

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

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

Avaliação da ecografia 3D (SonoAvc) para contagem de folículos antrais em mulheres inférteis: sua correlação com ecografia convencional 2D e com os níveis séricos do hormônio anti-Mülleriano

Paulo Augusto Peres Fagundes

Porto Alegre, 2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

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

Avaliação da ecografia 3D (SonoAvc) para contagem de folículos antrais em mulheres inférteis: sua correlação com ecografia convencional 2D e com os níveis séricos do hormônio anti-Mülleriano

Paulo Augusto Peres Fagundes

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, 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Peres Fagundes, Paulo Augusto

Avaliação da ecografia 3D(SonoAVC) na contagem de folículos antrais em mulheres inférteis: sua correlação com a ecografia transvaginal 2D convencional e a dosagem sérica do hormônio anti-Mülleriano / Paulo Augusto Peres Fagundes. -- 2015. 44 f.

Orientador: João Sabino Lahorgue da 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, 2015.

1. Contagem de folículos antrais. 2. hormônio anti-Mülleriano. 3. infertilidade. 4. ultrassom transvaginal. 5. 3DSonoAVC. I. Lahorgue da Cunha Filho, João Sabino, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

“Dedico esse Mestrado Acadêmico aos meus pais;

***Bolivar Messa Fagundes** (in memoriam), pelo exemplo que me passou de vida, de força, trabalho e coragem ao enfrentar os desafios da existência.*

***Eva Peres Fagundes**, nasci de ti, nos campos de Uruguaiana, de uma mulher gaúcha e disso me orgulho muito, pelo exemplo de amor incondicional, atenção e afeto, e por me ensinar a lutar sem nunca desistir dos meus sonhos, obrigado por tudo “*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelas graças recebidas e por esta Vida.

*Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. João Sabino Lahorgue da Cunha Filho**, pelo inestimável apoio durante todas as etapas desta conquista. Por ter me convidado a trabalhar junto a ele, por ter acreditado em mim, num momento difícil de minha vida. Devo a ele, a minha volta à seara da produção científica. A esse brilhante médico e professor, o meu reconhecimento e minha gratidão.*

*Agradeço à toda equipe do **Centro de Reprodução Humana INSEMINE**, pelo acolhimento e apoio, abrindo as portas da clínica para mim. **Dr. Alberto Stein, Farm. Dra. Kátia Simoni Delgado dos Santos e Dra. Luciana Fabian Guedes da Luz.***

*Agradeço à equipe do Instituto Willkok, nas pessoas da **Dra. Rita Chapon, Dra. Vanessa Krebs Genro e Dr. Carlos Augusto Bastos de Souza** pelo apoio durante a pesquisa.*

*Agradeço ao amigo **Dr. Raul Moreira Neto**, pelo apoio dispensado, abrindo as portas de sua clínica para que eu pudesse “reiniciar” na ecografia e pelo suporte dado na coleta de dados.*

*Ao acadêmico de medicina **Pedro Osten**, pelo apoio na formatação do projeto e na digitação dos dados.*

*Agradeço ao pastor da Igreja Metodista da Glória, **Lair Ferreira Vilagran** (in memoriam), por ter orado por mim e pelo apoio durante minha doença.*

*Agradeço a todos os meus sete irmãos: **Iara Beatriz, Izar Berenice, Bolivar, Izabel Cristina, Miguel Angelo, Leonardo e Ivanisa** pelo apoio, amor e carinho dispensados, sem vocês, as coisas seriam bem mais difíceis.*

*Agradeço aos médicos: **Dr. Cassiano Teixeira, Dra. Marlise Ribeiro e Dr. Leonardo Falkenberg** pelos excelentes cuidados que tiveram comigo, os quais oportunizaram resgatar a minha vida.*

*Agradeço a toda equipe de fisioterapia do Hospital Moinhos de Vento e em especial ao fisioterapeuta **Rogério da Cruz Cavalheiro**, que incansavelmente me acompanhou na minha longa luta para voltar a andar, tanto que hoje já estou jogando tênis.*

*Agradeço à **Dra. Ana Maria Furst de Souza Weiler**, minha psicóloga, pelo incondicional e fundamental apoio nos momentos difíceis.*

*Agradeço aos meus filhos **Cássio, Ana Paula e Helena**, pelo apoio e amor dispensados e por darem sentido à minha vida.*

*Agradecimento muito especial à minha esposa **Vera de Freitas**, pelo amor sem medida, pelo companheirismo, pela garra, pelo espírito de luta e por todo cuidado dispensado a mim, a você, a minha eterna gratidão e o meu amor.*

1. SUMÁRIO

1. LISTA DE ABREVIATURAS	4
2. LISTA DE FIGURAS.....	5
3. RESUMO.....	6-7
4. ABSTRACT	8-9
5. INTRODUÇÃO	10
6. REVISÃO DA LITERATURA	11
1.Estratégias para localizar e selecionar as informações	11-13
2.Marco conceitual esquemático	14
3. Revisão sistemática da literatura.....	15
3.1 Hormônio anti-Mülleriano.....	15-16
3.2 Contagem de folículos antrais.....	17-19
3.2.1 Ecografia 2D	17-18
3.2.2 Ecografia 3DSonoAVC	18-19
7. JUSTIFICATIVA	21
8. HIPÓTESES.....	21
9. OBJETIVOS	21
Principal	21
Secundários.....	21
10. REFERÊNCIAS	19-22
11. ARTIGO EM INGLÊS	22-25
12. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
13.PERSPECTIVAS FUTURAS	38

14. ANEXOS	1.TCLE	2. Protocolo de coleta de dados	39-42
------------	--------	---------------------------------------	-------

1. LISTA DE ABREVIATURAS

HAM: hormônio anti-Mülleriano

AFC: contagem de folículos antrais

FIV: fertilização *In-vitro*

SonoAVC – ultrassonografia baseada em análise automática computadorizada.

FSH- hormônio folículo estimulante

PRL- prolactina

TSH- hormônio tireoide-estimulante

E₂- estradiol

PCOD- ovários policísticos

SonoAVC- contagem automática do volume por ecografia

2D- ecografia bidimensional

3D- ecografia tridimensional

USTV- ultrassonografia transvaginal

ROI- área de interesse

ESCA- esterilidade sem causa aparente

TCLE- termo de consentimento livre e esclarecido

2. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marco conceitual esquemático.....	14
Figura 2. Folículos após processamento com o 3D SonoAVC	20

3. RESUMO

Introdução:

A contagem de folículos antrais (AFC) tornou-se uma ferramenta importante na avaliação da reserva ovariana. Vários estudos têm demonstrado uma relação entre a contagem de folículos antrais por ecografia transvaginal 2D e o hormônio anti-Mülleriano. Poucos estudos têm sido feitos estudando o papel da ecografia transvaginal 3D SonoAVC, particularmente em mulheres inférteis. A contagem de folículos na ecografia 2D convencional, como é conhecida, tem limitações como a variabilidade intra e inter-observadores e o tempo gasto no exame no caso de múltiplos folículos. Com a contagem automatizada dos folículos fornecida pelo software 3D Sono AVC, o tempo gasto é menor e a variabilidade entre observadores pode ser diminuída ou eliminada.

Objetivos:

Avaliar a contagem de folículos antrais pela nova tecnologia 3DSonoAVC em mulheres inférteis e sua relação com a ecografia transvaginal 2D convencional e a dosagem sérica do hormônio anti-Mülleriano.

Métodos:

Estudo prospectivo transversal, onde avaliamos um grupo de 43 mulheres inférteis com idade entre 25 e 40 anos, coletados entre abril e setembro de 2015, em um centro de reprodução assistida privado em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Os dados das pacientes incluíram a idade, o IMC e causa da infertilidade. No dia 3 do ciclo, os níveis séricos de AMH, FSH, CA 125, prolactina, TSH, E2, foram medidos e o número de folículos antrais (2-9) medidos pela ecografia. Foi realizada uma varredura ecográfica transvaginal com 3D SonoAVC e o 2D.

Resultados:

As medianas (amplitude de variação) dos níveis séricos de AMH, FSH, CA 125, prolactina, TSH, E2, foram 2,98 (0,02-15,8), 9,45 (5-9.4) 14,0 (6-35) 13,6 (5.2-29.4) 2,1 (0.61- 5,99) 46,2 (4,0-79), respectivamente, e a contagem de folículos antrais foi de 15,7 (3-35) com 2D e 17,0 (3-45) com o 3D. O tempo médio gasto para a realização da medição dos folículos pela ecografia 2D foi de 275 ±109 s e pelo 3DSonoAVC foi de 103 ± 57 s, ($p < 0.0005$). A idade e a contagem de folículos pelo 2D tiveram um coeficiente de correlação negativo, $r = -0,3$ ($p = 0,028$). A idade e a contagem pelo 3D SonoAVC tiveram um $r = -0,29$ ($p = 0,031$). A correlação de HAM com a contagem de folículos apresentou um coeficiente, $r = 0,675$ ($p < 0,01$) com 2D e $r = 0,659$ ($p < 0,001$) com o 3DSonoAVC.

As duas contagens pelo 2D e 3D SonoAVC, mostraram uma correlação positiva forte, $r = 0,983$ ($p < 0,001$). O volume ovariano correlacionado com o HAM mostrou um $r = 0,510$ ($p < 0,001$). O volume do ovário se mostrou fortemente correlacionado com o número de folículos, $r = 0,809$ ($p < 0,01$). Na avaliação dos folículos < 6 mm e HAM, se identificou um $r = 0,537$ ($p < 0,001$) com o 2D e $r = 0,510$ ($p < 0,001$) com o 3D SonoAVC.

Conclusão:

O estudo sugere que existe uma forte correlação entre o 3D SonoAVC e o 2D na contagem de folículos antrais. A contagem dos folículos antrais por ambos os métodos foi positivamente correlacionada com os níveis séricos do hormônio anti-Mülleriano. O 3D SonoAVC se mostrou significativamente mais rápido que o 2D na contagem de folículos.

Palavras-chave: contagem de folículos antrais, hormônio anti-Mülleriano, infertilidade, ecografia transvaginal, 3D SonoAVC.

4. ABSTRACT

Introduction:

The counting of antral follicles (AFC) has become an important tool in the assessment of ovarian reserve. Several studies have shown a relationship between the antral follicle count by conventional 2D transvaginal sonography and serum anti-Müllerian hormone. Few studies have been done studying the role of 3D SonoAVC technology, particularly in infertile women. The follicle count in the conventional 2D ultrasound, as known, has limitations as the intra- and inter-observer variability and increasing the time of performing the test in case of multiple follicles. With automated technology follicle count provided by the software 3DSono AVC, the time spent is less, and the variability between observers can be decreased or eliminated.

Objectives:

Evaluate the antral follicle count the new 3D technology (SonoAVC) in infertile women and its relationship with conventional 2D transvaginal ultrasound and serum anti-Müllerian hormone.

Methods:

This is a cross-sectional, prospective study, where they were evaluated a group of 43 infertile women aged less than 40 years, collected between April and September 2015 at a private fertility clinic in Porto Alegre, south Brazil. Patient data including age, BMI, cause of infertility. On cycle day 3, serum levels of AMH, FSH, CA 125, Prolactin, TSH, E2, were measured and the number of antral follicles (2-9 mm) estimated at ultrasound. Was performed a double scanning with transvaginal ultrasound 2D and 3D SonoAVC.

Results:

Median (range) serum levels of AMH, FSH, Ca 125, Prolactin, TSH, E2, were 2.98(0.02-15.8), 9.45(5-9.4)14.0(6-35)13.6(5.2-29.4)2.1(0.61-5.99)46,2(4.0-79), respectively, and antral follicle count was 15.7(3-35) with 2D and 17,0(3-45) with 3D. The average time taken to carry out the measurement of the follicles by 2D ultrasound was 275 ± 109 and the 3DSonoAVC was 103 ± 57 s., ($p < 0.0005$).

The age and the total count of follicles 2D had a negative correlation coefficient, $r = -0.3$ ($p = 0.028$). Age and 3D antral follicles count had $r = -0.29$ ($p = 0.031$). The dosage AMH was correlated with the total number of early antral follicles, $r = 0.675$ ($p < 0.01$) with 2D and $r = 0.659$ ($p < 0.001$) with 3D.

The two count, 2D and 3D SonoAVC, showed a strongly positive correlation, $r=0.983$ ($p < 0.001$) Ovarian volume correlated with AMH dosage, $r=0.510$ ($p < 0.001$). The ovarian volume is strongly correlated with follicle count, $r=0.809$ ($p < 0.01$).

In the evaluation of the follicles < 6 mm and AMH, $r=0.537$ ($p < 0.001$) in 2D and $r=0.510$ ($p < 0.001$) in 3D.

Conclusion:

The study suggests that there is a strong correlation between the 3D and 2D SonoAVC the antral follicle count. The counting of antral follicles by both methods was positively correlated with serum levels of anti-Müllerian hormone. 3D SonoAVC was significantly faster than in 2D follicle count.

Keywords: antral follicle count, anti-Müllerian hormone, infertility, transvaginal ultrasound, 3D SonoAVC.

5. INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios no manejo das pacientes inférteis é perda do potencial reprodutivo com o avançar da idade. O adiamento do projeto de gravidez no mundo moderno, fazem com que as mulheres optem por gestar cada vez mais tarde. A idade é um dos principais fatores de diminuição das chances de gestação e de aumento na taxa de abortamentos^{3,4}. A diminuição da reserva ovariana com a perda da qualidade oocitária e a depleção do número de oócitos disponíveis na coorte folicular com o passar dos anos, traduz-se na diminuição da taxa de recuperação de oócitos, diminuição na qualidade dos embriões e nas taxas de gestação nos ciclos de FIV^{3,4}.

A avaliação do potencial reprodutivo tem sido descrita por vários autores utilizando dosagens de FSH, estradiol e inibina B e mais recentemente do hormônio anti-Mülleriano,⁴. O hormônio anti-Mülleriano, produzido pelas células de Sertoli, induz à regressão dos ductos de Muller, mas também é produzido pelas células da granulosa dos folículos em desenvolvimento⁸. O hormônio anti-Mülleriano pode ser medido em qualquer fase do ciclo menstrual e sua dosagem apresenta uma relação direta com a contagem de folículos antrais^{1,5,7}. Torna-se detectável durante o ciclo reprodutivo da mulher e torna-se indetectável em mulheres ooforectomizadas e na pós-menopausa¹.

Atualmente se utiliza a contagem de folículos antrais e a dosagem sérica do hormônio anti-Mülleriano para avaliar a reserva ovariana.²¹ A contagem de folículos antrais é realizada pela ecografia transvaginal. Com o avanço da tecnologia no diagnóstico por imagem, a melhora da resolução e da utilização de transdutores transvaginais, o ovário começou a ser melhor visualizado e, conseqüentemente, melhor estudado. Alguns autores avaliaram a aplicabilidade da tecnologia 3D em comparação com a ecografia 2D, no sentido de avaliar a eficiência e a acurácia destes novos softwares de gerenciamento de imagens²¹.

Um novo software de captura de imagens em 3D, o 3DSonoAVC (GE Medical Systems, Áustria) iniciou a ser descrito em 2007³¹. Existem poucos estudos avaliando esta nova tecnologia em mulheres inférteis. Há necessidade de consenso sobre o diâmetro dos folículos representativos da real reserva funcional ovariana. Neste contexto, é imperativo a avaliação e validação destas novas ferramentas de imagem como o 3DSonoAVC no sentido de explorar suas potencialidades bem como detectar suas deficiências.

6. REVISÃO DA LITERATURA

1. Estratégias de busca para localizar e selecionar as informações:

A busca de artigos para a revisão da literatura foi realizada com as seguintes palavras-chave: 1) *hormônio anti-Mülleriano*; 2) *contagem de folículos antrais*; 3) *infertilidade*; 4) *ecografia transvaginal*, 5) *3D SonoAVC*

A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed e Scopus.

Em relação ao termo *hormônio anti-Mülleriano* foram encontrados 2225 artigos no PubMed e 2138 no Scopus. Usando o termo *contagem de folículos antrais* foram localizados 1188 artigos no PubMed e 911 no Scopus. Em relação ao termo *infertilidade* foram encontrados 71667 no PubMed e 106386 no Scopus.

Cruzando as palavras-chave *hormônio anti-Mülleriano* e *contagem de folículos antrais*, foram vistos 262 artigos no PubMed e 374 no Scopus. Ao se cruzar *hormônio anti-Mülleriano* e *infertilidade* foram vistos 436 artigos no PubMed e 637 no Scopus. Em relação ao cruzamento das palavras-chave *hormônio anti-Mülleriano* e *ecografia transvaginal*, foram encontrados 37 artigos no PubMed e 58 no Scopus. Em relação ao cruzamento das palavras-chave *contagem de folículos antrais* e *ecografia transvaginal* foram encontrados 99 artigos no PubMed e 118 no Scopus. Em relação ao cruzamento de *infertilidade* e *ecografia transvaginal*, foram encontrados 755 artigos no PubMed e 1123 no Scopus. Ao cruzarmos *hormônio anti-Mülleriano*, *contagem de folículos antrais* e *ecografia transvaginal*, foram encontrados 27 artigos no PubMed e 38 no Scopus.

Ao se cruzar *3D SonoAVC* e *ecografia transvaginal* foram encontrados 4 artigos no PubMed e 3 artigos no Scopus. Ao cruzarmos *hormônio anti-Mülleriano* e *3D SonoAVC* encontramos 1 artigo no PubMed e 3 artigos no Scopus. Ao cruzarmos *contagem de folículos antrais* com *3D SonoAVC* encontramos 6 artigos no PubMed e 7 artigos no Scopus e ao cruzarmos *3D SonoAVC* com *infertilidade* encontramos 6

artigos no PubMed e 8 artigos no Scopus. Ao cruzarmos as cinco palavras chaves, nenhum artigo foi encontrado.

As tabelas 1 e 2 resumizam a estratégia de busca das referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos do estudo.

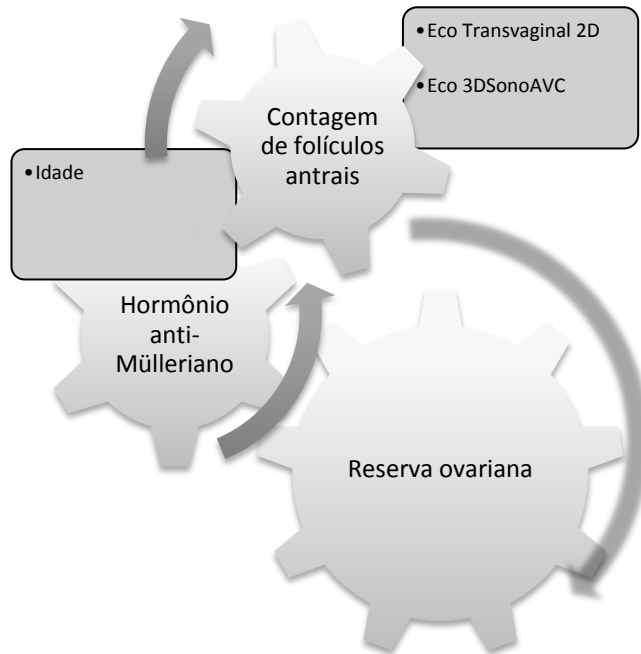
Tabela 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas PUBMED

Palavras-chave	PubMed
Hormônio anti-Mülleriano	2225
Contagem de folículos antrais	1188
Infertilidade	71667
Hormônio anti-Mülleriano e Contagem de folículos antrais	262
Hormônio anti-Mülleriano e Infertilidade	436
Contagem de folículos antrais e hormônio anti-Mülleriano e ecografia transvaginal e infertilidade	17
Hormônio anti-Mülleriano e Ecografia transvaginal	37
Infertilidade e 3D SonoAVC	6
Contagem de folículos antrais e 3D SonoAVC	6
Hormônio anti-Mülleriano e 3D SonoAVC	1
3D SonoAVC e ecografia transvaginal	4
3D SonoAVC + hormônio anti-Mülleriano + ecografia transvaginal + contagem de folículos antrais + 3D SonoAVC	0

Tabela 2: Estratégia de busca de referências bibliográficas- Scopus

Palavras-chave	SCOPUS
Hormônio anti-Mülleriano	2138
Contagem de folículos antrais	911
Infertilidade	106386
Hormônio anti-Mülleriano e Contagem de folículos antrais	374
Hormônio anti-Mülleriano e Infertilidade	637
Hormônio anti-Mülleriano e Ecografia transvaginal	39
Contagem de folículos antrais e hormônio anti-Mülleriano e ecografia transvaginal e infertilidade	20
Infertilidade e 3DSonoAVC	8
Contagem de folículos antrais e 3D SonoAVC	7
Hormônio anti-Mülleriano e 3D SonoAVC	3
3D SonoAVC e ecografia transvaginal	3
3D SonoAVC + hormônio anti-Mülleriano + ecografia transvaginal + contagem de folículos antrais + 3D SonoAVC	0

2. Marco conceitual



A reserva ovariana funcional é mediada pela ação do hormônio anti-Mülleriano que regula, através de seus receptores, a ação do FSH. O hormônio anti-Mülleriano diminui com o avanço da idade, assim como a contagem de folículos antrais.¹

A contagem de folículos antrais podem ser realizadas tanto pela ecografia transvaginal 2D, quanto pela 3D. Em geral, quanto menor a idade, maior a contagem de folículos antrais e maior o nível do hormônio anti-Mülleriano.^{2,3}

3. Revisão sistemática da literatura

3.1 Hormônio anti-Mülleriano

O hormônio anti-Mülleriano é uma glicoproteína dimérica da superfamília dos fatores de transformação e crescimento beta (TGF-B). Em ovários de fetos humanos o hormônio anti-Mülleriano pode ser detectado a partir de 32 semanas de gestação¹. Em folículos primordiais a expressão do HAM parece estar ausente. A presença do HAM pode ser detectada em folículos em fase inicial de desenvolvimento (primários), e expressa mais fortemente em pré-antrais e antrais²². O HAM continua sendo secretado até que os folículos atinjam um estágio de desenvolvimento que possam ser selecionados para a dominância folicular. Nos seres humanos isso é evidente em folículos antrais de 4- 6 mm²². O HAM é expresso em folículos que foram recrutados do pool de folículos primordiais, mas não selecionados para a dominância. O HAM não é produzido pelas células da teca, nem por folículos atrésicos²⁵.

Os níveis de HAM são quase indetectáveis no nascimento. As dosagens de HAM tem um ligeiro aumento nas primeiras semanas após o nascimento. Os níveis atingem o maior nível durante o final da puberdade²⁵. O nível sofre um declínio no decorrer da vida reprodutiva e se torna indetectável após a menopausa, quando a reserva ovariana se esgota²⁵. O nível de HAM se torna indetectável 3 a 5 dias após ooforectomia.⁵

O HAM pode ter uma função importante na inibição de recrutamento dos folículos primordiais e na seleção do folículo dominante. Outras ações de caráter autócrino e parácrino que possam ser mediados pelo HAM têm sido descritos e revistos por alguns autores⁵. O processo de seleção folicular pode ser influenciado pela função inibitória do HAM folicular ao FSH. Uma expressão diminuída do HAM nos folículos permitiria que os folículos continuassem a crescer e ovular no próximo ciclo¹⁰.

Alguns autores estudaram a função do HAM na esteroidogênese ovariana nas células da granulosa. Os níveis de HAM parecem ter uma relação com os níveis de estradiol no fluido folicular de folículos antrais²⁴. Estes dados foram corroborados por outro estudo que mostrou que os polimorfismos para o receptor tipo II do HAM podem estar relacionados aos níveis de estradiol da fase folicular, sugerindo uma função do HAM como marcador único que não se altera significativamente durante o ciclo menstrual²⁵. Os níveis de HAM parecem não se alterar em condições em que a liberação de gonadotrofina endógena é reduzida, como o estado de gravidez e sob o uso de análogos do GnRH. Os níveis de HAM refletem um crescimento folicular não

cíclico dos pequenos folículos do ovário e que são independentes do estímulo do FSH.^{5,7}

No momento presente, estes pontos de vista ainda são em grande parte especulativos, pois foram realizados poucos estudos *In-vitro* ou em vivo no caminho de esclarecer o papel fisiológico do HAM no ovário humano. Por isso nosso estudo é importante no sentido de aprofundar a busca do conhecimento da intimidade da coorte folicular, suas interações, e o papel do HAM na determinação da reserva ovariana.⁹

3.2 Contagem de folículos antrais pela ecografia transvaginal:

3.2.1- Ecografia 2D -

Há vários anos a ecografia transvaginal vem sendo utilizado em ginecologia e obstetrícia e tem sido de imensurável valor na prática diária do ginecologista, particularmente dos profissionais envolvidos em reprodução assistida.^{2,3}

A contagem de folículos antrais tem se mostrado eficaz no auxílio dos clínicos a determinar a reserva ovariana de cada paciente e, com isso, individualizar os protocolos de tratamento. A contagem dos folículos antrais (CFA) passou a ser uma ferramenta importante na avaliação da reserva ovariana³. A contagem de folículos antrais é superior à medida do volume ovariano na avaliação da resposta ovariana à fertilização *In vitro*. A contagem de folículos antrais se mostrou superior em relação à dosagem de gonadotrofinas basais na predição de resposta em pacientes submetidas à fertilização "*In-vitro*"¹⁹.

O folículo antral pode ser visualizado e medido pela ecografia transvaginal por possuir a cavidade antral que contém o líquido folicular.

A contagem total de folículos de ambos os ovários constitui a contagem de folículos antrais. Os folículos, na ecografia 2D, podem ser medidos em dois diâmetros quando assumem uma forma oval e se calcula o diâmetro médio, ou em diâmetro único, quando são de forma de uma esfera. Na literatura, muitos trabalhos não detalham em sua metodologia como os folículos são medidos.^{2,3}

Em 2007, Haasdma et al., avaliaram 474 mulheres inférteis e separaram as medidas da CFA em folículos menores (2mm a 6 mm) e maiores (7 a 10 mm), correlacionando a CFA com FSH, Inibina B, volume ovariano e teste do citrato de clomifeno. Encontraram correlação dos folículos maiores com o volume ovariano e à Inibina B e dos folículos menores com a idade, FSH, Inibina B e teste do citrato de clomifeno. A contagem de folículos menores diminui com a idade, enquanto que a contagem dos folículos maiores se mantém mais ou menos constante com o passar dos anos, provavelmente por fazerem parte da população de folículos atresícos. Neste estudo, os autores sugerem que a reserva ovariana funcional seja representada pelos folículos menores⁶.

Em 2010, Broekmans et al. tentaram estabelecer a melhor forma de se determinar a contagem dos folículos antrais. Os autores acreditam que o exame ecográfico seja realizado em pacientes eumenorreicas e sem patologias que possam comprometer a CFA, como endometriomas e cirurgias ovarianas prévias que tenham determinado um dano significativo ao parênquima ovariano. O exame deveria ser realizado entre

o segundo e quarto dia de um ciclo espontâneo. A ecografia transvaginal 2D com transdutor de no mínimo 7MHz, deve ser o requisito mínimo para a boa prática de execução do exame. Devem ser medidos os folículos entre 2 a 10 mm de diâmetro. Os folículos devem ser medidos em seu diâmetro interno em dois planos, e, posteriormente, calcular o diâmetro médio.^{2,3}

O avanço constante das tecnologias de imagem e dos softwares de gerenciamento, trouxeram ao mercado a tecnologia automatizada 3D. Este novo método de aquisição de imagem (3DSonoAVC) tem sido objeto de poucos estudos até agora. Este estudo utiliza essa nova tecnologia para contribuir com esses recentes avanços.³¹

3.2.2- Ecografia 3DSonoAVC

A avaliação dos folículos ovarianos através da ecografia transvaginal 3D foi descrita pela primeira vez em 1990². Esta tecnologia de imagem permite a análise do ovário através de cortes tomográficos e multiplanares com a possibilidade do armazenamento das imagens num bloco virtual 3D para posterior e detalhado estudo. Com o desenvolvimento dos transdutores transvaginais volumétricos 3D, abriram-se novas possibilidades ainda pouco exploradas na avaliação da pelve². Na avaliação do ovário, o uso do 3D multiplanar permite ao ecografista armazenar as imagens num bloco virtual 3D e realizar a contagem de folículos antrais no modo multiplanar, podendo “fatiar” o ovário, e analisá-lo minuciosamente, aumentando com isso a acurácia da avaliação⁴. Este processo apesar de propiciar uma avaliação minuciosa, aumenta muito o tempo do exame.³¹

A nova tecnologia 3D SonoAVC (GE Medical Systems, Áustria) é uma ferramenta que permite o cálculo automático das medidas e dos volumes de áreas líquidas que são reconhecidas pelo software durante a captura das imagens. O 3D SonoAVC transforma as áreas anecóicas (fluido folicular) em elementos opacos com volume (voxels) e a parte circundante do parênquima ovariano é eliminada, restando apenas imagens do líquido folicular.³¹

Os folículos antrais que possuem líquido em seu interior e por isso são facilmente medidos pelo 3DSonoAVC. O transdutor volumétrico do equipamento 3D é diferente do 2D. Esse transdutor 3D possui um mecanismo de varredura automático que faz um escaneamento de todo o órgão na “área de interesse” determinada pelo examinador (ROI). Após essa captura, imediatamente as imagens aparecem no monitor e o relatório completo das medidas dos folículos nos três eixos medidos (x,y e z) e o respectivo volume folicular, são informados. Após o processamento da captura, além do relatório completo, temos a visualização em 3D somente das áreas anecóicas correspondentes ao líquido folicular. O software produz uma imagem colorida com uma cor diferente para cada folículo avaliado.³¹

Ao contrário do 2D, que depende da subjetividade e da interpretação de cada examinador, o 3DSonoAVC parece não ter uma variação interobservador estatisticamente significativa. Utilizando O 3dSonoAVC, Jayaprakasan et al.(2007) avaliaram a CFA de 2mm a 10mm de diâmetro ao exame ultrassonográfico de 41 pacientes em investigação da infertilidade, de três investigadores com graus diferentes de experiência, verificaram que a variação interobservador na CFA, não foi estatisticamente significativa. Neste trabalho, entre outros, do grupo da Universidade de Nottingham, Inglaterra, utilizando a tecnologia 3D, a contagem de folículos antrais foi estratificada de 1mm a 1mm, de 2mm até 9 a 10 mm.^{12,15,20}

Novas tecnologias de imagem têm sido desenvolvidas e as evidências atuais são de que o 3DSonoAVC não melhora a acurácia da avaliação, mas, permite uma redução importante do tempo necessário para examinar o paciente e virtualmente elimina a diferença inter e intra examinador. Atualmente é discutido se o uso da tecnologia transvaginal 3DSonoAVC oferece vantagem em relação ao 2D na avaliação das pacientes inférteis¹⁴. Este estudo contribui com essa discussão.

Esta tecnologia também pode ser útil na avaliação dos ovários policísticos, aonde, na maioria dos casos, é difícil a mensuração exata do número de folículos com a tecnologia convencional 2D devido ao grande número de folículos envolvidos na contagem, particularmente em mulheres obesas. Nos centros de reprodução assistida, os controles ovulatórios vão ficando mais trabalhosos com o desenvolvimento folicular crescente nos ciclos de indução. O 3D SonoAVC pela rapidez e reprodutibilidade das imagens poderia se inserir nesta rotina com vantagens, trazendo uma maior fidedignidade na avaliação da coorte folicular e melhorando o fluxo do trabalho.²³

Este estudo é inédito, pois avalia a aplicabilidade do 3D SonoAVC numa população de mulheres inférteis, relacionando os resultados a ecografia 2D convencional e a relação de ambos com a dosagem sérica do hormônio anti-Mülleriano. Não encontramos nenhum estudo com este delineamento. No cruzamento das cinco palavras chaves (3DSonoAVC, ecografia transvaginal, hormônio anti-Mülleriano, contagem de folículos antrais e infertilidade) não encontramos nenhum artigo nas bases de dados consultadas (PubMed e Scopus). Com esse estudo pretendemos contribuir na avaliação desta nova ferramenta de diagnóstico por imagem.

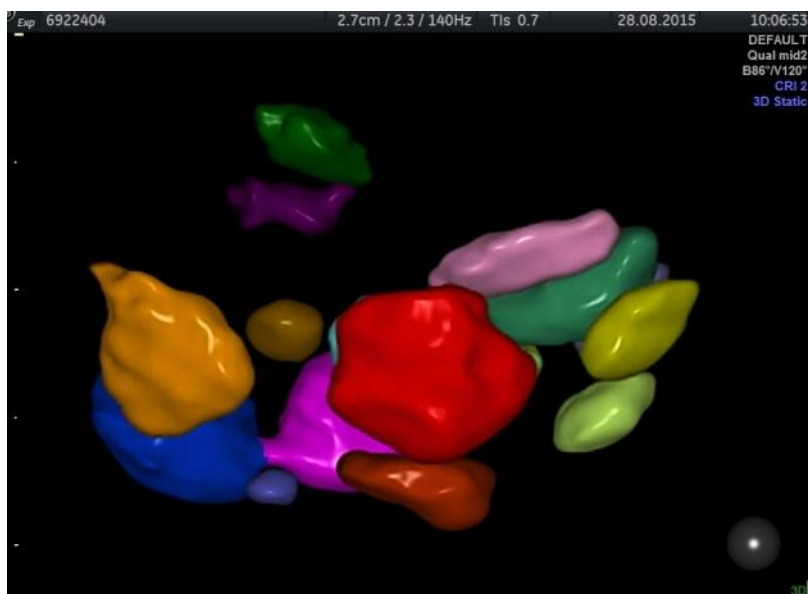


Figura 2. Imagem dos folículos após processamento com o 3D SonoAVC

7. JUSTIFICATIVA

A justificativa de nosso projeto de pesquisa é avaliar a reserva ovariana através de uma nova tecnologia de imagem por ultrassom, o 3D SonoAVC. Para tanto, nossa estratégia é comparar o 3D SonoAVC com a ecografia 2D transvaginal convencional na contagem de folículos antrais. No sentido de uma avaliação mais ampla da reserva ovariana, estudaremos a relação de ambas as contagens com a dosagem sérica do hormônio anti-Mülleriano.

8. HIPÓTESES

Hipótese Nula:

- A contagem de folículos ovarianos antrais medidas pela ecografia transvaginal 3D SonoAVC e 2D não se relacionam entre si e não têm relação com a dosagem sérica do hormônio anti-Mülleriano em mulheres inférteis.

9. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Relacionar a contagem de folículos 3D SonoAVC com a contagem convencional 2D

Objetivos secundários:

Relacionar a contagem de folículos por 3D SonoAVC com HAM.

Relacionar a contagem 3D SonoAVC com dosagem sérica de estradiol.

Relacionar a contagem 3D SonoAVC com dosagem sérica de FSH.

Relacionar a contagem 3D SonoAVC com o volume ovariano.

10. REFERÊNCIAS

1. de Vet A, Laven JSE, de Jong FH, Themmen APN, Fauser BCJM. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril*. 2002;77(2):357-62.
2. Kyei-Mensah A, Zaidi J, Pittrof R, Shaker A, Campbell S, Tan SL., Transvaginal three-dimensional ultrasound: accuracy of follicular volume measurements. *Fertil Steril* 1996;65:371-376.
3. Bonilla-Musoles F, Castillo JC, Caballero O, Pérez-Panades J, Bonilla F Jr, Dolz M, Osborne N. Clin Exp Obstet Gynecol. Predicting ovarian reserve and reproductive outcome using antimüllerian hormone (AMH) and antral follicle count (AFC) in patients with previous assisted reproduction technique (ART) failure. 2012;39(1):13-8.
4. La Marca A, Muttukrishna S, Blazar A,, Cunha-Filho JS, Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Raine-Fenning N, Jayaprakasan K. Age-related normograms of serum antimüllerian hormone levels in a population of infertile women: a multicenter study. *Fertil Steril*. 2011 Jun;95(7):2359-63, 2363.
5. Visser JA, de Jong FH, Laven JSE, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*. 2006;131(1):1-9.
6. Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EMA, Groenewoud ER, Heineman MJ, *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*. 2007;22(7):1925-31.
7. Fanchin R, Taieb J, Lozano DHM, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproductibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strenghtens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod*. 2005;20(4):923-7.
8. Fişicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as na indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2006;85(3):592-6.
9. Visser JA. L'ovocyte: avancées fondamentales et thérapeutiques. Rôle de l'AMH (hormone anti-Müllerienne) dans le recrutememt folliculaire initial et cyclique. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 2006;35(2):2S30-4.

10. Durlinger, Visser JA, Themmen APN. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*. 2002;124(5):601-9.
11. Maheshwari A, Fowler P, Bhattacharya S. Assessment of ovarian reserve – should we perform tests of ovarian reserve routinely? *Hum Reprod*. 2006;21(11):2729-35.
12. Jayaprakasan K, Hilwah N, Kendall NR, Hopkisson JF, Campbell BK, Johnson IR, *et al*. Does 3D ultrasound offer any advantage in the pretreatment assessment of ovarian reserve and prediction of outcome after assisted reproduction treatment. *Hum Reprod*. 2007;22(7):1932-41.
13. Hendriks DJ, Kwee J, Mol BWJ, te Velde ER, Broekmans JM. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril*. 2007;87(4):764-75.
14. Deb S, Campbell BK, Clewes JS, Raine-Fenning NJ. Quantitative analysis of number and size of antral follicles: a comparison of real-time two-dimensional and automated three-dimensional ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2010 Mar;35(3):354-60
15. Deb S, Campbell BK, Clewes JS, Pincott-Allen C, Raine-Fenning NJ. Intracycle variation in number of antral follicles stratified by size and in endocrine markers of ovarian reserve in women with normal ovulatory menstrual cycles. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013 Feb;41(2):216-22.
16. Deb S, Campbell BK, Pincott-Allen C, Clewes JS, Cumberpatch G, Raine-Fenning NJ. Quantifying effect of combined oral contraceptive pill on functional ovarian reserve as measured by serum anti-Müllerian hormone and small antral follicle count using three-dimensional ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012 May;39(5):574-80.
17. Zácková T, Mardesic T, Krofta L, Rezáková J, Feyereisl J. *Ceska Gynekol*. The role of three-dimensional ultrasonography in assisted reproduction 2011 Apr;76(2):128-34.
18. Deb S, Kannamannadiar J, Campbell BK, Clewes JS, Raine-Fenning NJ. The interovarian variation in three-dimensional ultrasound markers of ovarian reserve in women undergoing baseline investigation for subfertility. *Fertil Steril*. 2011 Feb;95(2):667-72.
19. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. A prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril*. 2010 Feb;93(3):855-64.

20. Deb S, Jayaprakasan K, Campbell BK, Clewes JS, Johnson IR, Raine-Fenning NJ. Intraobserver and interobserver reliability of automated antral follicle counts made using three-dimensional ultrasound and SonoAVC. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 Apr;33(4):477-83.
21. Jayaprakasan K, Hilwah N, Kendall NR, Hopkisson JF, Campbell BK, Johnson IR, Raine-Fenning NJ. Does 3D ultrasound offer any advantage in the pretreatment assessment of ovarian reserve and prediction of outcome after assisted reproduction treatment? *Hum Reprod.* 2007 Jul;22(7):1932-41.
22. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10:77-83.
23. Broekmans FJ, de Ziegler D, Howles CM, Gougeon A, Trew G, Olivennes F. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization, *Fertil. Steril.* 2010;94(3):1044-51.
24. Kevenaar ME, Themmen AP, Laven JS, Sonntag B, Fong SL, Uitterlinden AG, de Jong FH, Pols HA, Simoni M, Visser JA. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor polymorphisms are associated with follicular phase estradiol levels in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 2007;22:1547-1554.
25. La Marca A, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2006b;21:3103-3107.
26. Wallace WH, Kelsey TW. Ovarian reserve and reproductive age may be determined from measurement of ovarian volume by transvaginal sonography. *Hum Reprod.* 2004;19(7):1612-7.39
27. Fanchin. R., Lamazou, F., E. Arbo, Grynberg M., Levailant J.M., Fridman, R. Place de l'échographie pour le bilan de la réserve ovarienne dans Le cadre d'une infertilité. *Gynecol Obstet Fertil.* 2009 May;37(5):425-31.
28. Danielle Monniaux , Frédérique Clément , Rozenn Dalbiès-Tran , Anthony Estienne , Stéphane Fabre , Camille Mansanet , and Philippe Monget. The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles: What Is the Link? *Biology of Reproduction*, 90(4) 2014.

29. Van Disseldorp J, Lambalk CB J, Looman CW, Eijkemans MJ, Fauser BC, et al. Comparison of inter and intra-cycle variability of anti-Müllerian hormone and antral follicle counts. *Hum Reprod.* 2010; 25(1):221-7.
30. Fanchin R., Schonauer, Righini C., Guibourdenche J., Frydman R., Taieb J., Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Human Reprod.* 2003 vol. 18 N. 2 pp. 323-327.
31. Raine-Fenning*, K. Jayaprakasan .J. Clewes. Automated follicle tracking facilitates standardization and may improve work flow. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 2007; Vol. 30, Issue 7, pag. 1015–1018.

11. ARTIGO EM INGLÊS

(Este artigo está sendo enviado para publicação na revista Human Reproduction da European Society of Human Reproduction and Embryology)

Evaluation of 3D ultrasound (SonoAvc) to antral follicle count in infertile women: its correlation with conventional 2D ultrasound and serum levels of anti-Müllerian hormone

Peres Fagundes, A. P. 1,2

Chapon R. 1,2

Osten, P. 2

Cunha Filho, J.S.L. 1,2

¹ INSEMINE, Human Reproductive Center, Porto Alegre- Brazil.

² UFRGS, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre Clinical Hospital, Brazil.

Correspondence address. INSEMINE- Centro de Reprodução Humana, Av. Nilo Peçanha 2825 /905, Porto Alegre, Brazil. Zip code 91330-001 Tel: +55 51 33881212; Fax: + 55 51 33881212. Email: paulofagundes@insemine.com

ABSTRACT

STUDY QUESTION

What is the usefulness of the new technology 3D SonoAVC transvaginal ultrasound if compared to the conventional 2D transvaginal and serum levels of anti-Müllerian hormone and in infertile women?

SUMMARY ANSWER

The study suggests that there is a strong correlation between the antral follicle count comparing the measurements using the conventional 2D transvaginal ultrasound and by transvaginal ultrasound 3D SonoAVC. The 3D SonoAVC had a great advantage in time in carrying out the examination. Moreover, counting the antral follicles by both methods are positively correlated with serum levels of anti-Müllerian hormone.

WHAT IS KNOWN ALREADY

The antral follicle count has been proven effective in helping the clinicians to determine the ovarian reserve of each patient and thereby individualize treatment protocols. The counting of antral follicles (AFC) has become an important tool in the assessment of ovarian reserve. Several studies have shown a relationship between the antral follicle count by conventional 2D transvaginal sonography and serum anti-Müllerian hormone. Few studies have been done studying the role of transvaginal 3D ultrasound through SonoAVC technology, particularly in infertile women. The follicle count in the conventional 2D ultrasound, as known, has limitations as the intra- and inter-observer variability and increasing the time of performing the test in case of multiple follicles. With automated technology follicle count provided by the software SonoAVC, the time spent is less, and the variability between observers can be decreased or eliminated. Our study aims to evaluate the usefulness of new technology 3D SonoAVC in antral follicles and its correlation with conventional 2D ultrasound and serum anti-Müllerian hormone, in infertile women.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION

This is a cross-sectional, prospective study, where they were evaluated a group of 43 infertile women aged less than 40 years, collected between April and September 2015 at a private fertility clinic in Porto Alegre, south Brazil.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS

Patient data including age, BMI, cause of infertility. On cycle day 3, serum levels of AMH, FSH, CA 125, Prolactin, TSH, E2, were measured and the number of antral follicles (2-9 mm) estimated at ultrasound. Was performed a double scanning with transvaginal ultrasound 2D and 3D SonoAVC technology.

MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE

Median (range) serum levels of AMH, FSH, Ca 125, Prolactin, TSH, E2, were 2.98(0.02-15.8), 9.45(5-9.4), 14.0(6-35), 13.6(5.2-29.4), 2.1(0.61-5.99), 6.2(4.0-79), respectively, and antral follicle count was 15.7(3-35) with 2D and 17.0 (3-45) with 3D. The mean times taken to perform manual 2D ultrasound and 3DSonoAVC measurements were 275 ± 109 s and 103 ± 57 s, respectively ($p < 0.0005$) The age and the total count of follicles 2D had a correlation coefficient of -0.3 ($p = 0.028$) Age and 3D antral follicles count had $r = 0.29$ ($p = 0.031$). The dosage AMH was correlated

with the total number of early antral follicles, $r = 0.675$ ($p < 0.01$) with 2D and $r = 0.659$ ($p < 0.001$) with 3D.

The two count, 2D and 3D SonoAVC, showed a strongly positive correlation, $r = 0.983$ ($p < 0.001$) Ovarian volume correlated with AMH dosage, $r = 0.510$ ($p < 0.001$). The ovarian volume is strongly correlated with follicle count, $r = 0.809$ ($p < 0.01$). In the evaluation of the follicles < 6 mm and AMH, $r = 0.537$ ($p < 0.001$) in 2D and $r = 0.510$ ($p < 0.001$) in 3D.

LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION

The introduction of new imaging technologies in clinical practice should be assessed with caution. Conventional 2D ultrasound technology is sufficient for counting antral follicles, but the 3DSonoAVC ultrasound seems to save time. It needs experience and training of the ultrasound machine operators for efficient use of these new imaging technologies.

WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS

Our study showed a strong correlation between follicle count for 2D and 3D SonoAVC. There are insufficient data in obese patients or with PCOD and the correlation of 2D or 3D findings on reproductive outcomes is bad, the ease and speed of obtaining measurements by 3D SonoAVC can open perspectives to study this group of patients. The time spent counting the follicle was significantly lower using the 3D SonoAVC.

STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S)

The study was supported through a UFRGS, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre Clinical Hospital, Brazil and a Graduate Program in Health Sciences: Obstetrics and Gynecology.

The authors have no competing interests.

Keywords- anti-Müllerian hormone, antral follicle count, infertility, transvaginal ultrasound, 3D SonoAVC.

INTRODUCTION

One of the biggest challenges in the management of infertile patients is loss of reproductive potential with increasing age. The pregnancy project procrastination in the modern world is due to several factors; the inclusion of women in the labor market, the security offered by contraception, the development of assisted reproduction techniques, mean that women choose to gestate time later. Age is a major factor in decreasing the chances of pregnancy and increase in abortion rate^{4,5,12}. Decreased ovarian reserve with the loss of oocyte quality and the depletion of the number of oocytes available over the years, is reflected in the decline in oocyte recovery rate, decrease in quality of embryos and the pregnancy rates in cycles FIV.^{4,5}

The evaluation of reproductive potential has been described by several authors using FSH dose, estradiol and inhibin B and more recently the anti-Müllerian hormone⁶. The dosage of anti-Müllerian hormone is used, along with the counting of antral follicles in the clinical management of infertile patients.

The antral follicle count is assessed by 2D transvaginal ultrasound for several years with good resolution and accuracy. Some authors evaluated the applicability of 3D technology in comparison with conventional 2D ultrasound, to assess the efficiency and accuracy of these new image management software²¹.

The new 3D imaging software, 3DSonoAVC (GE Medical Systems, Austria) began to be described in 2007³¹. There are few studies evaluating this new technology in infertile women. There is need for consensus on the diameter of follicles representative of the actual ovarian functional reserve. In this context, it is imperative the evaluation and validation of these new imaging tools like 3DSonoAVC to exploit its potential in how to detect its shortcomings.

The new 3DSonoAVC is a tool that enables automatic calculation of measures and volumes of liquid areas that are recognized by the software while capturing the images. 3D SonoAVC turns anechoic areas (follicular fluid) in opaque elements with volume (voxel) and the surrounding part of the ovarian parenchyma is eliminated, leaving only images of follicular fluid.

This study aimed to correlate mainly count measured by transvaginal ultrasound antral follicles 2D and 3D SonoAVC and AMH, in infertile women.

MATERIALS AND METHODS

Study population and design:

Cross-sectional study where they will be assessed a group of 43 women infertile. Patient selection will be held in Porto Alegre Clinical Hospital in Ob/Gyn ambulatory and INSEMINE assisted reproduction center from Porto Alegre, Brazil.

Inclusion criteria: BMI: <30 kg / m², age: 25-40 years, both ovaries, not be taking hormone therapy, not having undergone chemotherapy or radiotherapy. Carrier infertility (the inability of a couple to achieve conception or bring a conception to term after a year or more of regular sexual intercourse without contraceptive protection).

Exclusion criteria: presence of ovaries with follicle > 10 mm in both ovaries. Ovarian cysts > = 3.0 cm, presence of endometrioma, presence of injuries and / or ovarian masses, presence of corpus luteum and / or hemorrhagic cyst body. Oophorectomy and / or prior partial ovarian cystectomy.

Study protocol:

Patients will be evaluated at the beginning of the menstrual cycle (days 3-4). Each patient will undergo a transvaginal ultrasound to be held in INSEMINE Human Reproduction Center with the Voluson E8 (GE Medical Systems) handset by the same researcher (P.A.P.F.) and the collection of blood sample for hormone measurements. We use the STROBE guidelines for observational studies.

Hormone measurements:

Serum AMH levels were determined using ultrasensitive enzyme-linked immunosorbente assay (ELISA) (Beckman-Coulter). Sens. <0,02 - 10,4.

Serum levels E₂, FSH, TSH, prolactin (Siemens,UK) and Ca 125(Siemens Om-MA Imunolite 2000, UK) were determined using chemiluminescence immunoassay.

E₂- sens. analytics- 10,7 ng/ml – 3000 pg/ml

FSH- 0,3 mUI/ml- 200 mUI/ml

TSH- 0,100 uU/ml – 150 u/ml

Prolactin – 0,3 ng/ml – 200 ng/ml

CA125 – 1U/ml – 500 U/ml

Transvaginal Ultrasound:

The patients were examined by the same researcher (P.A.P.F.) at the beginning of the menstrual cycle with the Voluson E8 Expert (GE Medical Systems) device, using volumetric transvaginal transducer. The purpose of the ultrasound was to perform counting and the size of each antral follicle observed and calculate the volume. Ovaries were evaluated by conventional 2D transvaginal ultrasound and the 3D, the average diameters from 2mm to 9mm. The antral follicles groups will be divided into subgroups of 2-3mm - 3.1-4 mm - 4.1- 5mm -5.1- 6mm - 6.1- 7mm -7.1- 8mm - 8.1- 9.0 mm. Ovarian volume was assessed by measuring the diameters (length x width x depth x 0.523).

Ultrasound settings of data acquisition were standardized for all subjects: transducer frequency, 7,5 MHz; gain, -5; enhance 2, speckle reduction image, 2; reject level, 25, and harmonic, high.

Measurement 1- 2D ultrasound image:

The extent of the follicles in the 2D ultrasound was performed in two plans and calculated the average diameter.

Measurement 2- 3D SonoAVC:

The extent of the follicles in 3D was performed using the software counting and calculated the volume of each follicle automatically by recognizing the anechoic intrafollicular areas. The device is adjusted so that the area of interest fit the ROI (area of interest), include avoiding extra ovarian structures. After follicular imaging are displayed with their measurements and volumes. The post processing is done manually, where possible are included in the count follicles not included in the automatic analysis and performed the exclusion of adjacent structures were counted as follicles.

The time spent in carrying out the follicle count by 2 D and 3DSonoavc was timed.

STATISTICS ANALYSIS:

The measure of central tendency used was the median, and data variability was expressed by the ranges. Categorical variables were compared using the chi-square or Fisher's exact tests. Continuous variables were analyzed using the Student t test for normally distributed, to compare means between two independent groups or the U test of Wilcoxon-Mann-Whitney nonparametric. Associations were made with Spearman test or logistic regression.

Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$. The statistical program SPSS version 22.0 for tabulation and analysis of the data was used.

RESULTS

The median age of participants was 33 (range 23-40) years and BMI was 24.47 (range 19.2-30.3), Kg/m². The causes of infertility found in this study were: sterility without apparent cause-5, anatomically-11, hormonal factor-4, endometriosis-14, PCOD-4 and genetics causes-2.

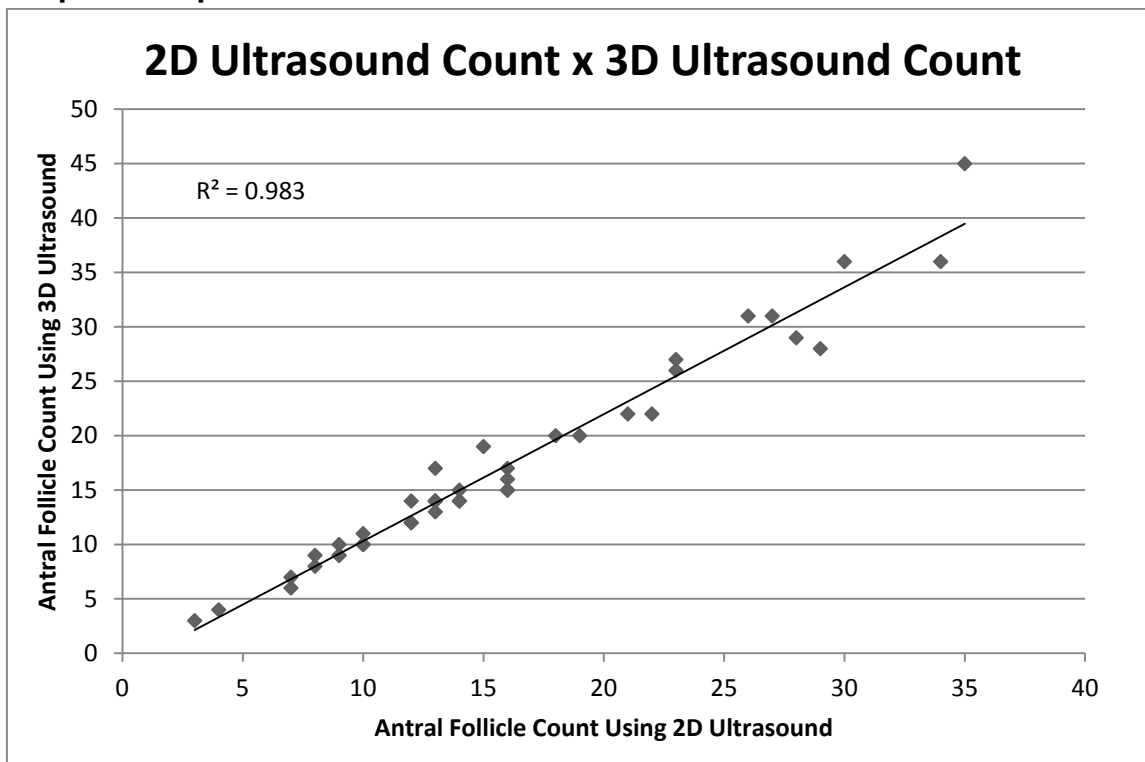
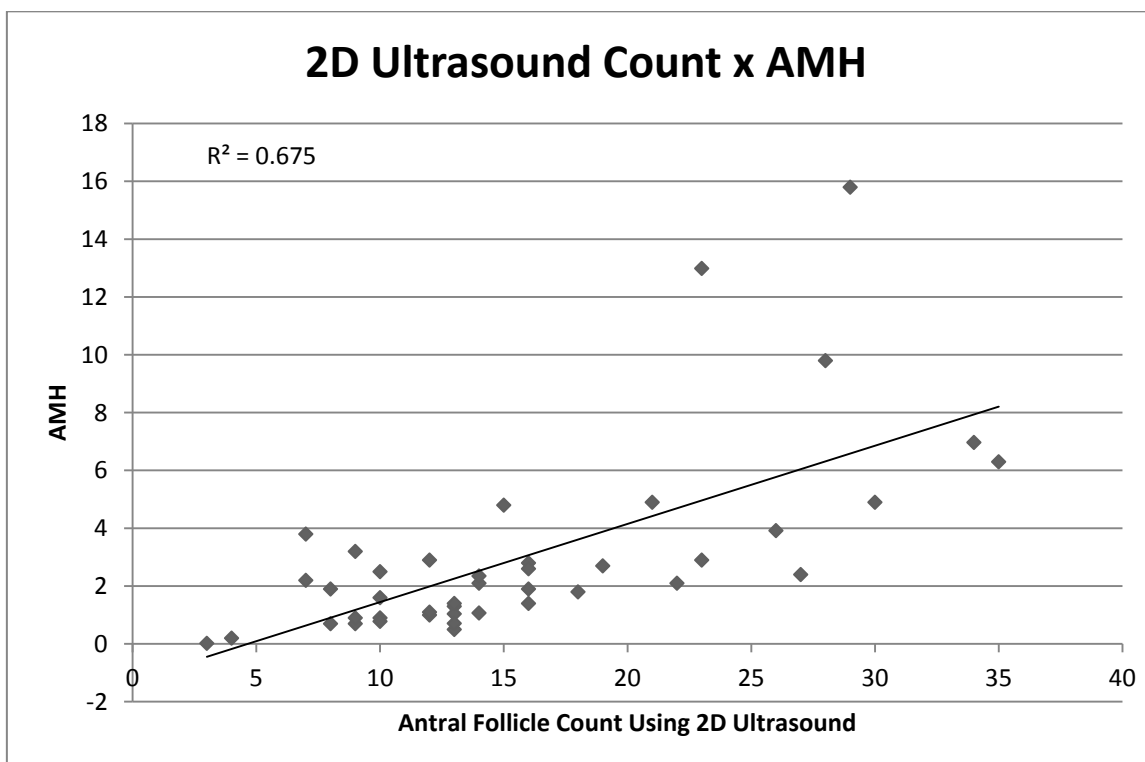
The median serum levels of AMH was 2.98 (range 0.02-15.8)ng/ml. The medium serum levels of FSH, TSH, E₂, Prolactin, CA125, were 9.45 (range 5.0-58.3)mIU/ml, 2.11 (range 0.61-5.99)mIU/ml, 46.2 (range 4.0-79.0)pg/ml, 13.6 (range 5.2-29.4)mIU/ml, 14.0 (6.0-35.0)mIU/ml, respectively.

The ultrasound scans 2D revealed a median number of antral follicle of 15 (range 3-35) and the ultrasound scans 3D SonoAVC revealed a median number of antral follicle of 17(range 3-45). The mean times taken to perform manual 2D ultrasound and 3DSonoAVC measurements were 275 ±109 s and 103 ± 57 s, respectively (p<0.0005).

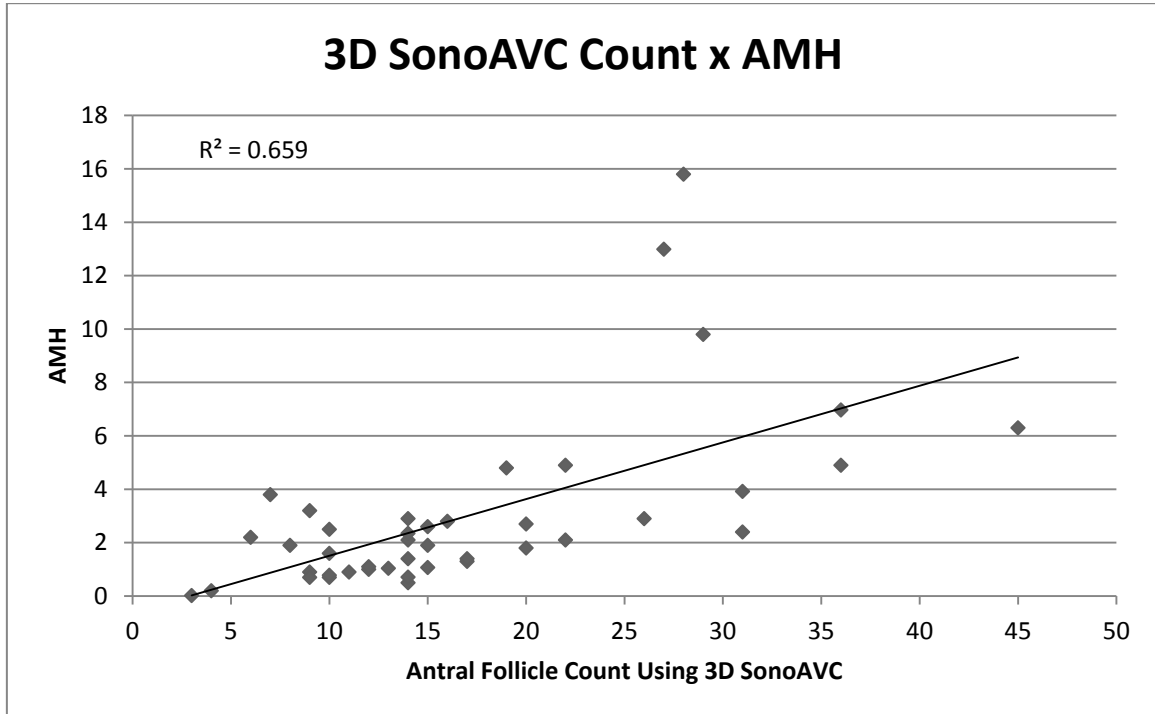
Age correlated negatively with AMH and showed no relationship other hormonal markers analyzed. Age was negatively correlated with the antral follicle count. The age and the total count of follicles 2D had a correlation coefficient of - 0.3 (p = 0.028) Age and 3D antral follicles count had a correlation coefficient of -0.29 (p = 0.031)

The dosage AMH was correlated with the total number of early antral follicles, coefficient of correlation was 0.675 (p <0.01) with 2D ultrasound and 0.659 (p <0.001) with 3D.

The two ways of performing the antral follicle count, 2D and 3D SonoAVC showed a strongly positive correlation, 0.983 (p <0.001) Ovarian volume correlated with AMH dosage correlation coefficient of 0.510 (p <0.001). The ovarian volume is strongly correlated with follicle count correlation coefficient of 0.809 (p <0.01). In the evaluation of the follicles <6 mm and AMH the correlation coefficient was 0.537 (p <0.001) in 2D and 0.510 (p <0.001) in 3D.

Graph 1. Graph of correlation between 2D ultrasound count and 3DSonoAVC**Graph 2. Graph of correlation between 2D ultrasound and anti-Müllerian hormone**

Graph 3. Graph of correlation between 3DSonoAVC and anti-Müllerian hormone



DISCUSSION:

This study was designed to determine whether there is a relationship between 3D SonoAVC technology antral follicle count and conventional transvaginal ultrasound 2D, in infertile women. Towards a broader assessment of ovarian reserve, we included the correlation of both counts with the serum of anti-Müllerian hormone. This study found a strong correlation between follicle count carried out by 3D SonoAVC compared with the 2D, showing that the new method is reliable and feasible to be incorporated into the routine evaluation of patients, however, does not add any benefit.

There are few studies evaluating this new technology transvaginal sonography with the analysis of the follicles 3D SonoAVC.

We agree the findings of previous studies that the antral follicle count has a positive correlation with serum anti-Müllerian hormone and a negative correlation with age. We found no correlation between antral follicle count and other hormonal markers analyzed.³⁰

Regarding the new 3D technology SonoAVC found advantages and disadvantages compared to 2D. In traditional 2D follicles count, the greater difficulty

in correctly determine the number of follicles is when there are a large number of follicles, which could cause an overestimate or an underestimate of the count, event been raised by some authors in previous studies^{7,14}. There may be the examiner count the same follicle more than once or fail to tell some follicle.

In the SonoAVC 3D technology, this count is performed automatically in a few seconds, the recognition by the computer of anechoic areas (voxels) of the follicles. In follicular diameter in three axes, x, y and z, follicular volume is also determined automatically. In our view this saves considerable time in the routine evaluation of patients and increases the quality of the measures, however, these same measures can be carried out by conventional 2D. The downside of this new technology 3D SonoAVC would be the higher cost of equipment and the need for specialized training of equipment operators for proper capture of ovarian 3D images.

In 3D there is a need to put the ovary properly in the "area of interest" (ROI) to prevent the addition of vessels and / or other extraovarian pelvic structures (iliac vessels, hydrosalpinx, Morgagni hydatids, etc ..) that could harm a more accurate assessment, causing an underestimation or overestimation of the count of the antral follicles. It depends on the operator and the appropriate management of software possibilities of the images obtained. Even though an automatic image capture, the result of automatic process must be evaluated and repeated if considered unsatisfactory. It depends on the expertise of the operator and training.³¹

Previous studies have shown a good correlation between the results obtained in the evaluation inter and intra-observer method²⁰. In this study the images were captured by the same observer, ultrasound specialist (P.A.P.F.), with the same technique and the same settings in all cases.

A characteristic of 3D SonoAVC observed in this study is the ease of getting fast and reproducible measurements, particularly in small follicles. It is necessary after image capture, the examiner assess the quality of it and the count performed automatically match your expectations, most of the time, it happens. This feature of the software can help doctors improve your performance and your workflow in fertility clinics, where the number of follicles to be measured sometimes is great.

Another interesting possibility of these new technologies already known, is the possibility of storing images in a 3D virtual block for further detailed studies in cases of special interest or research database.

We conducted the count in the initial phase of the menstrual cycle to minimize the effect of intracycle variation of follicular diameters and avoid including in ovarian cysts count or pre-existing corpus luteum, factors of research exclusion in this population.

We believe that there is still need for a consensus on what measures the follicles that are considered ideal in the total count of follicles to assess ovarian reserve. There are differences in the populations studied, there are differences in the methodology and in relation to the cycle phase in which the count was performed.²³

A situation where the 3D SonoAVC could be useful is in assessing patients with PCOD. In these patients, unwieldy sometimes in reproductive terms, the follicle count is difficult, so with in obese. In this group of patients, there are no data comparing the effectiveness of 3DSonoAVC with 2D. The ease, speed and reproducibility in obtaining the measures by the new technology of 3D SonoAVC can open perspectives for study this group of patients. The future prospects of research in this field are promising. With the possibility of the advent of new equipment with new image management technologies in the field of ultrasound can advance the knowledge of ovarian folliculogenesis, for example, the possibility measure follicles <2 mm, can even change the value of the measures currently used in the antral follicle count.

In conclusion, the study suggests that there is a strong correlation between 3DSonoAVC and 2D in antral follicle count. In addition, the count of the antral follicle by both methods was positively correlated with levels of serum anti-Müllerian hormone. The SonoAVC 3d proved faster than 2D in antral follicle count

AUTHOR'S ROLES

João Sabino Lahorgue da Cunha Filho: project design, analysis, manuscript drafting and critical discussion.

Paulo Augusto Peres Fagundes: data collet, execution, analysis, design, manuscript drafting and critical discussion

Rita Chapon: data tab, analysis, critical discussion.

Pedro Osten: project design, data tab.

ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks to Dr. Raul Moreira Neto for the support during searchable and the staff Insemine Reproduction Center.

FUNDING

This study was funded through the following institutions:

PPGGO - the Research Program and Graduate in Health-Sciences Gynaecology and Obstetrics, academic Master of the Federal University of Rio Grande do Sul.

FIPE- Research and events incentive Foundation, Porto Alegre Clinics Hospital, Porto Alegre city, Brazil.

CNPQ- National Council for Scientific and Technological Development, Ministry of Science, Technology and Innovation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossa pesquisa avaliou uma nova tecnologia do ultrassom diagnóstico. O novo software 3D SonoAVC se mostrou efetivo na contagem dos folículos antrais, mostrando ainda uma vantagem importante na economia com o tempo gasto com as avaliações. Devemos ter cautela ao avaliar novas tecnologias, mas não podemos fechar os olhos ao inovador, nem às novas ferramentas que vem sendo desenvolvidas. Estas novas ferramentas precisam ser testadas com estudos bem conduzidos, para que possam ser incorporadas à prática clínica, desde que tragam benefícios reais aos pacientes.

13. PERSPECTIVAS

As perspectivas de pesquisa neste campo são promissoras. Com a possibilidade do advento de novas tecnologias de processamento de imagens, poderemos avançar na avaliação da reserva ovariana. A possibilidade de medir folículos menores que 2 mm, pode trazer um novo campo de especulação no estudo por imagem da coorte folicular ovariana. A ecografia transvaginal 2D é o método atualmente mais utilizado em todo o mundo, porém, acreditamos que esta nova tecnologia (3DSonoAVC) , possa vir a ser incorporada à prática clínica pela facilidade e velocidade em obter a contagem e a medida dos folículos, economizando tempo e proporcionando maior eficiência nos diagnósticos.

Protocolos de pesquisa que incluam essas novas tecnologias de imagem e softwares inovadores devem ser estimulados e testados para que possam ser utilizados em benefício dos pacientes.

14. ANEXOS

1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidá-la a participar do estudo **“Avaliação da ecografia 3D (SonoAvc) para contagem de folículos antrais em mulheres inférteis: sua correlação com ecografia convencional 2D e com os níveis séricos do hormônio anti-Mülleriano”**, tendo como objetivo principal, a realização de um trabalho científico para melhor entendimento da associação entre a contagem de folículos ovarianos antrais e a dosagem do hormônio anti-Mülleriano.

Este estudo vai avaliar se existem alterações da função ovariana relacionadas ao hormônio anti-Mülleriano em mulheres com infertilidade. Para você os benefícios serão indiretos, uma vez que ajudará a entender melhor as origens desta doença e sua associação com infertilidade e, desta forma, definir tratamentos mais eficazes e individualizados para pacientes portadoras de endometriose no futuro.

Sua participação neste estudo envolverá a coleta de sangue e a realização de ecografia transvaginal 3D. Não haverá mudanças no seu tratamento, que será realizado rotineiramente pela sua equipe médica.

Na rotina da sua investigação e tratamento de infertilidade, você se submeterá a uma ecografia transvaginal no início do ciclo menstrual, para contagem de folículos antrais. No mesmo dia, será colhida amostra de sangue para dosagens hormonais, aonde serão analisados os níveis de FSH, estradiol e hormônio anti-Mülleriano.

O pesquisador responsável por este estudo é o Prof. João Sabino da Cunha Filho do Serviço de Ginecologia Obstetrícia (SGO), localizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 11º andar, sala 1117, e pode ser contatado pelo telefone 3359-8117. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, que aprovou este estudo, no 2º andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta. Este termo de consentimento foi elaborado em duas vias, uma delas será fornecida para a paciente e a outra ficará sob a guarda do pesquisador responsável.

Eu, _____, fui informada dos objetivos do estudo, especificados acima, e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações de que não serei submetida a nenhum

procedimento adicional àquele proposto para fertilização "In vitro". Além disto, sei que novas informações, obtidas durante o estudo, poderão ser fornecidas para mim e terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, se assim for de minha vontade. Os pesquisadores se comprometem em manter a confidencialidade dos dados de identificação pessoal dos participantes e os resultados serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo, e que não terei nenhum gasto ou custo adicional para participar da pesquisa.

Assinatura _____ da _____ participante:

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de _____.

Investigador: Paulo Augusto Peres Fagundes

Pesquisador responsável: Prof. João Sabino da Cunha Filho

Telefone de contato: 33881212

2. PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

PROJETO DE MESTRADO- GPPGO- UFRGS- 2015

Avaliação da ecografia 3D (SonoAvc) para contagem de folículos antrais em mulheres inférteis: sua correlação com ecografia convencional 2D e com os níveis séricos do hormônio anti-Mülleriano

Mestrando: Dr. Paulo Augusto Peres Fagundes

Orientador: Prof. Dr. João Sabino Lahorgue Cunha Filho

Nome: _____

Idade: _____ Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

Causas de infertilidade: 1- Esca 2- fator anatômico 2- fator hormonal 3- fator ovariano 5- endometriose 6- PCOD 7- genética

Tempo de infertilidade: _____ Paridade: _____

Infertilidade: PRIMÁRIA _____ SECUNDÁRIA _____

OVÁRIO DIREITO:

DIMENSÕES: X X VOLUME: cm³

CONTAGEM DE FOLÍCULOS:

2-3 mm-	3.1-4 mm-	4.1- 5 mm-	5.1- 6 mm-
6.1- 7 mm-	7.1-8 mm-	8.1- 9.0 mm-	9.1 -10 mm-

RESULTADO DO 3D-

2-3 mm-	3.1-4 mm-	4.1- 5 mm-	5.1- 6 mm-
6.1- 7 mm-	7.1-8 mm-	8.1- 9.0 mm-	9.1 -10 mm-

VOLUMETRIA 3D- x cm³ x cm³ x cm³ x cm³ x cm³

x cm³ x cm³ x cm³ x cm³

OVÁRIO ESQUERDO:

DIMENSÕES: X X VOLUME: cm³

CONTAGEM DE FOLÍCULOS:

2-3 mm-	3.1-4 mm-	4.1- 5 mm-	5.1- 6 mm-
6.1- 7 mm- mm-	7.1-8 mm-	8.1- 9.0 mm-	9.1 -10

RESULTADO DO 3D-

2-3 mm-	3.1-4 mm-	4.1- 5 mm-	5.1- 6 mm-
6.1- 7 mm- mm-	7.1-8 mm-	8.1- 9.0 mm-	9.1 -10

VOLUMETRIA 3D- x cm³ x cm³ x cm³ x cm³ x cm³

x cm³ x cm³ x cm³ x cm³

Tempo do exame 2D:

Tempo do exame 3DSonoAVC:

DOSAGENS HORMONAIS:

HAM-

FSH-

ESTRADIOL-

TSH-

CA 125-

PRL-