The average total intraindividual AMH variability was 20% (range: 2.1% to 73%). Biological variation was 19% (range: 0 to 71%) and at least twice the analytical variation of 6.9% (range: 4.5% to 16%). Reclassification rates were highest in women with low (33%) or reduced AMH (67%) levels. Expected variations around the 5, 10, and 30 pmol/L cutoffs were 3–7, 7–13, and 20–40 pmol/L, respectively. In a woman with mean AMH in the 10–30 pmol/L range, the span of results that could occur was 7–40 pmol/L.

Conclusion(s): Total variation in AMH was 20%, and the majority of this was biological. Changes in AMH resulted in reclassification in 29% of women and occurred most frequently in those with low and reduced AMH. In cycling women, the variability in AMH should be considered by clinicians, especially if a result is close to a clinical cutoff.

Fertility and Sterility (in press, June 2016)

Introducción

La hormona antimulleriana (AMH), tiene un importante papel en la comprobación de la reserva ovárica, y actualmente se considera mejor biomarcador que la edad, la FSH y el recuento de folículos antrales (1-3). Se han sugerido varios valores de corte para definir la baja reserva ovárica o el riesgo aumentado de hiperestimulación (4-6).

Sin embargo, a pesar de su amplia utilización en reproducción, se ha apuntado que hay que tener precaución a la hora de tener en cuenta sus valores, debido a la variabilidad de resultados entre los mismos pacientes (7, 8).

La AMH puede tener una gran variabilidad debido a variaciones biológicas, por lo que hay que ser cauto en su interpretación.

Se sabe que hay muchos factores que pueden influenciar en la variación de valores de la AMH y contribuyen a la variación de resultados en el mismo individuo, como pueden ser los cambios estacionales y los ritmos circadianos (8).

La disminución de la AMH también puede tener lugar en fumadoras (9), determinadas enfermedades agudas (10) o inmunológicas como el lupus (11). Por eso, se ha sugerido que es necesario cuando se interpreta la función ovárica hay que considerar el estado de salud general (12).

Ya que las gonadotropinas cambian continuamente en el ciclo menstrual, el concepto de que la AMH está ligada a la respuesta gonadotrópica puede explicar algunas variaciones biológicas (13)

El receptor de los agonistas de las gonadotropinas puede tener una gran variedad de efectos, incluyendo la supresión de AMH (14). Los contraceptivos orales, también se ha demostrado que reducen los niveles de AMH (15).

Aunque la influencia de estas variaciones individuales de la AMH parece de poca importancia, el efecto total de las variaciones de AMH no se ha cuantificado.

En este estudio se estudia la variabilidad biológica intraindividual (CV_I) recogiendo muestras en diferentes días del ciclo en la misma mujer, y la variabilidad analítica (CV_A), analizando la precisión de la AMH a varios niveles en un pool de pacientes.

Materiales y métodos

Las muestras se recogieron por la mañana, desde las 7:30 AM hasta las 9:30 AM para facilitar el transporte y análisis diario de las mismas. Se recogieron durante 1 a 3 meses consecutivos en todas las mujeres, con nueve mujeres que tenían como mínimo dos o más muestras en dos o tres ciclos.

Se incluyeron en el estudio las mujeres con evidencia de ovulación (determinada por un aumento de estradiol de como mínimo 500 pmol/L con un pico de LH >20 U/L. Se excluyeron las mujeres sin pico de LH y con ciclos irregulares.

Las muestras se analizaron en las tres primeras horas de forma rutinaria para estradiol, progesterona y gonadotropinas, y se prepararon alícuotas para otros test. El suero restante se congeló a -20°C hasta el análisis de AMH, que se realizó en duplicado, siguiendo las instrucciones del protocolo, y utilizándose AMH Gen, II (ELISA) de Beckman Coulter.

Basándose en la literatura (4-6) y los datos del laboratorio, los valores de corte se eligieron a 5, 10 y 30 pmol/L para establecer cuatro grupos de pacientes: bajas (<5 pmol/L), reducidas (5-10 pmol/L), moderadas (>10-30 pmol/L) o altas (> 30 pmol/L), lo que se corresponde con baja, reducida, moderada reserva ovárica y riesgo de hiperestimulación respectivamente.

Todas las muestras de las pacientes se analizaron por duplicado, y los resultados se calcularon como la media de los duplicados.

El porcentaje del coeficiente de variación (CV) se calculó como la desviación estándar (SD) dividida por la media por 100.

Se determinó la proporción de mujeres que cruzaban los puntos de corte: 5,10 y 30 pmol/L en test repetidos a lo largo del ciclo menstrual. También se determinó la proporción de mujeres que cruzaron los puntos de corte clínicos para cada banda media de AMH.

Resultados

Participantes del estudio

Tomaron parte en este estudio 38 mujeres con ciclos normales (238 observaciones de AMH) que tuvieron como mínimo dos resultados de AMH durante diferentes fases del ciclo.

El número medio de muestras por mujer fue de 6,3 (rango: 2-18) y el número medio de muestras por ciclo fue 4,4. Las mujeres donaron muestras desde uno a tres ciclos consecutivos, con un 80% de ellas proporcionadas en 43 días.

La edad de las mujeres osciló entre 22 y 42 años, con una media de edad de 34 años.

Variación intraindividual total de AMH y componentes analíticos biológicos

La variación total intra individuo de AMH (CVw), analítica (CVA) y biológica (CVI) se determinó para cada mujer y para cada franja de AMH (baja, reducida, moderada y alta).

La media de variación intraindividual de AMH (% CVw total) para la población de mujeres fue del 20 % (rango: 2,1 % a 73 %), 6,9 % analítica (rango: 4,5 % a 16 %) u 19 % de variación biológica (rango de 0 a 71 %).

Entre la media de las franjas de AMH, el mayor porcentaje de variación tuvo lugar en las mujeres con bajos niveles de AMH (47 %). En las mujeres con un valor reducido fue del 19 %, moderado del 16 % y alta del 15 % de concentración de AMH.

Para todas las franjas de AMH la variación biológica (%CVI) era mayor que la analítica (% CVA). La variación biológica fue aproximadamente dos veces la analítica, excepto en la franja más alta de AMH.

Reclasificación de mujeres después de repetidos test

Se determinó el número de individuos que cruzó un valor de corte de los descritos anteriormente, con significado clínico.

De las 38 mujeres del estudio, 11 (29 %), cruzaron uno de los tres valores clínicos de corte (5, 10 y 30 pmol/L) en repetidos test. Análisis posteriores de las mujeres con niveles diferentes en las medias de AMH mostraron que aquellas que más probablemente se reclasificaron eran las que tenían un valor reducido de AMH (5-10 pmol/L), y el 67 % de este grupo se reclasificaron como moderada o baja AMH repitiendo los test. Del grupo de mujeres con AMH moderada o alta, el 17 % y el 27 % respectivamente, también se reclasificaron al repetir los test.

Al cambiar los valores de corte a 5, 10 y 20 pmol/L de AMH, el 34 % de las mujeres fueron reclasificadas. Usando 5, 10 y 25 pmol/L como puntos de corte, la misma proporción (34 %) se reclasificaba.

Discusión

Este estudio proporciona una importante información sobre la variabilidad intraindividual de los resultados de AMH en mujeres con ciclos regulares.

Se ha cuantificado la variación de los resultados de AMH en mujeres con test repetidos en términos de variación intraindividual total, y los componentes analíticos y biológicos. La media total de variación intraindividual, combinando la analítica y la biológica, fue del 20 % (rango 2,1 al 71 %), y el 29 % de las mujeres fueron reclasificadas de una categoría de reserva ovárica a otra. La variación biológica era mayor para todos los niveles de AMH y aproximadamente dos veces mayor que la analítica.

Estas variaciones con significado clínico pueden ocurrir en los niveles de AMH cuando se analizan en diferentes días del mismo ciclo o en diferentes ciclos de mujeres con ciclos regulares, incluso con el mismo ensayo y en el mismo laboratorio.

Estos descubrimientos sugieren que los clínicos deben de ser cautos a la hora de interpretar una única determinación de AMH sin considerar la variación en los resultados que puede presentar una única mujer.

Bibliografía

1. La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, Macklon NS. ESHRE Special Interest Group for Reproductive Endocrinology—AMH Round Table. Antimüllerian hormone (AMH): what do we still need to know? *Hum Reprod* 2009; 24:2264–75.
2. van Rooij IA, Tonkelaar I, Broekmans FJ, Looman CW, Scheffer GJ, de Jong FH, et al. Anti-müllerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause* 2004;11:601
3. Sowers MR, Eyvazzadeh AD, McConnell D, Yosef M, Jannausch ML, Zhang D, et al. Anti-müllerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:3478–83.
4. Loh JS, Maheshwari A. Anti-müllerian hormone—is it a crystal ball for predicting ovarian ageing? *Hum Reprod* 2011; 26:2925–32.
5. Friden B, Sjoblom P, Menezes J. Using anti-müllerian hormone to identify a good prognosis group in women of advanced reproductive age. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2011; 51:411–5.
6. Nardo LG, Gelbaya TA, Wilkinson H, Roberts SA, Yates A, Pemberton P, et al. Circulating basal anti-müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2009; 92: 1586–93.
7. Leader B, Baker VL. Maximizing the clinical utility of antimüllerian hormone testing in women's health. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2014; 26:226–36.
8. Bungum L, Jacobsson AK, Rosen F, Becker C, Yding Andersen C, Guner N, et al. Circadian variation in concentration of anti-müllerian hormone in regularly menstruating females: relation to age, gonadotrophin and sex steroid levels. *Hum Reprod* 2011; 26:678–84.
9. Dolleman M, Verschuren WM, Eijkemans MJ, Dolle ME, Jansen EH, Broekmans FJ, et al. Reproductive and lifestyle determinants of anti-müllerian hormone in a large population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:2106–15.
10. Van Dorp W, van den Heuvel-Eibrink MM, de Vries AC, Pluijm SM, Visser JA, Pieters R, et al. Decreased serum anti-müllerian hormone levels in girls with newly diagnosed cancer. *Hum Reprod* 2014; 29:337–42.
11. Lawrenz B, Henes J, Henes M, Neunhoffer E, Schmalzing M, Fehm T, et al. Impact of systemic lupus erythematosus on ovarian reserve in premenopausal women: evaluation by using anti-müllerian hormone. *Lupus* 2011; 20:1193–7.
12. Iliodromiti S, Anderson RA, Nelson SM. Technical and performance characteristics of anti-müllerian hormone and antral follicle count as biomarkers of ovarian response. *Hum Reprod Update* 2015; 21:698–710.
13. Hagen CP, Sorensen K, Anderson RA, Juul A. Serum levels of antimüllerian hormone in early maturing girls before, during, and after suppression with GnRH agonist. *Fertil Steril* 2012; 98:1326–30.
14. Anderson RA, Themmen AP, Al-Qahtani A, Groome NP, Cameron DA. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Hum Reprod* 2006; 21:2583–92.
15. Kallio S, Puurunen J, Ruokonen A, Vaskivuo T, Piltonen T, Tapanainen JS. Antimüllerian hormone levels decrease in women using combined contraception independently of administration route. *Fertil Steril* 2013; 99:1305–10.

COMENTARIOS DEL EDITOR

En los últimos años se ha publicado una vasta relación de trabajos sobre la hormona antimülleriana (AMH) y su relación con la reserva ovárica, de tal forma que la mayoría de los centros de reproducción en todo el mundo la utilizan como el principal parámetro pronóstico de la misma. De hecho, recientemente se ha consensuado que el mejor test pronóstico de reserva ovárica es la AMH junto con la edad y la reserva folicular (1)

También se han publicado trabajos sobre la necesidad de estandarizar los procedimientos de análisis de AMH, y la posible variación biológica de la misma (2), aunque hay trabajos que no le dan importancia clínica a estas variaciones (3).

En el artículo de Hadlow y col., se estudian las variaciones intraindividuo de la AMH, no solo en distintos ciclos de una misma mujer, sino a lo largo del mismo ciclo, encontrándose variaciones significativas en ambos casos. Y lo que es más importante, las mayores variaciones se han encontrado en las mujeres con valores bajos de AMH (<5 pmol/L), que realmente son las que nos interesan ya que son las pacientes en las que hay que decidir si merece la pena o no realizar un ciclo de Fecundación in vitro.

En este trabajo, además, se han estudiado las mujeres que en repetidos test de AMH han cambiado de grupo en función del resultado. Esto tiene importantes repercusiones clínicas, de forma que, como comentan los autores en sus conclusiones, hay que ser cauto a la hora de interpretar los resultados de una única determinación de AMH.

Este hecho podría solucionarse si, en los casos de niveles bajos de la hormona, se realizan determinaciones seriadas en el mismo ciclo y en ciclos diferentes, para comprobar su exactitud.

En cualquier caso, una vez más se cumple el dicho “no pidamos a un test más de lo que nos puede dar”.

Bibliografía interesante para el editor:

1. La Marca A, Ferraretti AP, Palermo R, Ubaldi FM. The use of ovarian reserve markers in IVF clinical practice: a national consensus. *Gynecol Endocrinol.* 2016;32(1):1-5.

Consensus was achieved for many points: (a) poor ovarian response is predicted on the basis of the following: AMH < 1 ng/ml or AFC < 7, FSH ≥ 10 IU/l, age ≥ 40 yrs; (b) hyper-response is predicted on the basis of the following: AMH > 3 ng/ml or AFC > 14; (c) day 3 FSH measurement should always be associated to estradiol; (d) AMH can be measured on a random basis; (e) the measurement of the AFC with the 2D technology may be considered adequate and (f) the AFC should be measured in the early follicular phase and consists in the total number of 2-9 mm follicles in both the ovaries.

2. Kisell I KA, Danaher MR, Schisterman EF, Wactawski-Wende J, Ahrens KA, Schliep K, Perkins NJ, Sjaarda L, Weck J, Mumford SL. Biological variability in serum anti-Müllerian hormone throughout the menstrual cycle in ovulatory and sporadic anovulatory cycles in eumenorrheic women. *Hum Reprod.* 2014 Aug;29(8):1764-72.

Geometric mean AMH levels were observed to vary across the menstrual cycle ($P < 0.01$) with the highest levels observed during the mid-follicular phase at 2.06 ng/ml, decreasing around the time of ovulation to 1.79 ng/ml and increasing thereafter to 1.93 (mid-follicular versus ovulation, $P < 0.01$; ovulation versus late luteal, $P = 0.01$; mid-follicular versus late luteal, $P = 0.05$). Patterns were similar across all age groups and during ovulatory and anovulatory cycles, with higher levels of AMH observed among women with one or more anovulatory cycles ($P = 0.03$).

3. Pankhurst MW and Chong YH. Variation in circulating antimüllerian hormone precursor during the periovulatory and acute postovulatory phases of the human ovarian cycle. *Fertil Steril.* 2016 Jun 27: S0015-0282(16)61307-9.

The mean API in the 11 eligible women fell from 20.7 during the luteinizing hormone (LH) surge period to 18.7 during the acute postsurge period. No statistically significant differences in the API were observed among samples taken at single time points in the early follicular, midfollicular, midluteal, and late luteal phases.

Comentario: Dra. Rocío Núñez