

Aspectos genéticos da reprodução humana

WALTER PINTO JR.

Diretor da Embriocare – Clínica de Reprodução Humana

A nova genética trouxe inúmeras contribuições para o entendimento da fisiologia dos ovários e dos testículos. Como exemplo, é mister citar que a dominância de um folículo no ovário humano depende da integridade das conexinas 43 e 35, permitindo a emissão de sinais do sistema muscarínico do óvulo por meio das células do *cumulus* até o sistema neurogênico ovariano. Ela também permitiu a detecção e o diagnóstico de várias condições mórbidas, entre elas, uma das principais etiologias da agenesia dos canais deferentes, que poderia levar ao nascimento de crianças com o quadro clínico indesejável da fibrose cística. Outra etiologia de grande importância foi a detecção das deleções do cromossomo Y, responsáveis pela oligospermia severa ou azoospermia e ainda a esterilidade nos casos das síndromes de Kartagener e Kallmann, as deficiências dos receptores de andrógenos e estrógenos. Ao lado disso, o método genético-clínico aliado ao estudo molecular do DNA demonstrou que o ovário policístico tem uma base indubitavelmente genética (síndrome adrenogenital, mutações do gene *BMP15* e da folistatina).

Na área da citogenética, deve-se mencionar as inúmeras alterações dos cromossomos sexuais e as translocações cromossômicas associadas à infertilidade, chegando ao ponto de grande parte dos serviços de reprodução indicarem a cariotipagem como uma rotina nos casos de esterilidade não decorrentes de fatores somáticos (endometriose, alterações anatômicas etc.).

A citogenética molecular também teve o seu papel ao demonstrar que a grande maioria dos embriões não viáveis tem como etiologia as aberrações cromossômicas numéricas (monossomias e trissomias). Esse achado reveste-se de tanta importância que o diagnóstico pré-implantação (PGD) por FISH tornou-

se rotina, detectando as síndromes cromossômicas mais frequentes do recém-nascido.

Muitos casais que tiveram uma criança com síndrome de Down têm hoje a opção de realizar esse exame, evitando sua recorrência e/ou a interrupção da gestação. Percebendo essa importância e ainda o fato de uma pré-seleção dos embriões só poderia resultar na melhoria dos índices de gestação e de “bebê no colo”, muitos especialistas em reprodução humana passaram a incrementar sondas de outros cromossomos, denominando o teste de PGS (*pre-implantation genetics screening*).

Em relação às translocações presentes em um dos genitores e que levam ao abortamento habitual, com a técnica de FISH subtelomérica, tornou-se possível o diagnóstico pré-implantação de qualquer translocação desequilibrada. Nesta, o diagnóstico continua sendo chamado de PGD, uma vez que é essencial para evitar síndromes de trissomias ou monossomias de partes de cromossomos. As translocações equilibradas ocorrem com uma frequência de 1 em cada mil pessoas, sendo 50% delas decorrentes da translocação 13/14.

Não menos importante é o diagnóstico de doenças gênicas. Hoje, do ponto de vista prático, é possível diagnosticar qualquer doença gênica por meio do PGD, desde que o diagnóstico tenha sido feito e confirmado por DNA. No caso de doenças dominantes, como a coréia de Huntington, a maioria das ataxias cerebelares, (além de várias alterações osteomusculares etc.) podem ser hoje diagnosticadas a partir do conhecimento da mutação específica ou de polimorfismos associados ao alelo causador da doença. Para isso, é necessário que se tenha um estudo específico dessa família, tanto do ponto de vista genealógico quanto do ponto de vista molecular. Nas doenças recessivas, o estudo familiar e molecular muitas vezes envolve a necessidade de DNA de crianças ou adultos afetados por elas, acreditando-se, naturalmente, que o diagnóstico esteja correto.

As doenças mais freqüentes em nosso meio, como a fibrose cística e as hemoglobinopatias, já são diagnosticadas pelo PGD na rotina médica. Vale lembrar que 1 em cada 15 descendentes de italianos tem um gene mutante para talassemia, 1 em cada 10 negróides, o gene para a siclemia e 1 em cada 30 caucasóides, o gene mutante para fibrose cística.

As doenças recessivas ligadas ao sexo podem ser evitadas com a técnica de FISH e a escolha de embriões apenas do sexo feminino. É claro que, quando se conhece a mutação, poder-se escolher embriões masculinos normais e femininos não portadores da mutação. Como a grande maioria das doenças gênicas já se encontra mapeada no genoma humano, o uso dos polimorfismos do DNA permite que se diagnostique por PGD qualquer doença gênica, mesmo que o caso-índice já tenha falecido, conquanto exista material de DNA desse paciente.

Dito de modo objetivo, a reprodução humana também contribui para a genética, na medida da possibilidade de evitar o aparecimento de uma série de doenças indesejáveis e bastante caras do ponto de vista da saúde pública.

O PGD também pode ser considerado curativo, na medida em que pode selecionar embriões de um casal imunologicamente compatível com um filho

anterior desse casal afetado por doença na qual o transplante de medula seja necessário, como é o caso de várias hemoglobinopatias e da anemia de Fanconi. Nestas, pode-se utilizar o DPI do HLA por polimorfismos do DNA com um dos oito blastômeros e com outro, o diagnóstico da mutação, ou então o diagnóstico da mutação no corpúsculo polar e o do haplótipo do HLA no blastômero.

Outra aplicação da reprodução humana em doenças gênicas estabelecidas ou em filhos de consangüíneos se refere à sua prevenção, com o uso da doação de gametas masculinos ou femininos. Esta última também pode ser aplicada a pacientes com ausência ou falência ovariana, como é o caso da síndrome de Turner.

Também ficou claro que, depois da insofismável experiência de Hwang e Kang com clonagem terapêutica, qualquer procedimento confirmatório de sucesso da clonagem passará pelos testes moleculares da genética.

Assim, são tantas as inter-relações entre a genética e a medicina reprodutiva que se pode afirmar que as duas são irmãs na prevenção e/ou na terapêutica de quase todas as doenças genéticas.

Mais informações podem ser obtidas com o autor (walter@geneticamedica.com.br).

Climatério e obesidade

JOSÉ DOMINGOS BORGES
VALDIR TADINI
AARÃO MENDES PINTO NETO

O sobrepeso e a obesidade são problemas de saúde comuns cuja prevalência está aumentando em nível global. Segundo estatísticas recentes, um a cada dois adultos nos Estados Unidos encontra-se com excesso de peso ou obeso, com índice de massa corpórea (IMC) acima de 25 kg/m², caracterizando um aumento de mais de 25% dessa afecção nas três últimas décadas (Flegal *et al.*, 1998).

Nas sociedades industrializadas, a obesidade apresenta um pico de prevalência na faixa etária entre 55 e 65 anos nos homens e entre 65 e 74 anos nas mulheres, segundo os resultados de três estudos sucessivos NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), realizados entre 1971 e 1994 nos Estados Unidos. O relatório NHANES III mostra que a prevalência da obesidade em adultos aumentou 3,3% nos homens e 3,6% nas mulheres entre 1988 e 1991 (Kuczmarski *et al.*, 1997).

As razões pelas quais as mulheres têm uma maior prevalência de obesidade que os homens podem advir do fato de elas terem uma taxa metabólica menor, mesmo quando ajustada para diferenças na composição do corpo e no nível de atividade, por causa da perda, na pós-menopausa, no aumento da taxa metabólica que ocorre em associação à fase lútea do ciclo menstrual (Ferraro *et al.*, 1992).

Considerando-se o quadro exposto e o fato de que há uma maior incidência de obesidade entre mulheres mais idosas, nota-se a importância do ginecologista no acompanhamento e no tratamento dessa doença durante a pós-menopausa.

Existe uma tendência mundial de aumento da população feminina mais idosa, de forma que, por volta de 2050, mais de uma em cada cinco pessoas terá mais de 60 anos de idade. Particularmente interessante é o fato de que, embora a expectativa de vida esteja aumentando significativamente em relação às mulheres, a idade da menopausa vem se mantendo constante, entre 50 e 52 anos, determinando um tempo cada vez maior de vida sob os efeitos da insuficiência hormonal (Mckinlay *et al.*, 1992).

O nível circulante de estradiol (E2) após a menopausa é de aproximadamente 10 pg/mL a 20 pg/mL, a maior parte proveniente da conversão periférica de estrona (E1). O nível circulante de E1 em mulheres na pós-menopausa é maior que o de E2, ficando em torno de 30 pg/mL a 70 pg/mL. Ocorre parada na produção de estrógenos após a menopausa, embora os níveis desse hormônio possam ser significativos, principalmente em razão da conversão extraglandular de androstenediona (A) e de testosterona (T) em estrógeno (Meldrum *et al.*, 1981).

Após a menopausa, os níveis circulantes de A representam cerca de metade dos níveis anteriores à menopausa. A maior parte de A na pós-menopausa vem das adrenais, com apenas uma pequena quantidade sendo secretada pelos ovários. Os níveis de T não caem de forma importante, e, na realidade, o ovário na pós-menopausa, na maioria das mulheres, secreta mais T que na pré-menopausa. Com o desaparecimento dos folículos e dos estrógenos, o nível elevado de gonadotrofinas resultante provavelmente leva o tecido estromal remanescente a produzir maior quantidade de testosterona (Meldrum *et al.*, 1981).

A porcentagem de conversão de A em estrógeno correlaciona-se com o peso corporal, possivelmente pela capacidade da gordura em aromatizar andrógenos. Com a diminuição da secreção de estrógenos pelos ovários, a aromatização periférica de andrógenos pelas células gordurosas torna-se a maior fonte de estrógenos na mulher na pós-menopausa (Longcope *et al.*, 1986).

Uma vez que o tecido adiposo é um importante local de aromatização, o aumento no nível de estrógenos observado em mulheres obesas na pós-menopausa provavelmente ocorre por causa desse mecanismo (Longcope *et al.*, 1986). Esse fato, associado à diminuição dos níveis de globulina carregadora de hormônios sexuais, resulta em um aumento da concentração de estrógenos livres, elevando a associação entre obesidade e câncer de endométrio. O peso corpóreo, portanto, apresenta

uma correlação positiva com os níveis circulantes de E1 e E2 (Judd *et al.*, 1982).

Outro aspecto importante a ser abordado é a alta incidência de DCV em mulheres na menopausa. Esse tipo de afecção é a causa mais comum de morte entre mulheres americanas, sendo responsável por cerca de 280 mil óbitos por ano, e 50% dessas mulheres morrem em consequência de doenças arterioscleróticas, infarto agudo do miocárdio e derrame cerebral (Allison *et al.*, 1999). Tal quadro clínico, associado à hipertensão arterial, estaria relacionado não só com a própria fase de mudanças hormonais características desse período, mas também à obesidade, à distribuição central de gordura e ao tempo da menopausa (Tremollières *et al.*, 1996).

É à obesidade central que se associam riscos cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial e perfil lipoprotéico desfavorável. A razão cintura:quadril é a variável mais fortemente associada (de forma inversa) com o nível de HDL-2, que é a fração do HDL-colesterol mais consistentemente ligada à proteção contra DCV (Ostlund *et al.*, 1990).

TRATAMENTO

Quando se fala em tratamento na pós-menopausa, imediatamente se lembra da contribuição da terapia de reposição hormonal (TRH), que busca fundamentalmente o alívio da sintomatologia própria da deficiência hormonal e a prevenção das principais doenças que dela decorrem, ajudando a manter as condições de saúde adequadas e a qualidade de vida.

Nesse contexto, no qual a TRH aparenta ter poucas contra-indicações e resultados muito satisfatórios na síndrome climatérica, como intervir na mulher obesa, além das orientações dietéticas e do aumento de atividade física?

Sabe-se hoje que a TRH não determina, de modo geral, alterações no peso, não parecendo haver influência da hormonoterapia sobre o IMC em mulheres na pré e na pós-menopausa (Pasquali *et al.*, 1994; Reubinoff *et al.*, 1995).

Em 1995, o estudo denominado The PEPI Trial Group mostrou que mulheres na pós-menopausa não usuárias de TRH mostravam ganho de peso semelhante às usuárias de TRH estroprogestiva e significativamente maior que as usuárias de es-

trogênios isoladamente. Há, portanto, mulheres obesas, independentemente do uso ou não de TRH, para as quais o sucesso a longo prazo do tratamento de obesidade se baseia na redução do peso corpóreo e em medidas de manutenção para consolidar o efeito obtido.

Quando indicar o tratamento farmacológico para obesidade?

O ginecologista deve familiarizar-se com o manejo desta terapêutica, que está indicada quando o IMC é maior que 30 kg/m² (obesidade) e quando está entre 25 kg/m² e 30 kg/m² (sobrepeso), associado a doenças como DCV, diabetes melito, colecistopatia calculosa crônica, neoplasias e artropatias (Kissebah *et al.*, 1982).

A farmacoterapia tem importância fundamental para o efetivo tratamento antiobesidade, sendo útil para determinar perda de peso na obesidade refratária às terapêuticas clássicas. Além disso, é eficaz em prevenir a recuperação de peso e mantê-lo a longo prazo (Guy-Grand, 1997).

Atualmente, destaca-se, no grupo de medicamentos, a sibutramina, inibidor de recaptção de norepinefrina e serotonina, permitindo perda de peso corporal progressiva em indivíduos obesos, com poucos efeitos colaterais (Ryan *et al.*, 1995).

A sibutramina provoca perda de peso por meio do aumento de saciedade e da elevação da termogênese, e seu uso por tempo prolongado promove uma diminuição mais acentuada de gordura visceral do que subcutânea (Van Gaal *et al.*, 1998).

Considerando-se os dados apresentados aqui, com a importância da associação entre menopausa, obesidade e suas consequências, foi proposta a realização de um estudo clínico para avaliar as alterações clínicas e laboratoriais de um grupo de mulheres obesas com 45 a 60 anos de idade sob terapia de reposição hormonal após uso de sibutramina. O estudo da combinação dessa terapêutica antiobesidade associada à TRH acrescenta informações sobre a ação desse fármaco na obtenção de melhora da qualidade de vida dessa importante parcela da população feminina, merecendo maior atenção por se tratar de uma questão de saúde pública.

As referências bibliográficas podem ser obtidas com o autor (josedoming@uol.com.br).

A pesquisa com células-tronco embrionárias no Brasil após a Lei de Biossegurança

LYGIA DA VEIGA PEREIRA

Professora livre-docente do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

A nova Lei de Biossegurança, aprovada em março de 2005, permite o uso em pesquisas de embriões humanos inviáveis ou congelados há mais de três anos. Recebida com entusiasmo por grande parte da comunidade científica brasileira, esta lei permite que agora o País invista na promissora área de pesquisas com células-tronco embrionárias (células ES, do inglês *embryonic stem*).

Células ES são células indiferenciadas, derivadas do botão embrionário de blastocistos, e têm como característica principal sua pluripotência (Evans e Kaufman, 1981), ou seja, sua capacidade de se diferenciar em tecidos derivados dos três folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma. Se cultivadas em condições apropriadas, as células ES podem ser mantidas em seu estado indiferenciado quase indefinidamente. Por sua vez, tais células podem ser induzidas a iniciar um programa de diferenciação *in vitro*: quando expostas a diferentes fatores, sua diferenciação pode ser induzida em tipos celulares específicos, como células precursoras hematopoéticas (Palácios *et al.*, 1995) ou nervosas (McDonald *et al.*, 1999).

Essas propriedades das células ES levaram ao seu uso como modelo *in vitro* de desenvolvimento embrionário precoce, com os quais podem ser estudados, entre outros, mecanismos de diferenciação celular e efeitos de substâncias tóxicas e biologicamente ativas no desenvolvimento embrionário *in vitro* (Keller, 1995; Scholz *et al.*, 1999). Além disso, as células ES vêm sendo amplamente utilizadas como fonte de tecido para transplante capaz de aliviar os sintomas de diferentes doenças em modelos animais, incluindo doença de Parkinson (Kim *et al.*, 2002) e trauma de medula espinhal (McDonald *et al.*, 1999).

Linhagens de células ES bem caracterizadas já foram estabelecidas a partir de embriões de camundongos (Evans e Kaufman, 1981) e também de primatas não humanos (Thomson *et al.*, 1995). As

primeiras linhagens de células ES humanas foram descritas em 1998 (Thomson *et al.*, 1998), derivadas de embriões humanos excedentes de ciclos de fertilização *in vitro* (FIV) e doadas pelos pais biológicos. Desde essa época, outras linhagens de células ES humanas já foram descritas e vêm sendo utilizadas em pesquisas sobre biologia do desenvolvimento humano e terapia celular, revelando-se um importante modelo experimental (Zhang *et al.*, 2001; Reubinoff *et al.*, 2001; Kehat *et al.*, 2001). Ademais, o estudo da pluripotência das células ES pode revelar os mecanismos moleculares por trás da capacidade ampla de diferenciação dessas células, o que, por sua vez, poderá nos possibilitar o aumento da capacidade de diferenciação de células-tronco adultas.

Linhagens de células ES também podem ser estabelecidas a partir de embriões gerados por transferência nuclear, num procedimento chamado de clonagem terapêutica. Em humanos, a clonagem terapêutica visa, por meio da geração de células ES geneticamente idênticas a um indivíduo, à criação de tecidos imunocompatíveis com aquele indivíduo. Outra aplicação da clonagem terapêutica é a geração de linhagens de células ES a partir de pacientes com doenças genéticas para o estudo *in vitro* da progressão da doença naquelas células. Dois trabalhos recentes descreveram o estabelecimento de linhagens de células ES a partir de embriões clonados humanos, e o mais recente deles conseguiu aumentar a eficiência da técnica em até 15 vezes, tornando-a mais próxima de um uso mais amplo (Hwang *et al.*, 2004, 2005). Porém, apesar de também ser um instrumento poderoso de pesquisa e da capacidade técnica de desenvolvê-la no Brasil, a clonagem terapêutica está proibida pela Lei de Biossegurança.

Algumas das linhagens de células ES humanas podem ser obtidas dos grupos que as desenvolveram, porém sem nenhuma garantia de qualidade e com uma série de restrições quanto ao seu uso e quanto

à produção de patentes de produtos delas derivados (Thomson *et al.*, 1998; Cowan *et al.*, 2004). Além disso, as linhagens de ES humanas disponíveis foram estabelecidas e cultivadas na presença de produtos animais, o que impossibilita seu uso terapêutico em seres humanos (Martin *et al.*, 2005). Por isso, é fundamental que novas linhagens de células ES humanas sejam estabelecidas visando à autonomia para pesquisa com este material e à geração de linhagens adequadas para uso em seres humanos.

O estabelecimento de linhagens de células ES a partir de embriões pré-implantação é extremamente complexo – pelo que sabemos, há apenas um relato sobre o estabelecimento de linhagens de células ES no Brasil (Sukoyan *et al.*, 2002). De outro lado, uma vez estabelecidas, essas linhagens podem ser multiplicadas quase indefinidamente, suprimindo a necessidade de pesquisa de vários grupos de estudo. Assim, para fomentar a área de pesquisa com células ES humanas no Brasil e para conquistar autonomia nessa área, é

fundamental que sejam estabelecidas linhagens no País e que estas sejam colocadas à disposição de grupos de pesquisa nacionais.

A Lei de Biossegurança limita os embriões disponíveis para pesquisa àqueles inviáveis para reprodução ou congelados por mais de três anos, com a autorização dos pais biológicos. Estima-se que existam hoje no Brasil cerca de 3 mil destes embriões – quantos serão doados pelos pais para pesquisa ainda é uma incógnita. O importante é que esses recursos escassos sejam utilizados de forma responsável e racional, uma vez que o País já demonstrou grande competência em pesquisas com células-tronco adultas. Que grupos com excelência comprovada nas diferentes áreas que envolvem o estabelecimento de linhagens de células ES se unam para tornar as pesquisas com células-tronco embrionárias uma realidade no País.

As referências bibliográficas podem ser obtidas com a autora (Lpereira@usp.br).

Avaliação da reserva ovariana: o papel do hormônio antimulleriano

MARIO CAVAGNA

DIRCEU H. MENDES PEREIRA

Um dos aspectos importantes da medicina reprodutiva é a determinação da capacidade ovariana de realizar uma foliculogênese normal, de produzir oócitos de boa qualidade e, conseqüentemente, de formar embriões com adequado potencial de implantação.

A diminuição do número e da qualidade dos oócitos, associada principalmente à idade da mulher, é causa de dificuldades reprodutivas e de insucessos nas técnicas de reprodução assistida (TRA). A reserva ovariana, que traduz o número de folículos primordiais remanescentes nos ovários, deve ser adequadamente avaliada, em particular nas mulheres acima de 38 anos de idade para que sejam evitadas tentativas dispendiosas e inúteis de TRA.

Atualmente, há vários métodos de determinação da reserva ovariana. A dosagem dos níveis séricos basais de FSH, a dosagem de estradiol e de inibina B, o teste do clomifeno, o teste do estímulo com FSH (EFORT) e testes ultra-sonográficos, como a medida do volume ovariano e a contagem de folículos antrais, estão entre eles. Muitos serviços preconizam a associação de dois ou mais desses métodos para que a avaliação da reserva ovariana seja mais fidedigna. Entretanto, busca-se ainda a melhor maneira de se avaliar a reserva ovariana.

Van Rooij *et al.* (2002) foram os primeiros a sugerir que a concentração sérica basal (terceiro dia do ciclo) do hormônio antimulleriano (HAM) funcionaria como um marcador da função ovariana. O HAM é um fator de crescimento, membro da família TGF- β , produzido pelas células granulosas de folículos pré-antrais e antrais. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que o HAM possui efeito inibitório sobre o recrutamento dos folículos primordiais e diminui a sensibilidade folicular ao FSH (Visser e Themmen, 2005). O HAM pode ter um papel importante na avaliação da função ovariana não só em mulheres com quadro de infertilidade, mas também em pacientes submetidas a tratamento oncológico (Bath *et al.*, 2003).

Tremellen *et al.* (2005) registram que os níveis plasmáticos de HAM permanecem constantes (20 pmol/L a 25 pmol/L) entre 18 e 29 anos de idade; a partir dos 30 anos, começam a cair rapidamente, atingindo 10 pmol/L por volta de 37 anos de idade. Referem, ainda, que mesmo com uma queda de mais de 50% do HAM, os níveis basais de FSH quase não se alteram. Esses autores sugerem que um valor de corte de 8,1 pmol/L é capaz de prever a resposta em um ciclo de estimulação ovariana com uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 85%, e concluem que tal método se mostra superior ao FSH basal na identificação de mulheres com reserva ovariana diminuída.

Outra investigação recente, realizada por Van Rooij *et al.* (2005), comparou os principais métodos de determinação da reserva ovariana, entre eles a dosagem sérica basal de FSH, a dosagem de estradiol e inibina B e a contagem ecográfica de folículos antrais. Esses autores concluíram que a determinação dos níveis séricos do HAM representa o mais eficiente método de avaliação do declínio da capacidade reprodutiva relacionado à idade. Também recentemente, Penarrubia *et al.* (2005) compararam, para a determinação do prognóstico da resposta ovariana em ciclos de TRA, a mensuração dos níveis basais de HAM (terceiro dia do ciclo) com os níveis de HAM no quinto dia de estimulação ovariana, constatando que estes últimos predizem com mais segurança a probabilidade de cancelamento do ciclo.

Para concluir, a má resposta à estimulação ovariana em ciclos de TRA associa-se a concentrações diminuídas de HAM. Embora a determinação do HAM em nosso meio ainda não esteja incluída na rotina de avaliação da reserva ovariana, o método parece promissor e pode ter, já em futuro próximo, papel relevante na investigação da função gonadal feminina.

Referências bibliográficas

Bath LE, Wallace WH, Shaw MP *et al.* Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Mullerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Hum Reprod* 2003; 18 (11): 2368-2374.

Penarrubia J, Fabregues F, Manau D *et al.* Basal and stimulation day 5 anti-Mullerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. *Hum Reprod* 2005; 20 (4): 915-922.

Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekomge DN. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005; 45 (1): 20-24.

Visser JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 234 (1-2): 81-86.

Van Rooij IA, Broekmans FJ, Te Velde ER *et al.* Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002; 17 (12): 3065-3071.

Van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ *et al.* Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril* 2005; 83 (4): 979-987.

