

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Accuratezza predittiva dei marcatori sierici ed ecografici di riserva ovarica per il nato vivo da concepimento spontaneo: uno studio di coorte prospettico

Relatore:
Prof. Danilo Cimadomo

Correlatore:
Dott. Andrea Busnelli

Tesi Sperimentale di
Giada Licari

Anno Accademico 2025/2026

Sommario

ABSTRACT 5
ABSTRACT (english) 7
INTRODUZIONE 9
1. Contesto epidemiologico e demografico dell'infertilità. 9
1.1 Prevalenza globale dell'infertilità e rilevanza per la salute pubblica 9
1.2 Trend di posticipazione della genitorialità 10
1.3 Effetto dell'età femminile su fecondabilità e rischio di aborto spontaneo 11
1.4 Variabilità individuale della riserva ovarica indipendente dall'età anagrafica 13
1.5 Evoluzione dei biomarcatori di riserva ovarica e posizione delle società scientifiche 14
2. Riserva ovarica 15
2.1 Riserva ovarica totale e funzionale: definizioni operative 15
2.2 Determinanti quantitativi e qualitativi del potenziale riproduttivo 16
2.3 Classificazione dei biomarcatori di riserva ovarica 17
3. Ormone antimulleriano: biologia e applicazioni cliniche 18
3.1 Struttura molecolare e via di segnalazione dell'AMH 18
3.2 Variazione dell'AMH in funzione dell'età: modelli di riferimento 20
3.3 Determinanti genetici, ormonali e comportamentali dei livelli di AMH 21
3.4 Impiego dell'AMH nella procreazione medicalmente assistita 22
4. Conta dei follicoli antrali: biologia e applicazioni cliniche 23
4.1 Definizione e metodica di misurazione dell'AFC 23
4.2 Follicologenesi e correlati biologici dell'AFC 23
4.3 Variazione dell'AFC in funzione dell'età: nomogrammi di riferimento 24
4.4 Impiego dell'AFC nella procreazione medicalmente assistita 25
4.5 AMH e AFC a confronto: concordanza e complementarità 25
5. Valore predittivo dei biomarcatori di riserva ovarica per la fertilità naturale 26
5.1 AMH e probabilità di concepimento spontaneo: evidenze disponibili 26
5.2 AMH e rischio di aborto spontaneo 27
5.3 AFC e fertilità spontanea: limiti dell'evidenza disponibile 28
6. Sintesi e razionale del presente studio 29
Obiettivo dello Studio 30
Obiettivo primario 30
Obiettivi secondari 30
Materiali e Metodi 33
Disegno dello studio 33
Setting e reclutamento 33
Popolazione dello studio 33

Variabili di esposizione....35
Dosaggio ormonale....35
Conta dei follicoli antrali....36
Categorizzazione dei biomarcatori....36
Procedure di follow-up....36
Misure di esito....37
Piano statistico....37
Analisi descrittiva.....37
Analisi dell'esito primario.....37
Analisi degli esiti secondari.....38
Modello combinato.....38
Analisi di sensibilità.....38
Considerazioni etiche.....38
Risultati....39
Popolazione dello studio....39
Profilo ormonale basale e parametri di riserva ovarica....40
Esiti riproduttivi per categoria di biomarcatore....42
Concepimento spontaneo....43
Risultati gravidanza clinica....46
Risultati parto (nato vivo)....48
Aborto primo trimestre....51
Concepimento per AMH ed età....53
Discussione....54
SINTESI DEI RISULTATI....54
CONFRONTO CON LA LETTERATURA....54
Associazione tra AMH e probabilità di concepimento spontaneo.....54
Associazione tra AFC e concepimento spontaneo....55
AMH e parto....55
Aborto del primo trimestre....56
FSH, volume ovarico e variabile combinata AFC + AMH....56
Analisi stratificata per fascia d'età....57
INTERPRETAZIONE BIOLOGICA....58
Ruolo fisiologico di AMH, FSH e AFC: una sintesi funzionale....58
Perché biomarcatori di riserva ovarica potrebbero riflettere la quantità ovocitaria piuttosto che la competenza riproduttiva?....58
Livelli aggiuntivi di regolazione: epigenetica e trascrizione a singola cellula.....59
La distinzione tra riserva ovarica e fecondabilità: una riformulazione molecolare....59
Dalle tappe della follicologenesi al dato clinico....60

PUNTI DI FORZA DELLO STUDIO 62
LIMITI DELLO STUDIO 63
IMPLICAZIONI CLINICHE 64
PROSPETTIVE FUTURE 65
Conclusioni 66
Bibliografia 68

ABSTRACT

Background.

L'ormone antimulleriano (AMH) e la conta dei follicoli antrali (AFC) sono biomarcatori consolidati di riserva ovarica e predittori affidabili della risposta ovarica alla stimolazione controllata nella procreazione medicalmente assistita (PMA). Tuttavia, la loro capacità di predire la fertilità naturale in donne senza infertilità diagnosticata resta controversa. Inoltre, i dati prospettici sul valore predittivo dell'AFC in questo contesto sono quasi assenti in letteratura. Il presente studio valuta il valore predittivo di AMH, AFC, ormone follicolo-stimolante (FSH) e volume ovarico, singolarmente e in combinazione, per gli esiti del concepimento spontaneo, tra cui il nato vivo, la gravidanza clinica, e l'aborto del primo trimestre.

Metodi.

È stato condotto uno studio di coorte prospettico presso due centri di terzo livello dell'area metropolitana di Milano (IRCCS Istituto Clinico Humanitas Research Hospital e Humanitas San Pio X). Sono state reclutate donne di età 28-40 anni, con cicli mestruali regolari, che tentavano il concepimento spontaneo da tre mesi o meno, senza storia di infertilità. Tutte le partecipanti sono state sottoposte a valutazione basale in fase follicolare precoce (dosaggio di AMH, FSH; ed ecografia transvaginale per AFC e volume ovarico) e seguite prospetticamente fino a 12 cicli mestruali o al raggiungimento di una gravidanza. Sono state escluse dallo studio le donne con la Sindrome Ovarica Poliendocrina-Matabolica, endometriosi di stadio III-IV, insufficienza ovarica prematura, malformazioni uterine, pregressa chemioterapia o trattamento ormonale nei due mesi precedenti al reclutamento. I biomarcatori sono stati categorizzati secondo soglie cliniche consolidate (AMH, AFC, FSH) e analizzati anche come variabile combinata AFC+AMH. L'esito primario era il nato; gli esiti secondari includevano concepimento, gravidanza clinica, e aborto del primo trimestre, analizzati mediante curve di Kaplan-Meier e modelli di Cox non aggiustati e aggiustati per età, BMI, stato di fumatrice, etnia, età del partner, livello d'istruzione, uso di contraccettivi ormonali.

Risultati.

Sono state incluse 509 donne (età mediana 35 anni, IQR 33-38; BMI mediano 21,37 kg/m², IQR 19,72-23,64). L'AMH è stata categorizzata come bassa (<1,0 ng/mL), normale (1,0-5,5 ng/mL) o alta (>5,5 ng/mL), e l'AFC come bassa (≤7), normale (8-25) o alta (>25). La concentrazione sierica mediana di AMH era 2,56 ng/mL (IQR 1,41-3,78) e l'AFC mediana 16 follicoli (IQR 10-22).

Per nessuna delle esposizioni testate, compreso il modello combinato AFC+AMH, è stata osservata un'associazione indipendente statisticamente significativa né con la probabilità di nato vivo né con gli outcome secondari (probabilità di concepimento, gravidanza clinica e aborto del primo trimestre). Per il nato vivo, rispetto alle categorie normali, gli HR non corretti per AMH basso e alto erano rispettivamente 0,85 (IC 95% 0,60-1,20) e 1,12 (0,85-1,49), mentre per AFC basso e alto erano 1,11 (0,80-1,56) e 1,19 (0,83-1,71). Tali risultati sono stati confermati anche dopo correzione per i principali fattori di confondimento, con HR rispettivamente di 0,90 (IC 95% 0,62-1,30) e 1,08 (0,82-1,44) per AMH basso e alto, e di 1,10 (0,76-1,58) e 1,07 (0,72-1,60) per AFC basso e alto.

Conclusioni.

In questa coorte prospettica di donne senza infertilità accertata, né l'AMH, né l'AFC, né FSH, né il volume ovarico hanno predetto in modo indipendente il parto (nato vivo), concepimento spontaneo, la gravidanza clinica o l'aborto del primo trimestre. Anche in caso di concordanza AMH+AFC non è stata identificata una riduzione dei tassi negli esiti riproduttivi. Questi risultati rafforzano la distinzione concettuale tra riserva ovarica, che rappresenta un indicatore della quantità ovocitaria e predittore della risposta alla stimolazione in PMA, e fertilità. I risultati supportano le raccomandazioni delle linee guida attuali contro l'uso dei test di riserva ovarica come "test di fertilità" in donne senza infertilità diagnosticata e rafforzano il concetto che l'età resti il miglior predittore di successo riproduttivo.

ABSTRACT (ENGLISH)

Background

Anti-Müllerian hormone (AMH) and antral follicle count (AFC) are established biomarkers of ovarian reserve and reliable predictors of ovarian response to controlled ovarian stimulation in assisted reproductive technology (ART). However, their ability to predict natural fertility in women without diagnosed infertility remains controversial, and prospective data on the predictive value of AFC in this setting are scarce in the literature. The present study evaluates the predictive value of AMH, AFC, follicle-stimulating hormone (FSH), and ovarian volume, both individually and in combination, for spontaneous conception outcomes, including clinical pregnancy, first-trimester miscarriage, and live birth.

Methods

A prospective cohort study was conducted at two tertiary-level centres in the metropolitan area of Milan (IRCCS Istituto Clinico Humanitas Research Hospital and Humanitas San Pio X). Women aged 28–40 years, with regular menstrual cycles, who had been attempting spontaneous conception for three months or less and had no history of infertility were recruited. All participants underwent a baseline assessment during the early follicular phase, including AMH and FSH measurements and transvaginal ultrasonography for AFC and ovarian volume, and were prospectively followed for up to 12 menstrual cycles or until pregnancy was achieved. Women with Polyendocrine-Metabolic Ovarian Syndrome, stage III–IV endometriosis, premature ovarian insufficiency, uterine malformations, a history of chemotherapy, or hormonal treatment within the two months preceding enrolment were excluded from the study. Biomarkers were categorized according to established clinical thresholds (AMH, AFC, and FSH) and were also analysed using a combined AFC+AMH variable. The primary outcome was live birth; secondary outcomes included conception, clinical pregnancy, and first-trimester miscarriage. Outcomes were analysed using Kaplan–Meier curves and unadjusted and adjusted Cox proportional hazards models, adjusted for age, BMI, smoking status, ethnicity, partner age, educational level, and hormonal contraceptive use.

Results

A total of 509 women were included (median age 35 years, IQR 33–38; median BMI 21.37 kg/m², IQR 19.72–23.64). AMH was categorized as low (<1.0 ng/mL), normal (1.0–5.5 ng/mL), or high (>5.5 ng/mL), and AFC as low (≤7), normal (8–25), or high (>25). Median serum AMH concentration was 2.56 ng/mL (IQR 1.41–3.78), and median AFC was 16 follicles (IQR 10–22). No, statistically significant independent association was observed for any of the exposures tested, including the

combined AFC+AMH model, either with the probability of live birth or with the secondary outcomes (i.e., probability of conception, clinical pregnancy, and first-trimester miscarriage). For live birth, compared with the normal categories, the unadjusted HRs for low and high AMH were 0.85 (95% CI 0.60–1.20) and 1.12 (0.85–1.49), respectively, whereas those for low and high AFC were 1.11 (0.80–1.56) and 1.19 (0.83–1.71), respectively. These findings were also confirmed after adjustment for the main confounding factors, with HRs of 0.90 (95% CI 0.62–1.30) and 1.08 (0.82–1.44) for low and high AMH, respectively, and 1.10 (0.76–1.58) and 1.07 (0.72–1.60) for low and high AFC, respectively.

Conclusions

In this prospective cohort of women without established infertility, neither AMH, AFC, FSH, nor ovarian volume independently predicted spontaneous conception, clinical pregnancy, live birth, or first-trimester miscarriage. Even in the presence of concordant AMH+AFC values, no reduction in reproductive outcomes was identified. These findings reinforce the conceptual distinction between ovarian reserve, which represents an indicator of oocyte quantity and a predictor of ovarian response to stimulation in ART, and fertility. The results support current guideline recommendations against the use of ovarian reserve tests as “fertility tests” in women without diagnosed infertility and reinforce the concept that age remains the strongest predictor of reproductive success.

INTRODUZIONE

1. Contesto epidemiologico e demografico dell'infertilità.

1.1 Prevalenza globale dell'infertilità e rilevanza per la salute pubblica

L'infertilità, definita come il mancato raggiungimento di una gravidanza dopo 12 mesi di rapporti regolari e non protetti, rappresenta un problema di salute pubblica globale in crescita. Le stime più recenti del Global Burden of Disease (GBD) 2021 indicano che circa 110 milioni di donne e 55 milioni di uomini in età riproduttiva (15-49 anni) convivono con l'infertilità nel 2021, con tassi di prevalenza standardizzati per età aumentati in media dello 0,68% annuo nelle donne e dello 0,48% negli uomini tra il 1990 e il 2021, e proiezioni che indicano una prosecuzione di questa tendenza almeno fino al 2040 (Liang et.al.,2025) (1).

Un'analisi indipendente condotta sugli stessi dati GBD 2021 focalizzata specificatamente sull'infertilità femminile, ha confermato l'aumento costante del carico globale di malattia attribuibile all'infertilità femminile dal 1990, con una proiezione di ulteriore crescita fino al 2050 (Liu et al.,2025) (2).

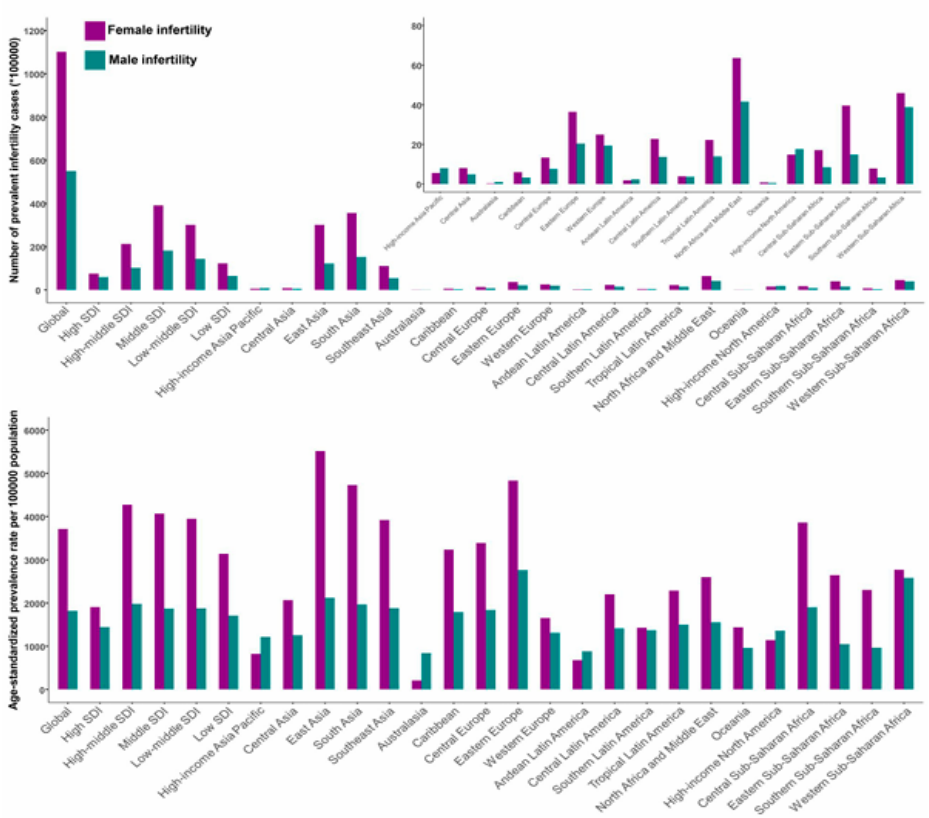


Figura 1. Carico globale dell'infertilità femminile in età riproduttiva (15-49 anni), Global Burden of Disease 1990-2021: prevalenza in crescita costante, con il picco nella fascia 35-39 anni. Da: Liu et al., Sci Rep 2025.

Parallelamente, l'ACOG ha formalizzato in un Obstetric Care Consensus dedicato la crescente rilevanza clinica della gravidanza in età materna avanzata (≥ 35 anni), riconoscendo che una quota sempre maggiore di gravidanze si verifica oggi in questa fascia d'età con implicazioni dirette sulle domande di assistenza ostetrica specialistica (ACOG,2022) (3).

Il fenomeno è stato inquadrato anche da una prospettiva demografica comparata, (Kraus et al., 2025) (4), in una revisione sui paesi ad alto il reddito, descrivono la maternità tardiva come una tendenza "sempre più diffusa ma rischiosa" sottolineando che l'aumento dell'età materna alla nascita di un figlio, si accompagna ad aumento parallelo dei rischi riproduttivi e delle difficoltà di concepimento (Esposito et al. (2024) (5) analizzando l'età dei genitori e il tasso di fertilità totale in diversi paesi ad alto reddito d'Europa e Nord America nel periodo 1990- 2020, hanno documentato come l'innalzamento dell'età media della genitorialità sia un fenomeno strutturale non transitorio in queste popolazioni.

Le conseguenze demografiche e mediche di questo posticipo sono state sistematizzate dalla Task Force ESHRE "Reproduction and Society", che ha evidenziato come il ritardo della genitorialità si traduca in un aumento della childlessness involontaria, in famiglie di dimensioni inferiori a quelle desiderate e in una domanda crescente di trattamenti di procreazione medicalmente assistita (Schmidt et al., 2012) (6).

1.2 ***Trend di posticipazione della genitorialità***

Nessun paese europeo rappresenta questo fenomeno in modo più netto dell'Italia, il contesto stesso in cui è stato condotto il presente studio. Secondo i dati Eurostat più recenti, pubblicati a marzo 2026, l'Italia si conferma il paese dell'Unione Europea con l'età media più alta alla nascita del primo figlio: circa 31,9 anni nel 2024, contro una media europea di 29,9 anni, un divario di due anni pieni rispetto al resto del continente (Eurostat,2026) (7). I dati ISTAT confermano il quadro: nel 2024 l'età media al parto ha raggiunto 32,6 anni, e quella al primo figlio 31,7 anni, con un incremento costante rispetto agli anni precedenti (ISTAT,2025) (8). L'analisi per coorte rende la traiettoria ancora più evidente: le donne nate nel 1975, che hanno concluso il proprio percorso riproduttivo nel 2024, sono diventate madri per la prima volta in media a 30 anni, contro appena 24,8 anni per donne nate nel 1947, un differimento di oltre cinque anni in una sola generazione (ISTAT,2025) (8). Il dato forse più rilevante dal punto di vista clinico riguarda l'estremo superiore della distribuzione: il rapporto CeDAP 2024 del Ministero della Salute documenta che il 10,9% dei parti in Italia avviene in donne di età superiore 40 anni, una percentuale più che doppia rispetto alla media europea del 2019 (4,5%), che colloca l'Italia insieme alla Spagna ai vertici della classifica continentale (Ministero della Salute, CeDAP, 2025) (9). Il fenomeno non riguarda solo le donne: anche l'età media della prima paternità in Italia

ha raggiunto 35,8 anni, la più alta d'Europa, in aumento di circa un decennio rispetto alla fine degli anni '90 (Il Fatto Quotidiano/SIA, 2024) (10). È in questo contesto demografico, in cui la posticipazione della genitorialità è più marcata e quasi un parto su nove avviene oltre i 40 anni, che si colloca la domanda clinica al centro di questo lavoro: i biomarcatori di riserva ovarica sono davvero in grado di guidare le scelte riproduttive della donna che per ragioni socioculturali e strutturali più che per scelta individuale, si trova a tentare il concepimento sempre più tardi?

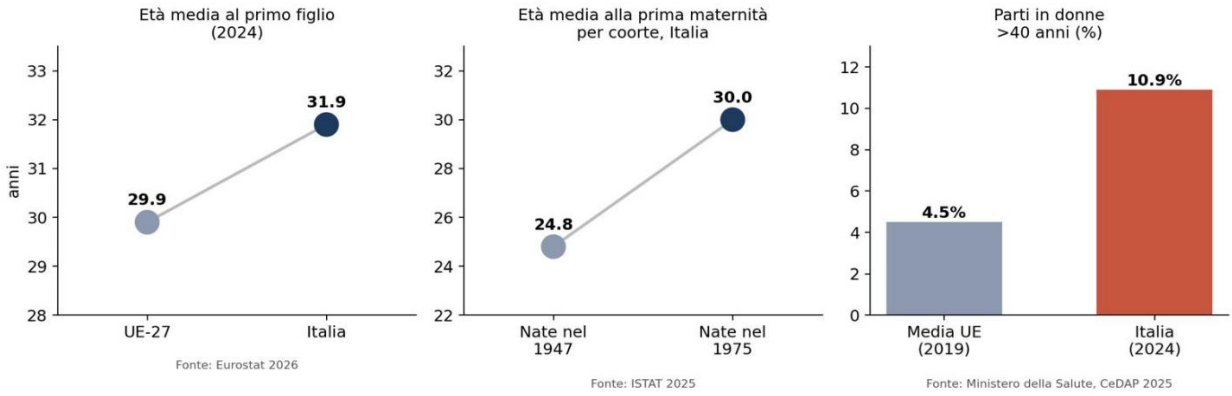


Figura 2. Posticipazione della maternità in Italia. A sinistra: età media al primo figlio, Italia vs UE-27 (2024). Al centro: età media alla prima maternità per coorte di nascita (1947 vs 1975). A destra: quota di parti in donne oltre i 40 anni, Italia vs media europea. Elaborazione propria su dati Eurostat 2026, ISTAT 2025 e Ministero della Salute (CeDAP).

1.3 *Effetto dell'età femminile su fecondabilità e rischio di aborto spontaneo*

Se l'Italia rappresenta il caso limite della posticipazione della genitorialità, la domanda biologia che ne consegue è ancora più stringente: quanto costa, in termini di probabilità di concepimento, ogni anno di attesa? La risposta della letteratura è netta e recente. Nella coorte di preconcepimento nordamericana PRESTO, (Wesselink et al. (2017) (11) hanno quantificato questo costo in termini di fecundability ratio (FR), ovvero la probabilità di concepimento per ciclo rispetto a un gruppo di riferimento. Rispetto alle donne tra i 21 e i 24 anni, il tasso di fecondità diminuiva progressivamente fino a 0,60 (IC 95% 0,44-0,81) per la fascia tra i 37 e i 39 anni è a 0,40 (IC 95% 0,22-0,73) nella fascia 40-45 anni. In pratica questo significa che una donna di 40-45 anni impiega in media più del doppio del tempo per concepire rispetto a una di 21-24 anni. Coerentemente, la probabilità cumulativa di concepimento entro 12 cicli scendeva dal 79,3% nelle donne di 25-27 anni al 55,5% in quelle di 40-45 anni. Uno studio più recente conferma e affina questi dati con dettaglio assente in Wesselink, ovvero la distinzione tra infertilità e rischio di aborto spontaneo come due fenomeni età-dipendenti ma parzialmente distinti in (Boxem et al. (2025) (12), in una coorte di popolazione di Rotterdam su 3.604 coppie, hanno mostrato che il rischio di infertilità (definita come tempo al concepimento

superiore a 12 mesi) aumentava in modo non lineare con l'età: le donne ≥40 anni avevano un rischio raddoppiato rispetto alla fascia di riferimento 30-34,9 anni (OR 2,00; IC 95% 1,05-3,80) mentre le donne di 35-39,9 anni non mostravano un rischio significativamente aumentato di infertilità rispetto alle donne di 30-34 anni. Il rischio di aborto spontaneo però seguiva una trattoria più rapida e già evidente prima dei 40 anni: OR 2,03 (IC 95% 1,51-2,72) per le donne di 35-39,9 anni e OR 4,24 (IC 95% 2,45-7,36) per le donne ≥40 anni, sempre rispetto alle 30-34enni.

Questo disallineamento tra fertilità relativamente preservata fino a 35-39 anni, ma rischio di aborto già in marcata ascesa nella stessa fascia è un dato che merita attenzione, perché segnala che i due esiti, ovvero raggiungere una gravidanza rispetto a portarla a termine, rispondono a meccanismi biologici età-dipendenti con tempistiche diverse. Alla base di questa seconda traiettoria, quella di rischio di aborto, vi è l'aumento età-correlato dell'aneuploidia embrionale, in particolare delle trisomie dei cromosomi 13,14,15,16,18,20,21e 22, con un'inflessione verso l'alto del rischio della maggior parte delle trisomie proprio attorno ai 35 anni (Fertil steril,2014) (13). Questo dato biologico spiega perché ACOG e ASRM raccomandino una valutazione accelerata della fertilità dopo 6 mesi di tentativi falliti nelle donne ≥35 anni, anziché attendere i canonici 12 mesi (ASRM Committee Opinion,"Optimizing natural fertility", 2022) (14). Una revisione recente pubblicata sul New England Journal of Medicine colloca questi elementi in un quadro clinico unitario, ribadendo l'età materna come il singolo fattore prognostico più robusto nella valutazione dell'infertilità di coppia (Santoro & Polotsky, 2025) (15).

É importante notare, tuttavia, che questi dati descrivono un fenomeno di popolazione: l'età predice bene l'andamento medio della fertilità e del rischio di aborto in una coorte, ma resta un predittore imperfetto a livello di singola donna, per la variabilità interindividuale nel ritmo di deplezione del pool follicolare, premessa biologica che introduce, nella sezione seguente, il razionale per la ricerca di biomarcatori individuali di riserva ovarica.

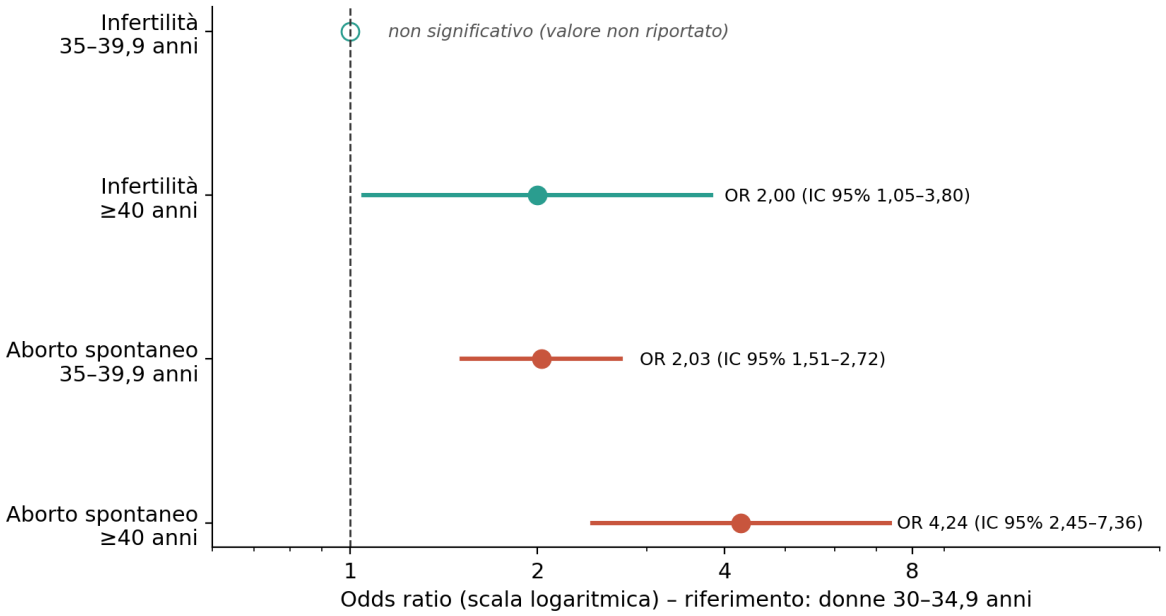


Figura 3. Odds ratio di infertilità e di aborto spontaneo per fascia d'età, con intervallo di confidenza al 95% (riferimento: donne di 30-34,9 anni). Il rischio di infertilità non è significativo a 35-39 anni e raddoppia dopo i 40; il rischio di aborto raddoppia già a 35-39 anni e supera il quadruplo dopo i 40. Elaborazione propria da Boxem et al., 2025.

1.4 *Variabilità individuale della riserva ovarica indipendente dall'età anagrafica*

Se l'età spiega bene l'andamento medio della fecondabilità in una popolazione, resta però un dato curioso, ovvero quanto sia ampia la variabilità tra donne della stessa età. Questa probabilità a livello statistico non è da trascurare a una base genetica solida e misurabile, ed è proprio da qui che nasce il razionale clinico per un marcatore individuale di riserva ovarica. L'evidenza più diretta viene dagli studi su gemelli e famiglie sull'età alla menopausa naturale, che rappresenta il punto finale osservabile del decremento del pool follicolare. Stime di ereditabilità convergono su valori sorprendentemente alti: tra il 44% e l'85% a seconda dello studio l'analisi su coppie di sorelle che raggiungono stime dello 0,85-0,87 (van Asselt et al., 2004; te Velde & Pearson, 2002) (16-17). Uno studio su gemelli condotto nel Regno Unito ha stimato un'ereditabilità del 63% per l'età alla menopausa, confermando che il timing della fine della vita riproduttiva è governato in larga parte da fattori genetici piuttosto che ambientali (Snieder, MacGregor & Spector, 1998) (18). In altre parole, due donne della stessa età cronologica possono trovarsi, per ragioni genetiche misurabili e non per caso, in punti radicalmente diversi della propria traiettoria di deplezione della riserva ovarica una con un pool follicolare ancora ampio, l'altra prossima all'esaurimento. A questa componente genetica si aggiungono fattori endocrini più ampi legati all'invecchiamento riproduttivo nel suo complesso, che coinvolgono non solo l'asse ovarico ma l'intero sistema endocrino riproduttivo (Van Den Beld et al., 2018) (19). Poiché come sintetizzano Tal e Seifer, nella loro guida di riferimento sul testing della

riserva ovarica, sintetizzano il punto clinico central2017) (ché "l'età cronologica da sola non cattura adeguatamente questa eterogeneità biologica", la comunità scientifica ha cercato marcatori capaci di stimare direttamente la dimensione del pool follicolare residuo, indipendentemente dall'età anagrafica (Tal & Seifer,2017) (20). L'obiettivo di un biomarcatore di riserva ovarica non è sostituire l'età come predittore del potenziale riproduttivo né tantomeno predire la fertilità naturale, ma piuttosto di affinare, all'interno di una data fascia d'età, la stima individuale della velocità di invecchiamento ovarico, con applicazioni cliniche primariamente nel contesto della procreazione assistita e della pianificazione riproduttiva (Moolhuijsen & Visser, 2020) (21). Come sottolineano Baker et al. in una revisione del 2025, la distinzione tra "cosa un test di riserva ovarica può legittimamente dire" e "cosa viene spesso frainteso come dica" è precisamente il nodo clinico che rende necessario uno studio come il presente (Baker et al., 2025) (22). È in risposta a questo razionale, la ricerca di un marcatore individuale della velocità di deplezione follicolare, distinto dall'età anagrafica che sono stati sviluppati nel tempo i biomarcatori di riserva ovarica, di cui i due protagonisti di questa tesi, AMH e AFC, rappresentano oggi lo stato dell'arte.

1.5 ***Evoluzione dei biomarcatori di riserva ovarica e posizione delle società scientifiche***

In questo vuoto lasciato dai marcatori di prima generazione si sono affermati AMH e AFC, oggi riconosciuti come gli strumenti più sensibili e affidabili per stimare il pool follicolare residuo un consenso che attraversa ASRM, ACOG ed ESHRE. Ma è proprio nella più recente revisione ESHRE sulla stimolazione ovarica per IVF/ICSI, aggiornata nel 2025 e pubblicata su Human Reproduction nell'aprile del 2026 (23), che si trova la formulazione più netta e più utile per inquadrare il problema centrale di questa tesi: il gruppo di sviluppo della linea guida raccomanda esplicitamente che i marcatori di riserva ovarica (AMH, AFC) non debbano essere utilizzati per predire la probabilità di gravidanza o di nato vivo, ribadendo che età femminile e BMI restano, invece, predittori validi di questi esiti. È una distinzione che la stessa comunità scientifica internazionale traccia in modo esplicito: AMH e AFC restano strumenti di prima scelta per predire la risposta ovarica alla stimolazione cioè quanti ovociti maturi si potranno recuperare in un ciclo di trattamento ma non per predire se, e quando, una gravidanza si realizzerà. Questa distinzione tra predizione della risposta ovarica in PMA e predizione della fertilità è precisamente il nodo concettuale su cui si sviluppa questa tesi, e viene approfondita nei capitoli 3, 4 e soprattutto 5, dove si esamina in dettaglio la letteratura, per certi versi contrastante, sulla capacità di AMH e AFC di predire il concepimento spontaneo in donne senza infertilità accertata.

2. **Riserva ovarica**

2.1 ***Riserva ovarica totale e funzionale: definizioni operative***

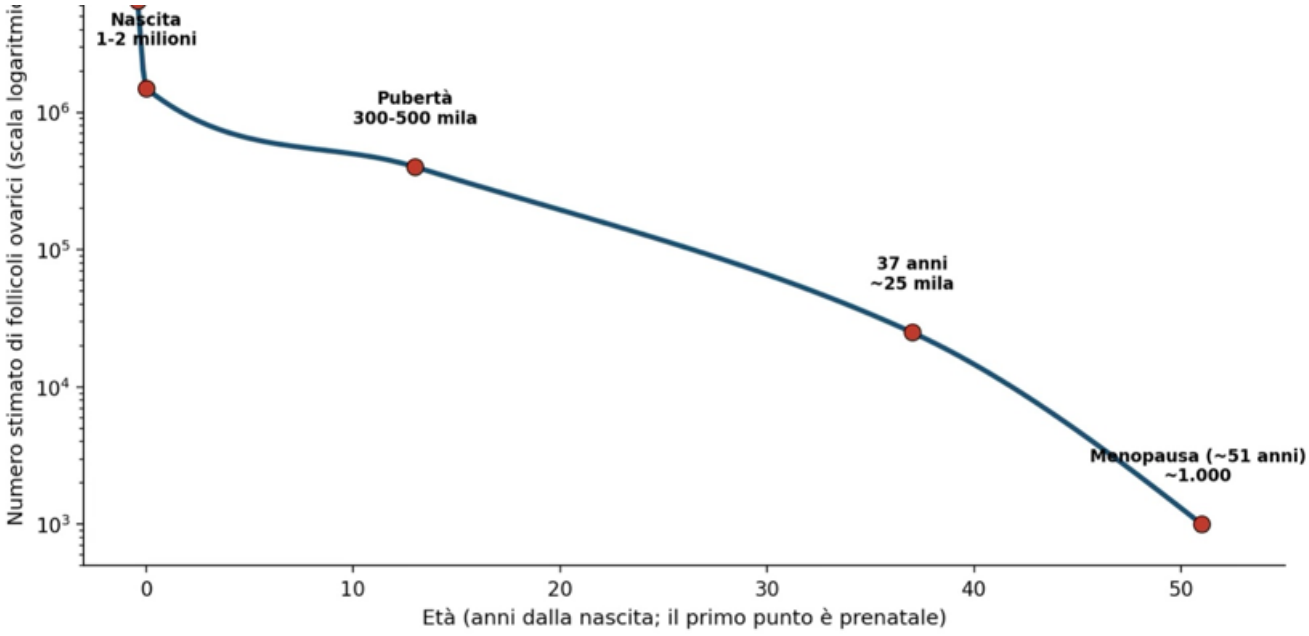


Figura 4. Traiettoria della deplezione del pool follicolare ovarico dalla vita fetale alla menopausa (scala logaritmica). Elaborazione propria; dati: ACOG (2025) e Faddy & Gosden (1992, 1995).22

Per comprendere perché la riserva ovarica sia diventata un concetto clinico centrale, occorre prima quantificarla nella sua traiettoria naturale. Il pool di cellule germinali raggiunge il proprio picco assoluto attorno alla ventesima settimana di gestazione, con circa 6-7 milioni di ovociti; da quel momento inizia un processo di atresia che non si arresta mai fino alla menopausa. Alla nascita ne restano circa 1-2 milioni; alla pubertà, tra 300.000 e 500.000; a 37 anni, circa 25.000; alla menopausa (in media 51 anni), appena un migliaio (American College of Obstetricians and Gynecologists, Committee Statement, novembre 2025) (24). Questa traiettoria matematicamente modellizzata per la prima volta da Faddy e Gosden negli anni ’90 rimane oggi il fondamento quantitativo di tutto ciò che chiamiamo “riserva ovarica” (Faddy & Gosden, 1992, 1995) (25-26). Nonostante sia un termine onnipresente in letteratura comparso per la prima volta oltre 25 anni fa e oggi presente in più di 1.500 pubblicazioni indicizzate su PubMed la riserva ovarica resta, paradossalmente, un concetto raramente definito con precisione, e il suo significato varia a seconda del contesto in cui è utilizzato (Pelosi, Forabosco & Schlessinger, 2015) (27). È utile distinguere, come propone la letteratura specialistica, tra riserva ovarica totale (TOR) l’intero pool di follicoli non in crescita (primordiali) presenti in un dato momento e riserva ovarica funzionale (FOR), ossia il sottoinsieme di follicoli già reclutati e in

fase di crescita, potenzialmente disponibili per l'ovulazione nei mesi successivi. Questa distinzione non è accademica nessun marcatore sierico o ecografico attualmente disponibile può misurare direttamente la TOR, poiché i follicoli primordiali sono troppo piccoli per essere visualizzati o per secernere quantità rilevabili di ormoni. Tutti i biomarcatori clinici AMH compresa misurano in realtà la FOR, usandola come proxy indiretto della TOR (Moolhuijsen & Visser, 2020) (21). L'ASRM definisce la riserva ovarica come "il potenziale riproduttivo in funzione del numero di ovociti", specificando che il termine si riferisce propriamente alla quantità ovocitaria residua, distinta dalla qualità ovocitaria che riguarda invece il potenziale di un ovocita fecondato di dare origine a un nato vivo. É essenziale distinguere ulteriormente la riserva ovarica da tre concetti correlati ma non equivalenti: la fertilità (la capacità di ottenere un figlio), la fecondabilità (la probabilità di gravidanza per ciclo), e la risposta ovarica (la resa ovocitaria effettivamente osservata dopo un ciclo di stimolazione). Come l'ASRM chiarisce esplicitamente, "una riserva ovarica ridotta ai test non implica necessariamente incapacità di concepire o subfertilità".

2.2 ***Determinanti quantitativi e qualitativi del potenziale riproduttivo***

L'invecchiamento riproduttivo procede lungo due assi biologici distinti, che declinano in parallelo ma con meccanismi molecolari differenti: la quantità e la qualità ovocitaria. La componente quantitativa descritta nella sezione precedente è relativamente ben compresa, la componente qualitativa, al contrario, ha una base molecolare più complessa e solo recentemente è stata chiarita in dettaglio. Una revisione pubblicata su *Nature Reviews Molecular Cell Biology* nel 2023 offre la sintesi più aggiornata dei meccanismi cellulari alla base del declino qualitativo età-correlato: l'aneuploidia negli ovociti umani la causa, singola più importante di infertilità e aborto spontaneo età-correlati, origina da almeno tre processi molecolari concorrenti, che si aggravano progressivamente con l'età materna, tra cui il deterioramento della coesina (la proteina che tiene uniti i cromatidi fratelli durante la meiosi, la cui perdita graduale nel corso dei decenni di arresto meiotico predispone alla non-disgiunzione cromosomica); la disregolazione del checkpoint di assemblaggio del fuso meiotico (che normalmente impedirebbe la progressione della divisione cellulare in presenza di cromosomi mal allineati, ma la cui efficacia si riduce con l'età); e la disfunzione mitocondriale ovocitaria, che compromette l'energia disponibile per una segregazione cromosomica fedele (Charalambous, Webster & Schuh, 2023) (28). Un meccanismo complementare, più direttamente legato ai biomarcatori oggetto di questa tesi, è stato proposto da Buratini et al. (2022) (29) l'aumento dei livelli intrafollicolari di FSH con l'avanzare dell'età materna potrebbe alterare l'omeostasi ovocitaria, fornendo un possibile collegamento meccanicistico tra il declino quantitativo della riserva (che porta all'aumento compensatorio di FSH, come descritto nel capitolo 1) e il deterioramento

qualitativo degli ovociti. Le due dimensioni, quindi, potrebbero non essere del tutto indipendenti, ma collegate da un anello di retroazione ormonale. Questa distinzione ha una conseguenza clinica diretta e concettualmente cruciale: gli attuali biomarcatori di riserva ovarica (AMH, AFC, e in misura minore l'FSH basale) sono validati per predire la dimensione del pool follicolare e, di conseguenza, la resa ovocitaria attesa in un ciclo di stimolazione controllata, ma non sono stati sviluppati, né validati, per predire la competenza degli ovociti stessi. Come sintetizza Cedars (2022) (30), l'AMH è "un marcatore affidabile della quantità ovocitaria" ma "non riflette la salute ovocitaria né la probabilità di gravidanza". Una donna con un pool follicolare ridotto ma giovane può possedere ovociti di ottima qualità; una donna con un pool follicolare apparentemente adeguato ma di età riproduttiva avanzata può avere ovociti in gran parte aneuploidi. È questa dissociazione (quantità misurabile, qualità no) a costituire il filo conduttore biologico di tutta la tesi, e il motivo per cui i biomarcatori di riserva ovarica, per quanto informativi in altri contesti, restano strumenti imperfetti per predire il concepimento spontaneo (Baker et al., 2025) (22).

2.3 ***Classificazione dei biomarcatori di riserva ovarica***

Poiché né la componente quantitativa né tantomeno quella qualitativa della riserva ovarica possono essere osservate direttamente, la ricerca clinica ha sviluppato nel tempo una serie di biomarcatori surrogati, ciascuno con un diverso grado di invasività, variabilità e accuratezza. Il capostipite storico fu l'FSH basale al giorno 2-4 del ciclo: quando il pool follicolare si riduce, la minore secrezione di inibina B ed estradiolo attenua il feedback negativo sull'ipofisi, causando un aumento compensatorio del FSH circolante. Il marcatore, tuttavia, soffre di una limitazione intrinseca: la significativa variabilità inter- e intra-ciclica, che rende inaffidabile una singola misurazione, motivo per cui l'ASRM ne ha progressivamente ridimensionato il ruolo clinico. La svolta è arrivata con l'affermazione di due marcatori concettualmente diversi: uno biochimico (l'ormone antimulleriano, secreto direttamente dalle cellule della granulosa dei follicoli in crescita) e uno morfologico (la conta dei follicoli antrali, una visualizzazione ecografica diretta del medesimo compartimento follicolare). Una revisione esaustiva sulla biologia dell'AMH nella riproduzione femminile la definisce oggi "il marcatore sierico più diretto disponibile della riserva ovarica funzionale", proprio per la sua origine diretta dal compartimento follicolare in crescita, a differenza dei marcatori indiretti di prima generazione come l'FSH (Di Clemente et al., 2021) (31). L'AFC (conta dei follicoli antrali), dal canto suo, richiede una tecnica ecografica standardizzata la cui riproducibilità dipende criticamente dall'esperienza dell'operatore e dalla qualità dell'apparecchiatura ma offre il vantaggio, unico tra i biomarcatori disponibili, di una visualizzazione diretta e in tempo reale del compartimento follicolare, senza necessità di prelievo ematico (Coelho Neto et al., 2018) (32). Entrambi i marcatori condividono

un limite concettuale comune, già anticipato nella sezione 2.2: derivano dal compartimento dei follicoli in crescita (la riserva ovarica funzionale), non dal pool primordiale sottostante, e nessuno dei due cattura in alcun modo la dimensione qualitativa degli ovociti contenuti in quei follicoli.

3. **Ormone antimulleriano: biologia e applicazioni cliniche**

3.1 ***Struttura molecolare e via di segnalazione dell'AMH***

L'esistenza dell'AMH fu ipotizzata per la prima volta negli anni '40-'50 da Alfred Jost, che identificò nei testicoli fetali un fattore responsabile della regressione dei dotti di Müller, le strutture embrionali che, in assenza di tale segnale, si sviluppano spontaneamente in utero, tube di Falloppio e porzione superiore della vagina. Un dettaglio storico non banale è che l'AMH sia stato scoperto per la sua funzione nel sesso maschile, decenni prima che se ne comprendesse il ruolo, apparentemente opposto, di regolatore quantitativo della riserva ovarica femminile. Dal punto di vista molecolare, l'AMH è una glicoproteina dimerica appartenente alla superfamiglia del transforming growth factor-β (TGF-β), che condivide con gli altri membri della famiglia, incluse le proteine morfogenetiche ossee (BMP) il meccanismo di segnalazione attraverso un recettore di tipo II e uno di tipo I di membrana. Nello specifico, l'AMH si lega al proprio recettore dedicato, AMHR2, che a sua volta recluta e fosforila un recettore di tipo I (ALK2, ALK3 o ALK6, condivisi con le vie BMP), attivando la cascata intracellulare mediata dalle proteine SMAD1, SMAD5 e SMAD8, che traslocano nel nucleo e regolano la trascrizione genica bersaglio (Di Clemente, Racine, Pierre & Taieb, 2021) (31). Nell'ovaio, l'espressione di AMH è confinata a una finestra di sviluppo follicolare ben definita inizia nei follicoli primari, raggiunge l'intensità massima nei follicoli preantrali e antrali di piccole dimensioni (fino a circa 8 mm), per poi spegnersi progressivamente man mano che il follicolo cresce oltre questa soglia e diventa sensibile alla selezione FSH-dipendente; l'espressione scompare del tutto nei follicoli atresici e nel corpo luteo. Questa finestra di espressione ristretta, che non contraddistingue né i follicoli primordiali, né quelli ormai selezionati per l'ovulazione, è precisamente ciò che rende l'AMH un marcatore della riserva ovarica *funzionale* (il compartimento dei follicoli in crescita) piuttosto che della riserva *totale* (il pool primordiale), come discusso nel capitolo 2.

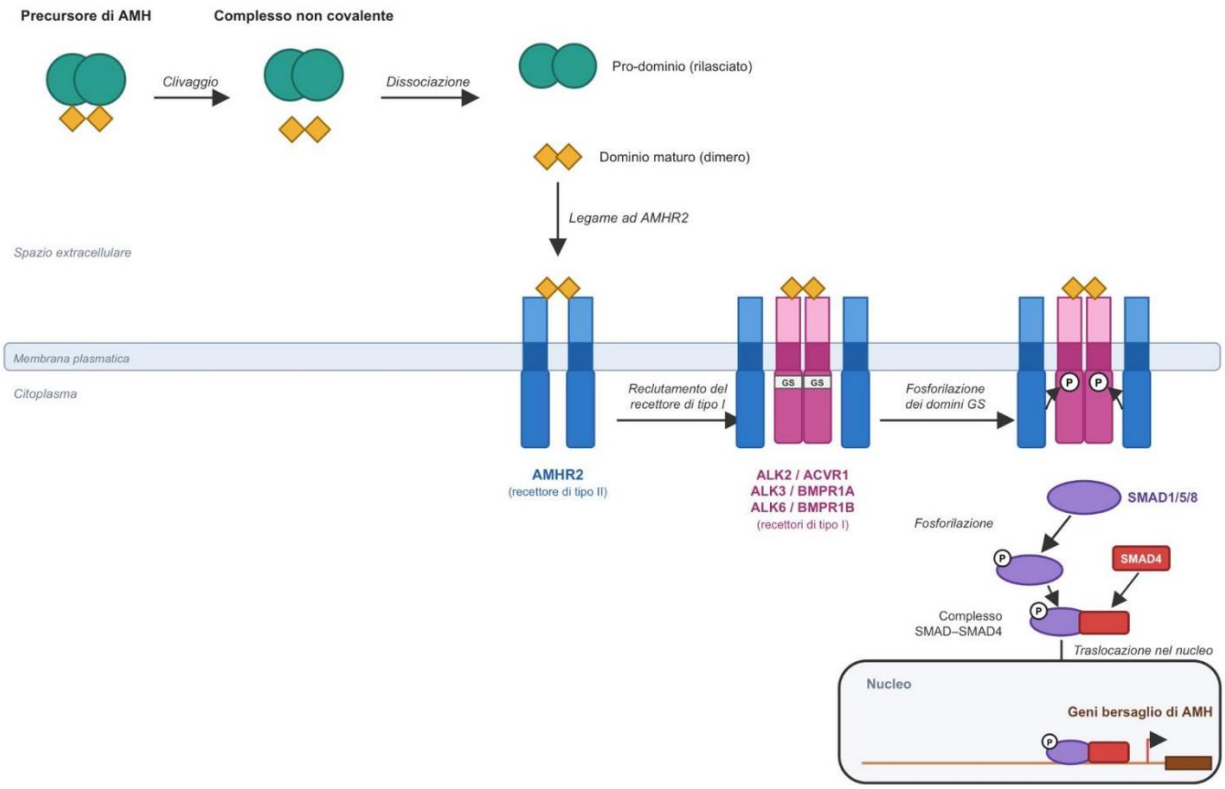


Figura 5. Via di segnalazione dell'AMH: legame ad AMHR2, reclutamento dei recettori di tipo I (ALK2/3/6) e attivazione di SMAD1/5/8 e SMAD4.

3.2 *Variazione dell'AMH in funzione dell'età: modelli di riferimento*

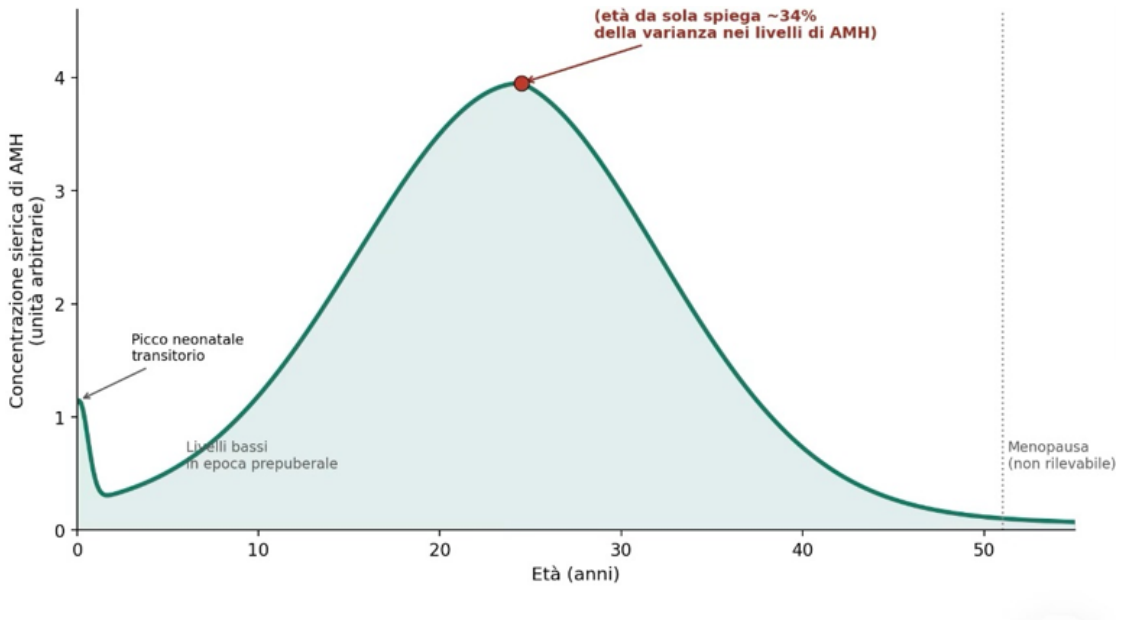


Figura 6. Traiettoria illustrativa dell'AMH sierica lungo l'arco della vita (unità arbitrarie). Elaborazione propria, schematica, sul modello di Kelsey et al. (2011).

La traiettoria dell'AMH lungo la vita di una donna è stata descritta con precisione matematica nel modello di riferimento di (Kelsey et al. 2011) (33), costruito su oltre 3.260 misurazioni in donne sane dal concepimento alla menopausa: il modello documenta un picco neonatale transitorio, un possibile picco prepuberale, un aumento costante dopo la pubertà fino a un massimo assoluto a 24,5 anni, seguito da un declino progressivo fino a valori non rilevabili alla menopausa. Un dato interessante emerso dallo stesso modello è che l'età da sola spiega circa il 34% della varianza complessiva nei livelli di AMH una percentuale che, pur sostanziale, lascia ampio spazio alla variabilità interindividuale discussa nel capitolo 1 (ereditabilità del timing riproduttivo). Un vantaggio pratico determinante dell'AMH rispetto a FSH, estradiolo e inibina B è la sua relativa stabilità nel corso del ciclo mestruale, che ne consente il dosaggio in qualsiasi giornata del ciclo, senza la necessità della finestra ristretta di fase follicolare precoce richiesta dagli altri marcatori (34). Questa caratteristica, unita all'assenza pressoché totale di variabilità legata all'ora del prelievo, ha reso l'AMH il marcatore sierico di riserva ovarica più praticabile su larga scala, incluso nel contesto di screening di popolazione o di test diretti al consumatore.

3.3 ***Determinanti genetici, ormonali e comportamentali dei livelli di AMH***

L'interpretazione clinica di un valore di AMH richiede la consapevolezza di diversi fattori modificatori, alcuni dei quali possono alterare significativamente la concentrazione circolante indipendentemente dal reale stato della riserva ovarica. Il fattore modificabile più rilevante è la contraccezione ormonale una revisione sistematica del 2024 su *Human Reproduction Update*, che ha sintetizzato l'intero corpo di letteratura sui fattori di stile di vita modificabili associati all'AMH circolante, conferma che l'uso di contraccettivi ormonali combinati si associa a una riduzione significativa dei livelli misurati, con il grado di soppressione variabile in base alla formulazione (Werner, Van Der Schouw & De Kat, 2024) (35). L'effetto appare reversibile dopo la sospensione, anche se con un ritardo di alcune settimane. Il BMI è inversamente associato ai livelli di AMH, e un'analisi condotta da Jaswa et al. (2020) ha chiarito un punto metodologicamente importante la riduzione osservata nelle donne con BMI elevato non è spiegabile con la sola emodiluizione (l'aumento del volume plasmatico che "diluisce" la concentrazione di qualsiasi analita), ma riflette una vera riduzione della produzione di AMH per follicolo un effetto biologico, non un artefatto di misurazione (36). Anche il fumo di sigaretta è stato confermato come fattore associato a una riduzione dei livelli di AMH e a un'accelerazione del ritmo di declino nel tempo, secondo un'analisi longitudinale pubblicata su *Reproductive BioMedicine Online* nel 2026 (Werner et al., 2026) (37). Un'area di ricerca più recente e ancora dibattuta riguarda la vitamina D, una meta-analisi pubblicata su *BMC Endocrine Disorders* nel dicembre 2025, che ha incluso 18 studi osservazionali e 6 interventistici, conclude che la relazione tra vitamina D e AMH è complessa e dipendente dallo stato ovulatorio della donna gli studi osservazionali trasversali mostrano risultati largamente discordanti, mentre la meta-analisi degli studi interventistici suggerisce una relazione causa-effetto, la cui direzione non è però univoca (38). Si tratta quindi di un'associazione biologicamente plausibile ma non ancora sufficientemente consolidata da avere ricadute cliniche dirette. Va infine ricordato che condizioni endocrine specifiche alterano l'AMH indipendentemente dalla riserva ovarica reale la sindrome ovarica poliendocrina-metabolica (PMOS) si associa tipicamente a livelli di AMH elevati, per il maggior numero di piccoli follicoli antrali secernenti che caratterizza la condizione, mentre condizioni di soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi tendono ad abbassarla artificialmente. Anche l'etnia contribuisce a una variabilità di fondo nei valori di riferimento, come documentato da uno studio multicentrico e multietnico asiatico su donne infertili, che ha rilevato differenze significative nella distribuzione dei livelli di AMH tra gruppi etnici a parità di età (Tzeng et al., 2023) (39). Una componente della variabilità nei livelli di AMH parallela a quella genetica sull'età alla menopausa discussa nel capitolo 1, ha una base genetica diretta e specifica del gene stesso. Una revisione sulla determinazione genetica della riserva ovarica ha catalogato polimorfismi a singolo

nucleotide (SNP) nei geni del recettore dell'AMH (AMHR2), del recettore dell'FSH (FSHR), del recettore dell'LH (LHCGR) e del growth differentiation factor-9 (GDF9), alcuni dei quali associati a scarsa risposta ovarica e a riserva ovarica ridotta; la stessa revisione segnala inoltre il ruolo emergente dell'RNA lungo non codificante H19, il cui declino nel siero è stato associato a una riduzione dell'AMH e a un aumentato rischio di riserva ovarica severamente ridotta (40). Un contributo del tutto recente arriva da un genoma-wide association study studio che confronta il genoma di molti individui per identificare varianti genetiche statisticamente associate a una caratteristica misurabile, in questo caso il livello di AMH, pubblicato nel giugno 2025 su una coorte di 1.185 donne samoan, è la prima indagine genome-wide sull'AMH condotta al di fuori di popolazioni di ascendenza europea che ha identificato undici loci genome-wide suggestivi, il segnale più forte nel gene ARID3A, la cui variante lead è in forte disequilibrio di associazione con una nota variante dell'età alla menopausa, e un gene candidato biologicamente plausibile (KISS1R, che codifica il recettore della kisspeptina, regolatore dello sviluppo follicolare) (41). Questo studio, oltre ad ampliare la mappa genetica nota dell'AMH, sottolinea un limite finora poco discusso della letteratura esistente in materia: la quasi totale concentrazione degli studi genetici su popolazioni europee, con conseguente incertezza sulla generalizzabilità dei valori di riferimento a popolazioni diverse.

3.4 ***Impiego dell'AMH nella procreazione medicalmente assistita***

È nel contesto della procreazione medicalmente assistita che l'AMH ha trovato la sua applicazione clinica più solida e meno controversa. La misurazione pretrattamento consente di personalizzare il dosaggio delle gonadotropine, anticipare il numero atteso di ovociti recuperabili e identificare precocemente le pazienti a rischio di scarsa risposta o, all'estremo opposto, di sindrome da iperstimolazione ovarica (Russell, Gilmore & Roudebush, 2022) (42). Una revisione sistematica e metanalisi pubblicata su *Human Reproduction* nel 2023 ha esaminato specificamente la capacità dell'AMH di predire la probabilità di nato vivo dopo concepimento spontaneo o assistito, confermando una relazione positiva ma non lineare tra i livelli di AMH e il tasso cumulativo di nato vivo dopo IVF/ICSI, senza tuttavia identificare una soglia netta al di sotto della quale il nato vivo diventi impossibile (Peigné et al., 2023) (43). Questo è un punto concettualmente importante anche nel contesto in cui l'AMH funziona meglio come predittore, il suo valore resta probabilistico, non un test binario "fertile/infertile".

4. **Conta dei follicoli antrali: biologia e applicazioni cliniche**

4.1 ***Definizione e metodica di misurazione dell'AFC***

La conta dei follicoli antrali è definita come il numero totale di follicoli di diametro medio 2-10 mm, visualizzati bilateralmente mediante ecografia transvaginale. A differenza dell'AMH, che può essere misurata in qualsiasi momento del ciclo, l'AFC viene tradizionalmente valutata in fase follicolare precoce (giorni 2-4) per ridurre l'interferenza del follicolo dominante in via di selezione sebbene la letteratura più recente confermi che la variabilità intraciclica dell'AFC sia in realtà modesta, rendendo la misurazione ragionevolmente affidabile anche al di fuori di questa finestra. Una guida pratica pubblicata su Ultrasound in Obstetrics & Gynecology ha standardizzato i criteri tecnici di conteggio, inclusi i criteri per distinguere follicoli realmente separati da immagini sovrapposte, e per la gestione delle cisti funzionali proprio per ridurre la variabilità interoperatore che rappresenta il principale limite tecnico del metodo (44). Proprio su questo limite tecnico, la dipendenza dall'esperienza dell'operatore, che resta il principale svantaggio dell'AFC rispetto a un dosaggio ormonale standardizzato si è concentrato un filone di ricerca esploso nell'arco degli ultimi mesi: l'automazione del conteggio follicolare tramite intelligenza artificiale. Uno studio multicentrico pubblicato all'inizio del 2026 su oltre 5.500 scansioni ecografiche transvaginali provenienti da quattro centri IVF in Polonia, Argentina, Colombia e Stati Uniti ha validato una piattaforma di intelligenza artificiale per il conteggio e la misurazione automatizzata dei follicoli, con prestazioni comparabili a quelle di ecografisti certificati (45). Un approccio complementare, basato su radiomica e deep learning applicati a immagini ecografiche bidimensionali di routine, è stato proposto per predire simultaneamente sia l'AFC sia i livelli di AMH da una singola scansione, con l'obiettivo dichiarato di superare la variabilità interoperatore del conteggio manuale (46). Sebbene questi strumenti non siano ancora entrati nella pratica clinica corrente e non siano stati utilizzati nel presente studio, condotto con metodica ecografica manuale standard la loro rapida evoluzione segnala una direzione futura plausibile per ridurre proprio il limite tecnico più citato dell'AFC rispetto all'AMH, discusso più diffusamente nella sezione 4.5.

4.2 ***Follicologenesi e correlati biologici dell'AFC***

Il follicolo ovarico attraversa quattro stadi di sviluppo primordiale, primario, secondario, terziario (antrale) in un processo continuo che dura per l'intera vita riproduttiva. La transizione dai follicoli primordiali ai primi stadi di crescita è indipendente dalle gonadotropine ed è regolata da segnali paracrini locali, tra cui le proteine morfogenetiche ossee (BMP), il growth differentiation factor-9 (GDF-9) secreto dall'ovocita stesso, il kit ligand prodotto dalle cellule della granulosa, e lo stesso

AMH, che agisce come freno inibitorio su questa fase iniziale (47). Il mantenimento della quiescenza dei follicoli primordiali dipende da vie molecolari inibitorie intracellulari (FOXO3a, PTEN, TSC1), la cui alterazione sperimentale porta ad attivazione follicolare massiva e prematura, con conseguente esaurimento accelerato della riserva. Solo quando un follicolo raggiunge circa 2 mm di diametro diventa visibile all'ecografia e acquisisce una sensibilità significativa all'FSH, entrando nella fase gonadotropino-dipendente propriamente detta. É questo compartimento (i follicoli tra 2 e 10 mm, reclutabili ma non ancora selezionati) a costituire ciò che l'AFC misura. Monniaux et al. (2014) hanno formalizzato il legame tra questo compartimento dinamico e il pool primordiale sottostante, mostrando che la dimensione della riserva antrale in crescita è statisticamente predetta dalla dimensione della riserva primordiale di partenza, pur con una relazione non strettamente lineare (48). Un'evidenza istologica diretta a supporto di questo legame è stata fornita recentemente da uno studio che ha correlato prospetticamente l'AFC ecografica, i livelli di AMH sierica, e la conta istologica dei follicoli primordiali in tessuto ovarico escisso, confermando che l'AFC rappresenta un surrogato non invasivo affidabile della riserva primordiale reale (Demir et al., 2025) (49).

4.3 ***Variazione dell'AFC in funzione dell'età: nomogrammi di riferimento***

Come l'AMH, l'AFC declina progressivamente con l'età, ma con un dettaglio aggiuntivo che l'ecografia permette di cogliere e che il dosaggio sierico non può ovvero il cambiamento nella composizione del pool antrale, non solo nella sua dimensione totale. Bentzen et al. (2013), analizzando le sottoclassi dimensionali dei follicoli antrali nel corso dell'invecchiamento riproduttivo normale, hanno documentato una riduzione relativa della proporzione di follicoli più piccoli (2-4 mm) accompagnata da un aumento relativo di quelli più grandi (8-10 mm), suggerendo che il pool residuo si arricchisca progressivamente di follicoli più maturi e più responsivi all'FSH man mano che la riserva si riduce (50). Diversi nomogrammi età-specifici sono stati costruiti per fornire valori di riferimento clinicamente utilizzabili da quello pionieristico di La Marca et al. (2011) (51) su 362 donne, ai più recenti Bozdag et al. (2016) (52) e, ancora più aggiornato, Balachandren et al. (2024) (53), che ha derivato un nomogramma su una coorte osservazionale di 3.821 donne, oggi tra i più ampi disponibili in letteratura. Un confronto diretto tra AFC e AMH nella loro relazione con l'età, condotto da Rosen et al. (2012) (54) attraverso analisi istologica di tessuto ovarico, ha suggerito che l'AFC possa correlare con l'età in modo lievemente più stretto rispetto all'AMH, sebbene le differenze tra i due marcatori in questo ambito restino generalmente modeste.

4.4 *Impiego dell'AFC nella procreazione medicalmente assistita*

L'AFC è, insieme all'AMH, il marcatore cardine per la personalizzazione del trattamento di stimolazione ovarica controllata. Jayaprakasan et al. (2012) (55), in una coorte prospettica di oltre 1.000 donne, hanno definito soglie di AFC clinicamente utili per predire l'esito della fecondazione in vitro a diversi livelli di cut-off (55). Valori di AFC molto bassi sono incorporati nei criteri di Bologna e, più recentemente, nei criteri POSEIDON per la classificazione delle pazienti a prognosi sfavorevole un sistema di classificazione validato su una coorte di oltre 9.000 pazienti che utilizza congiuntamente AFC e AMH (Esteves et al., 2021) (56). Un aspetto tecnico rilevante per l'affidabilità clinica dell'AFC è la sua variabilità intraciclica. Uno studio di Deb et al. (2013) su donne con cicli ovulatori normali ha quantificato questa variabilità stratificandola per classe dimensionale di follicolo, fornendo dati utili per l'interpretazione di misurazioni ripetute nello stesso ciclo (57).

4.5 *AMH e AFC a confronto: concordanza e complementarità*

L'AFC e AMH sono fortemente correlate tra loro, ma non sono intercambiabili, e la letteratura più recente ha affinato il confronto delle loro prestazioni predittive. Una revisione tecnica di riferimento (Iliodromiti, Anderson & Nelson, 2015) ha sostenuto che gli studi monocentrici tendano a sovrastimare l'equivalenza dei due marcatori, mentre studi multicentrici su larga scala con dosaggio centralizzato indicherebbero un vantaggio predittivo dell'AMH per la risposta ovarica (58). Metanalisi più recenti offrono un quadro più sfumato sia Sun et al. (2022) sia Liu et al. (2023), confrontando sistematicamente la capacità predittiva dei due marcatori per la risposta ovarica, concludono che le prestazioni sono nel complesso comparabili, con differenze minime che dipendono dal contesto clinico specifico e dalla popolazione studiata (59-60). In pratica, i due marcatori restano complementari più che sostituibili l'AMH offre stabilità di misurazione indipendente dal ciclo e maggiore standardizzabilità analitica; l'AFC offre una visualizzazione diretta, immediata e priva di prelievo ematico, oltre a informazioni sulla distribuzione dimensionale del pool follicolare che nessun dosaggio sierico può fornire. È questa complementarità non equivalenza, ma nemmeno sostituibilità a motivare l'uso combinato dei due marcatori raccomandato dalla pratica clinica corrente, e a giustificare la scelta metodologica di includerli entrambi come variabili di esposizione nel presente studio.

5. **Valore predittivo dei biomarcatori di riserva ovarica per la fertilità naturale**

5.1 ***AMH e probabilità di concepimento spontaneo: evidenze disponibili***

Il punto di riferimento imprescindibile in questo campo resta lo studio Time to Conceive di Steiner et al. (2017), pubblicato su JAMA: in una coorte prospettica di 750 donne di 30-44 anni senza storia di infertilità, un'AMH bassa (≤0,7 ng/mL) non si è associata a una probabilità cumulativa di concepimento ridotta né a 6 né a 12 cicli di tentativo, dopo correzione per età (61). Diversi studi indipendenti hanno corroborato questo risultato negativo, in contesti demografici anche molto diversi tra loro Hagen et al. (2012), in una coorte prospettica di 186 giovani donne danesi (19-35 anni), non hanno riscontrato differenze nella probabilità mensile di gravidanza tra i gruppi di AMH (62) Streuli et al. (2014) non hanno trovato alcuna relazione tra concentrazione di AMH e tempo effettivo al concepimento in donne che hanno concepito naturalmente, identificando l'età come unico predittore significativo (63); Hvidman et al. (2017), in uno studio trasversale su 279 donne con gravidanza naturale confermata, hanno concluso che il tempo al concepimento non era correlato ai valori di AMH misurati in gravidanza precoce (64). Un'analisi secondaria dello studio EAGeR, su oltre 1.200 donne con aborti pregressi, ha confermato l'assenza di associazione (65). Una metanalisi di Lin et al. (2021), su 11 studi e 4.388 donne, ha concluso che l'AMH sierica possiede uno scarso valore predittivo per il concepimento spontaneo (AUC complessiva 0,59) (66). Non tutti gli studi convergono, tuttavia, su questa conclusione. Nelson et al. (2024), nella coorte prospettica più ampia mai analizzata su questo tema, hanno riportato un'associazione modesta ma statisticamente significativa: le donne con AMH <1 ng/mL presentavano una fecondabilità per ciclo ridotta di circa il 23% rispetto a quelle con AMH normale, sebbene l'associazione perdesse significatività statistica utilizzando la soglia più bassa di 0,7 ng/mL adottata da Steiner (67). Anche Korsholm et al. (2018), in una coorte prospettica danese di 260 donne di 25-42 anni, hanno riportato un'associazione tra livelli di AMH più elevati e tassi di gravidanza migliori: 60,1% nel gruppo AMH basso contro 78,3% nel gruppo AMH alto ($p = 0,03$) (68).

Due studi condotti in contesti demografici finora poco rappresentati in questa letteratura, prevalentemente nordamericana ed europea, offrono un contributo utile a valutare la generalizzabilità di questi risultati contrastanti. Uno studio prospettico giapponese, condotto da Konishi et al. (2020) su coppie che tentavano il concepimento del primo figlio, ha rilevato che né l'età cronologica né l'AMH ("età riproduttiva") risultavano associate alla probabilità di gravidanza a 24 settimane di follow-up mentre la frequenza dei rapporti risultava l'unico fattore significativamente associato (OR 1,23; IC 95% 1,02-1,47) (69). È un risultato che, pur in una coorte piccola (80 donne), introduce un elemento metodologico importante: la frequenza e la tempistica dei rapporti come potenziale

confondente non misurato in molti degli studi sopra citati un punto su cui si tornerà nei limiti del presente lavoro. In un contesto demografico diverso, uno studio trasversale condotto in Pakistan su 423 donne ha confrontato AFC e AMH tra donne fertili e infertili di età inferiore ai 40 anni, rilevando che i due marcatori mostravano andamenti sovrapponibili indipendentemente dallo stato di fertilità, suggerendo che la bassa risposta osservata in PMA non rifletta necessariamente una sovra-rappresentazione di donne con declino precoce della riserva ovarica, quanto piuttosto un fenomeno di deplezione follicolare età-specifica comune a tutte le donne (Khan et al., 2019) (70).
L'ACOG ha concluso che una singola misurazione di AMH in donne con presunta fertilità non dovrebbe essere utilizzata per predire il tempo al concepimento (71), posizione ribadita nel 2025 dalla ESHRE, come già discusso nel capitolo 1.

5.2 *AMH e rischio di aborto spontaneo*

Un secondo filone di ricerca ha indagato l'AMH come potenziale predittore non se una donna concepisca, ma se la gravidanza prosegua, i risultati sono ancora più eterogenei. Lyttle Schumacher et al. (2018), in un'analisi secondaria della stessa coorte Time to Conceive, hanno riportato una relazione inversa tra AMH e rischio di aborto spontaneo in gravidanze concepite naturalmente le donne con riserva ovarica severamente ridotta (AMH ≤0,4 ng/mL) presentavano un rischio più che doppio rispetto a quelle con AMH ≥1 ng/mL (72).
Un contributo metodologicamente distinto, e finora assente da questo filone di letteratura, arriva da uno studio pubblicato alla fine di dicembre 2025 su Reproductive Biology and Endocrinology, che ha combinato un'ampia coorte osservazionale retrospettiva (19.154 donne sottoposte a fecondazione in vitro presso il Peking University Third Hospital) con un'analisi di randomizzazione mendeliana un approccio che utilizza varianti genetiche associate ai livelli di AMH come "strumenti" per verificare se l'associazione osservata rifletta un nesso causale, anziché un semplice confondimento (Mao et al., 2025) (73). Nella coorte osservazionale, le donne con AMH <1,1 ng/mL presentavano un tasso di aborto precoce significativamente più alto (17,7% contro 10,9% nel gruppo di riferimento; OR corretto1,26, IC 95% 1,11-1,44). Tuttavia, l'analisi di randomizzazione mendeliana condotta su varianti genetiche associate all'AMH tratte da un ampio meta-GWAS, e su tre distinti dataset per gli esiti di aborto spontaneo e ricorrente non ha rilevato alcuna relazione causale tra i livelli di AMH e il rischio di aborto, né spontaneo né ricorrente. Gli autori concludono esplicitamente che le donne con AMH bassa che concepiscono naturalmente non hanno motivo di preoccuparsi eccessivamente del rischio di aborto precoce, mentre una cautela interpretativa resta giustificata limitatamente alla popolazione in trattamento di fecondazione assistita (73).

Questo studio è particolarmente rilevante per il presente lavoro perché scompone un'associazione osservazionale in due componenti: (i) correlazione, ben documentata anche nella coorte IVF analizzata, e (ii) causalità, non supportata dall'evidenza genetica, così offrendo una spiegazione plausibile per la persistente eterogeneità dei risultati in questo campo. L'AMH bassa potrebbe essere un marcatore (correlato ad altri fattori sfavorevoli, come l'età materna più avanzata osservata sistematicamente nel gruppo a bassa AMH), piuttosto che una causa diretta dell'aborto. Una metanalisi più ampia di Kasaven et al. (2025), su 16 studi retrospettivi e 43.147 pazienti in trattamento di PMA, ha confermato un'associazione tra AMH bassa e rischio di aborto (OR 1,48; IC 95% 1,20-1,83), significativa nelle donne under 35 (OR 1,34) ma non in quelle di 35 anni o più, un pattern che gli stessi autori attribuiscono alla sovrapposizione, in età avanzata, con altri fattori di rischio come l'aneuploidia embrionale età-correlata (74).

Le linee guida attuali, in ogni caso, non raccomandano il dosaggio dell'AMH per la predizione del rischio di aborto in popolazioni non selezionate, e i risultati della randomizzazione mendeliana rafforzano, con uno strumento metodologico diverso da quello epidemiologico classico, la cautela di questa posizione per il contesto specifico del concepimento naturale.

5.3 ***AFC e fertilità spontanea: limiti dell'evidenza disponibile***

È in questa sezione che emerge il vuoto di letteratura più rilevante per il presente studio. A differenza dell'AMH, quasi nessuno studio prospettico ha specificamente esaminato l'associazione tra AFC e probabilità di concepimento spontaneo in donne della popolazione generale senza infertilità accertata. Le evidenze disponibili sono per lo più trasversali o retrospettive, e provengono in larga parte da popolazioni già subfertili un disegno che, per sua natura, non può rispondere alla domanda prospettica di interesse.

Lo studio pakistano di Khan et al. (2019), già citato nel paragrafo 5.1, è tra i pochi ad aver confrontato direttamente l'AFC tra donne fertili e infertili, ma con disegno cross-sezionale, non longitudinale (70). Depmann et al. (2017) (75), in una coorte prospettica di 102 donne sane che pianificavano una gravidanza, hanno osservato che l'AFC era significativamente associata al tempo al concepimento in analisi univariata, ma l'associazione scompariva completamente dopo correzione per l'età femminile nel modello multivariato un risultato che indica come l'apparente valore predittivo dell'AFC possa essere in realtà interamente mediato dall'età materna, e non un contributo indipendente. Evidenze indirette da popolazioni subfertili, come quelle discusse nel capitolo 4, mostrano che le donne infertili tendono ad avere un'AFC inferiore rispetto a controlli di pari età ma si tratta, ancora una volta, di confronti di studi retrospettivi di coorte che non possono stabilire una capacità predittiva prospettica nella popolazione generale.

Questo gap di evidenza, tecnicamente semplice da colmare in funzione del fatto, che l'AFC è già misurata di routine in molti contesti clinici, ma finora non colmato, costituisce uno dei razionali centrali del presente lavoro, che include l'AFC come variabile di esposizione primaria accanto all'AMH.

6. **Sintesi e razionale del presente studio**

Il quadro che emerge da questo capitolo è di una letteratura solida ma internamente contrastante sull'AMH, e quasi assente sull'AFC, nel contesto specifico della fertilità. Quattro osservazioni meritano di essere sottolineate:

(i) gli studi che riportano un'associazione tra AMH e concepimento spontaneo (Nelson et al., 2024, Korsholm et al., 2018) tendono a farlo con effetti modesti, spesso sensibili alla soglia di cut-off utilizzata, un pattern che suggerisce un effetto biologico reale ma di piccola entità, più che un errore sistematico in una direzione o nell'altra.

(ii) relativamente all'aborto spontaneo, l'evidenza di randomizzazione mendeliana discussa in 5.2 introduce un elemento nuovo e concettualmente importante: anche quando un'associazione osservazionale è statisticamente robusta, l'evidenza genetica può non supportarne la causalità, suggerendo cautela nell'attribuire all'AMH un ruolo meccanicistico diretto.

(iii) il confondimento introdotto da fattori comportamentali non misurati in particolare la frequenza e la tempistica dei rapporti, come suggerito dallo studio giapponese di Konishi et al. resta un limite metodologico trasversale a gran parte della letteratura e non superabile neanche dal presente studio.

(iv) l'AFC è singolarmente sotto-studiata rispetto all'AMH nel contesto specifico della fertilità naturale, nonostante la sua diffusione clinica sia paragonabile.

È a partire da queste quattro osservazioni (eterogeneità dell'evidenza sull'AMH, distinzione tra correlazione e causalità nel rischio di aborto, confondimento comportamentale non controllato, e vuoto quasi totale sull'AFC) che si costruisce il razionale metodologico del presente studio.

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Il presente studio, a partire da quanto discusso nel capitolo 5, analizza la relazione tra biomarcatori di riserva ovarica e fertilità, un ambito che resta contraddistinto da tre problemi irrisolti: l'eterogeneità dei risultati sull'AMH, la distinzione ancora poco esplorata tra correlazione e causalità nel rischio di aborto, e l'assenza quasi totale di dati prospettici sull'AFC. Gli obiettivi di questo studio mirano a rispondere ai tre nodi concettuali, all'interno del disegno di coorte prospettico descritto nel capitolo successivo.

Obiettivo primario

L'obiettivo primario si concentra sul determinare se i livelli sierici di AMH e l'AFC, misurati in fase follicolare precoce, siano associati alla probabilità di parto (nato vivo) in donne di età compresa tra i 28 e i 40 anni prive di storia di infertilità.

L'obiettivo primario deriva dal gap identificato nel capitolo 5, mentre per l'AMH la letteratura è ampia ma contraddittoria, con lo studio Time to Conceive di Steiner et al. che non rileva associazione e la coorte più recente di Nelson et al. che ne rileva una modesta; per l'AFC, invece non esiste alcuno studio prospettico fino ad oggi condotto specificamente su una popolazione generale non infertile.

Il presente studio considera entrambi i biomarcatori nella stessa coorte prospettica, permettendo per la prima volta un confronto diretto e internamente coerente del loro valore predittivo.

L'ipotesi nulla del presente studio è che i biomarcatori di riserva ovarica, con valori categorizzati secondo soglie clinicamente validate (AMH: bassa < 1,0 ng/mL, normale 1,0-5,5 ng/mL, alta >5,5 ng/mL; AFC: bassa ≤7, normale 8-25, alta >25), non siano associati in modo indipendente alla probabilità di parto (nato vivo) dopo la correzione per i principali fattori di confondimento quali età, BMI, stato di fumatrice. L'ipotesi alternativa, coerente con quanto detto nel paragrafo 5.1, è che un'eventuale associazione, se presente, sia di entità modesta (fecundability ratio nell'ordine di 0,75-0,80 per il confronto tra riserva ridotta e normale) piuttosto che marcata, e sensibile alla soglia di cut-off adottata.

Obiettivi secondari

1. Tempo di concepimento. Stimare l'effetto di AMH e AFC, come variabili sia categoriche che continue sul tempo di concepimento (time to pregnancy) espresso in numero di cicli mestruali, mediante modelli di sopravvivenza a rischi proporzionali (Cox) e curve di Kaplan-Meier stratificate per biomarcatore. Tale obiettivo consente una valutazione più dettagliata rispetto al

semplice esito binario “gravidanza / assenza di gravidanza” a 12 cicli, permettendo di distinguere tra un ritardo nel concepimento e una reale difficoltà a concepire.

2. Gravidanza clinica. Valutare l’associazione tra AMH e AFC e la probabilità di gravidanza clinica evolutiva spontanea, definita come presenza di sacco gestazionale intrauterino con attività cardiaca fetale documentata ecograficamente, in assenza di trattamenti di procreazione medicalmente assistita nel ciclo di concepimento. Come per il tempo di concepimento, l'analisi si basa sulle probabilità cumulative a 6 e 12 cicli, sulle curve di Kaplan-Meier e sugli HR, non corretti e corretti, ottenuti con modelli di Cox. Tale obiettivo colloca la gravidanza clinica tra il concepimento e il nato vivo e consente di capire se un'eventuale associazione con i biomarcatori agisca sulla capacità di avviare una gravidanza o sulla sua evoluzione successiva.

3. Aborto spontaneo del primo trimestre. Valutare l’associazione tra AMH e AFC e il rischio di aborto spontaneo precoce (perdita gestazionale entro le 12 settimane) e di gravidanza biochimica nelle partecipanti che raggiungono una gravidanza. Tale obiettivo affronta direttamente il secondo nodo irrisolto discusso nel capitolo 5, ovvero la persistente incertezza sul possibile ruolo dell’AMH nell’aborto spontaneo precoce. Sebbene l’evidenza derivante dalla randomizzazione mendeliana di Mao et al. (2025), essa non risulta ancora conclusiva. L’analisi proposta mira quindi a chiarire il ruolo causale dell’AMH nella perdita gestazionale precoce, indipendentemente dal suo ruolo, più consolidato, di marcatore quantitativo della riserva follicolare.

4. Modello combinato AMH+AFC. Confrontare il potere predittivo di un modello che combini AMH+AFC rispetto ai due biomarcatori considerati separatamente. La discordanza tra AMH e AFC, descritta in letteratura fino al 30% dei casi in letteratura (cap.4.), suggerisce che l’uso congiunto dei due marcatori fornisca una valutazione del rischio più accurata rispetto all’impiego di ciascun marcatore preso singolarmente. Questa ipotesi è coerente con la raccomandazione ESHRE di impiego combinato di AMH e AFC in ambito PMA. Nel presente studio tale approccio verrà valutato, per la prima volta, nel contesto della fertilità naturale.

5. Analisi esplorativa. Valutare, in via esplorativa, associazione di FSH basale e volume ovarico con gli stessi esiti.

6. Modificazione d’effetto per età. Esaminare l’eventuale modificazione dell’effetto in relazione alla fascia d’età (28-32, 33-35, 36-38, e 39-40 anni), in accordo con le evidenze discusse nel capitolo

1 sulla non linearità del declino della fertilità e dell'aumento del rischio di aborto lungo l'asse dell'età.

Poiché sia Boxem et al. (2025) sia Kasaven et al. (2025) hanno descritto pattern età-dipendenti diversi per infertilità e per rischio di aborto, è plausibile che anche il valore predittivo di AMH e AFC non sia uniforme nelle diverse fasce d'età, ma più marcato in specifiche sottopopolazioni.

MATERIALE E METODI

Disegno dello studio

Il presente lavoro è uno studio di coorte prospettico, finalizzato a valutare l'associazione tra alcuni marcatori della riserva ovarica e la probabilità di concepimento spontaneo nelle donne in età riproduttiva. Le partecipanti sono state osservate nel tempo per un periodo massimo di 12 cicli mestruali consecutivi, a partire dalla data di reclutamento, fino a quando non si è verificata una gravidanza o fino al termine del periodo di osservazione, a seconda di quale evento si fosse verificato per primo. Il disegno prospettico è stato scelto per motivi metodologici ben definiti, come spiegato nel quinto capitolo poiché gran parte della letteratura contrastante sull'AMH, e la quasi totale assenza di dati sull'AFC nel contesto della fertilità, derivano proprio dalla scarsa disponibilità di studi che misurino i biomarcatori di riserva ovarica prima dell'esito riproduttivo. Al contrario, i confronti trasversali tra donne fertili e infertili non permettono di stabilire una relazione temporale e quindi la capacità predittiva.

Lo studio è stato condotto in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki (76) e secondo le raccomandazioni STROBE per la conduzione e la presentazione degli studi osservazionali (77).

La scelta del disegno prospettico, anziché retrospettivo o trasversale, risponde a un preciso razionale metodologico discusso nel capitolo 5: gran parte della letteratura contrastante sull'AMH, e la quasi totale assenza di dati sull'AFC nel contesto della fertilità, derivano proprio dalla scarsità di studi che misurino i biomarcatori di riserva ovarica prima dell'esito riproduttivo, anziché dedurne il valore predittivo da confronti trasversali tra donne fertili e infertili un disegno, quest'ultimo, intrinsecamente incapace di stabilire una relazione temporale e quindi potenzialmente predittiva (78).

Setting e reclutamento

Lo studio è stato condotto in due centri: IRCCS Istituto Clinico Humanitas Research Hospital e Humanitas San Pio X, scelti per il gran numero di donne in età riproduttiva che vengono sottoposte a valutazioni ginecologiche di routine. Questa condizione ha permesso un reclutamento continuo non selezionato in base a specifiche condizioni di infertilità. Le donne potenzialmente interessate sono state identificate durante visite di controllo, dove sono state informate dello studio con materiale scritto standardizzato prima del consenso, tramite un colloquio telefonico o in presenza.

Popolazione dello studio

Criteri di inclusione:

- Donne con età compresa tra 28 e 40 anni al momento del reclutamento.

- Tentativo di concepimento spontaneo da tre mesi o meno.
- Cicli mestruali regolari, definiti con una durata compresa tra 21 e 35 giorni ed una variazione non superiore a +3 giorni negli ultimi tre cicli.
- Partner maschile senza fattori di infertilità severi noti (in assenza di analisi del liquido seminale, il criterio è stato valutato in base all'anamnesi: assenza di diagnosi di oligo/asteno/teratozoospermia severa o azoospermia).

Criteri di esclusione:

- Storia di infertilità, definita come mancato concepimento dopo più di 12 mesi di rapporti regolari non protetti in un precedente tentativo.
- Sindrome Ovarica Poliendocrina-Metabolica.
- Endometriosi nota di stadio III-IV secondo la classificazione ASRM.
- Insufficienza ovarica prematura o menopausa precoce.
- Malformazioni uterine congenite clinicamente significative.
- Precedente chirurgia ovarica (cistectomia, ovariectomia parziale) o esposizione precedente a chemioterapia o radioterapia gonadotossica.
- Trattamento con contraccettivi ormonali o altre terapie ormonali nei due mesi precedenti l'arruolamento, per l'effetto potenziale sull'AMH.
- Patologie sistemiche croniche non controllate con impatto potenziale sulla fertilità (diabete non controllato, patologie tiroidee non trattate, malattie autoimmuni attive).

La scelta di reclutare solo donne che avevano cercato di concepire da tre mesi o meno risponde alla necessità di ridurre il bias da left-truncation. Se si includessero donne che avevano cercato per periodi più lunghi, il campione risulterebbe povero di quelle coppie più fertili, che concepiscono velocemente e non arrivano mai a un arruolamento tardivo, causando una sovrastima del tempo medio al concepimento nella coorte complessiva (78-79).

Tutte le partecipanti sono state sottoposte a una valutazione clinica standardizzata al momento del reclutamento, condotta durante la fase follicolare precoce del ciclo mestruale (giorni 2-5), comprendente:
Anamnesi strutturata: età, etnia, livello di istruzione, professione, indice di massa corporea (BMI, calcolato da peso e altezza misurati direttamente), stato di fumatrice (fumatrice attuale, ex-fumatrice,

mai fumatrice), consumo di alcol, attività fisica regolare, uso pregresso di contraccezione ormonale (tipo e durata), storia mestruale (età al menarca, lunghezza media e variabilità del ciclo), storia riproduttiva (precedenti gravidanze e relativi esiti, precedenti perdite gestazionali), comorbidità note, e anamnesi familiare di menopausa precoce o infertilità.

Anamnesi di coppia: età del partner maschile, BMI del partner, stato di fumatore del partner, frequenza dei rapporti sessuali nell'ultimo ciclo mestruale completo prima del reclutamento variabile inclusa specificamente in risposta al limite metodologico discusso nel capitolo 5.

Variabili di esposizione

Le esposizioni primarie erano l'ormone antimulleriano (AMH), la conta dei follicoli antrali (AFC), l'ormone follicolo-stimolante (FSH) e il volume ovarico totale, ciascuno categorizzato secondo soglie clinicamente consolidate. È stata inoltre costruita una variabile combinata AFC+AMH a quattro livelli bassa, normale, alta, e "discordante" (categoria residua comprendente le combinazioni in cui AFC e AMH ricadevano in classi diverse tra loro) per valutare il valore incrementale dell'uso congiunto dei due marcatori rispetto ai singoli biomarcatori.

Dosaggio ormonale

I campioni di sangue venoso sono stati raccolti durante la fase follicolare precoce del ciclo (giorni 2-5).

Sono stati dosati:

- AMH sierica (ng/mL), mediante immunodosaggio automatizzato di seconda generazione, con limite inferiore di quantificazione di 0,08 ng/mL. Sebbene, come discusso nel capitolo 3, i livelli di AMH non richiedano tempistica di fase follicolare precoce, il prelievo è stato eseguito contestualmente agli altri parametri per convenienza logistica e per garantire uniformità procedurale con la letteratura di riferimento.
- FSH sierico (mIU/mL) ed estradiolo (E2) (pg/mL), come marcatori di controllo secondario, interpretati congiuntamente poiché una concentrazione elevata di E2 può sopprimere l'FSH per feedback negativo e mascherare artificiosamente una riserva ovarica ridotta.
- LH, TSH e prolattina, per l'esclusione di condizioni endocrine confondenti (disfunzione tiroidea, iperprolattinemia) non emerse dall'anamnesi.

Tutti i dosaggi sono stati eseguiti presso il laboratorio centralizzato di ciascun centro partecipante, con controlli di qualità interni ed esterni periodici, al fine di minimizzare la variabilità inter-laboratorio discussa come limite tecnico nel capitolo 3.

Conta dei follicoli antrali

L'ecografia transvaginale è stata eseguita contestualmente al prelievo ematico, da personale ecografista dedicato con esperienza specifica in ecografia riproduttiva, secondo la metodica standardizzata descritta nel capitolo 4: conteggio di tutti i follicoli di diametro medio 2-10 mm visibili in entrambe le ovaie, registrati separatamente per ovaio destro e sinistro e come somma totale bilaterale.

Categorizzazione dei biomarcatori

Coerentemente con il Committee Opinion dell'ASRM (14) e con le soglie adottate nella letteratura di riferimento discussa nel capitolo 5, i biomarcatori sono stati categorizzati come segue, oltre a essere analizzati come variabili continue in tutti i modelli principali:

- AMH: bassa (< 1 ng/mL), normale (1,0-5,5 ng/mL, categoria di riferimento), alta (> 5,5 ng/mL).
- AFC: bassa (≤7), normale (8-25, categoria di riferimento), alta (>25).
- FSH: normale (≤10 mIU/mL) vs elevato (>10 mIU/mL).

  Al fine di valutare il possibile valore aggiuntivo dell'impiego congiunto di AMH e AFC, è stata costruita una variabile combinata a quattro livelli, riserva bassa (quando entrambi i marcatori rientravano nella categoria bassa), normale (quando entrambi rientravano nella categoria normale), alta (quando entrambi rientravano nella categoria alta) e discordante.

Procedure di follow-up

Dopo l'arruolamento, le partecipanti sono state seguite prospetticamente mediante contatti periodici a cadenza mensile, per la raccolta di dati come: data di inizio dell'ultimo ciclo mestruale, eventuale esecuzione e risultato di test di gravidanza domestici, frequenza dei rapporti nel ciclo appena concluso, ed eventuali variazioni ai criteri di eleggibilità (ad esempio, avvio di trattamenti di fertilità, che avrebbe comportato la censura della partecipante). In caso di positività del test di gravidanza urinario o di rilevazione di β-hCG sierica, è stata programmata un'ecografia transvaginale di conferma a 6-7 settimane di età gestazionale, per la verifica della presenza di sacco gestazionale intrauterino con attività cardiaca fetale, e un successivo controllo a 12 settimane compiute per la conferma dell'esito primario. Le partecipanti che non hanno raggiunto una gravidanza clinica entro 12 cicli osservati, quelle che hanno interrotto volontariamente il tentativo di concepimento, quelle che hanno iniziato un trattamento di fertilità nel corso del follow-up, e quelle perse al follow-up per mancata risposta ai contatti periodici, sono state censurate all'ultimo ciclo per cui erano disponibili dati completi. Questo approccio consente di includere nell'analisi il contributo temporale (in cicli a

rischio) di tutte le partecipanti fino al momento della censura, coerentemente con la logica dei modelli di sopravvivenza descritti più avanti.

Misure di esito

Esito primario:

- Nato vivo, è stato invece definito come il parto di un neonato a 24 settimane di gestazione o oltre.

Esiti secondari:

- Tempo al concepimento (TTP), numero di cicli mestruali intercorsi tra il reclutamento e il concepimento della gravidanza clinica.
- Tasso di concepimento spontaneo, definito come positività del test di gravidanza urinario o della β-hCG sierica.
- Gravidanza clinica evolutiva spontanea, definita come presenza di sacco gestazionale intrauterino con attività cardiaca embrionale documentata ecograficamente, in assenza di qualsiasi trattamento di procreazione assistita nel ciclo di concepimento.
- Aborto spontaneo precoce, clinicamente confermato (con conferma ecografica) prima del completamento della dodicesima settimana di gestazione, calcolata tra le sole partecipanti che hanno raggiunto una gravidanza clinica.

Piano statistico

Analisi descrittiva.

Le caratteristiche basali della coorte sono state descritte mediante medie, deviazione standard o mediane con intervalli interquartili per le variabili continue, e frequenze assolute e relative per le variabili categoriche.

Analisi dell'esito primario.

La probabilità cumulativa di parto (nato vivo) è stata stimata mediante curve di Kaplan-Meier con bande di confidenza al 95%, stratificate per categoria di AMH e, per categorie di AFC, FSH, volume ovarico e AMH+AFC. L'associazione tra biomarcatori e probabilità di parto per ciclo è stata quindi modellata mediante regressione di Cox a rischi proporzionali, riportando hazard ratio (HR) sia non corretti che corretti per la covariante pre-specificate (età, BMI, livello di istruzione, stato di fumatrice,

età del partner, etnia, pregresso uso di contraccettivi ormonali), con intervalli di confidenza al 95%. Con lo stesso approccio sono state stimate le probabilità cumulative di concepimento e di gravidanza clinica a 6 e 12 cicli.

Analisi degli esiti secondari.

Il tempo al concepimento è stato analizzato con gli stessi modelli di Cox descritti sopra, trattando il numero di cicli come variabile tempo-evento. Gli esiti dicotomici secondari (aborto spontaneo, gravidanza biochimica) sono stati analizzati mediante regressione logistica multi-variabile, stimando odds ratio (OR) aggiustati con intervalli di confidenza al 95%.

Modello combinato.

Per l'obiettivo secondario relativo al valore incrementale del modello combinato AMH+AFC, è stato confrontato il potere discriminante (espresso come c-index) di modelli annidati solo AMH, solo AFC, AMH+AFC mediante test del rapporto di vera somiglianza, per verificare se l'aggiunta del secondo biomarcatore migliori significativamente l'adattamento del modello rispetto al singolo marcatore.

Analisi di sensibilità.

Sono state pre-specificate le seguenti analisi di sensibilità:

(i) stratificazione per fascia d'età: 28-32 anni, 33-35 anni, 36-38 anni e >38 anni, con test formale di interazione;

(ii) analisi ristretta alle sole partecipanti con follow-up completo a 12 cicli;

(iii) analisi con soglie di cut-off alternative per l'AMH (<1,0 ng/mL, 1,0-5,5 ng/mL e > 5,5 ng/mL, coerente con lo studio di Steiner et al.);

Considerazioni etiche.

Il protocollo di studio è stato condotto in conformità ai principi della Dichiarazione di Helsinki. Tutte le partecipanti hanno fornito consenso informato scritto, dopo essere state informate degli obiettivi dello studio, delle procedure previste (prelievo ematico ed ecografia transvaginale) e del diritto di ritirarsi in qualsiasi momento senza conseguenze per l'assistenza clinica ricevuta. I dati sono stati raccolti e conservati in forma pseudonimizzata, in conformità con le normative vigenti in materia di protezione dei dati personali sanitari.

RISULTATI

Popolazione dello studio

Delle 700 donne reclutate e valutate per l'eleggibilità, 191 (27,3%) sono state escluse per i motivi riportati nel diagramma di flusso (figura 7); le restanti 509 (72,7%) soddisfacevano tutti i criteri di eleggibilità e sono state incluse nell'analisi.

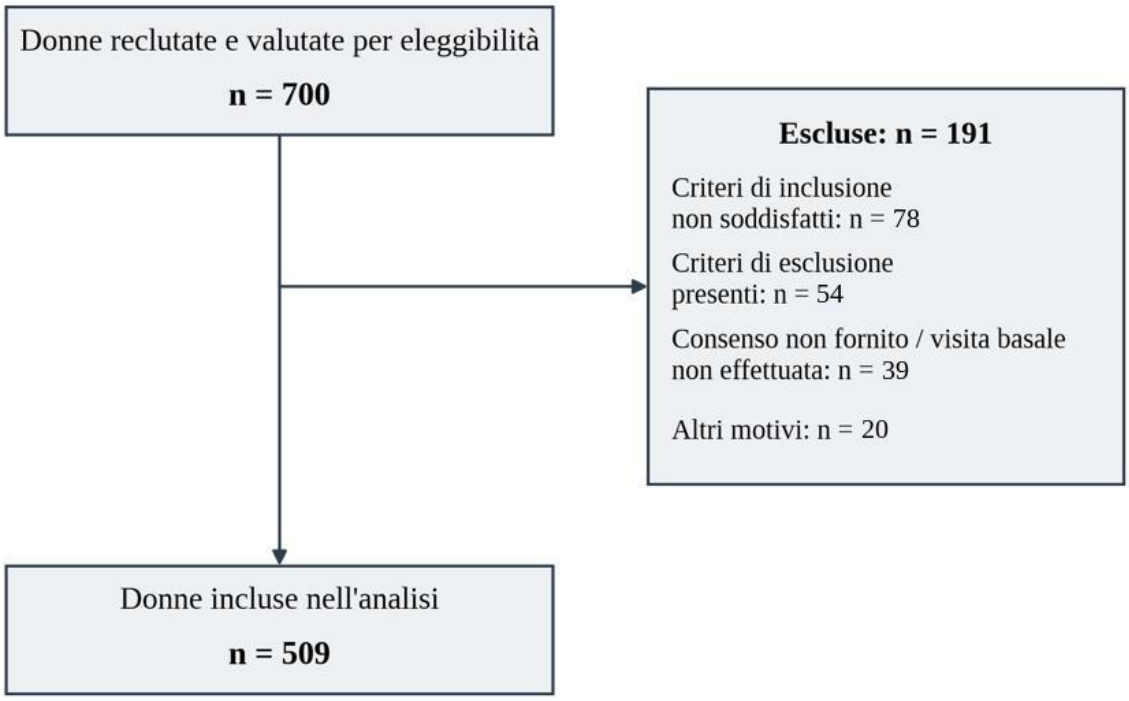


Figura 7. Diagramma di flusso del reclutamento (STROBE). Delle 700 donne reclutate e valutate per l'eleggibilità, 191 sono state escluse e 509 sono state incluse nell'analisi.

Nella tabella 1 sono riportate le caratteristiche demografiche e cliniche basali. L'età mediana delle donne era di 35 anni (IQR 33-38), e il BMI mediano era 21,37 kg/m² (IQR 19,72-23,64). La maggioranza delle partecipanti era di etnia caucasica 97,4% e il 62% possedeva un titolo di laurea. Cinquantasette donne (11,2%) erano fumatrici e 357 (70,1%) riportavano un precedente uso di contraccezione ormonale. L'età mediana del partner maschile era 37 anni (IQR 34-41), con un BMI mediano di 24,21 kg/m² (IQR 22,42-26,69).

Caratteristica	Valore
Età femminile, mediana [IQR], anni	35 [33–38]
Fumo, %	70,1%
BMI femminile, mediana [IQR], kg/m²	21,37 [19,72–23,64]
Etnia caucasica, %	97,4%

Caratteristica	Valore
Titolo di laurea, %	62%
Precedente uso di contraccezione ormonale, n (%)	357 (70,1%)
Età partner maschile, mediana [IQR], anni	37 [34–41]
BMI partner maschile, mediana [IQR], kg/m²	24,21 [22,42–26,69]

Tabella 1. Caratteristiche demografiche e cliniche basali delle partecipanti (n = 509).

Profilo ormonale basale e parametri di riserva ovarica

La concentrazione sierica mediana di AMH era 2,56 ng/mL (IQR 1,41-3,78), e l'AFC era 16 follicoli (IQR 10-22). L'FSH basale mediano era 7,12 IU/L (IQR 5,90-9,00), l'LH era 5,6 IU/L (IQR 4,03-7,8), e l'estradiolo era 44,0 pg/mL (IQR 32,0-59,0). I livelli mediani di TSH e prolattina erano rispettivamente 1,77 mIU/L (IQR 1,3-2,3) e 15,7 ng/mL (IQR 12,0-20,0). I volumi ovarici mediani destro e sinistro erano rispettivamente 7,23 cm³ (IQR 4,45-10,5) e 7,47cm³ (IQR 4,78-10,49). La lunghezza mediana del ciclo mestruale era 28,0 giorni (IQR 26,5-29,5).

Parametro	Mediana [IQR]
AMH, ng/mL	2,56 [1,41– 3,78]
AFC, n follicoli	16 [10–22]
FSH basale, IU/L	7,12[5,90–9]
LH, IU/L	5,6 [4,03–7,8]
Estradiolo, pg/mL	44 [32,0–59,0]
TSH, mIU/L	1,77 [1,3–2,3]
Prolattina, ng/mL	15,7 [12,0–20,0]
Volume ovarico destro, cm³	7,23 [4,45–10,5]
Volume ovarico sinistro, cm³	7,47 [4,78–10,49]
Lunghezza mediana del ciclo, giorni	28,0 [26,5–29,5]

Tabella 2. Profilo ormonale ed ecografico basale della coorte (mediana [IQR]).

Caratteristiche	N. (%) (n = 509)	Lunghezza mediana dell'intervallo intermestruale giorni	AMH ng/mL	Volume ovarico mL	AFC n	FSH mUI/mL	LH mUI/mL	TSH µUI/mL	PRL ng/mL	Estradiolo pg/mL
Età, anni										
28-32	113 (22,2%)	28 (27-30)	3,14 (2,05-4,45)	8,42 (6,04-10,93)	20 (15-27)	6,70 (5,55-8,43)	5,52 (4,00-7,76)	1,73 (1,29-2,30)	12 (8,76-15)	43 (29-55)
33-35	149 (29,3%)	28 (26,5-29)	2,56 (1,57-3,90)	8,17 (5,99-10,48)	16 (12,5-24)	7,00 (5,70-8,77)	5,90 (4,20-7,75)	1,73 (1,30-2,35)	12,4 (9,5-16)	44 (32-61,1)
36-38	149 (29,3%)	28 (26,5-29)	1,92 (0,99-3,73)	7,12 (5,00-9,10)	15 (9-20)	7,31 (6,05-9,26)	5,80 (4,15-7,94)	1,80 (1,35-2,30)	11,5 (8,82-14,85)	44 (32,5-60)
>38	98 (19,13%)	28 (26-29)	1,24 (0,79-2,40)	5,96 (4,12-8,87)	10 (7-15)	7,62 (6,00-10,75)	5,30 (4,01-7,35)	1,70 (1,31-2,29)	11,9 (8,7-16)	43,5 (34-58,5)
Valore di p		*0,835*	***<0,001***	***<0,001***	***<0,001***	*0,305*	*0,547*	*0,702*	*0,774*	*0,771*
Livello di istruzione										
Scuola elementare	2 (0,4%)	31,75 (—)	3,46 (—)	6,30 (—)	20 (11,25-26,75)	3,20 (—)	3,15 (—)	1,62 (—)	21,79 (—)	65 (—)
Scuola media	36 (7,1%)	28 (26,12-29,37)	2,85 (1,51-3,80)	8,10 (6,03-11,11)	16 (10-22)	6,95 (5,22-8,75)	5,05 (3,58-7,57)	2,08 (1,35-2,37)	17 (14,2-20,67)	34 (23,25-46,25)
Scuola superiore	155 (30,5%)	28 (26,5-29)	2,12 (1,28-3,91)	7,65 (5,56-10,60)	15 (10-22)	7,00 (5,87-9,20)	5,30 (3,80-7,73)	1,80 (1,33-2,33)	15 (12-20,81)	44 (32-60)
Università	315 (62,1%)	28 (26,5-29,5)	2,23 (1,00-3,66)	7,38 (4,95-10,06)	15 (11,75-26,25)	7,30 (6,00-9,00)	5,80 (4,30-7,80)	1,73 (1,30-2,29)	15,48 (11,79-20)	44 (33-59,8)
Valore di p		*0,162*	*0,346*	*0,861*	*0,219*	*0,258*	*0,291*	*0,472*	*0,360*	*0,061*
Indice di massa corporea (kg/m²)										
<18,5 (sottopeso)	54 (10,6%)	28 (26,5-29,25)	2,91 (1,66-3,80)	8,04 (6,18-10,02)	15 (10-22)	7,85 (6,07-9,74)	5,45 (4,00-7,25)	1,59 (1,29-2,24)	17,1 (12-21,05)	44,5 (36-63,25)
18,5-24,9 (normopeso)	374 (73,5%)	28 (26,5-29)	2,19 (1,10-3,80)	7,63 (5,24-10,35)	16 (8,25-22)	7,14 (6,00-8,90)	5,62 (4,17-7,80)	1,76 (1,30-2,30)	15,89 (12-20,25)	43,25 (32-57,82)
25-29,9 (sovrappeso)	64 (12,6%)	28 (26-29)	2,20 (1,02-3,37)	6,84 (4,37-10,56)	16 (10-22,5)	7,00 (5,61-9,00)	5,94 (4,10-7,99)	1,88 (1,40-2,38)	14,65 (11,29-18,9)	45,7 (32,5-60,5)
≥30 (obesità)	17 (3,3%)	29 (28,75-31,75)	1,70 (1,03-3,05)	6,33 (4,70-8,96)	15,5 (10-23)	6,00 (4,40-9,90)	4,00 (2,85-5,85)	1,74 (1,10-2,20)	15,3 (12,5-23,8)	38,9 (27,5-62,5)
Valore di p		***0,016***	*0,213*	*0,162*	*0,934*	*0,274*	*0,137*	*0,496*	*0,827*	*0,711*
Fumatrice attuale										
No	452 (88,8%)	28 (26,5-29)	2,30 (1,10-3,80)	7,70 (5,37-10,55)	15 (10,5-18,5)	7,01 (5,90-9,00)	5,56 (4,02-7,80)	1,96 (1,22-3,30)	15,6 (11,8-20)	44 (32-57,07)
Sì	57 (11,2%)	29 (27,75-30)	1,96 (1,22-3,30)	6,66 (5,01-8,34)	16,5 (11-23,25)	7,60 (5,90-8,85)	5,94 (4,10-7,45)	1,76 (1,30-2,30)	16,7 (12,8-23,75)	48 (33,59-73)
Valore di p		***0,041***	*0,528*	***0,032***	*0,399*	*0,541*	*0,442*	*0,587*	*0,151*	***0,039***
Uso di contraccettivi orali per almeno 1 anno prima di iniziare la ricerca di gravidanza										
No	152 (29,9%)	28 (27-29)	2,45 (1,27-4,60)	7,72 (5,68-10,88)	15 (10-22)	7,09 (5,40-9,00)	7,80 (5,80-9,47)	1,83 (1,37-2,34)	16 (12-20)	43,5 (28,8-55,62)
Sì	357 (70,1%)	28 (26,5-29,75)	2,20 (1,05-3,69)	7,42 (5,01-9,92)	19 (11-25)	7,12 (6,00-9,00)	7,66 (5,53-9,26)	1,73 (1,30-2,30)	15 (12-20)	44 (33-61,1)
Valore di p		*0,920*	*0,608*	*0,244*	*0,258*	*0,946*	*0,492*	*0,614*	*0,274*	*0,850*
Età del partner, anni										
28-32	56 (11,0%)	29 (27,5-31)	2,82 (1,70-3,91)	7,90 (5,72-9,80)	18 (11-24,75)	6,50 (5,21-7,70)	5,60 (4,00-7,50)	1,50 (1,22-2,30)	18,8 (12-21,74)	40 (28-55)
33-35	112 (22,0%)	28 (26,5-29)	2,63 (1,22-3,97)	7,70 (5,52-11,23)	15 (11-20,75)	7,55 (5,92-9,00)	5,10 (4,00-7,42)	1,78 (1,41-2,34)	15 (11,77-19,23)	43 (28,25-55)
36-38	116 (22,8%)	28 (26,12-29)	2,12 (1,20-3,59)	7,36 (5,13-9,71)	14 (9-20)	7,25 (6,11-8,80)	5,92 (4,05-8,15)	1,83 (1,29-2,30)	15 (12,07-20,75)	45,5 (33-67,67)
>38	225 (44,2%)	28 (26,5-29)	1,90 (0,99-3,59)	7,58 (4,97-10,26)	8 (5-18,5)	7,20 (5,82-9,75)	5,80 (4,20-7,93)	1,77 (1,34-2,29)	15 (12,07-20,75)	43,5 (33-58,5)
Valore di p		*0,358*	***0,013***	*0,814*	***0,003***	*0,246*	*0,157*	*0,559*	*0,255*	*0,337*
Indice di massa corporea del partner (kg/m²)										
<18,5 (sottopeso)	4 (0,8%)	29,5 (26,37-31)	2,80 (1,11-5,69)	7,30 (3,84-13,49)	10 (7-15)	6,14 (4,62-8,72)	4,70 (3,78-7,77)	1,80 (1,31-2,72)	16 (13,75-20,31)	59,9 (35,75-64,5)
18,5-24,9 (normopeso)	293 (57,6%)	28 (26,5-29)	2,20 (1,10-3,68)	7,70 (5,37-10,44)	9 (6-15)	7,19 (6,00-8,90)	5,60 (4,10-7,80)	1,77 (1,33-2,28)	15 (11,72-19,97)	44,22 (33-57,21)
25-29,9 (sovrappeso)	179 (35,2%)	28 (26,5-29,12)	2,20 (1,12-3,80)	7,32 (5,20-10,01)	11 (8,4-18)	7,25 (5,93-9,17)	5,37 (4,00-7,27)	1,80 (1,30-2,34)	15,94 (12,15-21,13)	42,15 (32-60)
≥30 (obesità)	33 (6,5%)	29 (27,25-30)	3,00 (1,35-4,60)	7,84 (4,97-10,06)	—	6,80 (5,13-9,10)	6,10 (4,02-8,06)	1,70 (1,29-2,30)	17,47 (13,06-21,87)	40 (24,5-57,21)
Valore di p		*0,377*	*0,158*	*0,635*	*0,738*	*0,289*	*0,718*	*0,852*	*0,528*	*0,158*

Tabella 3. Valori mediani (intervallo interquartile) dei biomarcatori per caratteristiche delle partecipanti. AFC, conta dei follicoli antrali; AMH, ormone antimülleriano; FSH, ormone follicolo-stimolante; LH, ormone luteinizzante; TSH, ormone tireostimolante; PRL, prolattina; OCP, contraccettivi orali. P < 0,05

Come atteso, i livelli di AMH, il volume ovarico e l'AFC diminuivano in modo significativo all'aumentare dell'età (p < 0,001 per tutti e tre i parametri). La mediana dell'AMH passava da 3,14 ng/mL nella fascia 28-32 anni a 1,24 ng/mL nelle donne con più di 38 anni, il volume ovarico da 8,42 a 5,96 mL e l'AFC da 20 a 10 follicoli. L'FSH mostrava un modesto incremento con l'età (da 6,70 a 7,62 mIU/mL), che non raggiungeva tuttavia la significatività statistica (p = 0,305), mentre la lunghezza dell'intervallo intermestruale, l'LH, il TSH, la prolattina e l'estradiolo non differivano tra le classi di età.

L'intervallo intermestruale variava in modo significativo in funzione del BMI (p = 0,016), con una mediana di 29 giorni nelle donne obese contro i 28 giorni degli altri gruppi, e dell'abitudine al fumo (p = 0,041; 29 giorni nelle fumatrici contro 28 nelle non fumatrici). Le fumatrici (n = 57) presentavano inoltre un volume ovarico inferiore (6,66 vs 7,70 mL; p = 0,032) e livelli di estradiolo più elevati (48 vs 44 pg/mL; p = 0,039), mentre i valori di AMH non differivano in modo significativo (1,96 vs 2,30 ng/mL; p = 0,528). Analogamente, le donne obese (n = 17) mostravano valori mediani di AMH

numericamente inferiori rispetto alle normopeso (1,70 vs 2,19 ng/mL), senza però che la differenza risultasse significativa (p = 0,213), verosimilmente per la ridotta numerosità di questo sottogruppo.

Non emergevano differenze significative dei biomarcatori in base al livello di istruzione, né in base all'uso di contraccettivi orali nell'anno precedente, né in base al BMI del partner. L'età del partner risultava invece associata ai livelli di AMH (p = 0,013), che diminuivano da 2,82 ng/mL con partner di 28-32 anni a 1,90 ng/mL con partner di età superiore ai 38 anni, e all'AFC (p = 0,003); tale associazione riflette verosimilmente la correlazione tra l'età della donna e quella del partner.

Esiti riproduttivi per categoria di biomarcatore

Le tabelle riportano gli esiti di nascita, aborto del primo trimestre, concepimento e gravidanza clinica per categoria di AMH, AFC, FSH, volume ovarico, e per la variabile combinata AFC+AMH. Per gli esiti tempo dipendenti sono state considerate le probabilità cumulative a 6 e 12 cicli, mentre l'associazione tra le categorie di biomarcatori e il tempo all'evento è stata valutata mediante HR, sia non corretti sia corretti per le covariate previste nel modello statistico.

Nel complesso i risultati non hanno evidenziato delle associazioni statisticamente significative tra i biomarcatori di riserva ovarica presi in esame. In particolare, per l'AMH e l'AFC, che rappresentano le esposizioni di maggiore interesse, gli HR corretti sono risultati generalmente prossimi a 1 e gli intervalli di confidenza al 95% hanno incluso il valore nullo di associazione, pari a 1.

Le differenze osservate sono state quindi principalmente di tipo descrittivo. In alcuni gruppi sono state osservate percentuali apparentemente differenti di concepimento, gravidanza clinica, e parto, ma tali differenze non sono state accompagnate da una corrispondente evidenza di associazione statisticamente significativa nell'analisi time to event.

Biomarcatori	N.partecipanti	A 6 cicli		A 12 cicli		Hazard ratio (95% CI)	
		Concepimenti, no.	Probabilità cumulativa, % (IC 95%)	Concepimenti, no.	Probabilità cumulativa, % (IC 95%)	Non corretto	Corretto
AMH, ng/mL							
<1 (basso)	106	30	28 (20-38)	66	62 (53-71)	0,92 (0,70-1,22)	1.08 (0,80-1,46)
1-5,5 (normale)	238	69	29 (23-34)	167	70 (64-76)	1 [-]	1 [-]
>5,5 (alto)	165	50	30 (23-37)	121	73 (66-80)	1,05 (0,84-1,34)	1,17 (0,85-1,62)
AFC							
<7 (basso)	112	37	33 (24-42)	75	67 (58-75)	0,95 (0,73-1,25)	1,01 (0,75- 1,35)
8-25 (normale)	248	74	30 (24-36)	174	70 (64-76)	1 [-]	1 [-]
>25 (alto)	149	45	30 (23-38)	105	70 (63-77)	0,93 (0,69-1,26)	0,95 (0,68-1,33)
FSH, mIU/mL							
<10	418	126	30 (26-35)	294	70 (66-75)	1 [-]	1 [-]
>10	91	30	33 (23-43)	60	66 (56-75)	0,96 (0,73-1,28)	1,32 (0,76-2,28)
Volume ovarico							
Basso	18	5	28 (7-49)	10	56 (34-75)	1,26 (0,69-2,30)	1,26 (0,68-2,35)

Biomarcatori	N.partecipanti	A 6 cicli		A 12 cicli		Hazard ratio (95% CI)	
		Concepimenti, no.	Probabilità cumulativa, % (IC 95%)	Concepimenti, no.	Probabilità cumulativa, % (IC 95%)	Non corretto	Corretto
Normale	357	102	29 (24-33)	248	70 (65-74)	1 [-]	1 [-]
Alto	134	49	37 (28-45)	96	72 (64-79)	1,47 (0,79-2,75)	1,48 (0,78-2,81)
AFC + AMH							
Basso	67	23	34 (23-45)	45	67 (55-77)	0,95 (0,67-1,33)	1,01 (0,70-1,46)
Normale	161	48	30 (23-37)	116	72 (65-78)	1 [-]	1 [-]
Alto	97	32	33 (24-42)	68	70 (60-78)	0,93 (0,64-1,36)	0.98 (0,66-1,47)
Discordante	184	53	29 (22-35)	125	68 (61-74)	0,88 (0,63-1,24)	0,88 (0,62-1,26)

Tabella 4. Probabilità cumulativa di concepimento a 6 e 12 cicli e hazard ratio (HR) per categoria di biomarcatore.

Concepimento spontaneo

Per l'AMH, le probabilità cumulative stimate di concepimento sono risultate pari al 28%, 29% e 30% a 6 cicli nelle categorie <1, 1-5,5 e > 5,5ng/mL; a 12 cicli le stime sono risultate del 62%, 70% e 73%.

Nel modello corretto, l'HR è risultato 1,08 (0,80-1,46) per AMH < 1 ng/mL e 1,17 (0,85-1,62) per l'AMH >5,5 ng/mL rispetto alla categoria di riferimento. In entrambi i casi l'IC 95% comprende 1 pertanto non emerge evidenza di un'associazione statisticamente significativa.

Per l'AFC, le probabilità cumulative riportate sono state 33%, 30% e 30% a 6 cicli e 67%, 70% e 71% a 12 cicli nelle categorie bassa, normale e alta. Gli HR corretti sono risultati rispettivamente 1,01 (0,75- 1,35) e 0,95 (0,68-1,33). Anche in questo caso gli intervalli comprendono 1.

Per l'FSH, le probabilità cumulative riportate sono state 30% e 33% a 6 cicli e 70% e 67% a 12 cicli; l'HR corretto è risultato1,32 (0,76-2,28) per valori >10 mIU/mL.

Per il volume ovarico, le probabilità cumulative riportate sono state 28%, 29% e 37% a 6 cicli e 56%, 70% e 72% a 12 cicli gli HR corretti sono 1,26 (0,68-2,35) e 1,48 (0,78-2,81).

Nella variabile combinata AFC+AMH, le probabilità cumulative riportate sono state 34%, 30% 33% e 29% a 6 cicli e 67%,72% 70% e 68% a 12 cicli; gli HR corretti per il concepimento sono 1,01 (0,70-1,46), 0.98 (0,66-1,47) e 0,88 (0,62-1,26). Anche in questo caso gli IC 95% comprendono 1.

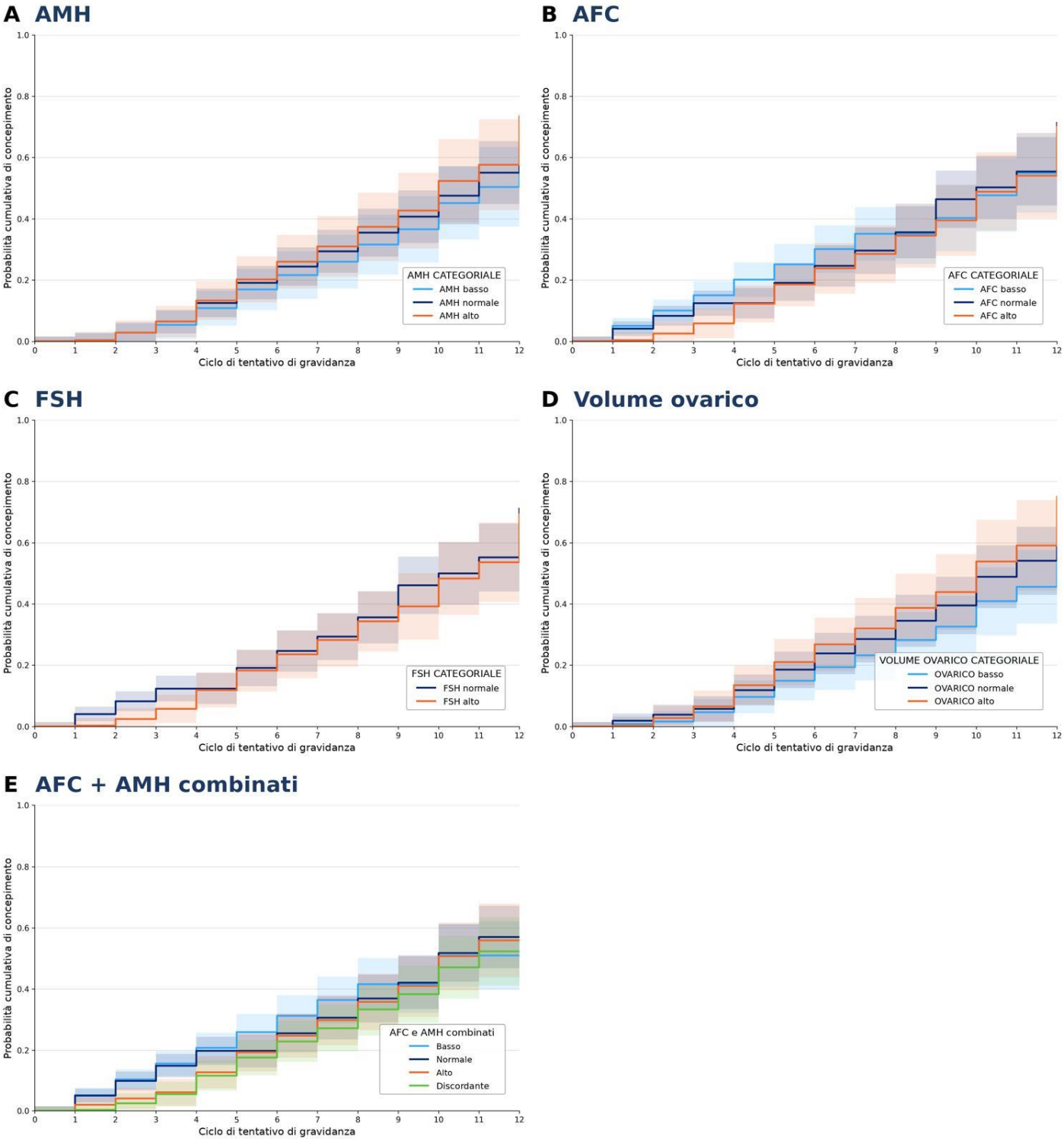


Figura 1. Probabilità cumulativa di concepimento in funzione del ciclo di tentativo (curve di Kaplan-Meier), stratificata per categorie di AMH (A), AFC (B), FSH (C), volume ovarico (D) e AFC + AMH combinati (E). Le aree ombreggiate indicano gli intervalli di confidenza al 95%.

Le curve di Kaplan-Meier per il concepimento sono riportate in Figura 1. Le curve delle diverse categorie erano ampiamente sovrapposte e i relativi intervalli di confidenza si intersecavano lungo tutto il periodo di osservazione. Le donne con AMH elevato mostravano una probabilità cumulativa numericamente maggiore nei cicli finali (circa 73% al ciclo 12) rispetto a quelle con AMH normale (circa 55%) e basso (circa 62%) (Figura 1A). Nelle categorie di AFC le curve risultavano quasi sovrapponibili a 12 cicli (54-55%), con una probabilità leggermente maggiore per l'AFC bassa nei primi cicli (Figura 1B). Per l'FSH la probabilità cumulativa era numericamente inferiore nelle donne con FSH elevato (Figura 1C), mentre per il volume ovarico si osservava un andamento crescente dalla categoria bassa (circa 46%) a quella alta (circa 59%) (Figura 1D). La combinazione AFC + AMH non mostrava una separazione stabile tra le categorie (Figura 1E).

Biomarcatori	N.partecipanti	A 6 cicli		A 12 cicli		Hazard ratio (95% CI)	
		Gravidanze cliniche, no.	Probabilità cumulativa, % (IC 95%)	Gravidanze cliniche, no.	Probabilità cumulativa, % (IC 95%)	Non corretto	Corretto
AMH, ng/mL							
<1 (basso)	106	31	29 (21-39)	59	56 (46-65)	0,89 (0,66-1,20)	0,87 (0,63-1,19)
1-5,5 (normale)	238	72	30 (25-36)	155	65 (59-70)	1 [-]	1 [-]
>5,5 (alto)	165	53	32 (26-40)	110	67 (59-73)	1,05 (0,82-1,34)	1,05 (0,82-1,36)
AFC							
<7 (basso)	112	37	33 (25-42)	67	60 (59-73)	1,00 (0,74-1,31)	1,05 (0,77-1,44)
8-25 (normale)	248	74	30 (25-36)	160	65 (58-70)	1 [-]	1 [-]
>25 (alto)	149	45	30 (23-38)	97	65 (57-72)	0,98 (0,72-1,34)	1,00 (0,71-1,43)
FSH, mIU/mL							
<10 (basso)	418	126	30 (26-35)	270	65 (60-70)	1 [-]	1 [-]
>10 (alto)	91	30	33 (24-43)	54	59 (50-69)	0,96 (0,71-1,27)	0,97 (0,72-1,31)
Volume ovarico							
Basso	18	5	28 (13-51)	10	56 (34-75)	1,25 (0,66-2,35)	1,21 (0,63-2,33)
Normale	357	102	29 (24-34)	224	63 (58-68)	1 [-]	1 [-]
Alto	134	49	37 (29-45)	90	67 (59-75)	1,50 (0,78-2,87)	1,40 (0,73-2,82)
AFC + AMH							
Basso	67	23	34 (24-46)	38	57 (45-68)	1,05 (0,72-1,52)	1,16 (0,78-1,71)
Normale	161	48	30 (23-37)	107	67 (59-73)	1 [-]	1 [-]
Alto	97	32	33 (24-43)	62	64 (54-73)	1,03 (0,70-1,55)	1,11 (0,72-1,72)
Discordante	184	53	29 (23-36)	117	64 (56-70)	1 (0.70-1.45)	1,02 (0,69-1,50)

Tabella 5. Probabilità cumulativa di gravidanza clinica a 6 e 12 cicli e hazard ratio (HR) per categoria di biomarcatore

Risultati gravidanza clinica

La gravidanza clinica è stata analizzata come endpoint statistico distinto dal concepimento.

Tra le 509 donne con dati di AMH disponibili, la probabilità cumulativa di gravidanza clinica a 6 cicli è stata del 29% per l'AMH basso, 30% per l'AMH normale e 32% per l'AMH alto; a 12 cicli è stata del 56% per l'AMH basso, 65% AMH normale e 67% per l'AMH alto; HR corretti 0,87 (0,63-1,19) e 1,05 (0,82-1,36); tuttavia, queste differenze non hanno raggiunto la significatività statistica.

Per l'AFC, la probabilità cumulativa di gravidanza clinica a 6 cicli è stata del 33% per l'AFC basso, 30% per l'AFC normale e 30% per l'AFC alto; a 12 cicli è stata del 60% per l'AFC basso, 65% per l'AFC normale e 65% per l'AFC alto; HR corretti 1,05 (0,77-1,44) e 1,00 (0,71-1,43); tuttavia, questa e differenze non hanno raggiunto la significatività statistica.

Per l'FSH basso e alto a 6 cicli la probabilità cumulativa è stata rispettivamente del 30% e 33% e a 12 cicli del 65% e 59 %) con un HR corretto 0,97 (0,72-1,31).

Per il volume ovarico la probabilità cumulativa a 6 cicli è stata del 28%, 29% e 37% e a 12 cicli del 56%, 63% e 68% nelle categorie bassa, normale e alta, con HR corretti 1,21 (0,63-2,33) e 1,40 (0,73-2,82).

Per la variabile combinata AFC+AMH la probabilità cumulativa a 6 cicli è stata del 34%, 30%, 33% e 29%, e a 12 cicli del 57%, 67%, 64%, 64% con HR corretti 1,16 (0,78-1,71), 1,11 (0,72-1,72), e 1,02 (0,69-1,50).

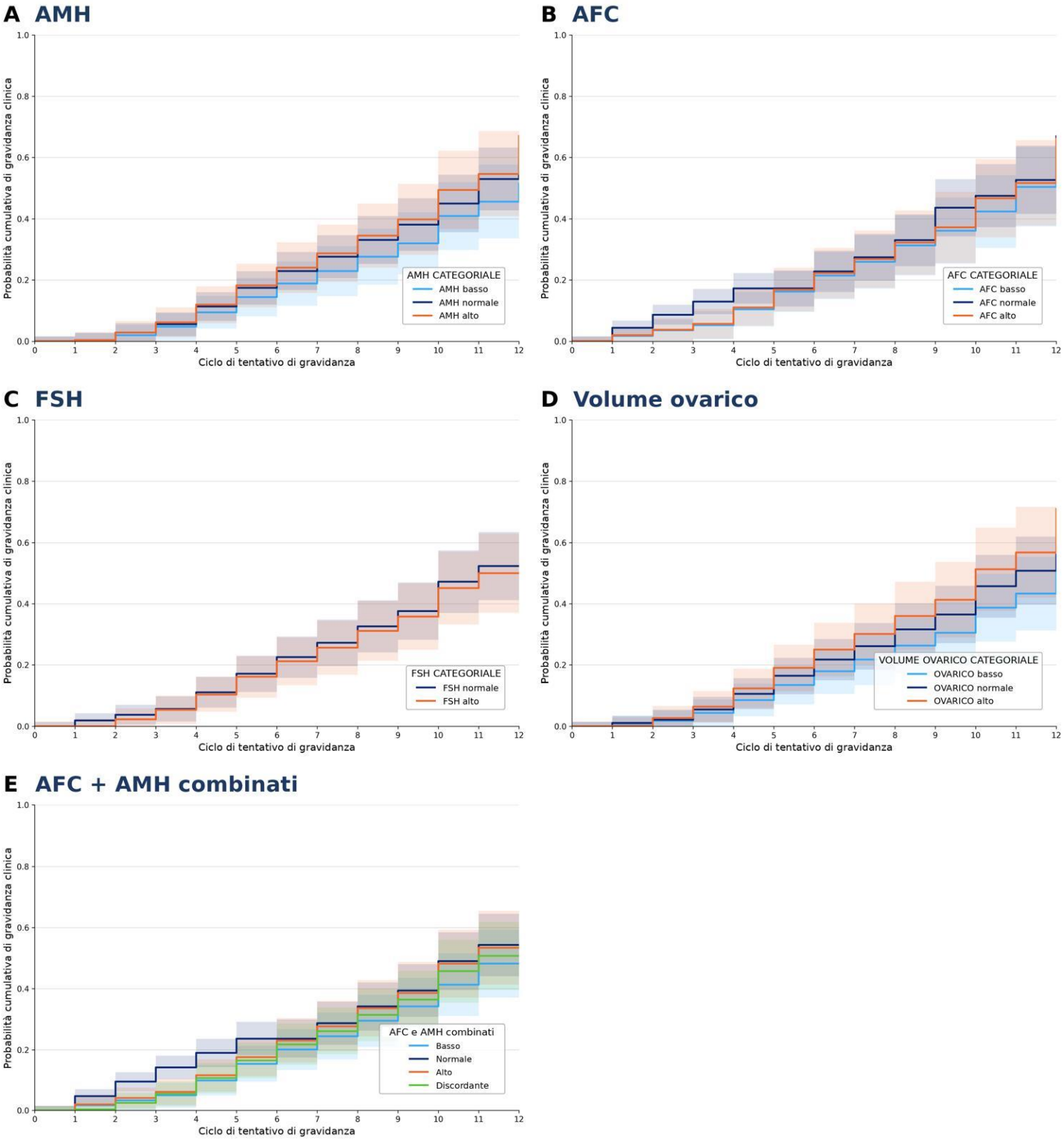


Figura 2. Probabilità cumulativa di gravidanza clinica in funzione del ciclo di tentativo (curve di Kaplan-Meier), stratificata per categorie di AMH (A), AFC (B), FSH (C), volume ovarico (D) e AFC + AMH combinati (E). Le aree ombreggiate indicano gli intervalli di confidenza al 95%.

Per la gravidanza clinica (Figura 2) le curve erano anch'esse sovrapposte tra le categorie di AMH, AFC e FSH, con intervalli di confidenza ampi. La probabilità cumulativa a 12 cicli era di circa 56%, 53% e 67% per AMH basso, normale ed elevato (Figura 2A), e di circa 50% e 52% per FSH elevato

e normale (Figura 2C). Il volume ovarico basso mostrava la probabilità più bassa (circa 44%) rispetto al normale (circa 51%) e all'elevato (circa 57%), con intervalli sovrapposti (Figura 2D). Nella combinazione AFC + AMH la categoria "normale" mostrava una probabilità cumulativa superiore alle altre nei primi cicli, con una progressiva convergenza delle curve (Figura 2E).

Biomarcatori	N.partecipanti	No. (%)	Non corretto HR (95% CI)	Corretto HR (95% CI)
AMH, ng/mL				
<1 (basso)	106	43 (41%)	0,85 (0,60-1,20)	0,90 (0,62-1,30)
1-5,5 (normale)	238	118 (50%)	1 [-]	1 [-]
>5,5 (alto)	165	90 (55%)	1,12 (0,85-1,49)	1,08 (0,82-1,44)
AFC				
<7 (basso)	112	46 (41%)	1,11 (0,80-1,56)	1,10 (0,76-1,58)
8-25 (normale)	248	124 (50%)	1 [-]	1 [-]
>25 (alto)	149	81 (54%)	1,19 (0,83-1,71)	1,07 (0,72-1,60)
FSH, mIU/mL				
<10 (basso)	418	215 (51%)	1 [-]	1 [-]
>10 (alto)	91	36 (40%)	0,80 (0,56-1,14)	0,87 (0,61-1,25)
Volume ovarico				
Basso	18	8 (44%)	1,18 (0,58-2,40)	1,04 (0,50-2,17)
Normale	357	170 (48%)	1 [-]	1 [-]
Alto	134	73 (54%)	1,53 (0,73-3,17)	1,30 (0,60-2,70)
AFC + AMH				
Basso	67	26 (39%)	1,10 (0,70-1,71)	1,00 (0,70-1,78)
Normale	161	77 (48%)	1 [-]	1 [-]
Alto	97	49 (51%)	1,19 (0,74-1,91)	1,10 (0,66-1,83)
Discordante	184	99 (54%)	1,23 (0,80-1,90)	1,14 (0,72-1,80)

Tabella 6. Nato vivo (parto): numero di eventi e hazard ratio (HR) per categoria di biomarcatore.

Parto (nato vivo)

Il parto rappresenta l'endpoint clinico più avanzato tra quelli analizzati.

Nella categoria AMH <1 ng/mL sono stati osservati 43 parti su 106 partecipanti (41%), nella categoria 1-5,5 ng/mL 118 su 238 (50%), nella categoria > 5,5 ng/mL 90 su 165 (55%) con HR corretti 0,90 (0,62-1,30) e 1,08 (0,82-1,44).

Per l'AFC <7 sono stati osservati 46 parti su 112 (41%), nella categoria 8-25 sono stati registrati 124 parti su 248 (50%) e infine nella categoria > 25 i parti sono stati 81 su 149 (54%), con HR corretti pari a 1,10 (0,76-1,58) e 1,07 (0,72-1,60).

Per l'FSH < 10 sono stati osservati 215 parti su 418 (51%) e per la categoria >10 sono stati osservati 36 parti su 91 (40%), con HR corretti 0,87 (0,61-1,25).

Per il volume ovarico, nella categoria bassa si sono registrati 8 parti su 18 (44%), nella normale 170 su 357 (48%) e nell'alta 73 su 134 (54%); gli HR corretti sono stati 1,04 (0,50-2,17) e 1,30 (0,60-2,70).

La variabile combinata AFC+AMH mostra proporzioni di parto pari a basso 26 su 67 (39%), 77 su 161 (48%), 49 su 97 (51%) e 99 su 184 (54%), rispettivamente nelle categorie bassa, normale, alta e discordante. Gli HR corretti sono 1,00 (0,70-1,78), 1,10 (0,66-1,83), e 1,14 (0,72-1,80).

Nessun intervallo di confidenza esclude 1.

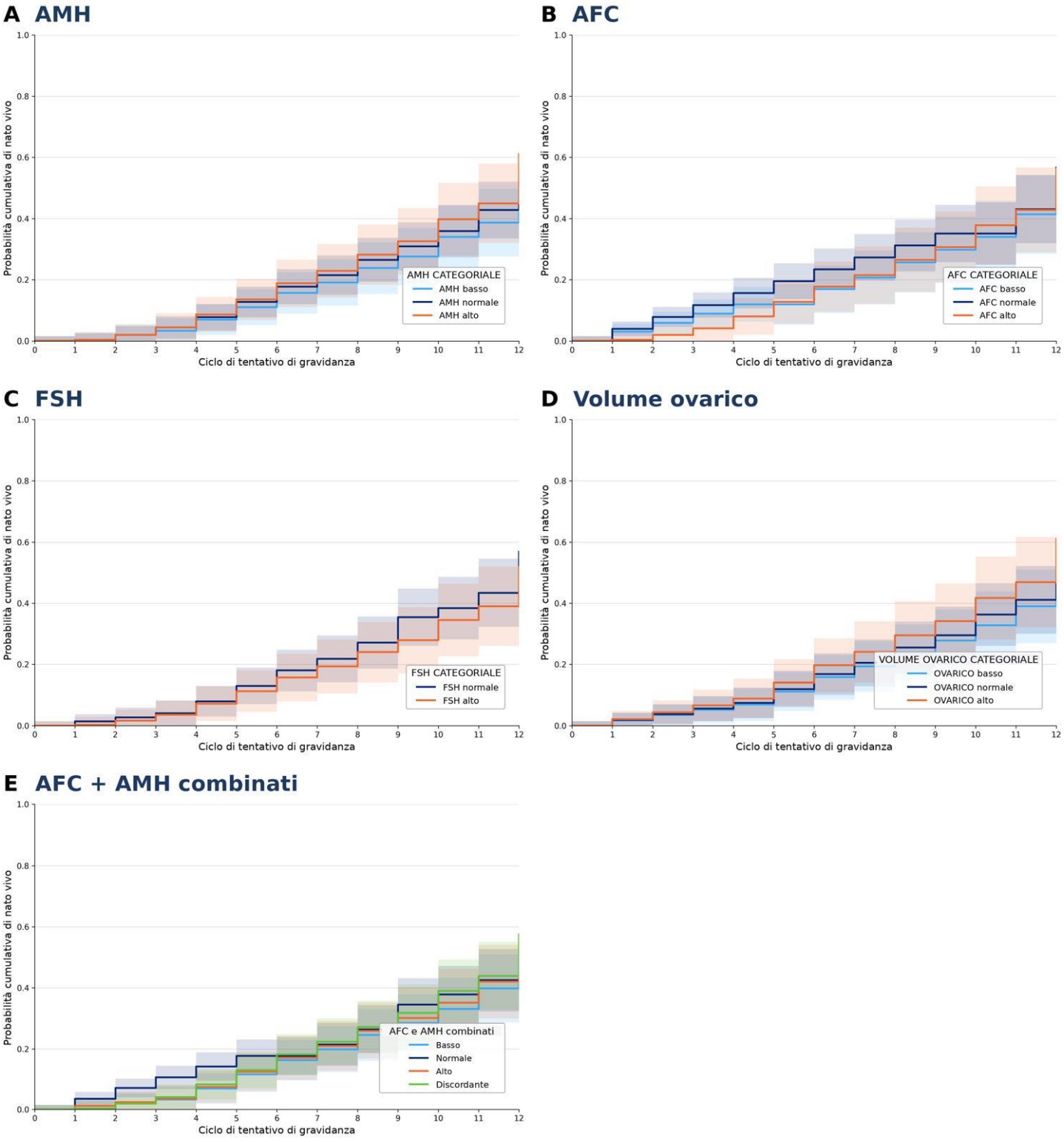


Figura 3. Probabilità cumulativa di nato vivo in funzione del ciclo di tentativo (curve di Kaplan-Meier), stratificata per categorie di AMH (A), AFC (B), FSH (C), volume ovarico (D) e AFC + AMH combinati (E). Le aree ombreggiate indicano gli intervalli di confidenza al 95%.

Le curve relative al nato vivo (Figura 3) si collocavano su valori inferiori rispetto a quelle del concepimento e della gravidanza clinica, con una probabilità cumulativa a 12 cicli compresa tra circa

il 41% e il 55% nelle diverse categorie. Le curve non si separavano in modo evidente per AMH (Figura 3A), AFC (Figura 3B), volume ovarico (Figura 3D) e AFC + AMH (Figura 3E). Solo per il FSH le donne con valori elevati mostravano una probabilità cumulativa numericamente inferiore (circa 39% vs 44%), con intervalli di confidenza ampiamente sovrapposti (Figura 3C).

Biomarcatori	N.partecipanti	No. (%)	Non corretto HR (95% CI)	Corretto HR (95% CI)
AMH, ng/mL				
<1 (basso)	106	16 (15%)	0,95 (0,53-1,71)	0,82 (0,44-1,50)
1-5,5 (normale)	238	39 (16%)	1 [-]	1 [-]
>5,5(alto)	165	18 (11%)	0,69 (0,39-1,20)	0,77 (0,44-1,35)
AFC				
<7 (basso)	112	20 (18%)	0,77 (0,45-1,33)	0,94 (0,51-1,72)
8-25 (normale)	248	23 (9%)	1 [-]	1 [-]
>25 (alto)	149	16 (11%)	0,55 (0,29-1,07)	0,77 (0,37-1,60)
FSH, mIU/mL				
<10 (basso)	418	55 (13%)	1 [-]	1 [-]
>10 (alto)	91	18 (20%)	1,55 (0,91-2,65)	1,32 (0,76-2,29)
Volume ovarico				
Basso	18	1 (6%)	2,90 (0,40-21,00)	3,23 (0,45-23,85)
Normale	357	53 (15%)	1 [-]	1 [-]
Alto	134	19 (14%)	3,09 (0,41-23,09)	3,86 (0,50-29,58)
AFC + AMH				
Basso	67	12 (18%)	0,94 (0,48-1,84)	1,20 (0,58-2,47)
Normale	161	30 (19%)	1 [-]	1 [-]
Alto	97	13 (13%)	0,70 (0,32-1,53)	1,08 (0,46-2,52)
Discordante	183	18 (10%)	0,50 (0,24-1,02)	0,60 (0,27-1,28)

Tabella 7. Aborto del primo trimestre: numero di eventi e hazard ratio (HR) per categoria di biomarcatore.

Aborto primo trimestre

L'analisi dell'aborto del primo trimestre deve essere interpretata diversamente rispetto al concepimento e al parto.

Per l'AMH sono stati registrati 16 aborti su 106 partecipanti nella categoria <1 ng/mL, 39 su 238 nella categoria 1–5,5 ng/mL e 18 su 164 nella categoria >5,5 ng/mL, con proporzioni descrittive rispettivamente del 15%, 16% e 11%; gli HR corretti sono 0,82 (0,44-1,50) e 0,77 (0,44-1,35).

Per l'AFC, sono stati registrati 20 aborti su 112 per AFC basso, 23 su 247 per AFC normale e 16 su 149 per AFC alto con gli HR corretti sono 0,94 (0,51-1,72) e 0,77 (0,37-1,60).

Per l'FSH, sono stati registrati 55 aborti su 417 per FSH basso e 18 su 91 per FSH alto, con HR corretto 1,32 (0,76-2,29).

Per il volume ovarico si sono registrati 1 aborto su 18 per il valore basso, 53 su 356 per il valore normale e 19 su 134 per il valore alto, gli HR corretti sono rispettivamente 3,23 (0,45-23,85) e 3,86 (0,50-29,58).

Per la variabile combinata AFC+AMH, sono stati registrati 12 aborti su 67 valori bassi, 30 su 161 valori normali, 13 su 97 valori alti e 18 su 183 per i valori discordanti, gli HR corretti sono 1,20 (0,58-2,47), 1,08 (0,46-2,52) e 0,60 (0,27-1,28).

Gli intervalli di confidenza sono ampi e comprendono 1 in tutte le categorie. In particolare, la variabile combinata suggerisce alcune differenze nelle stime puntuali, ma l'incertezza è troppo elevata per sostenere un'associazione statisticamente significativa. Il dato va inoltre letto alla luce della definizione dell'evento, della possibile presenza di più concepimenti per la stessa donna e della corretta identificazione del tempo a rischio.

Biomarcatori	N.partecipanti	A 6 cicli		A 12 cicli		Hazard ratio (95% CI)	
		Concepimenti, no.	Probabilità cumulativa, % (IC 95%)	Concepimenti, no.	Probabilità cumulativa, % (IC 95%)	Non corretto	Corretto
Età 28-32							
<1 (basso)	9	3	33 (12-65)	6	67 (35-88)	1,23 (0,52-2,92)	1,30 (0,52-3,21)
1-5,5 (normale)	53	13	25 (15-38)	39	74 (60-84)	1 [-]	1 [-]
>5,5 (alto)	51	18	35 (24-49)	36	71 (57-81)	1,08 (0,69-1,70)	0,95 (0,57-1,56)
Età 33-35							
<1 (basso)	21	8	38 (21-59)	12	57 (37-76)	0,85 (0,45-1,59)	0,95 (0,50-1,83)
1-5,5 (normale)	74	24	32 (23-44)	53	72 (61-81)	1 [-]	1 [-]
>5,5 (alto)	54	16	30 (19-44)	36	67 (53-78)	0,88 (0,57-1,34)	0,90 (0,57-1,42)
Età 36-38							
<1 (basso)	37	12	32 (20-49)	23	62 (46-76)	0,93 (0,57-1,52)	1,02 (0,60-1,74)
1-5,5 (normale)	69	19	28 (18-40)	50	73 (61-82)	1 [-]	1 [-]
>5,5 (alto)	43	11	26 (15-40)	33	77 (62-87)	1,07 (0,69-1,65)	1,12 (0,71-1,77)
Età >38							
<1 (basso)	39	8	21 (11-36)	26	67 (51-80)	0,90 (0,52-1,53)	0,85 (0,47-1,55)
1-5,5 (normale)	42	16	38 (25-53)	27	64 (49-77)	1 [-]	1 [-]
>5,5 (alto)	17	8	47 (26-70)	16	94 (73-99)	1,85 (1,00-3,43)	1,26 (0,54-2,92)

Tabella 8. Probabilità cumulativa di gravidanza clinica e HR per categoria di AMH, stratificati per fascia d'età.

Concepimento per AMH ed età

Nell'analisi stratificata per età, una bassa concentrazione di AMH non risultava associata a una riduzione della probabilità di concepimento in nessuna delle fasce considerate: gli HR corretti erano 1,30 (0,52-3,21) a 28-32 anni, 0,95 (0,50-1,83) a 33-35 anni, 1,02 (0,60-1,74) a 36-38 anni e 0,85 (0,47-1,55) oltre i 38 anni. Nelle donne con età superiore a 38 anni, i valori elevati di AMH (n=17) si associavano a una probabilità cumulativa del 94% (IC 95% 73-99) a 12 cicli e a un HR non corretto di 1,85 (1,00-3,43), al limite della significatività e non confermato dopo la correzione [HR 1,26 (0,54-2,92)]; tale stima va interpretata con cautela data la ridotta numerosità del sottogruppo.

Nel complesso questi risultati sono in linea con quanto riportato da Steiner et al. (JAMA 2017) (61) e indicano che, nella popolazione studiata, i marcatori di riserva ovarica non predicono la probabilità di concepimento.

DISCUSSIONE

Sintesi dei risultati

Nel presente studio prospettico su 509 donne di età compresa tra i 28 e i 40 anni senza storia di infertilità che tentavano il concepimento spontaneo, né la categoria di AMH, né quella di AFC, né quella di FSH, né il volume ovarico, né la variabile combinata AMH +AFC sono risultati significativamente associati alla probabilità di concepimento, gravidanza clinica, nascita e aborto del primo trimestre entro i 12 cicli di follow-up. Per l'esito nascita, il tasso variava dal 41% nelle categorie di riserva ridotta (AMH bassa e AFC bassa) al 50%- 55% per l'AMH normale-alto e 52-49% per l'AFC normale alto con Hazard-ratio aggiustati. Un pattern analogo emergeva per la gravidanza clinica a 12 cicli, compresi tra il 56% (AMH basso) e 65% (AMH normale), quest'ultimo numericamente il più alto dell'intera analisi ma con ampia sovrapposizione degli intervalli di confidenza rispetto alle altre categorie. Le curve di Kaplan-Meier per ciascun esito, stratificate per categoria di biomarcatore mostravano bande di confidenza ampiamente sovrapposte lungo l'intero periodo di osservazione, coerentemente con l'assenza di separazione statisticamente significativa tra i gruppi. Le uniche stime con intervalli di confidenza particolarmente ampi riguardavano il volume ovarico in relazione al rischio di aborto, un risultato attribuibile alla ridotta numerosità della categoria di riferimento (n= 18) piuttosto che a un effetto biologico reale. Complessivamente, i risultati confermano l'assenza di un valore predittivo indipendente dei biomarcatori di riserva ovarica per gli esiti di fertilità in questa popolazione.

Confronto con la letteratura

- ***Associazione tra AMH e probabilità di concepimento spontaneo.***

I risultati ottenuti sono in accordo con lo studio cardine TTC di Steiner et al. (2017) (61) che ha seguito 750 donne tra i 30 e i 44 anni senza storia di infertilità che tentavano un concepimento spontaneo. In quello studio, le donne con AMH bassa (<0,7 ng/mL) non presentavano una fecondabilità significativamente ridotta rispetto alle donne con valori di AMH normali dopo aggiustamento per l'età, e la probabilità cumulativa di concepimento a 12 cicli era simile tra le categorie di AMH (84% vs. 75%, differenza non significativa). L'analisi di sensibilità utilizzando soglie di AMH sia più alte (≤1,0 ng/mL) sia più basse (≤0,4 ng/mL) non ha hanno comunque mostrato evidenza di fecondabilità ridotta. Il presente studio estende questi risultati dimostrando un'assenza di associazione analoga utilizzando una soglia di AMH di 1,0 ng/mL in una coorte prevalentemente europea di donne di 28-40 anni, ampliando così la generalizzabilità dei risultati del

TTC a una fascia d'età più giovane e a una popolazione geograficamente ed etnicamente diversa. È inoltre coerente con quanto riportato da Hagen et al., Streuli et al. (62-63)

- ***Associazione tra AFC e concepimento spontaneo***

Per l'AFC, il presente studio rappresenta, come sottolineato nel paragrafo 5.3 uno dei primi contributi prospettici su popolazione generale senza infertilità. I risultati sono coerenti con quanto riportato da Depmann et al. (75), in cui l'associazione non corretta dell'AFC con il tempo di concepimento scompariva dopo la correzione per età, e il confronto trasversale di Khan et al. (70) tra donne fertili e infertili.

Questo studio ha valutato simultaneamente AFC e AMH in una coorte prospettica di concepimento naturale. A differenza della letteratura sull'AMH e fertilità, i dati prospettici sull'associazione tra AFC e probabilità di concepimento in donne della popolazione generale senza diagnosi di infertilità sono quasi assenti.

Lo studio colma questo il gap critico, l'AFC, categorizzata in bassa (< 7 follicoli), normale (8-25) e alta (> 25), non è risultata associata né alla probabilità di concepimento né a quella di gravidanza clinica. Per la gravidanza clinica la probabilità cumulativa a 12 cicli era del 60%, 65% e 65% nelle tre categorie, con hazard ratio corretti di 1,05 (IC 95% 0,77-1,44) per l'AFC bassa e 1,00 (0,71-1,43) per l'AFC alta rispetto alla categoria di riferimento (Tabella 5).

Il risultato è coerente con quanto osservato da Depmann et al., nella cui coorte l'associazione non corretta tra AFC e tempo al concepimento non persisteva dopo correzione per l'età femminile, e con l'impostazione concettuale discussa nel capitolo 4: l'AFC quantifica il compartimento dei follicoli antrali reclutabili, ma non fornisce informazioni sulla competenza dell'ovocita che verrà ovulato in un dato ciclo.

Il confronto con la letteratura va condotto con cautela, perché le evidenze prospettiche sull'AFC in donne senza infertilità nota sono limitate a studi di piccole dimensioni e perché l'AFC è una misura operatore-dipendente, con criteri di conteggio, apparecchiature e soglie di categorizzazione che variano tra gli studi. Nel presente studio le misurazioni sono state eseguite secondo una metodica standardizzata.

- ***AMH e parto***

Per il nato vivo, l'endpoint clinicamente più rilevante, la percentuale di nati vivi è stata del 41%, 50% e 55% nelle categorie di AMH bassa, normale e alta, con hazard ratio aggiustati corretti pari a 0,90 (IC 95% 0,62-1,30) e 1,08 (0,82-1,44) rispetto al gruppo di riferimento (Tabella 6).

L'andamento crescente delle proporzioni grezze non trova conferma nell'analisi time-to-event, in cui gli intervalli di confidenza includono ampiamente l'unità.

Il confronto con la letteratura in ambito PMA richiede una precisazione. Peigné et al. (43) hanno documentato una relazione positiva ma non lineare tra AMH e probabilità cumulativa di nato vivo dopo IVF/ICSI, senza una soglia netta al di sotto della quale il nato vivo diventi impossibile.

In quel contesto l'AMH influenza in modo diretto il numero di ovociti recuperati e, di conseguenza, il numero di embrioni disponibili, e la probabilità cumulativa di nato vivo dipende anche da questo parametro quantitativo. Nel concepimento spontaneo, invece, ogni ciclo si basa in larga misura sull'ovulazione di un singolo ovocita: la quantità del pool follicolare residuo incide poco sulla probabilità che quell'ovocita sia competente, che è determinata soprattutto dall'età e dai meccanismi di qualità ovocitaria discussi nella sezione 2.2. Una relazione osservabile in PMA non è quindi automaticamente trasferibile alla fertilità, e i due contesti non dovrebbero essere sovrapposti nell'interpretazione dei biomarcatori.

Anche per il FSH elevato, la proporzione di nati vivi era numericamente inferiore (40% contro 51%), ma senza significatività statistica (HR corretto 0,87; IC 95% 0,61-1,25).

- ***Aborto del primo trimestre***

Per l'aborto del primo trimestre nessuna categoria di biomarcatore ha mostrato un'associazione significativa (Tabella 7).

L'AMH bassa non si associava a un rischio aumentato (HR corretto 0,82; IC 95% 0,44-1,50), diversamente da quanto riportato da Lyttle Schumacher et al. (72) nella coorte Time to Conceive, in cui valori molto bassi di AMH si associavano a un rischio maggiore di aborto spontaneo.

La differenza può dipendere dalla soglia utilizzata, poiché la categoria più bassa del presente studio (< 1 ng/mL) include donne con riserva moderatamente ridotta e non solo con riserva marcatamente compromessa, e dal numero limitato di eventi (16 aborti nel gruppo con AMH bassa). L'assenza di associazione è inoltre in linea con l'interpretazione di Mao et al. e di Kasaven et al. (73-74), secondo cui le associazioni osservate in coorti di PMA non riflettono un nesso causale stabile tra riserva ovarica e aborto spontaneo.

- ***FSH, volume ovarico e variabile combinata AFC + AMH***

L'FSH basale, utilizzato con la soglia tradizionale di 10 mIU/mL, non è risultato associato al concepimento (HR non corretto 0,96; IC 95% 0,73-1,28) né alla gravidanza clinica (HR corretto 0,97; IC 95% 0,72-1,31). Il risultato è sovrapponibile a quello di Steiner et al., che nella coorte Time to Conceive non hanno osservato una riduzione della fecondabilità nelle donne con FSH elevato (HR

corretto 1,22; IC 95% 0,92-1,62). Gli autori propongono che un FSH elevato, espressione di una ridotta riserva, possa favorire l'ovulazione multi-follicolare e il reclutamento di più follicoli, compensando almeno in parte la minore disponibilità di ovociti; si tratta di un'ipotesi biologicamente plausibile ma non verificabile con i dati del presente studio.

Il volume ovarico è il marcatore meno studiato tra quelli considerati. La categoria con volume ridotto comprende solo 18 donne (3,5% della coorte), con conseguente instabilità delle stime e intervalli di confidenza molto ampi; i risultati relativi a questo parametro devono essere considerati esplorativi.

La variabile combinata AFC + AMH ha classificato come concordi bassa 67 donne (13%), normale 161 (32%) e alta 97 (19%), mentre 184 donne (36%) presentavano valori appartenenti a categorie diverse per i due marcatori. Questa quota elevata di discordanza conferma che AFC e AMH, pur correlati, non sono intercambiabili. Rispetto alla categoria normale, gli hazard ratio corretti per la gravidanza clinica erano 1,16 (IC 95% 0,78-1,71) per la categoria bassa, 1,11 (0,72-1,72) per la alta e 1,02 (0,69-1,50) per la discordante: la combinazione dei due marcatori non ha quindi fornito un'informazione prognostica aggiuntiva rispetto ai marcatori considerati singolarmente.

- ***Analisi stratificata per fascia d'età***

Nell'analisi stratificata per età (Tabella 8) una bassa concentrazione di AMH non era associata a una riduzione della probabilità di gravidanza clinica in nessuna fascia: gli hazard ratio corretti erano 1,30 (IC 95% 0,52-3,21) a 28-32 anni, 0,95 (0,50-1,83) a 33-35 anni, 1,02 (0,60-1,74) a 36-38 anni e 0,85 (0,47-1,55) oltre i 38 anni. La probabilità cumulativa a 12 cicli nelle donne con AMH normale era del 74%, 72% e 73% fino ai 38 anni e del 64% oltre i 38, a conferma che il principale determinante della fertilità osservata resta l'età anagrafica e non il livello del biomarcatore. Le stime nelle fasce con poche donne (9 nella fascia più giovane con AMH bassa) sono molto imprecise e l'assenza di associazione non può essere considerata una dimostrazione di assenza di effetto in ciascun sottogruppo.

Un dato che merita cautela riguarda le donne di età superiore a 38 anni con AMH elevato (n = 17): la probabilità cumulativa a 12 cicli era del 94% (IC 95% 73-99) e l'HR non corretto 1,85 (1,00-3,43), al limite della significatività, mentre dopo correzione la stima scendeva a 1,26 (0,54-2,92). L'andamento è in linea con quanto osservato da Steiner et al., che riportavano una tendenza a una maggiore fecondabilità nelle donne più anziane con AMH elevato, senza significatività. Data la piccola numerosità, l'assenza di correzione per confronti multipli e la natura esplorativa delle analisi per sottogruppo, il risultato va interpretato come generatore di ipotesi.

Interpretazione biologica

- ***Ruolo fisiologico di AMH, FSH e AFC: una sintesi funzionale***

I risultati di questo studio vanno interpretati alla luce di ciò che AMH, FSH e AFC misurano realmente a livello molecolare e cellulare, un principio ripreso dai capitoli 2, 3 e 4. L'AMH è il prodotto di secrezione delle cellule della granulosa di una finestra ristretta di follicoli in crescita (dai primari agli antrali di piccole dimensioni fino a circa 8 mm), regolata dalla via AMHR2-SMAD 1/5/8 e dal suo cross-talk con i segnali ovocita-dipendenti BMP15/GDF9 discusso nel capitolo 3. Il segnale si esaurisce progressivamente man mano che il follicolo supera questa soglia dimensionale, per poi scomparire del tutto nei follicoli selezionati per l'ovulazione. L'AFC, al contrario, non è un dosaggio biochimico ma una visualizzazione morfologica diretta: conta i follicoli di 2-10 mm, dimensioni evidenti proprio nel punto in cui il follicolo diventa visibile agli ultrasuoni e acquisisce piena sensibilità all'FSH, cioè quando entra nella fase di sviluppo gonadotropino-dipendente descritta nel capitolo 4. L'FSH, discusso nei capitoli precedenti come marcatore di controllo secondario, si colloca a monte di entrambi: il suo aumento compensatorio in risposta alla riduzione del pool follicolare è ciò che in ultima analisi, guida la transizione dei follicoli attraverso la finestra dimensionale misurata dall'AFC. Nessuno dei tre marcatori, per costruzione biologica, accede al pool primordiale sottostante (la riserva ovarica totale) né alla competenza meiotica degli ovociti in esso contenuti.

- ***Perché biomarcatori di riserva ovarica potrebbero riflettere la quantità ovocitaria piuttosto che la competenza riproduttiva?***

Il concepimento spontaneo dipende in ultima analisi dalla capacità di un singolo ovocita di completare correttamente la meiosi, essere fecondato e sostenere lo sviluppo embrionale precoce. Come discusso in 2.2, l'aneuploidia ovocitaria età-correlatta, è il principale determinante del declino della fertilità, origina da almeno tre meccanismi molecolari: il deterioramento della coesina, la disregolazione del checkpoint di assemblaggio del fuso meiotico, e la disfunzione mitocondriale ovocitaria (28). Nessuno di questi tre processi è catturato, nemmeno indirettamente, da una misura quantitativa del pool follicolare in crescita. Un contributo che rafforza specificamente questo punto viene dalla letteratura più recente sul DNA mitocondriale ovocitario. Ogni ovocita umano contiene 200.000 copie di DNA mitocondriale (mtDNA), essenziali per la produzione di energia necessaria a una segregazione cromosomica fedele; l'età materna avanzata si associa sia una ridotta quantità sia una ridotta qualità del mtDNA ovocitario, in un processo mediato dall'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (80). Un recente studio di randomizzazione mendeliana bidirezionale, un disegno metodologicamente affine a quello già discusso per l'AMH e il rischio di aborto in 5.2, ha

esaminato la relazione causale tra il numero di copie mtDNA e diversi disturbi riproduttivi ovarici, rafforzando l'ipotesi che la componente energetica-mitocondriale dell'ovocita rappresenti l'asse d'invecchiamento riproduttivo distinto e non misurato dai biomarcatori ormonali o ecografici convenzionali (81). In altre parole, se il nostro studio non rileva un'associazione tra riserva ovarica e concepimento spontaneo, un'interpretazione biologicamente plausibile è che la variabilità nella competenza ovocitaria governata da coesine, checkpoint del fuso e integrità mitocondriale sia semplicemente un asse causale distinto da quello quantitativo che AMH e AFC misurano, e non una conseguenza diretta.

- ***Livelli aggiuntivi di regolazione: epigenetica e trascrizione a singola cellula.***

Tre ulteriori livelli di evidenza biologica, discussi nel capitolo 2, sono importanti per contestualizzare i risultati del presene studio. Primo, l'invecchiamento ovarico osservato mediante trascrittoma a singola cellula e spaziale mostra traiettorie molecolari distinte per ciascun tipo di cellulare ovarico, ovociti, cellule della granulosa, stroma con marcatori specifici (come la sovraespressione di DKK1 nelle cellule della granulosa in insufficienza ovarica prematura) che nessun dosaggio sierico di AMH può discriminare (79) un filone di ricerca che include anche l'osservazione preliminare di una ridotta resa ovocitaria in donne con età epigenetica accelerata rispetto all'età cronologica , e un più recente studio su 379 cicli di fecondazione in vitro che conferma il valore predittivo indipendente dall'età epigenetica su successo della IVF. Terzo, è più rilevante per questa tesi , l'evidenza sull'età epigenetica applicata alla fertilità naturale in particolare il risultato nullo nella coorte norvegese MoBa su 1.657 coppie di concepimento spontaneo suggerisce (80) il che pattern "biomarcatore biologicamente sofisticato ma non predittivo del concepimento spontaneo" non sia specifico dell'AMH e dell'AFC, ma un fenomeno più generale che attraversa più livelli di biomarcatori dell'invecchiamento riproduttivo (ormonale, ecografico, epigenetico).

- ***La distinzione tra riserva ovarica e fecondabilità: una riformulazione molecolare***

I capitoli precedenti hanno inquadrato la distinzione tra riserva ovarica e fecondabilità principalmente in termini concettuali (quantità vs qualità). È possibile riformulare la stessa distinzione in termini molecolari: la riserva ovarica, misurata da AMH e AFC, riflette l'output di un singolo asse di segnalazione (la secrezione delle cellule della granulosa dei follicoli in crescita, regolata dalla via SMAD discussa nel capitolo 3.1). La fecondabilità al contrario è la risultante di molteplici assi biologici paralleli e in gran parte indipendenti tra loro: l'integrità genomica e mitocondriale dell'ovocita (3.2), il profilo epigenetico cellulare (3.3), la funzione tubarica ed endometriale, e il

fattore non biologico ma comportamentale, discusso nel capitolo 5 a proposito dello studio di Konishi et al. (69).

Sulla frequenza e tempistica dei rapporti. Un singolo asse di segnalazione, per quanto ben caratterizzato a livello molecolare, difficilmente può fungere da proxy affidabile per l'intersezione di più assi biologici indipendenti: è questa, in ultima sintesi molecolare, e la ragione per cui ci si attende e la letteratura discussa nel capitolo 5 in gran parte confermata che AMH e AFC abbiano un valore predittivo limitato per il concepimento spontaneo, pur restando strumenti validi per predire la risposta quantitativa alla stimolazione ovarica in PMA.

- ***Dalle tappe della follicologenesi al dato clinico***

Le sezioni precedenti hanno descritto separatamente i meccanismi che determinano la quantità e la qualità ovociti. La Figura 8 li colloca lungo le tappe della follicologenesi.

L'AMH è prodotto dalle cellule della granulosa dei follicoli in crescita, dallo stadio primario fino ai piccoli follicoli antrali, (85) e inibisce sia l'attivazione dei follicoli primordiali (83-84) sia la sensibilità dei follicoli in crescita all'FSH (86-87). L'FSH agisce invece sui follicoli antrali, nei quali la crescita diventa gonadotropino-dipendente, e guida il reclutamento ciclico e la selezione del follicolo dominante; l'inibina B e l'estradiolo, prodotti dai follicoli antrali, esercitano un feedback negativo sulla sua secrezione (88). L'AFC misura per via ecografica i follicoli antrali di 2-10 mm, cioè la popolazione nella quale i due ormoni interagiscono.

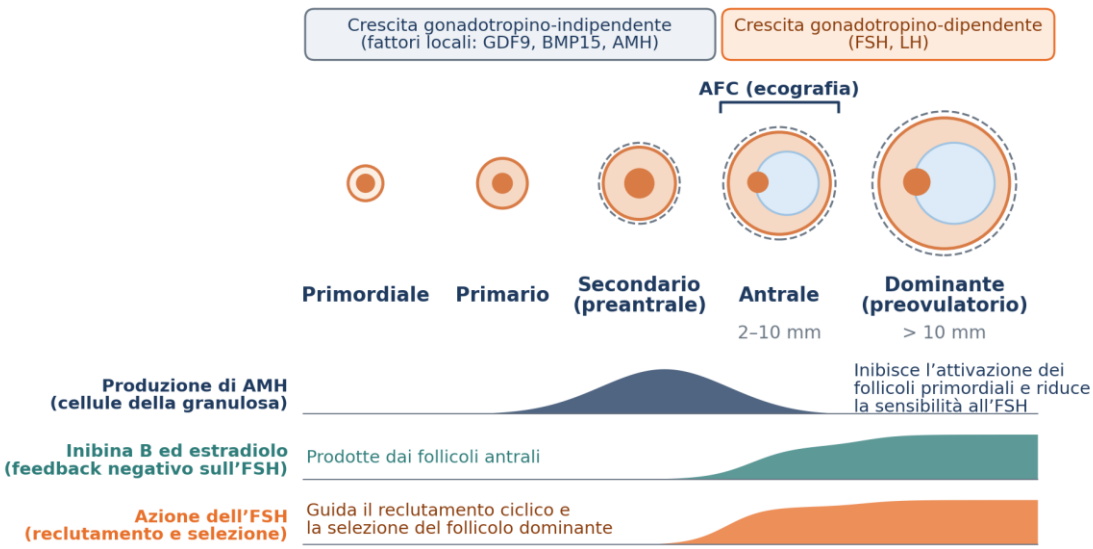


Figura 8. Tappe della follicologenesi e fasi di produzione dell'AMH e di azione dell'FSH. L'AMH è prodotto dai follicoli in crescita (dallo stadio primario ai piccoli follicoli antrali) e modula l'attivazione dei follicoli primordiali e la sensibilità all'FSH; l'FSH agisce sui follicoli antrali, nella fase gonadotropino-dipendente. Elaborazione propria, schematica.

In questa cornice AMH, AFC e FSH basale descrivono lo stesso compartimento, quello quantitativo del reclutamento: l'AMH e l'AFC ne misurano la numerosità, l'FSH ne riflette indirettamente il feedback attraverso la minore produzione di inibina B ed estradiolo. Nessuno dei tre fornisce informazioni dirette sulla competenza dell'ovocita che verrà ovulato, determinata dalla corretta segregazione dei cromosomi, dall'integrità dei complessi di coesina, dalla funzione mitocondriale e dallo stato epigenetico (89-90).

Poiché queste proprietà sono legate più strettamente all'età cronologica che al numero di follicoli, il modello riportato in Figura 8 prevede che la relazione tra quantità e probabilità di concepire sia debole in una popolazione di donne senza infertilità nota, nella quale ogni ciclo dipende dall'ovulazione di un singolo ovocita.

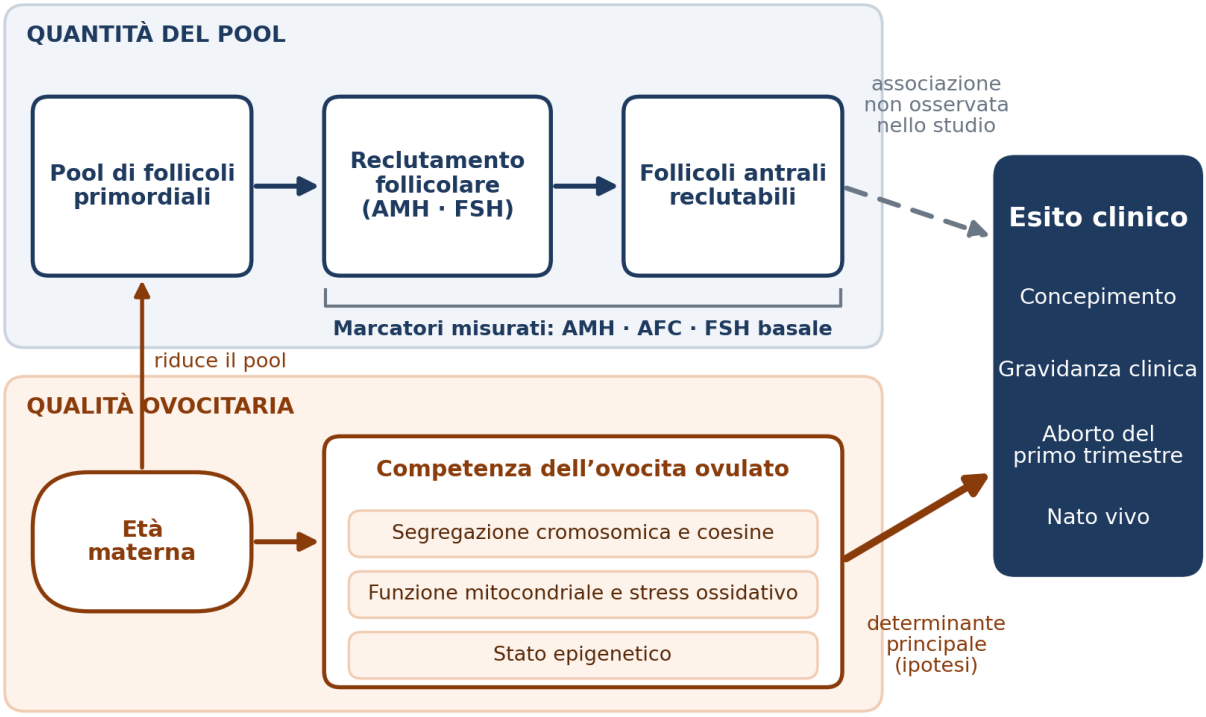


Figura 9. Modello concettuale: dal pool primordiale all'esito clinico. AMH, AFC e FSH basale misurano la quantità del pool reclutabile; l'esito dipende soprattutto dalla competenza dell'ovocita ovulato, legata all'età materna. La freccia tratteggiata indica una relazione non osservata nel presente studio; le relazioni con l'età e con la competenza ovocitaria sono ipotesi coerenti con la letteratura e con i dati, non risultati dimostrati. Elaborazione propria

Questa previsione è coerente con i risultati del presente studio: gli HR per AMH, AFC e FSH erano compatibili con l'unità e la probabilità cumulativa di gravidanza clinica a 12 cicli nelle donne con AMH normale diminuiva soltanto oltre i 38 anni (64% contro il 72-74% delle fasce più giovani). Il modello non esclude tuttavia un ruolo della quantità quando la riserva è gravemente compromessa:

in questa condizione la riduzione del numero di cicli ovulatori potrebbe diminuire la fecondabilità indipendentemente dalla qualità, come ipotizzato da Steiner et al., il cui studio non aveva potenza per valori molto bassi di AMH. Anche nella presente coorte le donne con valori molto bassi erano poche 106.

Il quadro proposto ha infine un carattere interpretativo.

Il presente studio non ha misurato direttamente marcatori di qualità ovocitaria, come lo stato dei mitocondri o i parametri epigenetici, e le relazioni rappresentate con frecce in Figura 9 sono ipotesi coerenti con la letteratura e con i dati osservati. La misura di tali marcatori su campioni biologici conservati rappresenta una possibile estensione del lavoro.

Punti di forza dello studio

Il presente studio possiede diversi aspetti metodologici che ne rappresentano dei punti di forza.

(i) Il disegno di coorte prospettico, con reclutamento entro tre mesi dall'inizio del tentativo del concepimento, particolarmente adatto per valutare l'eventuale relazione tra i marcatori della riserva ovarica e il tempo necessario per ottenere una gravidanza e minimizza il bias left-trunctions discusso in Materiali e Metodi. L'inclusione delle donne nelle fasi iniziali del tentativo di concepimento consente infatti di osservare una popolazione più rappresentativa delle diverse condizioni di fecondabilità, evitando che le donne che concepiscono rapidamente siano già escluse dallo studio al momento del reclutamento. Inoltre, la raccolta prospettica dei dati permette di valutare i biomarcatori all'inizio del periodo di osservazione di registrare successivamente gli eventi riproduttivi man mano che si verificano, limitando i possibili bias legati alla ricostruzione retrospettiva delle informazioni.

(ii) L'inclusione simultanea di AMH e AFC, identificato in 5.3 come principali indicatori della riserva ovarica. La maggior parte degli studi disponibili si è concentrata soprattutto sull'AMH, mentre le evidenze prospettiche relative all'associazione tra AFC e fertilità sono ancora limitate. L'utilizzo di entrambi i parametri permette quindi di considerare la riserva ovarica attraverso due misure differenti e in parte complementari, offrendo una valutazione più completa rispetto all'impiego di un singolo biomarcatore.

(iii) Il piano statistico basato su modelli quali Kaplan-Meier e Cox che rappresenta un avanzamento rispetto all'analisi preliminare condotta sulla stessa coorte (2.4), consentendo la stima di HR corretti anziché il solo confronto di proporzioni cumulative.

(iv) L'inclusione di esiti secondari. Lo studio non considera esclusivamente il raggiungimento della gravidanza entro i 12 cicli, ma prende in esame anche ulteriori esiti riproduttivi, la valutazione del concepimento, aborti spontanei, e il parto consente una caratterizzazione più completa del potenziale riproduttivo.

Limiti dello studio

Il presente studio presenta dei limiti che devono essere considerati nell'interpretazione dei risultati.

(i) Valutazione del fattore maschile. La componente maschile della fertilità di coppia è stata valutata principalmente sulla base delle informazioni anamnestiche disponibili, senza l'esecuzione sistematica di uno spermiogramma. Non è quindi possibile escludere che eventuali alterazioni della qualità del liquido seminale non diagnosticate abbiano influenzato la probabilità di concepimento. La presenza di fattori maschili non rilevati potrebbe aver ridotto la possibilità di osservare una eventuale associazione tra i biomarcatori della riserva ovarica e gli esiti riproduttivi.

(ii) La frequenza dei rapporti. A differenza di numerosi studi precedenti, la frequenza dei rapporti sessuali è stata considerata come possibile variabile di confondimento nell'analisi. Tuttavia, le informazioni sono state raccolte tramite auto referto mensile e possono quindi essere soggette a bias di richiamo o a una possibile tendenza a riportare informazioni considerate più socialmente accettabili. Inoltre, la sola frequenza dei rapporti non consente di stabilire con precisione quanto questi siano avvenuti in corrispondenza della finestra fertile. Nonostante questo, l'inclusione della variabile permette di tenere conto almeno in parte di un fattore comportamentale importante per la probabilità di concepimento.

(iii) Generalizzabilità dei risultati. La popolazione studiata è stata reclutata presso due centri di terzo livello appartenenti alla stessa area metropolitana e presenta caratteristiche demografiche ed etniche relativamente omogenee. I risultati potrebbero quindi non essere direttamente applicabili a popolazioni con caratteristiche socioeconomiche, culturali o genetiche differenti. Questo aspetto assume particolare importanza considerando la possibile influenza dell'etnia e della variabilità genetica sui livelli di AMH, già discussa nella sezione (3.3). Inoltre, la limitata presenza di donne con una riserva ovarica gravemente ridotta rende più difficile estendere i risultati a questa specifica popolazione.

(iv) Durata del follow-up e valutazione degli esiti. Il periodo di osservazione, limitato a un massimo di 12 mesi mestruali, consente di valutare la probabilità di concepimento durante il primo anno di ricerca della gravidanza, ma non permette di analizzare gli eventuali esiti riproduttivi a più lungo termine. Inoltre, il raggiungimento del concepimento entro 12 cicli non fornisce informazioni complete sull'evoluzione successiva della gravidanza. I risultati devono quindi essere interpretati in relazione al periodo di osservazione considerato e non possono essere automaticamente estesi a donne con caratteristiche cliniche diverse, in particolare a quelle con una riserva ovarica severamente ridotta.

(v) L'AFC dipende dall'operatore e, nel presente studio, la competenza degli ecografisti non è stata valutata in modo formale: non è stata misurata la concordanza tra operatori né è stato effettuato un controllo di qualità sistematico. Un'ulteriore conferma delle evidenze emerse in questo studio dovrebbe essere ottenuta mediante AFC automatizzata, ad esempio tramite l'utilizzo dell'intelligenza artificiale, e/o da parte di operatori con comprovata esperienza e riproducibilità interoperatore nella misurazione.

Implicazioni cliniche

I risultati del presente studio hanno una ricaduta diretta sulla pratica clinica, perché i marcatori di riserva ovarica sono oggi largamente utilizzati, anche al di fuori della PMA, come strumenti di valutazione della fertilità. Nelle donne senza infertilità nota che cercano un concepimento da meno di tre mesi, né l'AMH, né l'AFC, né il FSH, né il volume ovarico hanno permesso di identificare un gruppo con ridotta probabilità di concepire o di portare a termine la gravidanza. Questo è coerente con le raccomandazioni di ACOG e dell'ESHRE, che non sostengono l'impiego dei test di riserva ovarica per predire la fertilità.

In termini di counseling, una donna che riceve un valore basso di AMH o una conta antrale ridotta può essere informata che tale dato descrive la quantità del pool follicolare e non la probabilità di concepire nel singolo ciclo. Il messaggio deve però essere bilanciato: non è corretto né rassicurare in modo indiscriminato né rinviare la ricerca di gravidanza, poiché l'età resta il determinante principale della fertilità e le raccomandazioni di valutazione dopo sei mesi di tentativi nelle donne di età pari o superiore a 35 anni rimangono valide.

Un secondo aspetto riguarda i rischi di un uso improprio dei test. La diffusione di dosaggi e kit venduti direttamente alle donne può generare ansia, false rassicurazioni, richieste di trattamenti non necessari o decisioni affrettate, ad esempio sulla crioconservazione ovocitaria, sulla base di un valore isolato. L'AMH e l'AFC mantengono invece un ruolo appropriato nella pianificazione della stimolazione

ovarica in PMA e nella valutazione di sospette condizioni come l'insufficienza ovarica prematura: il limite che emerge dai dati è il passaggio dal dominio della PMA a quello del concepimento spontaneo, non la validità del marcatore in sé.

Prospettive future

I risultati suggeriscono alcune direzioni di ricerca.

In primo luogo, sono necessari studi più ampi, con un numero adeguato di donne con valori molto bassi di AMH e con AFC ridotta, per valutare se una soglia di riserva gravemente compromessa modifichi la fecondabilità, come ipotizzato dagli stessi autori della coorte Time to Conceive.
In secondo luogo, studi con follow-up più lungo e con la registrazione dell'ovulazione e della frequenza dei rapporti permetterebbero di stimare la fecondabilità nel ciclo ovulatorio e di ridurre una classificazione errata dell'esposizione al concepimento.
Sul piano metodologico, una metanalisi dei dati individuali delle coorti prospettiche disponibili consentirebbe stime più precise negli strati per età e negli esiti rari come l'aborto. Infine, rimane aperta la ricerca di marcatori della competenza ovocitaria, distinti dai marcatori quantitativi, e la valutazione di come il counseling e la comunicazione del risultato dei test influenzino le decisioni riproduttive delle donne.
Sul piano molecolare, se i campioni di siero fossero ancora disponibili, su sottogruppi della coorte potrebbero essere misurati ulteriori marcatori, come l'inibina B o le forme circolanti di AMH, per valutare se informino sulla funzione follicolare meglio del solo dosaggio totale. Marcatori di qualità ovocitaria, come il DNA mitocondriale libero, i microRNA e i metaboliti del liquido follicolare, e gli orologi di metilazione del DNA, già studiati in relazione alla fecondabilità, potrebbero inoltre distinguere l'età biologica da quella cronologica e fornire una misura più vicina alla competenza dell'ovocita rispetto ai marcatori di quantità.

CONCLUSIONI

Il presente studio di coorte prospettico, condotto su 509 donne di età compresa tra 28-40 anni senza storia di infertilità, ha valutato il valore predittivo di AMH, AFC, FSH, volume ovarico e della variabile combinata AMH+AFC per il parto (nato vivo), esito primario, e per il concepimento spontaneo, la gravidanza clinica e l'aborto del primo trimestre e il parto nell'arco di un follow up fino a 12 cicli mestruali.

Coerentemente con la maggioranza della letteratura discussa nel capitolo 5 e, in particolare, con lo studio cardine di Steiner et al. (61) nessuno dei biomarcatori considerati è risultato associato in modo indipendente alla probabilità di parto (nato vivo): l'HR corretto era 0,90 (IC 95% 0,62-1,30) per l'AMH bassa e 1,10 (IC 95% 0,76-1,58) per l'AFC bassa, rispetto alle categorie di riferimento.

Le donne con valori di biomarcatori indicativi di riserva ovarica ridotta non hanno mostrato una fecondabilità ridotta, un tasso di aborto spontaneo aumentato, né un tasso di nato vivo inferiore, né una fecondabilità ridotta, né un tasso di aborto spontaneo aumentato rispetto alle donne con riserva ovarica normale o alta, e lo stesso pattern di assenza di associazione è stato osservato per FSH, volume ovarico e per la variabile combinata AFC+AMH.

Questi risultati, ottenuti con un piano statistico più rigoroso basato su modelli di sopravvivenza rafforzano, la distinzione concettuale al centro di questa tesi: AMH e AFC sono biomarcatori validati della quantità ovocitaria e predittori affidabili della risposta ovarica alla stimolazione controllata nel contesto della procreazione medicalmente assistita, ma non misure surrogate della fertilità. Come discusso in dettaglio nel capitolo 3 della Discussione, questa dissociazione trova un fondamento biologico coerente su più livelli dai meccanismi molecolari dell'aneuploidia ovocitaria (coesina, checkpoint del fuso, integrità mitocondriale) alla trascrittomica single-cell dell'invecchiamento ovarico, fino all'evidenza, strutturalmente analoga, di un risultato nullo per l'età epigenetica nel concepimento naturale (82). Il denominatore comune di queste evidenze è che il concepimento spontaneo dipende dall'intersezione di molteplici assi biologici in gran parte indipendenti tra loro, mentre AMH e AFC catturano l'output di un singolo asse, la secrezione follicolare quantitativa per quanto ben caratterizzato a livello molecolare.

Un contributo originale specifico di questo lavoro riguarda l'AFC: colmando un vuoto di evidenza prospettica su popolazione generale identificato in 5.3, lo studio fornisce una delle prime stime di fecondabilità corretta per l'AFC in donne senza infertilità accertata, estendendo a questo marcatore le stesse conclusioni consolidate per l'AMH.

In un contesto quello italiano, descritto nel capitolo 1, in cui posticipazione della genitorialità è la più marcata d'Europa e la disponibilità commerciale di test di riserva ovarica diretti al consumatore è in

crescita, un counseling accurato su cosa questi biomarcatori possano e non possano predire assume una rilevanza di salute pubblica diretta.

Diversi limiti, discussi nel capitolo precedente (la valutazione del fattore maschile su base anamnestica, la misurazione autoriferita della frequenza dei rapporti, la dimensione campionaria raggiunta pari a 509 partecipanti, il 74% del target proposto di 686) e la composizione demografica della coorte, prevalentemente omogenea per etnia indicano la necessità di repliche in popolazioni più ampie ed eterogenee. Studi futuri che integrino ai biomarcatori ormonali ed ecografici tradizionali i livelli di evidenza molecolare discussi in questa tesi, ovvero determinanti genetici (3.3), profilo epigenetico e numero di copie del DNA mitocondriale ovocitario (paragrafo 3.2 della Discussione) potrebbero in prospettiva avvicinarsi a una stima realmente integrata della competenza riproduttiva, oggi non raggiungibile da alcun singolo biomarcatore quantitativo, inclusi quelli qui esaminati.

BIBLIOGRAFIA

1. Liang Y, Huang J, Zhao Q, Mo H, Su Z, Feng S, et al. Global, regional, and national prevalence and trends of
infertility among individuals of reproductive age (15–49 years) from 1990 to 2021, with projections to 2040.
Hum Reprod. 2025 Mar 40(3) :529–44.
2. Liu J, Qin Y, Liu H, Liu Y, Yang Y, Ning Y, et al. Global, Regional, and National Burden of Female Infertility
and Trends from 1990 to 2021 with Projections to 2050 Based on the GBD 2021 Analysis. Sci Rep. 2025 May
21;15(1):17559.
3. Pregnancy at Age 35 Years or Older: ACOG Obstetric Care Consensus No. 11. Obstet Gynecol. 2022
Aug;140(2):348–66.
4. Kraus M, Hartmann B, Kirchengast S. Delaying Motherhood—An Increasingly Common but Risky Trend in
High-Income Countries. Am J Hum Biol. 2025 Apr;37(4): e70037.
5. Esposito G, Parazzini F, Chatenoud L, Santucci C, La Vecchia C, Negri E. Parents' age and total fertility rate
in selected high-income countries from Europe and North America, 1990–2020. Eur J Obstet Gynecol Reprod
Biol. 2024 Aug; 299:32–6
6. Schmidt L, Sobotka T, Bentzen JG, Nyboe Andersen A, on behalf of the ESHRE Reproduction and Society
Task Force. Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood. Hum Reprod Update.
2012;18(1):29–43.
7 Eurostat. Natalità nell'Unione Europea, dati 2024. Pubblicato 9 marzo 2026.
8 ISTAT. Natalità e fecondità della popolazione residente — Anno 2024. Ufficio Stampa ISTAT, 21 ottobre
2025.
9 Ministero della Salute — Ufficio di Statistica. Certificato di Assistenza al Parto (CeDAP) — Analisi

dell'evento nascita, Anno 2024. Dicembre 2025.
10 Palmieri A., dati ISTAT su età paterna, citato in: Il Fatto Quotidiano, 18 marzo 2024.
11. Wesselink AK, Rothman KJ, Hatch EE, Mikkelsen EM, Sørensen HT, Wise LA. Age and fecundability in a
North American preconception cohort study. Am J Obstet Gynecol. 2017 Dec;217(6): 667.e1-667.e8.
12 Boxem AJ, Blaauwendraad SM, Mulders AGMGJ, Bekkers EL, Gaillard R, Jaddoe VWV. Age among women and men, time to pregnancy and risk of miscarriage. BMC Med. 2025 Nov 17;23(1):639.
13 Female age-related fertility decline. Fertil Steril. 2014 Mar; 101(3):633-4.
14. Penzias A, Azziz R, Bendikson K, Falcone T, Hansen K, Hill M, et al. Optimizing natural fertility: a
committee opinion. Fertil Steril. 2022 Jan;117(1):53–63.
15. Santoro N, Polotsky AJ. Infertility Evaluation and Treatment. N Engl J Med. 2025 Mar 13;392(11):1111–9.
16. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. Hum Reprod Update. 2002;8(2):141–54.
17. van Asselt, K. M., Kok, H. S., Pearson, P. L., Dubas, J. S., Peeters, P. H., Te Velde, E. R., & van Noord, P. A. (2004). Heritability of menopausal age in mothers and daughters. *Fertility and sterility*, *82*(5), 1348–1351. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.04.047
18. Snieder H, MacGregor AJ, Spector TD. Genes control the cessation of a woman's reproductive life: a twin
study hysterectomy and age at menopause. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83(6):1875–80.
19. Van Den Beld AW, Kaufman JM, Zillikens MC, Lamberts SWJ, Egan JM, Van Der Lely AJ. The physiology of endocrine systems with ageing. Lancet Diabetes Endocrinol. 2018 Aug;6(8):647–58.
20. Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide. Am J Obstet Gynecol. 2017 Aug;217(2):129–40.
21. Moolhuijsen LME, Visser JA. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian
Function. J Clin Endocrinol Metab. 2020 Nov 1;105(11):3361–73.
22. Baker KM, FernandezCriado R, Eaton JL, Mensah VA. The Clinical Utility of Measures of Ovarian
Reserve. Obstet Gynecol Surv. 2025 Feb;80(2):121–33.

23. ESHRE Guideline Group on Ovarian Stimulation. ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI —
an update in 2025. Hum Reprod. 2026 Apr;41(4):498.
24.American College of Obstetricians and Gynecologists. Anticipatory Counseling Regarding Ovarian-Factor Fertility Decline. Committee Statement. Obstet Gynecol. Nov 2025.
25. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. Hum Reprod. 1992; 7:1342-6;
26. Faddy MJ, Gosden RG. Physiology: A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary. Hum Reprod. 1995 Apr; 10(4):770-5.
27. Pelosi E, Forabosco A and Schlessinger D (2015) Genetics of the ovarian reserve. Front. Genet. 6:308. doi: 10.3389/fgene.2015.00308
28. Charalambous C, Webster A, Schuh M. Aneuploidy in mammalian oocytes and the impact of maternal ageing. Nat Rev Mol Cell Biol. 2023 Jan;24(1):27–44.
29. Buratini J, Dellaqua TT, Dal Canto M, La Marca A, Carone D, Mignini Renzini M, et al. The putative roles of FSH and AMH in the regulation of oocyte developmental competence. Hum Reprod Update. 2022 Feb 28;28(2):232–54.
30. Cedars MI. Evaluation of Female Fertility—AMH and Ovarian Reserve Testing. J Clin Endocrinol Metab. 2022 May 17;107(6):1510–9.
31. Di Clemente N, Racine C, Pierre A, Taieb J. Anti-Müllerian Hormone in Female Reproduction. Endocr Rev. 2021 Nov 16;42(6):753–82
32. Coelho Neto MA, Ludwin A, Borrell A, Benacerraf B, Dewailly D, Da Silva Costa F, et al. Counting ovarian antral follicles by ultrasound: a practical guide. Ultrasound Obstet Gynecol. 2018 Jan;51(1):10–20.
33. Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA, Wallace WHB. A Validated Model of Serum Anti-Müllerian Hormone from Conception to Menopause. PLoS One. 2011;6(7): e22024.
34. Amanvermez R, Tosun M. An Update on Ovarian Aging and Ovarian Reserve Tests. Int J Fertil Steril. 2017 Jan;9(4).
35. Werner L, Van Der Schouw YT, De Kat AC. A systematic review of the association between modifiable lifestyle factors and circulating anti-Müllerian hormone. Hum Reprod Update. 2024 May 2;30(3):262–308.
36. Jaswa EG, Rios JS, Cedars MI, Santoro NF, Pavone MEG, Legro RS, et al. Increased Body Mass Index Is Associated with A Nondilutional Reduction in Antimüllerian Hormone. J Clin Endocrinol Metab. 2020 Oct 1;105(10):3234–42.

37. Werner L, Verschuren WM, Picavet HSJ, Broekmans F, Van Der Schouw YT, De Kat AC. Exploring the association between lifestyle factors and anti-Müllerian hormone concentration and rate of decline. Reprod Biomed Online. 2026 Jul;53(1):105432.
38. The impact of vitamin D supplementation on anti-Müllerian hormone levels: a systematic review and meta-analysis. BMC Endocr Disord. 2025 Dec.
39. Tzeng CR, Huang Z, Asada Y, Zhang C, Ho MT, Li RHW, et al. Factors affecting the distribution of serum anti-müllerian hormone levels among infertile Asian women. Hum Reprod. 2023 Jul 5;38(7):1368–78.
40. Genetic determination of the ovarian reserve: a literature review. J Ovarian Res. 2021.
41. Erdogan-Yildirim Z, Carlson JC, Krishnan M, Zhang JZ, Lambert-Messerlian G, Naseri T, Viali S, Hawley NL, McGarvey ST, Weeks DE, Minster RL. A Genome-Wide Association Study of Anti-Müllerian Hormone (AMH) Levels in Samoan Women. Genes (Basel). 2025 Jun 30;16(7):793.
42. Russell N, Gilmore A, Roudebush WE. Clinical Utilities of Anti-Müllerian Hormone. J Clin Med. 2022 Dec 4 ;11(23) :7209.
43. Peigné M, Bernard V, Dijols L, Creux H, Robin G, Hocké C, et al. Using serum anti-Müllerian hormone levels to predict the chance of live birth after spontaneous or assisted conception: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod. 2023 Sep 5;38(9):1789–806.
44. Coelho Neto MA, Ludwin A, Borrell A, Benacerraf B, Dewailly D, Da Silva Costa F, et al. Counting ovarian antral follicles by ultrasound: a practical guide. Ultrasound Obstet Gynecol. 2018 Jan;51(1):10–20.
45. An artificial intelligence platform for automated measurement and count estimation of ovarian follicles during ovarian stimulation and IVF: a multicenter study. J Assist Reprod Genet. 2026 Jan 3.
46. Zhang J, Liu S, Liu S, Rong Y, Zhong C, Ni D, Ran S, et al. Ultrasound radiomics and deep learning for predicting antral follicle count and anti-Müllerian hormone. Sci Rep. 2025 Dec 20.
47. Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. Hum Reprod. 2010 Dec 1 ;25(12) :2944–54.
48. Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, et al. The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles: What Is the Link? Biol Reprod. 2014 Apr 1;90(4).
49. Demir MB, Çopuroğlu M, Çevik Kaya F, Yüksek Ş. Correlation between serum AMH, AFC, and histologically quantified primordial follicles: a prospective study in premenopausal women. J Ovarian Res. 2025 Oct 17;18(1):226.

50. Bentzen JG, Forman JL, Johannsen TH, Pinborg A, Larsen EC, Andersen AN. Ovarian Antral Follicle Subclasses and Anti-Müllerian Hormone During Normal Reproductive Aging. J Clin Endocrinol Metab. 2013 Apr 1;98(4):1602–11.
51. La Marca A, Spada E, Sighinolfi G, Argento C, Tirelli A, Giulini S, et al. Age-specific nomogram for the decline in antral follicle count throughout the reproductive period. Fertil Steril. 2011 Feb;95(2):684–8.
52. Bozdag G, Calis P, Zengin D, Tanacan A, Karahan S. Age related normogram for antral follicle count in general population and comparison with previous studies. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2016 Nov; 206:120–4.
53. Balachandren N, Kastora SL, Yasmin E, Saridogan E, Jurkovic D, Learner HE, et al. An age-related nomogram for antral follicle count: an observational study of 3821 women. Reprod Biomed Online. 2024 Nov;49(5):104295.
54. Rosen MP, Johnstone E, McCulloch CE, Schuh-Huerta SM, Sternfeld B, Reijo-Pera RA, et al. A characterization of the relationship of ovarian reserve markers with age. Fertil Steril. 2012 Jan;97(1):238–43.
55. Jayaprakasan K, Chan Y, Islam R, Haoula Z, Hopkisson J, Coomarasamy A, et al. Prediction of in vitro fertilization outcome at different antral follicle count thresholds in a prospective cohort of 1,012 women. Fertil Steril. 2012 Sep;98(3):657–63.
56. Esteves SC, Yarali H, Vuong LN, Carvalho JF, Özbek İY, Polat M, et al. Antral follicle count and anti-Müllerian hormone to classify low-prognosis women under the POSEIDON criteria. Hum Reprod. 2021 May 17;36(6):1530–41.
57. 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.
58. 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 Nov;21(6):698–710.
59. Sun X, Xiong W, Liu L, Xiong J, Liao C, Lan Y, et al. Comparison of the predictive capability of antral follicle count vs. the anti-Müllerian hormone for ovarian response in infertile women. Front Endocrinol. 2022 Oct 31; 13:862733.
60. Liu Y, Pan Z, Wu Y, Song J, Chen J. Comparison of anti-Müllerian hormone and antral follicle count in the prediction of ovarian response: a systematic review and meta-analysis. J Ovarian Res. 2023 Jun 27;16(1):117.

61. Steiner AZ, Pritchard D, Stanczyk FZ, Kesner JS, Meadows JW, Herring AH, et al. Association Between Biomarkers of Ovarian Reserve and Infertility Among Older Women of Reproductive Age. JAMA. 2017;318(14):1367–76.
62. Hagen CP, Vestergaard S, Juul A, Skakkebaek NE, Andersson AM, Main KM, et al. Low concentration of circulating antimüllerian hormone is not predictive of reduced fecundability in young healthy women. Fertil Steril. 2012 ;98(6) :1602–8.
63. Streuli I, de Mouzon J, Paccolat C, Chapron C, Petignat P, Irion OP, et al. AMH concentration is not related to effective time to pregnancy in women who conceive naturally. Reprod Biomed Online. 2014; 28:216–24.
64. Hvidman HW, Bang AK, Priskorn L, Scheike T, Birch Petersen K, Nordkap L, et al. Anti-Müllerian hormone levels and fecundability in women with a natural conception. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2017 ;217 :44–52.
65. Zarek SM, Mitchell EM, Sjaarda LA, et al. Is anti-Müllerian hormone associated with fecundability? Findings from the EAGeR trial. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(11):4215–21.
66. Lin C, Jing M, Zhu W, Tu X, Chen Q, Wang X, et al. The value of anti-Müllerian hormone in the prediction of spontaneous pregnancy: a systematic review and meta-analysis. Front Endocrinol. 2021; 12:695157.
67. Nelson SM, Shaw M, Ewing BJ, McLean K, Vechery A, Briggs SF. Antimüllerian hormone levels are associated with time to pregnancy in a cohort study of 3,150 women. Fertil Steril. 2024;122(6):1114–23.
68. Korsholm AS, Petersen KB, Bentzen JG, Hilsted LM, Andersen AN, Hvidman HW. Investigation of anti-Müllerian hormone concentrations in relation to natural conception rate and time to pregnancy. Reprod Biomed Online. 2018;36(5):568–75.
69. Konishi S, Saotome TT, Shimizu K, Oba MS, O'Connor KA. Coital Frequency and the Probability of Pregnancy in Couples Trying to Conceive Their First Child: A Prospective Cohort Study in Japan. Int J Environ Res Public Health. 2020 Jul 10;17(14):4985.
70. Khan HL, Bhatti S, Suhail S, Gul R, Awais A, Hamayun H, et al. Antral follicle count (AFC) and serum anti-Müllerian hormone (AMH) are the predictors of natural fecundability... among fertile and infertile women below the age of 40 years. Reprod Biol Endocrinol. 2019 Feb 11;17(1):19.
71. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Committee Opinion No. 773: the use of antimüllerian hormone in women not seeking fertility care. Obstet Gynecol. 2019;133: e274–8.

72. Lyttle Schumacher BM, Jukic AMZ, Steiner AZ. Antimüllerian hormone as a risk factor for miscarriage in naturally conceived pregnancies. Fertil Steril. 2018; 109:1065–1067.e1.
73. Mao D, Wang Y, Lin M, Liu FT, Nan W, Liu J, Qin X, Hu KL, Li R. Association of serum anti-Müllerian hormone levels with early miscarriage: a retrospective cohort and mendelian randomization study. Reprod Biol Endocrinol. 2026; 24:11 (published online 24 Dec 2025).
74. Kasaven LS, Anson N, Jones BP, Odia R, Cordero J, Ben Nagi J, Theodorou E, et al. Is ovarian reserve associated with an increased risk of miscarriage? A systematic review and meta-analysis. Reprod Biomed Online. 2025 May 20. doi: 10.1016/j.rbmo.2025.105041.
75. Depmann M, Broer SL, Eijkemans MJC, et al. Anti-Müllerian hormone does not predict time to pregnancy: results of a prospective cohort study. Gynecol Endocrinol. 2017; 33:644–8.
76. World Medical Association. Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA. 2013;310(20):2191–4.
77. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP; STROBE Initiative. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement. Lancet. 2007;370(9596):1453–7.
78. Weinberg CR, Wilcox AJ. Reproductive epidemiology. In: Rothman KJ, Greenland S, eds. Modern Epidemiology. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1998:585–608.
79. Baird DD, Wilcox AJ, Weinberg CR. Use of time to pregnancy to study environmental exposures. Am J Epidemiol. 1986;124(3):470–80.
80. Ma Y, et al. Maintaining mitochondrial DNA copy number mitigates ROS-induced oocyte decline and female reproductive aging. Commun Biol. 2024 Oct 1.
81. Peng K, Han X, Wu C, Lu Q, Gao S. The mitochondrial DNA copy number and ovary-related reproductive disorders: a bidirectional two-sample mendelian randomization study. Int J Gynaecol Obstet. 2025;169:112–20.
82. Arge LA, Lee Y, Skåra KH, Myrskylä M, Ramlau-Hansen CH, Håberg SE, et al. Epigenetic aging and fecundability: the Norwegian mother, father and child cohort study. Hum Reprod. 2024;39(12):2806–15.
83. Durlinger ALL, Kramer P, Karels B, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. Endocrinology. 1999;140(12):5789–96. doi:10.1210/endo.140.12.7204.
84. Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, et al. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. Endocrinology. 2002;143(3):1076–84.

85. Weenen C, Laven JSE, von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. Mol Hum Reprod. 2004;10(2):77–83. doi:10.1093/molehr/gah015.
86. Gruijters MJG, Visser JA, Durlinger ALL, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. Mol Cell Endocrinol. 2003;211:85–90. doi:10.1016/j.mce.2003.09.024.
87. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, et al. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. Fertil Steril. 2011;96(5):1246–51.
88. Santoro N, Isaac B, Neal-Perry G, et al. Impaired folliculogenesis and ovulation in older reproductive aged women. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(11):5502–9.
89. Chiang T, Duncan FE, Schindler K, Schultz RM, Lampson MA. Evidence that weakened centromere cohesion is a leading cause of age-related aneuploidy in oocytes. Curr Biol. 2010;20(17):1522–8. doi:10.1016/j.cub.2010.06.069.
90. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Hum Reprod Update. 2008;14(2):159–77. doi:10.1093/humupd/dmm040.