LUCAS YUGO SHIGUEHARA YAMAKAMI

**Avaliação da reserva ovariana em pacientes
com síndrome antifosfolípide primária**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Serafini

Co-orientador: Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva

SÃO PAULO

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Yamakami, Lucas Yugo Shiguehara

Avaliação da reserva ovariana em pacientes com síndrome antifosfolípide primária / Lucas Yugo Shiguehara Yamakami. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Paulo Cesar Serafini.

Co-orientador: Clovis Artur Almeida da Silva.

Descritores: 1.Síndrome antifosfolípídica 2.Doenças autoimunes
3.Hormônio antimülleriano 4.Folículo ovariano/ultrassonografia 5.Hormônio foliculoestimulante 6.Hormônio luteinizante 7.Estradiol 8.Testes de função ovariana 9.Estudos transversais

USP/FM/DBD-200/13

DEDICATÓRIA

Escrevi em alguns sábados e domingos
às vezes longe da minha família
ao meu pai, que tanto trabalhou para nos dar um futuro
à minha mãe, que me acompanhou em todos os momentos
alguns fáceis, outros nem tanto
e juntos me deram tudo

Nunca poderia imaginar-me hoje
mesmo nas mais otimistas previsões que, erradamente
não eram tão completas
à Laís, que encontrei até que tarde, na vida quase sempre próxima
mas que nada mais poderia pedir. Muito e sempre, sempre

Brinco com Pedro e sua risada, pequenina, enche a mim
e a qualquer outra coisa que esteja meio vazia
ao meu filho, alegria, que de tanto, não sei quanto
vida e sonho

E, assim como muitas pessoas são, eu sei que sou
e disso tenho que me lembrar diariamente, para nada mais pedir
aos meus irmãos Raquel e Jonathan, e a minha família, que são
à minha nova família André, Shirley, Juliana, Edgar, Ivan, Isabel e Oliver

Findo este trabalho, aguardo agora, o amanhã
e aos que vierem...

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Paulo Cesar Serafini**, meu orientador, médico diuturno e referência nacional e internacional da medicina reprodutiva. Por sorte ou destino, nossos caminhos sempre se cruzaram e, seu conhecimento e percepção do mundo, enriqueceram-me.

Ao **Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva**, meu co-orientador, que conheci em um dia comum e, com sua simplicidade e dedicação, guiou minha vida acadêmica. Professor, na essência da palavra, que nada mais me desejou que o bem.

Ao **Prof. Dr. Edmund Chada Baracat**, que exerce suas decisões de forma admirável, com justiça, meritocracia e equilíbrio, e a quem devo todas as oportunidades nesta faculdade, inclusive esta.

Ao **Daniel Brito Araújo**, meu companheiro nesta jornada, que me ajudou desde o primeiro rabisco até o último, e se tornou um grande amigo.

À **Dra. Vilma Viana e Elaine Pires Leon**, que realizaram as análises laboratoriais fundamentais, com um carinho que sempre me trouxe felicidade.

À **Profa. Dra. Eloísa Bonfá**, por sua valiosa ajuda na Tese e no artigo que dela surgiu.

À **Andrea Rocha, Prof. Dr. Samuel Shinjo e Fernando Souza**, que me ajudaram em diversas etapas deste projeto.

À equipe de enfermagem da Disciplina de Ginecologia, em especial à **Andrea Oracic, Áurea Gonçalves, Regina Ferreira, Sônia Lima e Cristina Origassa**, que me ajudaram, sorrindo, nas coletas de sangue e ultrassonografias.

À equipe administrativa do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, em especial à **Adriana Festa, Célia Moraes, Cláudia Vieira, Cristiane Amaral, Francisca Oliveira, Glauciete Anjos, Mara Rúbia, Moacir Lopes, Neusi Silva, Rosângela Rodrigues e Sônia Rodrigues**, que sempre me ajudaram.

À equipe de enfermagem da Disciplina de Reumatologia, em especial a enfermeira **Sandra**, que sempre me ajudou no transporte das amostras de sangue à Faculdade de Medicina, apesar de pouco me conhecer.

À bibliotecária **Marisa Umetsu**, que conseguiu todos os artigos solicitados, em tempo recorde e com enorme alegria.

Ao **Dr. Ulysses Doria-Filho**, responsável pela análise estatística deste trabalho.

À **Dra. Nádia Aikawa**, colega de turma, que me ajudou, por incrível coincidência, desde as provas da faculdade até este momento.

À Sra. **Suely Campos Cardoso**, da Divisão de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que além de fazer a ficha catalográfica, ajudou na formatação adequada desta Tese.

A todas as **participantes** deste estudo, que possibilitaram sua realização.

Ao **Renato Bussadori Tomioka**, que após algumas voltas na vida, tornou-se, por sorte, meu sócio-amigo-irmão e que me apoiou em todos os momentos desta caminhada. Desejo que nossa história continue verdadeira, companheira e, acima de tudo, feliz.

Ao **Sidney Tomyo Nishida Arazawa**, meu amigo e parceiro, pelo apoio e decisões sempre éticas e equilibradas.

Aos meus amigos da VidaBemVinda, **Camila Barião Fonseca Miyahira, Conrado Alvarenga, Paula Gabriela Marin Figueira, Fábio Kayano e Fábio Katayama e Ivo Pamplona**, que me acompanharam e ajudaram neste período.

À minha querida equipe VidaBemVinda, **Marcela Lages, Maiara Conatti, Helena Higuti e Thayana Gomes**, por tornarem minha vida quase sempre mais fácil e possibilitarem a realização desta Tese.

Aos **médicos professores, professores médicos e professores**, que encontrei durante minha formação e fazem parte de mim.

Ao **Dr. Miguel Vera** (*in memoriam*), que em conversas, atitudes e habilidades, ensinou-me durante toda a Residência Médica e fora dela.

À **Dra. Sylvia Hayashida e Prof. Dr. Gustavo Maciel**, pela ajuda na Ginecologia endócrina.

Aos Drs. **Dani Ejzenberg, Élvio Tognotti, Gustavo Kroger, Marcos Shiroma, Paulo Bianchi, Pedro Monteleone e Rodrigo Rodrigues**; à **Camila Sommer, Gabriela Romanenghi e aos demais colegas** do Centro de Reprodução Humana, pelo apoio no projeto.

Aos Drs. **Edilberto Olivares, Célio Gonçalves, José Píndaro Plese, Edson Hisato, Ricardo Beyruti, Pedro Nabuco e demais médicos e profissionais da saúde**, que cuidaram de mim e me trouxeram até aqui.

Aos amigos da Câmara Municipal de São Paulo, **Álvaro, Carlos, Cláudio, Eduardo, Fernanda, Gisele, João, Lorena, Luciana, Marcos, Noely, Roberto**, de quem me afastei nos últimos dois anos para me dedicar a esta Tese.

Aos amigos da vida, coleguinhas do Pioneiro e Etapa, **Alexandre, Anderson, Augusto, Clayton, Clécio, Dedé, Felipe, Kanai, Kenji, Marcel, Marcos, Ronaldo, Rubem, Satoshi, Willian**, companheiros de Panela, **André, Brasil, Fantini, Gabi, George, Guilherme, Hugo, Jack, Oscar, Ricardo, Rodrigo, Rogério, Soriano, Scabello, Zen, Wendell**; Residência Médica, **Cris, Daniele, Elaine, Maíra, Tenório, Wagner**, e amigos que ganhei com minha esposa, **Big, Carina, Dudu, Juli, George, Letícia, Harumi, Imai, Ana Paula, Leandro, Juliana, Luiz, Cali, Marcos, Paula, Rafaela, Ronaldo, Miki e Ricardo**. Todos ajudaram na minha formação acadêmica e pessoal.

Aos meus amigos Japabikers, **Alex Ikegami, Marcos Takao Fuwa e Daniel Jun Mitsuiki**, que nas pedaladas de quarta-feira e finais de semana, me deram força para terminar este trabalho.

E a todas as outras pessoas, anônimas a este trabalho, mas não a minha vida...

Este estudo foi financiado para Clovis A. Silva pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP #11/12471-2), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ #302724/2011-7) e Federico Foundation, Suíça.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de siglas	
Lista de símbolos	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Síndrome antifosfolípide primária (SAFP).....	1
1.2 Reserva ovariana.....	3
1.3 SAFP e reserva ovariana.....	7
2 OBJETIVOS.....	10
3 MÉTODOS.....	11
3.1 Pacientes.....	11
3.2 Consentimento.....	12
3.3 Dados demográficos e parâmetros gerais.....	12
3.4 Avaliação clínica e laboratorial da SAFP	13
3.5 Avaliação ginecológica.....	14
3.6 Exames laboratoriais de reserva ovariana.....	14
3.7 Exames de imagem de reserva ovariana.....	15
3.8 Detecção do anticorpo anti-corpo lúteo.....	16
3.9 Análise estatística.....	16
4 RESULTADOS.....	18
4.1 SAFP vs. controles.....	18
4.2 SAFP e baixa reserva ovariana vs. SAFP e reserva normal.....	21
4.3 Associação entre anticorpos antifosfolípides e reserva ovariana na SAFP.....	23
4.4 Associação entre anticorpo anti-corpo lúteo e reserva ovariana na SAFP.....	23
4.5 Correlação entre marcadores de reserva ovariana.....	25
5 DISCUSSÃO.....	27
6 CONCLUSÕES.....	31
7 ANEXOS.....	32
8 REFERÊNCIAS.....	38
Apêndice	

LISTA DE SIGLAS

aCL	Anticorpo anticardiolipina
AL	Anticoagulante lúpico
anti-β2-GPI	Anticorpo anti- β 2 glicoproteína I
anti-CoL	Anticorpo anti-corpo lúteo
ASC	Área sob a curva
CFA	Contagem de folículos antrais
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSH	Hormônio folículo estimulante
HAM	Hormônio anti-Mülleriano
IMC	Índice de massa corpórea
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LH	Hormônio luteinizante
SAF	Síndrome antifosfolípide
SAFP	Síndrome antifosfolípide primária
vs.	<i>Versus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

C	Celsius
GPL	micrograma de imunoglobulina G
kg/m²	quilograma por metro quadrado
mg/dL	miligrama por decilitro
mm	milímetro
mm³	milímetro cúbico
MPL	micrograma de imunoglobulina M
ng/mL	nanograma por mililitro
pg/mL	picograma por mililitro
U/mL	unidade por mililitro
UI/L	unidade internacional por litro
>	maior
≥	maior ou igual
<	menor
≤	menor ou igual
=	igual

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados demográficos e história ginecológica das pacientes com síndrome antifosfolípide primária e controles.....	19
Tabela 2 – Marcadores de reserva ovariana em pacientes com síndrome antifosfolípide primária e controles.....	20
Tabela 3 – Baixa reserva ovariana em pacientes com síndrome antifosfolípide primária e controles.....	21
Tabela 4 – Dados demográficos, história ginecológica, características clínicas, laboratoriais e anticorpo anti-corpo lúteo em pacientes com síndrome antifosfolípide primária, classificadas de acordo com a contagem de folículos antrais ($CFA \leq$ ou > 10).....	22
Tabela 5 – Marcadores de reserva ovariana em pacientes com síndrome antifosfolípide primária, classificadas de acordo com a contagem de folículos antrais ($CFA \leq$ ou > 10).....	23
Tabela 6 – Dados demográficos, história ginecológica, características clínicas, laboratoriais e anticorpo anti-corpo lúteo em pacientes com síndrome antifosfolípide primária, classificadas de acordo com a contagem de folículos antrais ($CFA \leq$ ou > 5).....	24
Tabela 7 – Marcadores de reserva ovariana em pacientes com síndrome antifosfolípide primária, classificadas de acordo com a contagem de folículos antrais ($CFA \leq$ ou > 5).....	25
Tabela 8 – Associação entre presença de anticorpos antifosfolípidos e marcadores de reserva ovariana em pacientes com síndrome antifosfolípide primária.....	26

RESUMO

Yamakami LYS. *Avaliação da reserva ovariana em pacientes com síndrome antifosfolípide primária* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: A síndrome antifosfolípide é uma doença autoimune caracterizada por eventos trombóticos e/ou obstétricos adversos associados à presença de anticorpos antifosfolípidos. Considera-se síndrome antifosfolípide primária (SAFP) quando não há outra doença autoimune ou inflamatória associada.

Objetivos: Avaliar marcadores de reserva ovariana em mulheres com SAFP e a associação entre estes marcadores e dados clínicos, laboratoriais e anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL).

Métodos: Realizou-se estudo transversal em 18 pacientes com SAFP e 24 controles. A reserva ovariana foi avaliada na fase folicular precoce através das dosagens de hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estradiol e hormônio anti-Mülleriano (HAM), pela técnica de ELISA, e contagem ultrassonográfica de folículos antrais (CFA). O anti-CoL foi avaliado através de immunoblot. Todas as análises foram realizadas após suspensão de contraceptivo hormonal por, no mínimo, 6 meses e retorno das menstruações. O teste t foi utilizado para comparar médias $\pm$ desvio padrão e o teste de Mann-Whitney, para comparar medianas (variação). O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar diferenças entre variáveis categóricas. Adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados: A média da idade foi similar em pacientes com SAFP e controles ($33,0 \pm 5,0$ vs. $30,4 \pm 7,0$ anos, $p = 0,19$). Houve maior frequência de CFA baixa (≤ 10) (56% vs. 22%, $p = 0,04$) e muito baixa (≤ 5) (37% vs. 9%, $p = 0,04$) em pacientes com SAFP quando comparadas aos controles. Em relação ao HAM, observou-se tendência de maior frequência de concentração sérica reduzida ($< 1,0$ ng/mL), baixa ($< 0,5$ ng/mL) e muito baixa ($< 0,2$ ng/mL) em pacientes com SAFP ($p = 0,08$; $p = 0,07$ and $p = 0,07$; respectivamente). As concentrações séricas de FSH, LH e estradiol foram semelhantes em pacientes e controles ($p > 0,05$). Não houve associação entre baixa reserva ovariana e tipos específicos de anticorpos antifosfolípidos. A presença do anti-CoL foi observada apenas em pacientes com SAFP (11% vs. 0%, $p = 0,177$) e não foi relacionada a parâmetros de reserva ovariana. **Conclusões:** Pacientes com SAFP apresentaram reserva ovariana diminuída, com prevalência maior do que 50%, o que reforça o aconselhamento reprodutivo e planejamento familiar.

Descritores: Síndrome antifosfolipídica; Doenças autoimunes; Hormônio antimülleriano; Folículo ovariano/ultrassonografia; Hormônio foliculoestimulante; Hormônio luteinizante; Estradiol; Testes de função ovariana; Estudos transversais

ABSTRACT

Yamakami LYS. *Ovarian reserve evaluation in patients with primary antiphospholipid syndrome* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Introduction: Antiphospholipid syndrome is an autoimmune disease characterized by thrombosis and/or pregnancy morbidity associated with antiphospholipid antibodies. Primary APS (PAPS) is diagnosed when no other autoimmune or inflammatory diseases are present. **Objective:** to determine ovarian reserve in PAPS women and to evaluate the association between ovarian reserve tests and clinical and laboratorial parameters, and anti-corpus luteum antibody (anti-CoL). **Methods:** In this cross sectional study, 18 PAPS patients and 24 healthy women were evaluated at early follicular phase with measurement of follicle stimulating hormone (FSH), estradiol, and anti-Müllerian hormone (AMH), carried out by ELISA test, and sonographic antral follicle count (AFC). Serum measurement of anti-CoL was determined by immunoblot analysis. All analyses were performed after at least 6 months from the last intake of hormonal contraceptive and resumption of menstruation. Data were compared by t-test and Mann–Whitney test in continuous variables and by Fisher's exact test in categorical variables. The level of significance was set at 5% ($p < 0.05$). **Results:** The mean age was comparable in PAPS and controls (33.0 ± 5.0 vs. 30.4 ± 7.0 years; $p = 0.19$). Regarding ovarian reserve tests, the frequencies of low AFC (≤ 10) (56% vs. 22%, $p = 0.04$) and very low AFC (≤ 5) (37% vs. 9%, $p = 0.04$) were significantly higher in PAPS patients than controls. Trends of higher frequencies of reduced (< 1.0 ng/mL), low (< 0.5 ng/mL) and negligible (< 0.2 ng/mL) AMH levels were found in PAPS patients ($p = 0.08$; $p = 0.07$ and $p = 0.07$; respectively). FSH, LH and estradiol were similar in patients and controls. There was no association between low ovarian reserve and specific types of antiphospholipid antibodies. Anti-CoL was solely observed in PAPS patients (11% vs. 0%; $p = 0.177$) and was not related to ovarian reserve tests. **Conclusion:** Women suffering from PAPS possessed reduced ovarian reserve, with prevalence greater than 50%, emphasizing fertility counseling and family planning.

Descriptors: Antiphospholipid syndrome; Autoimmune diseases; Anti-Müllerian hormone; Ovarian follicle/ultrasonography; Follicle stimulating hormone; Luteinizing hormone; Estradiol; Ovarian function testes; Cross-sectional studies

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome antifosfolípide primária

A síndrome antifosfolípide (SAF) é uma doença autoimune adquirida caracterizada por eventos trombóticos e/ou obstétricos associados à presença de autoanticorpos circulantes. Estes autoanticorpos, chamados de anticorpos antifosfolípides, têm como alvo proteínas ligadoras de fosfolípides e são representados pelo anticoagulante lúpico (AL), pela anticardiolipina (aCL) e, mais recentemente, pela anti- β 2 glicoproteína I (anti- β 2-GPI)¹⁻³.

Devido a frequência de eventos trombóticos e obstétricos na população em geral, bem como a presença destes anticorpos em indivíduos assintomáticos, o diagnóstico baseia-se em critérios rigorosos que buscam classificar pacientes nas quais a presença de alterações laboratoriais e eventos adversos caracterizem uma relação causa-efeito. Desta forma, os critérios atuais foram definidos em consenso e exigem a ocorrência de um evento clínico adverso associado a uma alteração laboratorial não transitória¹.

Considera-se evento clínico a ocorrência de:

1. Trombose arterial, venosa e/ou de pequenos vasos em qualquer órgão ou tecido, confirmada por critério objetivo validado, como exames de imagem apropriados ou histopatologia sem sinal evidente de inflamação;

2. Morbidades na gestação:

- Um ou mais óbitos inexplicados de feto morfológicamente normal a partir da 10^a semana de gestação;
- Um ou mais partos prematuros de feto morfológicamente normal antes da 34^a semana de gestação, em consequência a pré-eclâmpsia grave, eclâmpsia ou diagnóstico de insuficiência placentária;
- Três ou mais abortamentos espontâneos, consecutivos e inexplicados antes da 10^a semana de gestação, tendo sido excluídas anormalidades hormonais ou anatômicas maternas e, também, cromossômicas maternas e paternas.

E considera-se alteração laboratorial relevante e persistente a presença no soro ou plasma de:

- aCL, do isotipo IgG e/ou IgM, com títulos médios ou altos, e em duas ou mais dosagens com intervalo de pelo menos 6 semanas. A dosagem deve ser feita por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) padronizado para aCL dependente de β 2-glicoproteína I;
- AL em duas ou mais dosagens, separadas por pelo menos 6 semanas, detectadas de acordo com as diretrizes da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia⁴.

Em 2006, durante oficina de trabalho que precedeu o 11^o Congresso Internacional em Anticorpos Antifosfolípidos, foram adotadas algumas alterações nestes critérios, principalmente nos laboratoriais. Introduziu-se o anticorpo anti- β 2-GPI, dos isotipos IgG e/ou IgM; aumentou-se o intervalo de

tempo necessário entre as dosagens de 6 para 12 semanas; e se definiu 40 GPL (ou MPL) ou valores acima do 99º percentil como médio ou alto título de aCL e anti- β 2-GPI².

Estabelecidos estes critérios, não é surpresa existirem pacientes com outras doenças reumatológicas, principalmente lúpus eritematoso sistêmico (LES), que os preencham. Assim, convencionou-se usar o termo SAF primária (SAFP) para situações em que não há outra doença autoimune ou inflamatória associada³. Trata-se de síndrome infrequente e, por isso, pouco estudada em diversos aspectos.

Os mecanismos exatos que explicam as manifestações clínicas da SAFP não estão completamente esclarecidos. As principais hipóteses são: (a) ativação de células endoteliais pelos complexos β 2-GPI e anti- β 2-GPI, com consequente produção de fatores teciduais e expressão de receptores de adesão celular^{5,6}; (b) ativação de plaquetas por ligação direta da β 2-GPI⁷; (c) desbalanço da hemostasia devido a presença de autoanticorpos contra proteínas anticoagulantes nativas³; (d) fibrinólise anormal devido a presença de autoanticorpos⁸; (e) ativação dos mecanismos inflamatórios de neutrófilos e do sistema complemento⁹.

1.2 Reserva ovariana

Define-se reserva ovariana como a quantidade e a qualidade dos folículos primordiais remanescentes nos ovários¹⁰. Em última análise, é a representação

da capacidade reprodutiva ou fecundidade da mulher. O desenvolvimento ovariano inicia-se aproximadamente na 5ª semana de gestação, quando as cristas gonadais são formadas, através de proeminências celômicas sobre os mesonefros¹¹. Estas estruturas contêm as células germinativas primitivas, que migram para a crista gonadal entre a 4ª e 6ª semana de gestação¹¹. A partir de então, há uma rápida multiplicação mitótica das células germinativas, formando oogônias. Estima-se que, entre a 16ª e 20ª semanas de gestação, os ovários tenham seis a sete milhões de oogônias. A primeira fase de formação do oócito ocorre quando a oogônia inicia a primeira divisão meiótica, que fica suspensa na profase (oócito primário) até o final do desenvolvimento folicular, o que acontecerá apenas no menacme. Os oócitos primários são envolvidos por células da pré-granulosa, espiculares, e este complexo recebe o nome de folículo primordial. Assim que são formados, por volta da 18ª a 20ª semana de vida intrauterina, os folículos primordiais começam a ser perdidos. Ao nascer, este número é de um a dois milhões. Na menarca, estima-se que existam quatrocentos mil folículos primordiais nos ovários e, na menopausa, próximo a mil, número insuficiente para manter função hormonal cíclica e menstruação¹¹.

A quantificação dos folículos ovarianos remanescentes através de parâmetros clínicos mostrou-se imprecisa, pois, durante o menacme, os ovários conseguem manter o padrão menstrual adequado mesmo quando sua capacidade reprodutiva está comprometida^{12,13}. Assim, uma avaliação mais fidedigna do patrimônio folicular envolve exames de sangue e de imagem, realizados de forma estática ou dinâmica¹⁰.

Apesar da contagem histológica dos folículos primordiais ser o método mais direto de quantificar a reserva ovariana, esta nunca chegou a ser empregada clinicamente. Além de ser invasiva, a distribuição heterogênea dos folículos faz com que amostras consideráveis de tecido ovariano tenham que ser biopsiadas, o que resultaria *per se* em redução do patrimônio folicular^{14,15}. Atualmente, os métodos indiretos são os únicos disponíveis e usados clinicamente¹⁶.

A concentração sérica do hormônio folículo estimulante (FSH) é o método mais utilizado na avaliação da função gonadal. No entanto, a facilidade de sua dosagem contrapõe-se a diversas desvantagens. O FSH apresenta grande variabilidade inter e intraciclo menstrual e limitada acurácia no diagnóstico de baixa reserva ovariana^{17,18}. A maioria dos estudos mostraram razão de verossimilhança menor que cinco na predição de desfechos como baixa resposta ovariana à estimulação e insucesso em tratamentos de reprodução assistida, mesmo com valores de corte de FSH de 15 UI/L^{16,19}. De fato, o FSH só apresenta bom valor preditivo positivo quando valores de corte muito altos são usados, o que reduz muito o valor preditivo negativo e a sensibilidade, e o torna pouco relevante para a imensa maioria das mulheres^{16,19}.

O estradiol não deve ser usado como teste de reserva ovariana de maneira isolada. Apresenta alta variabilidade inter e intraciclo menstrual²⁰ e não tem valor na predição de resposta ovariana ou gravidez^{16,21}. Na prática, é interpretado em conjunto com o FSH, pois valores altos de estradiol na fase folicular inicial (acima de 60 a 80 pg/mL) podem ser o primeiro sinal de

insuficiência ovariana e, por retroalimentação negativa, reduzirem falsamente o FSH¹⁰.

A inibina B é uma glicoproteína produzida pelas células da granulosa de folículos ovarianos em desenvolvimento²². Diferente do hormônio anti-Mülleriano (HAM), a inibina B aumenta sob ação do FSH. Desta forma, apresenta maior variabilidade inter e intraciclo²³. A maioria dos trabalhos mostra capacidade limitada na predição de resposta ovariana, com valores de área sob a curva (ASC) obtidas através de regressão logística *receiver operating characteristic* (ROC) menores do que 0,8^{16,24}. Na prática clínica, o emprego da inibina B é limitado pois, além das características descritas anteriormente, apresenta alto custo e baixa disponibilidade^{10,16}.

Atualmente, os melhores exames estáticos de avaliação da reserva ovariana são o HAM e a contagem ultra-sonográfica de folículos antrais (CFA). O HAM é uma glicoproteína da superfamília do fator de crescimento de transformação β , expresso pelos ovários a partir da 36ª semana de vida intrauterina, com maiores concentrações a partir da puberdade^{20,25}. Em mulheres no menacme, é produzido por células da granulosa de folículos pré-antrais (primários e secundários) e antrais iniciais, atuando provavelmente como modulador do próprio recrutamento folicular e da esteroidogênese²⁰.

O HAM pode ser usado como marcador sérico de resposta ovariana, pois estima a quantidade e a atividade das unidades recrutáveis de um *pool* inicial de folículos em estágios precoces de maturação. Assim, é considerado um dos melhores marcadores de reserva ovariana, sendo que a maioria dos trabalhos mostrou valores de ASC maior do que 0,90 quando o desfecho foi resposta

ovariana à estimulação^{16,20,26-28}. O HAM apresenta a vantagem de ser secretado de maneira mais constante durante o ciclo menstrual, ao contrário do FSH, da inibina B e do estradiol²⁹.

Em relação à CFA, os trabalhos demonstram que esta tem acurácia similar ao HAM na predição de resposta ovariana durante a estimulação com gonadotrofinas^{16,28,30,31}. Alguns estudos consideraram-na o melhor preditor de resposta ovariana, com valores de ASC entre 0,85 e 0,99^{16,30,32,33}. Mesmo sendo operador dependente, a CFA apresenta boa reprodutibilidade inter e intraobservador³⁴⁻³⁸.

Outra medida ultrassonográfica que pode ser útil na avaliação do patrimônio folicular é o volume ovariano médio¹⁶. Embora alguns estudos correlacionem-no tanto com a resposta ovariana à estimulação quanto à CFA, este parâmetro apresenta algumas desvantagens. A principal é a dificuldade de generalização, pois não pode ser usado em mulheres com afecções ovarianas, como endometriomas ou cistos^{31,39}. Outra desvantagem é a maior variabilidade inter e intraexaminador, quando comparada à CFA^{31,38}.

1.3 SAFP e reserva ovariana

A SAFP, assim como a maioria das doenças autoimunes adquiridas, predomina no sexo feminino, em especial no menacme^{2,40}. Os eventos adversos gestacionais têm sido extensamente pesquisados. No entanto, ainda

há uma lacuna no conhecimento de repercussões reprodutivas fora do período gravídico-puerperal.

Dentre as dúvidas que surgem, está a possível relação entre SAFP e baixa reserva ovariana. Neste sentido, há plausibilidade biológica, tanto por uma possível destruição autoimune dos folículos primordiais^{41,42}, quanto por um comprometimento da vascularização ovariana devido a eventos trombóticos, culminando em perda folicular⁴³.

De maneira geral, estima-se que a ooforite autoimune seja responsável por 5% das insuficiências ovarianas prematuras^{41,42}. Em mulheres com LES, por exemplo, há diversos trabalhos que observaram menor reserva ovariana⁴⁴⁻⁴⁹. No entanto, dentre as explicações para este comprometimento, além da autoimunidade, estão o uso de ciclofosfamida e glicocorticosteróides. Na SAFP, por outro lado, o tratamento padrão não envolve tais medicações, o que torna seu estudo relevante.

Diversos autoanticorpos antiovário foram descritos na literatura. Dentre eles, citam-se os anticorpos antioócito^{50,51}, antizona pelúcida⁵², anticélula esteróide^{41,42,53-55} e anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL)⁵⁶. O anti-CoL foi inicialmente descrito por Pasoto et al.⁵⁶ em 1999. Em trabalho pioneiro, este anticorpo foi positivo em 22% das mulheres adultas com LES, tendo sido associado a alterações menstruais e a níveis elevados de FSH⁵⁶. Entretanto, um estudo posterior do mesmo grupo não mostrou associação entre anti-CoL e disfunção gonadal⁵⁷.

Ao se pesquisar a base bibliográfica de dados Medline/Pubmed, em 01/04/2010, com os seguintes termos Mesh: (*antiphospholipid antibodies* OU *antiphospholipid syndrome*) E (*ovarian function test* OU *anti-Müllerian hormone* OU *follicle stimulating hormone*), não se encontrou nenhum artigo publicado. Quando se ampliou a busca, utilizando os termos *antiphospholipid* E *ovary*, foram recuperados 29 artigos, sendo que nenhum estudou a reserva ovariana. Em 01/04/2013, ao se realizar a mesma pesquisa, também não se encontrou nenhum artigo.

Portanto, diante de uma doença que compromete a vida da mulher, em particular no período gravídico-puerperal, consideramos essencial avaliar outras repercussões que possam influenciar sua capacidade reprodutiva e, consequentemente, o planejamento de sua família.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar marcadores de reserva ovariana em mulheres com síndrome antifosfolípide primária em comparação a um grupo controle;
2. Avaliar a associação entre a reserva ovariana e dados demográficos, história ginecológica e características clínicas e laboratoriais em mulheres com SAFP;
3. Verificar se há associação entre a presença de anticorpos antifosfolípides e marcadores de reserva ovariana;
4. Verificar se existe associação entre a presença de anticorpo anti-corpo lúteo e marcadores de reserva ovariana

3 MÉTODOS

3.1 Pacientes

Este estudo transversal foi realizado entre abril de 2010 e março de 2013, com pacientes do sexo feminino e diagnóstico de SAFP, acompanhadas na Divisão Reumatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e que foram consecutivamente selecionadas a participar da pesquisa.

Critérios de inclusão: mulheres entre 18 e 40 anos de idade que preenchiam critério de Sapporo para SAFP¹, sem uso de hormônios exógenos e ausência de outras doenças autoimunes ou inflamatórias. Mulheres que estavam usando hormônios exógenos, como contraceptivos hormonais, tinham que os suspender por pelo menos seis meses e apresentar dois episódios de sangramento vaginal (menstruações) para participar do estudo. Neste caso, foi fornecido preservativo masculino.

Critérios de exclusão: gestação ou lactação atual, contraindicação a interrupção do contraceptivo hormonal (risco aumentado de sangramento ou incapacidade de usar preservativo masculino), cirurgia ovariana, quimioterapia ou radioterapia prévia, uso atual de análogo do GnRH, insuficiência renal (nível sérico de creatinina acima de 1,5 mg/dL) ou não consentimento em participar do estudo.

O grupo controle incluiu mulheres que foram selecionadas consecutivamente no mesmo período, através de convites verbais e de cartazes colocados no Hospital das Clínicas e em Unidades Básicas de Saúde da região. Exceto pelo diagnóstico de SAFP, foram adotados os mesmos critérios de inclusão e exclusão.

3.2 Consentimento

Todas as mulheres que participaram do estudo receberam informação e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido informado (Anexo A). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da FMUSP e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da FMUSP em 28/04/2010 sob o protocolo nº 0051/10 (Anexo B).

3.3 Dados demográficos e parâmetros gerais

Avaliou-se idade, peso, altura, índice de massa corpórea (IMC) (peso em quilogramas dividido por altura em metro quadrado), tabagismo atual e classe socioeconômica, classificada de acordo com o critério proposto pela Associação Brasileira de Anunciantes e Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercados (Anexo C)⁵⁸.

3.4 Avaliação clínica e laboratorial da SAFP

Realizou-se revisão pormenorizada dos prontuários físicos e eletrônicos de pacientes com SAFP, incluindo dados clínicos, laboratoriais e terapêuticos. As manifestações clínicas foram divididas em trombose vascular ou morbidade gestacional, de acordo com o critério diagnóstico de Sapporo¹. Calculou-se o tempo de duração da doença a partir do início das manifestações clínicas da SAFP.

Os títulos de aCL e anti- β 2-GPI, isotipos IgG e IgM, foram analisados por ELISA⁵⁹. A pesquisa do AL foi feita através dos protocolos estabelecidos pela Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia⁴. Os outros anticorpos pesquisados foram o anti-DNA de dupla hélice, detectado através de imunofluorescência indireta usando a *Crithidia lucilliae* de substrato; anticorpos anti-RNP e anti-Sm, detectados através de ensaio de hemaglutinação com extraído de timo de coelho; e os anticorpos contra antígenos salino-solúveis, anti-Ro/SS-A e anti-La/SS-B, detectados através de contraímuno eletroforese contra extrato salino de baço de cachorro^{60,61}. Todos os autoanticorpos foram feitos durante o período do estudo. No entanto, os resultados anteriores também foram considerados para análise. Assim, uma paciente com determinado anticorpo negativo no momento do estudo, mas positivo em exame anterior, foi considerada como tendo este anticorpo positivo e comparada com pacientes que sempre tiveram o mesmo negativo.

3.5 Avaliação ginecológica

As participantes foram questionadas sobre a idade da menarca, com a qual foi calculado o tempo de duração do menacme. Os antecedentes obstétricos basearam-se em informações das participantes e foram confirmados em dados coletados nos prontuários.

3.6 Exames laboratoriais de reserva ovariana

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa periférica na fase folicular inicial (2º ao 4º dias do ciclo menstrual). Todos os soros foram centrifugados e armazenados a -70 °C até a análise. As dosagens de FSH, hormônio luteinizante (LH) e estradiol foram realizadas por radioimunoensaio (Cobas®, Roche, Mannheim, Germany). Os coeficientes de variação intra e interensaio recomendados pelo fabricante foram limitados a 5,7% e 3,6%, respectivamente. Considerou-se normal concentração sérica de FSH menor do que 10 UI/L; e elevada quando foi maior ou igual a 10 UI/L (baixa reserva ovariana)^{10,62,63}. Em relação ao estradiol, considerou-se normal concentração sérica menor do que 60 pg/mL e elevada concentração maior ou igual a 60 pg/mL¹⁰.

A dosagem do HAM foi feita por ELISA (AMH Gen II ELISA, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA), no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Reumatologia da FMUSP, em duplicata. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram limitados a 5,4% e 5,6%, respectivamente.

Classificou-se a concentração do HAM de acordo com os seguintes valores de corte sugeridos pelo fabricante e literatura: maior ou igual a 1 ng/mL (reserva ovariana normal); menor que 1 ng/mL (reserva ovariana reduzida); menor que 0,5 ng/mL (reserva ovariana baixa) e menor que 0,2 ng/mL (reserva ovariana muito baixa)^{27,28}.

3.7 Exames de imagem de reserva ovariana

A ultrassonografia para CFA foi realizada no mesmo dia da coleta de sangue. Todos os exames foram feitos por um mesmo observador, com transdutor endovaginal de 6,5 MHz (HD3, Philips Ultrasound, Bothell, WA, USA), sem conhecimento do grupo ao qual pertenciam as participantes e dos resultados dos exames séricos colhidos. O exame de ultrassonografia não foi realizado em mulheres que nunca tinham tido relação sexual vaginal. Os ovários foram avaliados nos planos axial e longitudinal e os maiores diâmetros obtidos no sentido longitudinal, ântero-posterior e transversal. O volume ovariano foi calculado através da fórmula da elipsoide ($\text{volume} = \text{longitudinal} \times \text{ântero-posterior} \times \text{transversal} \times 0,523$) e o volume médio de ambos os ovários obtido para cada participante. O diâmetro médio dos folículos ovarianos, obtido pela mensuração dos dois maiores diâmetros perpendiculares, foi usada na CFA, sendo considerados folículos de 2 a 10 mm de diâmetro médio^{10,26}. Os valores de CFA foram classificados de maneira clinicamente relevante: mais de 10 folículos (reserva ovariana normal), menor ou igual a 10 folículos (reserva ovariana baixa) e menor ou igual a 5 folículos (reserva ovariana muito baixa)²⁸.

3.8 Detecção do anti-CoL

A dosagem do anti-CoL foi realizada no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Reumatologia da FMUSP, usando eletroforese em gel de poliacrilamida e Western blot, como descrito por Pasoto et al.⁵⁶. Os extratos de células e tecidos de corpo lúteo bovino foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de sulfato dissódico usando o gel de acrilamida a 12%. Procedeu-se, então, transferência eletroforética dos extratos a uma membrana de nitrocelulose cortada em tiras, que foram incubadas em solução bloqueadora de leite desnatado a 5% em tampão fosfato salino por duas horas, em temperatura ambiente e sob agitação contínua. As tiras foram incubadas com soro diluído (1:10) em tampão fosfato salino contendo 15% de soro bovino adulto inativado, 3% de leite desnatado e 0,05% de polissorbato 20. Após lavagem, as tiras foram incubadas com anti-IgG humana misturada com fosfatase alcalina. A reação foi visualizada através da adição de fosfato 5-bromo-4-cloro-3-indolil e nitroazul de tetrazólio.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão ou mediana (variação) para variáveis contínuas paramétricas e não paramétricas, respectivamente, e porcentagem para variáveis categóricas. O teste t foi utilizado para comparar médias $\pm$ desvio padrão e o teste de Mann-Whitney para comparar medianas (variação). O teste exato de Fisher foi utilizado para

comparar diferenças entre variáveis categóricas, e o teste de correlação de Spearmann para avaliar correlação entre as diferentes variáveis contínuas. Em todos os testes estatísticos, adotou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Neste estudo, foram avaliadas 85 mulheres com SAF entre 18 e 40 anos, acompanhadas na Divisão Reumatológica do Hospital das Clínicas da FMUSP, sendo que destas, 43 (51%) tinham diagnóstico de SAFP. No total, foram excluídas 25 pacientes, sendo que o principal motivo de exclusão foi a contraindicação ou o não consentimento na interrupção do contraceptivo hormonal (n=21), pois a maioria das pacientes com SAFP utilizavam progestagênio isolado contínuo, principalmente o acetato de medroxiprogesterona trimestral, para prevenir hemorragia uterina e ovariana. As outras pacientes foram excluídas devido à gestação ou lactação (n=3) e a cirurgia ovariana prévia (n=1).

Assim, 18 (42%) pacientes com SAFP foram incluídas no presente estudo e comparadas com 24 controles. Duas mulheres do grupo SAFP e uma do controle eram virgens e, portanto, não foram submetidas à ultrassonografia transvaginal para CFA e cálculo do volume ovariano médio.

Nenhuma paciente apresentou os autoanticorpos anti-DNA de dupla hélice, anti-RNP, anti-Sm, anti-Ro/SS-A e anti-La/SS-B.

4.1 SAFP vs. controles

A Tabela 1 inclui os dados demográficos e ginecológicos das pacientes com SAFP e controles. A média da idade e do IMC, bem como os outros parâmetros demográficos, como frequência de tabagismo e hipertensão arterial sistêmica, foram semelhantes entre os dois grupos ($p>0,05$). Pacientes com

SAFP tiveram estatisticamente maior número de partos [1 (0-6) vs. 0 (0-2), $p=0,02$] do que os controles; assim como mais mulheres no grupo controle eram nuligestas.

Tabela 1 – Dados demográficos e história ginecológica das pacientes com síndrome antifosfolípide primária (SAFP) e controles

	SAFP (n=18)	Controles (n=24)	p
Dados demográficos			
Idade (anos)	33,0 ± 5,0	30,4 ± 7,0	0,19
IMC (kg/m ²)	27,0 ± 5,4	24,9 ± 4,5	0,18
Tabagismo (%)	6	4	1,00
HAS (%)	17	4	0,30
Raça caucasiana (%)	67	54	0,53
Classe sócio-econômica C ou D (%)	67	58	0,75
História ginecológica			
Idade na menarca (anos)	12 (9-15)	12 (11-18)	0,98
Duração do menacme (anos)	20,7 ± 5,0	17,9 ± 6,8	0,14
Paridade	1 (0-6)	0 (0-2)	0,02
Nuligesta (%)	17	54	0,02

Valores expressos em média ± desvio padrão, mediana (variação) e porcentagem. IMC - índice de massa corpórea, HAS – hipertensão arterial sistêmica.

As Tabelas 2 e 3 incluem os resultados dos marcadores de reserva ovariana em pacientes com SAFP e controles. Apesar de menor em pacientes com SAFP, não houve diferença estatisticamente significante entre as médias da CFA e as medianas do HAM (Tabela 2). As concentrações séricas de FSH,

LH e estradiol, bem como o volume ovariano médio, foram semelhantes em pacientes e controles ($p>0,05$).

Tabela 2 – Marcadores de reserva ovariana em pacientes com síndrome antifosfolípide primária (SAFP) e controles

Marcadores	SAFP	Controles	p
	(n=18)	(n=24)	
FSH (UI/L)	6,1 (3,8-20,1)	5,8 (2,2-14,4)	0,85
LH (UI/L)	5,6 (1,9-9,9)	4,9 (2,1-10,6)	0,56
Estradiol (pg/mL)	39 (26-75)	34 (24-128)	0,74
HAM (ng/mL)	1,6 (0-4,2)	2,8 (0,1-6,6)	0,16
	(n=16)	(n=23)	
CFA	12,4 ± 12,3	17,3 ± 8,9	0,16
Volume ovariano médio (mm ³)	5,1 (2,9-9,3)	5,1 (1,4-17,3)	0,70

Valores expressos em mediana (variação) e média ± desvio padrão. FSH – hormônio folículo estimulante, LH – hormônio luteinizante, HAM – hormônio anti-Mülleriano, CFA – contagem de folículos antrais.

Em relação a frequência de baixa reserva ovarina, classificada de acordo com os marcadores avaliados, houve diferença estatisticamente significativa, com maior frequência de CFA baixa (56% vs. 22%, $p=0,04$) e muito baixa (37% vs. 9%, $p=0,04$) em pacientes com SAFP quando comparadas aos controles (Tabela 3). Quando as concentrações de HAM foram classificadas em reduzida, baixa ou muito baixa, houve uma tendência de maior frequência de valores alterados em pacientes com SAFP, porém, sem significância estatística.

Tabela 3 – Baixa reserva ovariana em pacientes com síndrome antifosfolípide primária (SAFP) e controles

Marcadores alterados	SAFP	Controles	p
	(n=18)	(n=24)	
FSH elevado (≥ 10 UI/L)	17	8	0,64
Estradiol elevado (≥ 60 pg/mL)	17	17	1,00
HAM reduzido ($< 1,0$ ng/mL)	44	16	0,08
HAM baixo ($< 0,5$ ng/mL)	39	13	0,07
HAM muito baixo ($< 0,2$ ng/mL)	28	4	0,07
	(n=16)	(n=23)	
CFA baixa (≤ 10)	56	22	0,04
CFA muito baixa (≤ 5)	37	9	0,04

Valores expressos em porcentagem. FSH – hormônio folículo estimulante, HAM – hormônio anti-Mülleriano, CFA – contagem de folículos antrais.

4.2 SAFP e baixa reserva ovariana vs. SAFP e reserva normal

Quando se compararam pacientes com SAFP e reserva ovariana baixa (CFA $\leq$ 10) *versus* pacientes com SAFP e reserva ovariana normal, não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre dados demográficos, história ginecológica, características clínicas e laboratoriais prévias e anti-CoL, apesar de existir tendência de idade mais avançada e maior duração do menacme em pacientes com SAFP e reserva ovariana baixa (Tabela 4). Pacientes com SAFP e CFA baixa apresentavam valores séricos de HAM estatisticamente mais baixo que aquelas com CFA normal (Tabela 5).

Tabela 4 – Dados demográficos, história ginecológica, características clínicas, laboratoriais e anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL) em pacientes com síndrome antifosfolípide primária, classificadas de acordo com a contagem de folículos antrais (CFA $\leq$ ou $>$ 10)

Variáveis	CFA $\leq$ 10 (n=9)	CFA $>$ 10 (n=7)	p
Dados demográficos			
Idade (anos)	35,7 $\pm$ 3,5	32,2 $\pm$ 4,2	0,09
IMC (kg/m ²)	28,2 $\pm$ 6,1	26,7 $\pm$ 4,9	0,61
Tabagismo (%)	0	14	0,44
História ginecológica			
Idade na menarca (anos)	12 (9-15)	12 (11-15)	0,92
Duração do menacme (anos)	23,5 $\pm$ 3,6	19,6 $\pm$ 3,8	0,06
Uso prévio de contraceptivo (%) ⁽¹⁾	44	86	0,15
Paridade	2 (1-3)	1 (0-6)	0,40
Características clínicas e laboratoriais prévias			
Duração da doença (anos)	5,3 (0,7-11,8)	4,8 (2,6-12,9)	0,92
Trombocitopenia (%)	0	0	1,00
Livedo reticular (%)	22	14	1,00
Trombose arterial (%)	11	29	0,55
Trombose venosa (%)	78	86	1,00
Morbidade gestacional (%)	33	43	1,00
AL positivo (%)	67	57	1,00
aCL IgM $>$ 20 MPL (%)	67	43	0,61
aCL IgG $>$ 20 GPL (%)	56	29	0,36
Anti- β 2-GPI IgM $>$ 8 U/mL (%)	0	0	1,00
Anti- β 2-GPI IgG $>$ 8 U/mL (%)	22	14	1,00
Anti-CoL			
Positivo (%)	11	14	1,00

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão, mediana (variação) e porcentagem. IMC – índice de massa corpórea, AL – anticoagulante lúpico, aCL – anticorpo anticardiolipina, Anti- β 2-GPI - Anti- β 2-glicoproteína I. ⁽¹⁾ Acetato de medroxiprogesterona de depósito ou desogestrel diário.

Tabela 5 – Marcadores de reserva ovariana em pacientes com síndrome antifosfolípide primária, classificadas de acordo com a contagem de folículos antrais (CFA $\leq$ ou $>$ 10)

Reserva Ovariana	CFA $\leq$ 10 (n=9)	CFA $>$ 10 (n=7)	p
FSH (UI/L)	6,4 (4,6-20,1)	5,2 (4,3-7,2)	0,17
Estradiol (pg/mL)	42 (26-75)	37 (26-58)	0,46
HAM (ng/mL)	0,1 (0-0,8)	2,8 (1,3-4,2)	0,002

Valores expressos em mediana (variação). FSH – hormônio folículo estimulante, HAM – hormônio anti-Mülleriano.

Quando se comparou o grupo SAFP e CFA $\leq$ 5 *versus* SAFP e CFA $>$ 5, resultados semelhantes foram obtidos (Tabela 6 e 7).

4.3 Associação entre anticorpos antifosfolípides e reserva ovariana na SAFP

Não houve associação entre tipos específicos de anticorpos antifosfolípides (AL, aCL IgG, aCL IgM e anti- β 2-GPI IgG) e baixa reserva ovariana (Tabela 8). Todas as pacientes com SAFP tinham títulos negativos de anti- β 2-GPI IgM.

4.4 Associação entre anti-CoL e reserva ovariana na SAFP

O anti-CoL foi positivo apenas em pacientes com SAFP (11% vs. 0%, p=0,18). Destas, uma paciente tinha marcadores de reserva ovariana normal e,

outra, baixa reserva ovariana. Não houve associação entre anti-CoL e reserva ovariana em pacientes com SAFP ($p > 0,05$).

Tabela 6 – Dados demográficos, história ginecológica, características clínicas, laboratoriais e anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL) em pacientes com síndrome antifosfolípide primária, classificadas de acordo com a contagem de folículos antrais ($CFA \leq$ ou > 5)

Variáveis	CFA ≤ 5 (n=6)	CFA > 5 (n=10)	p
Dados demográficos			
Idade (anos)	36,6 $\pm$ 2,6	32,8 $\pm$ 4,3	0,07
IMC (kg/m ²)	28,2 $\pm$ 6,1	26,7 $\pm$ 4,9	0,61
Tabagismo (%)	0	14	1,00
História ginecológica			
Idade na menarca (anos)	12,5 (12-15)	12 (9-15)	0,41
Duração do menacme (anos)	23,8 $\pm$ 2,3	20,7 $\pm$ 4,6	0,15
Uso prévio de contraceptivo (%) ⁽¹⁾	67	60	1,00
Paridade	1,5 (1-3)	1,5 (0-6)	1,00
Características clínicas e laboratoriais prévias			
Duração da doença (anos)	5 (0,7-11,8)	5,4 (2,6-12,9)	0,79
Trombocitopenia (%)	0	0	1,00
Livedo reticular (%)	33	10	0,52
Trombose arterial (%)	33	20	1,00
Trombose venosa (%)	83	80	1,00
Morbidade gestacional (%)	33	40	1,00
AL positivo (%)	83	50	0,31
aCL IgM > 20 MPL (%)	100	50	0,09
aCL IgG > 20 GPL (%)	67	40	0,61
Anti- $\beta 2$ -GPI IgM > 8 U/mL (%)	0	0	1,00
Anti- $\beta 2$ -GPI IgG > 8 U/mL (%)	17	20	1,00
Anti-CoL			
Positivo (%)	17	10	1,00

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão, mediana (variação) e porcentagem. IMC – índice de massa corpórea, AL – anticoagulante lúpico, aCL – anticorpo anticardiolipina, Anti- $\beta 2$ -GPI – Anti- $\beta 2$ -glicoproteína I. ⁽¹⁾ Acetato de medroxiprogesterona de depósito ou desogestrel diário.

Tabela 7 – Marcadores de reserva ovariana em pacientes com síndrome antifosfolípide primária, classificadas de acordo com a contagem de folículos antrais (CFA $\leq$ ou > 5)

Reserva Ovariana	CFA ≤ 5 (n=6)	CFA > 5 (n=10)	<i>p</i>
FSH (UI/L)	7,5 (5,7-15,3)	5,6 (4,3-20,1)	0,14
Estradiol (pg/mL)	35,5 (26-75)	41,5 (26-59)	0,87
HAM (ng/mL)	0,07 (0-0,3)	2,2 (0-4,2)	0,008

Valores expressos em mediana (variação). FSH – hormônio folículo estimulante, HAM – hormônio anti-Mülleriano.

4.5 Correlação entre marcadores de reserva ovariana

A CFA e o HAM tiveram forte correlação de Spearman, tanto no grupo SAFP quanto controle ($r=+0,824$; $p<0,001$ e $r=+0,776$; $p<0,001$). Em pacientes com SAFP, o HAM e o FSH tiveram correlação negativa de Spearman ($r=-0,550$; $p=0,02$). A CFA e o FSH não tiveram correlação estatisticamente significativa ($r=-0,459$, $p=0,07$).

Tabela 8 – Associação entre presença de anticorpos antifosfolípides e marcadores de reserva ovariana em pacientes com síndrome antifosfolípide primária

Autoanticorpos	Positivo	Negativo	p
AL	(n = 12)	(n = 6)	
HAM < 0,2 ng/mL	25	33	1,00
HAM < 0,5 ng/mL	42	33	1,00
HAM < 1,0 ng/mL	42	50	1,00
CFA ≤ 5 ⁽¹⁾	50	17	0,31
CFA ≤ 10 ⁽¹⁾	60	50	1,00
aCL IgG > 20 GLP	(n = 9)	(n = 9)	
HAM < 0,2 ng/mL	33	22	1,00
HAM < 0,5 ng/mL	44	33	1,00
HAM < 1,0 ng/mL	56	33	0,64
CFA ≤ 5 ⁽¹⁾	50	25	0,61
CFA ≤ 10 ⁽¹⁾	63	50	1,00
aCL IgM >20 MPL	(n = 11)	(n = 7)	
HAM < 0,2 ng/mL	36	14	0,60
HAM < 0,5 ng/mL	54	14	0,15
HAM < 1,0 ng/mL	54	28	0,37
CFA ≤ 5 ⁽¹⁾	50	17	0,31
CFA ≤ 10 ⁽¹⁾	60	50	1,00
Anti-β2-GPI IgG > 8 U/mL	(n = 3)	(n = 15)	
HAM < 0,2 ng/mL	33	27	1,00
HAM < 0,5 ng/mL	33	40	1,00
HAM < 1,0 ng/mL	67	40	0,56
CFA ≤ 5 ⁽¹⁾	33	38	1,00
CFA ≤ 10 ⁽¹⁾	67	54	1,00

Valores expressos em porcentagem. HAM – hormônio anti-Mülleriano, CFA – contagem de folículos antrais, AL – anticoagulante lúpico, aCL – anticorpo anticardiolipina, Anti-β2-GPI - Anti-β2-glicoproteína I. ⁽¹⁾ n = 16 pacientes.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho observou redução da reserva ovariana em mais de metade das mulheres com SAFP.

A avaliação da reserva ovariana foi feita de forma rigorosa e com os melhores métodos disponíveis atualmente. Todos os exames foram realizados na fase folicular inicial, quando as concentrações séricas de FSH, LH, estradiol e HAM, bem como a CFA, apresentam menor variabilidade inter e intraciclo menstrual^{64,65}. Além disso, como a maioria das pacientes com SAFP estavam em uso de progestagênios isolados contínuos, principalmente o acetato de medroxiprogesterona trimestral, que tem capacidade de bloqueio do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano por longo período, adotou-se o cuidado de suspender o uso de hormônios exógenos por no mínimo seis meses e de aguardar, também, o retorno de duas menstruações consecutivas. Assim, estas duas condições, tempo e menstruação, remeteram-nos a uma atividade ovariana normal e, portanto, a um valor fidedigno de todos os hormônios, inclusive do HAM⁶⁶⁻⁶⁹.

Este critério criou a principal restrição na seleção de nossa população. As pacientes com SAFP, que tinham risco aumentado de sangramento uterino e ovariano⁷⁰, tiveram que ser excluídas do estudo. Apesar de refletir em segurança (não houve nenhuma complicação hemorrágica ou gestação neste período), houve uma taxa de participação de 42% que, quando associada à baixa frequência da SAFP, resultou em uma amostra reduzida, a maior limitação do estudo.

Aproximadamente 50% das pacientes com SAFP tiveram redução da CFA e do HAM. Apesar deste achado ter sido estatisticamente significativo quando se utilizou o primeiro método, não foi discrepante do encontrado com o segundo. Houve forte correlação entre a CFA e o HAM, bem como tendência a significância estatística quando a reserva era classificada de acordo com o HAM em todos os valores de corte (reduzido, baixo ou muito baixo). No entanto, uma possibilidade para explicar tal achado é a característica da CFA de avaliar folículos em um estágio mais avançado de desenvolvimento, sendo, talvez, mais sensíveis a alterações da microvascularização ovariana. Atualmente, diante do alto custo e baixa disponibilidade do HAM, a CFA é o método mais viável no seguimento destas pacientes.

A reserva ovariana em doenças autoimunes crônicas pode ser influenciada por fatores como idade, tabagismo, eventos trombóticos, ooforite, medicações e genética⁷¹⁻⁷³. No presente estudo, a idade e o tabagismo provavelmente não influenciaram os achados, pois os grupos SAFP e controle eram semelhantes nestes parâmetros.

A trombose ovariana não foi diagnosticada em nenhuma de nossas pacientes, apesar desta manifestação ser raramente descrita⁴³. Uma possibilidade para explicar a menor reserva é a existência de disfunção endotelial subclínica ovariana. A distribuição periférica dos folículos primordiais torna-os mais suscetíveis à isquemia microvascular. Esta possibilidade foi aventada em homens com SAFP e SAF relacionada ao LES acompanhados em nosso serviço, nos quais se encontraram alterações morfofuncionais penianas^{74,75}.

A ooforite autoimune parece não ter influenciado os resultados obtidos, ao contrário do que foi observado em mulheres com LES e anti-CoL positivo⁵⁶. Em nossa casuística, embora o anti-CoL tenha sido encontrado apenas em mulheres com SAFP, não houve associação entre este autoanticorpo e o patrimônio folicular. Anticorpos direcionados a células foliculares pré-ovulatórias, e não ao corpo lúteo, têm maior chance de comprometer a reserva ovariana e merecem ser estudados. Estes achados estão em concordância com outros trabalhos da Disciplina de Reumatologia, Unidade de Reumatologia Pediátrica do Instituto da Criança e Divisão de Clínica Urológica da FMUSP, que observaram que anticorpos antiespermatozóides não estiveram associados a anormalidades espermáticas em homens com SAFP, SAF associado ao LES e LES⁷⁴⁻⁷⁸.

O tratamento da SAFP, baseado na anticoagulação crônica, não está relacionado à redução da reserva ovariana. Ao contrário do que ocorre com outras doenças autoimunes, nossas pacientes não usavam drogas imunossupressoras como ciclofosfamida^{71-73,79} e glicocorticosteróides⁸⁰, que podem induzir perda de folículos ovarianos.

A presença de maior número de partos no grupo SAFP quando comparadas ao controle foi, provalvemente, uma consequência da morbidade gestacional associada à síndrome¹. A maior frequência de mulheres nuligestas no grupo controle pode refletir uma seleção não intencional de mulheres interessadas na avaliação de sua capacidade reprodutiva. Este grupo, constituído de mulheres de fertilidade desconhecida, fortaleceu nosso achado de menor reserva ovariana em pacientes com SAFP. Uma população

sabidamente fértil traria um viés importante e teria favorecido uma diferença ainda mais significativa, porém, irreal.

Portanto, diante de uma doença que compromete a vida da mulher em diversos aspectos, o aconselhamento reprodutivo e planejamento familiar são essenciais e devem estar presentes na prática clínica.

6 CONCLUSÕES

1. Em mulheres com síndrome antifosfolípide primária, os marcadores de reserva ovariana foram mais baixos do que nos controles;
2. Não houve associação entre marcadores de reserva ovariana e dados demográficos, história ginecológica e características clínicas e laboratoriais;
3. Não houve associação entre marcadores de reserva ovariana e tipos específicos de anticorpos antifosfolípidos;
4. Não houve associação entre marcadores de reserva ovariana e anticorpo anti-corpo lúteo.

7 ANEXOS

Anexo A – Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO..... Nº: APTO:

BAIRRO:..... CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:..... SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA, DO ANTICORPO ANTI-CORPO LÚTEO, DA FUNÇÃO SEXUAL, DA QUALIDADE DE VIDA E DE INFECÇÕES DO TRATO GENITAL INFERIOR EM MULHERES ADULTAS COM SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDE PRIMÁRIA”.

2. PESQUISADOR: Dr. Lucas Yugo Shiguehara Yamakami

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente da Disciplina de Ginecologia

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 112.079

UNIDADE DO HC-FMUSP: Disciplina de Ginecologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos.

1. **Desenho do estudo e objetivo(s):** Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. Temos como objetivo avaliar o funcionamento dos seus ovários e a presença de alterações no exame ginecológico devido à presença da Síndrome Antifosfolípide e os tratamentos aos quais a Senhora foi submetida.
2. A Síndrome Antifosfolípide é diagnosticada quando detectamos que o corpo produz substâncias de defesa (anticorpos) que agredem ele mesmo. Além disso, devem estar presentes sintomas associado à ação destes anticorpos, como trombozes, ou seja, obstrução dos vasos por sangue coagulado, ou problemas na gravidez, como abortamentos de repetição, óbito ou sofrimento do bebê antes do parto.
3. A senhora será submetida à avaliação do funcionamento dos seus ovários, bem como avaliação de seu colo do útero, e responderá a questionários. Para isto serão feitos exames pelo ginecologista, incluindo o exame de Papanicolau e ultra-sonografia pélvica transvaginal e coleta de sangue no Laboratório Central e no Centro de Dispensação de Medicação de Alto Custo (CEDMAC) do Hospital das Clínicas.
4. **Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos:** A senhora realizará um exame ginecológico de rotina, em um local reservado, no Ambulatório de Ginecologia do Hospital das Clínicas. Os riscos relacionados ao exame ginecológico são mínimos, idênticos aos que a Senhora está exposta durante o exame ginecológico de rotina. Também será coletado 32 mL de sangue venoso (veia periférica) para realização de exames, o qual também tem riscos mínimos, sendo o principal à presença de um hematoma no local da coleta de sangue, que desaparecerá com o tempo. O exame ultra-sonográfico será realizado por um médico experiente com risco e desconforto mínimos.
5. **Benefícios para o participante:** Em caso da senhora apresentar alterações no exame ginecológico será acompanhada e tratada por Ginecologista do HCFMUSP, além de manter acompanhamento reumatológico no mesmo hospital.

6. **Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos:** Caso sejam encontradas alterações nos ovários ou no exame de Papanicolau, a senhora será acompanhada no Serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas. Além de orientações para a senhora que gostaria de ter filhos no futuro.
7. **Garantia de acesso:** em qualquer etapa do estudo, a senhora terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Dr. Lucas Yugo S. Yamakami**, que pode ser encontrado no endereço **Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647 CEP 05403-900 – São Paulo- SP** Telefone(s) 3069-7621. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br
8. **É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento:** A senhora pode deixar o estudo em qualquer época e continuará a ter o seu tratamento no Hospital das Clínicas.
9. **Direito de confidencialidade:** Neste estudo não será divulgado o nome da senhora e as informações do estudo serão analisadas em conjunto com todos os pacientes.
10. **Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas:** A senhora será comunicada de todos os seus exames realizados.
11. **Despesas e compensações:** A senhora não terá nenhuma despesa com exames e consultas e não receberá dinheiro com sua participação
12. **Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos:** A senhora tem direito a tratamento médico no Hospital das Clínicas do HC-FMUSP.

Acredito ter sido informado a respeito do estudo **“AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA, DO ANTICORPO ANTI-CORPO LÚTEO, DA FUNÇÃO SEXUAL, DA QUALIDADE DE VIDA E DE INFECÇÕES DO TRATO GENITAL INFERIOR EM MULHERES ADULTAS COM SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDE PRIMÁRIA”** e que li ou que foram lidas para mim todas as informações. Eu discuti com o **Dr. Lucas Yugo S. Yamakami**, com o **Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva** e com o **Dr. Daniel Brito de Araújo** sobre a minha decisão e concordo em participar nesse estudo.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Anexo B – Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28/04/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0051/10**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA, DO ANTICORPO ANTI-CORPO LÚTEO, DA FUNÇÃO SEXUAL E DE INFECÇÕES DO TRATO GENITAL INFERIOR EM MULHERES ADULTAS COM SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDE PRIMÁRIA"** apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva, Dr. Paulo Serafini, Dr. Jozéllo Freire de Carvalho**

Pesquisador (a) Executante: **Lucas Yugo Shiguehara Yamakami, Daniel Brito de Araújo**

CAPPesq, 29 de Abril de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa

Anexo C – Formulário da Associação Brasileira de Anunciantes e Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercados

CLASSE SÓCIO-ECONÔMICA ABA-ABIPEMI

A. Quem é o chefe da família na sua casa? () o próprio entrevistado () outros

B. Qual foi o último ano da escola que o chefe da família cursou?

Grau de instrução máximo	Pontos
Não estudou ou primário incompleto	0
Primário completo ou ginásio incompleto	05
Ginásio completo ou colegial incompleto	10
Colegial incompleto ou universitário incompleto	15
Universitário completo	21

C. Na sua casa tem?

Aparelho de vídeo cassete () não () sim (10 pontos)

Máquina de lavar roupas () não () sim (08 pontos)

Geladeira () não () sim (07 pontos)

Aspirador de pó () não () sim (06 pontos)

D. Quantos (cada item abaixo) existem em sua casa?

Item	Nenhum	1	2	3	4	5	6 ou +
Carros	0	4	9	13	18	22	26
TV em cores	0	4	7	11	14	18	22
Banheiros	0	2	5	7	10	12	15
Empregada mensalista	0	5	11	16	21	26	32
Rádio	0	2	3	5	6	8	9

Total de Pontos:

8 REFERÊNCIAS

1. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1309-11.
2. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006;4:295-306.
3. Pasquali JL, Poindron V, Korganow AS, Martin T. The antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22:831-45.
4. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost.* 1995;74:1185-90.
5. Zhang J, McCrae KR. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Blood.* 2005;105:1964-9.
6. Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, et al. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood.* 2005;106:2340-6.
7. Lutters BC, Derksen RH, Tekelenburg WL, Lenting PJ, Arnout J, de Groot PG. Dimers of beta 2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2'. *J Biol Chem.* 2003;278:33831-8.

8. Cesarman-Maus G, Ríos-Luna NP, Deora AB, Huang B, Villa R, Cravioto MeC, et al. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2006;107:4375-82.
9. Salmon JE, de Groot PG. Pathogenic role of antiphospholipid antibodies. *Lupus*. 2008;17:405-11.
10. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012;98:1407-15.
11. Speroff L, Fritz MA. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005.
12. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev*. 2009;30:465-93.
13. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*. 2002;8:141-54.
14. Schmidt KL, Byskov AG, Nyboe Andersen A, Müller J, Yding Andersen C. Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries. *Hum Reprod*. 2003;18:1158-64.
15. Lambalk CB, de Koning CH, Flett A, Van Kasteren Y, Gosden R, Homburg R. Assessment of ovarian reserve. Ovarian biopsy is not a valid method for the prediction of ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2004;19:1055-9.
16. Yamakami LYS, Alkimi R, Izzo CR, Serafini P, Baracat EC. Avaliação da Reserva Ovariana em Técnicas de Reprodução Assistida. *JBRA Assist Reprod*. 2010;14:39-42.
17. Scott RT, Hofmann GE, Oehninger S, Muasher SJ. Intercycle variability of day 3 follicle-stimulating hormone levels and its effect on stimulation quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1990;54:297-302.

18. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Lambalk CB, Schoemaker J. Intercycle variability of ovarian reserve tests: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod.* 2004;19:590-5.
19. Bancsi LF, Broekmans FJ, Mol BW, Habbema JD, te Velde ER. Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2003;79:1091-100.
20. Fanchin R, Taieb J, Lozano DH, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod.* 2005;20:923-7.
21. Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, et al. Dynamic assays of inhibin B, anti-Mullerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod.* 2005;20:3178-83.
22. Hall JE, Welt CK, Cramer DW. Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod.* 1999;14:409-15.
23. McIlveen M, Skull JD, Ledger WL. Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Hum Reprod.* 2007;22:778-85.
24. Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG.* 2005;112:1384-90.

25. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, et al. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod.* 2002;17:3065-71.
26. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Themmen A, de Jong F, Lambalk C. Evaluation of anti-Müllerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2008;90:737-43.
27. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Anti-Müllerian hormone (AMH) defines, independent of age, low versus good live-birth chances in women with severely diminished ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2010;94:2824-7.
28. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. A prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril.* 2010;93:855-64.
29. La Marca A, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod.* 2006;21:3103-7.
30. Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, Te Velde ER, Broekmans FJ. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril.* 2005;83:291-301.
31. Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW, te Velde ER, Broekmans FJ. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril.* 2007;87:764-75.
32. Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a

- prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2002;77:328-36.
33. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Looman CW, Blankenstein M, Fauser BC, te Jong FH, et al. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod*, 2003;18:700-6.
 34. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, Habbema JD, Looman CW, Te Velde ER. Quantitative transvaginal two- and three-dimensional sonography of the ovaries: reproducibility of antral follicle counts. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2002;20:270-5.
 35. Frattarelli JL, Levi AJ, Miller BT, Segars JH. A prospective assessment of the predictive value of basal antral follicles in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2003;80:350-5.
 36. Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Impact of repeated antral follicle counts on the prediction of poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004;81:35-41.
 37. Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Expected poor responders on the basis of an antral follicle count do not benefit from a higher starting dose of gonadotrophins in IVF treatment: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2005;20:611-5.
 38. Mercé LT, Gómez B, Engels V, Bau S, Bajo JM. Intraobserver and interobserver reproducibility of ovarian volume, antral follicle count, and vascularity indices obtained with transvaginal 3-dimensional ultrasonography, power Doppler angiography, and the virtual organ computer-aided analysis imaging program. *J Ultrasound Med*. 2005;24:1279-87.
 39. Järvelä IY, Sladkevicius P, Kelly S, Ojha K, Campbell S, Nargund G. Quantification of ovarian power Doppler signal with three-dimensional

- ultrasonography to predict response during in vitro fertilization. *Obstet Gynecol.* 2003;102:816-22.
40. Lim W, Crowther MA. Antiphospholipid antibodies: a critical review of the literature. *Curr Opin Hematol.* 2007;14:494-9.
 41. Bakalov VK, Anasti JN, Calis KA, Vanderhoof VH, Premkumar A, Chen S, et al. Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 2005;84:958-65.
 42. La Marca A, Brozzetti A, Sighinolfi G, Marzotti S, Volpe A, Falorni A. Primary ovarian insufficiency: autoimmune causes. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010;22:277-82.
 43. André M, Delèvaux I, Amoura Z, Corbi P, Courthaliac C, Aumaître O, et al. Ovarian vein thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 2004;50:183-6.
 44. Araújo DB. *Avaliação da reserva ovariana e do anticorpo anti-corpo lúteo em mulheres adultas com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância* [TESE]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.
 45. Laskari K, Zintzaras E, Tzioufas AG. Ovarian function is preserved in women with severe systemic lupus erythematosus after a 6-month course of cyclophosphamide followed by mycophenolate mofetil. *Clinical and Experimental Rheumatology.* 2010;28:83-6.
 46. Boumpas DT, Austin HA, 3rd, Vaughan EM, Yarboro CH, Klippel JH, Balow JE. Risk for sustained amenorrhea in patients with systemic lupus erythematosus receiving intermittent pulse cyclophosphamide therapy. *Ann Intern Med.* 1993;119:366-9.

47. Mok CC, Chan PT, To CH. Anti-müllerian hormone and ovarian reserve in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2013;65:206-10.
48. Lawrenz B, Henes J, Henes M, Neunhoeffler E, Schmalzing M, Fehm T, et al. Impact of systemic lupus erythematosus on ovarian reserve in premenopausal women: evaluation by using anti-Muellerian hormone. *Lupus.* 2011;20:1193-7.
49. Brunner HI, Bishnoi A, Barron AC, Houk LJ, Ware A, Farhey Y, et al. Disease outcomes and ovarian function of childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2006;15:198-206.
50. Tong ZB, Nelson LM. A mouse gene encoding an oocyte antigen associated with autoimmune premature ovarian failure. *Endocrinology.* 1999;140:3720-6.
51. Pires ES, Meherji PK, Vaidya RR, Parikh FR, Ghosalkar MN, Khole VV. Specific and sensitive immunoassays detect multiple anti-ovarian antibodies in women with infertility. *J Histochem Cytochem.* 2007;55:1181-90.
52. Kelkar RL, Meherji PK, Kadam SS, Gupta SK, Nandedkar TD. Circulating auto-antibodies against the zona pellucida and thyroid microsomal antigen in women with premature ovarian failure. *J Reprod Immunol.* 2005;66:53-67.
53. Falorni A, Laureti S, Candeloro P, Perrino S, Coronella C, Bizzarro A, et al. Steroid-cell autoantibodies are preferentially expressed in women with premature ovarian failure who have adrenal autoimmunity. *Fertil Steril.* 2002;78:270-9.
54. Coulam CB, Kempers RD, Randall RV. Premature ovarian failure: evidence for the autoimmune mechanism. *Fertil Steril.* 1981;36:238-40.
55. Tsigkou A, Marzotti S, Borges L, Brozzetti A, Reis F, Candeloro P, et al. High serum inhibin concentration discriminates autoimmune oophoritis from

- other forms of primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:1263-9.
56. Pasoto SG, Viana VS, Mendonca BB, Yoshinari NH, Bonfa E. Anti-corpus luteum antibody: a novel serological marker for ovarian dysfunction in systemic lupus erythematosus? *J Rheumatol.* 1999;26:1087-93.
 57. Cabral de Sousa D, das Chagas Medeiros MM, Trindade Viana VS, Salani Mota RM. Anti-corpus luteum antibody and menstrual irregularity in patients with systemic lupus erythematosus and Hashimoto's thyroiditis. *Lupus.* 2005;14:618-24.
 58. Almeida PM, Whickerrhauser H. Critério de classe econômica da Associação Brasileira de Anunciantes (ABA) e Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercado (ABIPEME). In: Almeida PM, Wickerrhauser H, editores. *O critério ABA/ABIPEME, ABIPEME.* São Paulo; 1991. p1-29.
 59. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis.* 1987;46:1-6.
 60. Kurata N, Tan EM. Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum.* 1976;19:574-80.
 61. Elkon KB, Culhane L. Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with the sicca syndrome and lupus erythematosus. *J Immunol.* 1984;132:2350-6.
 62. Esposito MA, Coutifaris C, Barnhart KT. A moderately elevated day 3 FSH concentration has limited predictive value, especially in younger women. *Hum Reprod.* 2002;17:118-23.

63. Kahapola Arachchige KM, Wardrop R, Lim EM, Stuckey B, Hadlow N. Waiting for an elevated FSH--too late a marker of reduced ovarian reserve? *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2012;52:460-4.
64. Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, Kretschmer R, Birkhäuser MH. Statistically significant changes of antimüllerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women. *Fertil Steril.* 2008;89:927-33.
65. Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME. Serum müllerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril.* 2000;73:859-61.
66. Kallio S, Puurunen J, Ruukonen A, Vaskivuo T, Piltonen T, Tapanainen JS. Antimüllerian hormone levels decrease in women using combined contraception independently of administration route. *Fertil Steril.* 2013;99:1305-10.
67. Kristensen SL, Ramlau-Hansen CH, Andersen CY, Ernst E, Olsen SF, Bonde JP, et al. The association between circulating levels of antimüllerian hormone and follicle number, androgens, and menstrual cycle characteristics in young women. *Fertil Steril.* 2012;97:779-85.
68. Fábregues F, Castelo-Branco C, Carmona F, Guimerá M, Casamitjana R, Balasch J. The effect of different hormone therapies on anti-müllerian hormone serum levels in anovulatory women of reproductive age. *Gynecol Endocrinol.* 2011;27:216-24.
69. Arbo E, Vetori DV, Jimenez MF, Freitas FM, Lemos N, Cunha-Filho JS. Serum anti-mullerian hormone levels and follicular cohort characteristics after pituitary suppression in the late luteal phase with oral contraceptive pills. *Hum Reprod.* 2007;22:3192-6.
70. Yamakami LY, de Araujo DB, Silva CA, Baracat EC, de Carvalho JF. Severe hemorrhagic corpus luteum complicating anticoagulation in antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2011;20:523-6.

71. Silva CA, Bonfa E, Østensen M. Maintenance of fertility in patients with rheumatic diseases needing antiinflammatory and immunosuppressive drugs. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62:1682-90.
72. Silva CA, Brunner HI. Gonadal functioning and preservation of reproductive fitness with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16:593-9.
73. Aikawa NE, Sallum AM, Leal MM, Bonfá E, Pereira RM, Silva CA. Menstrual and hormonal alterations in juvenile dermatomyositis. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28:571-5.
74. Rabelo-Júnior CN, Freire de Carvalho J, Lopes Gallinaro A, Bonfá E, Cocuzza M, Saito O, Silva CA. Primary antiphospholipid syndrome: morphofunctional penile abnormalities with normal sperm analysis. *Lupus*. 2012;21:251-6.
75. Rabelo-Júnior CN, Bonfá E, Carvalho JF, Cocuzza M, Saito O, Abdo CH, Silva CA. Penile alterations with severe sperm abnormalities in antiphospholipid syndrome associated with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2013;32:109-13.
76. Silva CA, Hallak J, Pasqualotto FF, Barba MF, Saito MI, Kiss MH. Gonadal function in male adolescents and young males with juvenile onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2002;29:2000-5.
77. Soares PM, Borba EF, Bonfa E, Hallak J, Corrêa AL, Silva CA. Gonad evaluation in male systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007;56:2352-61.
78. Suehiro RM, Borba EF, Bonfa E, Okay TS, Cocuzza M, Soares PM, Silva CA. Testicular Sertoli cell function in male systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47:1692-7.
79. Aikawa NE, Sallum AM, Pereira RM, Suzuki L, Viana VS, Bonfá E, Silva CA. Subclinical impairment of ovarian reserve in juvenile systemic lupus

erythematosus after cyclophosphamide therapy. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30:445-9.

80. Silva CA, Deen ME, Febrônio MV, Oliveira SK, Terreri MT, Sacchetti SB, et al. Hormone profile in juvenile systemic lupus erythematosus with previous or current amenorrhea. *Rheumatol Int*. 2011;31:1037-43.

Apêndice

Publicações do autor relacionadas à Tese:

“Ovarian reserve in women with primary antiphospholipid syndrome”

Submetido à revista *Human Reproduction*

“Severe hemorrhagic corpus luteum complicating anticoagulation in antiphospholipid syndrome”

Publicado na revista *Lupus*

“Avaliação da Reserva Ovariana em Técnicas de Reprodução Assistida”

Publicado na revista *JBRA Assisted Reproduction*

Draft Manuscript For Review. Reviewers should submit their review at
<http://mc.manuscriptcentral.com/humrep>

OVARIAN RESERVE IN WOMEN WITH PRIMARY ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME

Running title: Ovarian reserve in PAPS

Journal:	<i>Human Reproduction</i>
Manuscript ID:	HUMREP-13-0601
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	14-May-2013
Complete List of Authors:	Yamakami, Lucas; Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Department of Gynecology Serafini, Paulo; Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Department of Gynecology Araujo, Daniel; Hospital do Servidor Público Estadual de Sao Paulo, Department of Rheumatology Bonfá, Eloisa; Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Division of Rheumatology Leon, Elaine; Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Division of Rheumatology Baracat, Edmund; Medical School, University of São Paulo, Department of Gynecology Silva, Clovis; Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Division of Rheumatology; Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Pediatric Rheumatology Unit
Keywords:	Antiphospholipid syndrome, anti-Müllerian hormone, antral follicle count, OVARIAN RESERVE, autoimmune diseases
Specialty:	Reproductive Endocrinology

SCHOLARONE™
Manuscripts

**OVARIAN RESERVE IN WOMEN WITH PRIMARY ANTIPHOSPHOLIPID
SYNDROME**

Running title: Ovarian reserve in PAPS

Lucas Y. S. Yamakami^{1*}, Paulo C. Serafini¹, Daniel B. de Araujo^{2,3}, Eloisa Bonfá²,
Elaine P. Leon², Edmund C. Baracat¹, Clovis A. Silva^{2,4*}

¹Department of Gynecology, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo,
Sao Paulo, Brazil

²Division of Rheumatology, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Sao
Paulo, Brazil

³Department of Rheumatology, Hospital do Servidor Público Estadual de Sao Paulo,
Sao Paulo, Brazil.

⁴Pediatric Rheumatology Unit, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo,
Sao Paulo, Brazil

Disclosure statement: The authors have no conflicts of interest

*Paulo C. Serafini and Clovis A. Silva contributed equally to this work

Corresponding author:

Lucas Yugo Shiguehara Yamakami

23 Departamento de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
24 USP.
25 Avenida Doutor Enéas Carvalho de Aguiar, 255, 10º andar ICHC. Cerqueira Cesar –
26 São Paulo – SP – Brazil, 05403-000. TEL: 00 55 11 2661-6647, e-mail:
27 lucas.yamakami@gmail.com

28 **Extended Abstract**

29

30 **Study question:** Is ovarian reserve decreased in women with primary antiphospholipid
31 syndrome (PAPS)?

32 **Summary answer:** More than 50% of women suffering from PAPS had diminished
33 ovarian reserve.

34 **What is known already:** Diminished ovarian reserve was reported in adult systemic
35 lupus erythematosus (SLE), juvenile dermatomyositis and juvenile SLE. However, there
36 is no data assessing this abnormality in PAPS patients.

37 **Study design, size, duration:** In this cross sectional study, we have screened 85
38 female patients between 18 to 40 years old with APS, from April 2010 to March 2013.
39 After exclusion of 67 patients due to concomitant autoimmune diseases (n=42),
40 contraindication or unwillingness to stop hormonal contraceptive (n=21), current
41 pregnancy or breastfeeding (n=3) and previous ovarian surgery (n=1), 18 PAPS
42 patients and 24 healthy controls were evaluated.

43 **Participants/materials, setting, methods:** Ovarian reserve tests – follicle stimulating
44 hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol, anti-Müllerian hormone (AMH) and
45 antral follicle count (AFC) – were performed at early follicular phase (menstrual cycle
46 day 2 through 4). Hormonal contraceptive were withdrawn for at least six months and
47 two consecutive menstruations before evaluation. Ovarian anti-corpus luteum antibody
48 (anti-CoL) was done by immunoblot. Demographic features, gynecological history and
49 PAPS data were also analyzed. Data were compared by t-test and Mann–Whitney test
50 in continuous variables and by Fisher's exact test in categorical variables.

Main results and the role of chance: The mean of current age was comparable in PAPS and controls (33.0 ± 5.0 vs. 30.4 ± 7.0 years; $p=0.189$). Arterial thrombosis, venous thrombosis and pregnancy morbidity were observed in 17%, 83% and 33% of the PAPS patients. Lupus anticoagulant, anticardiolipin and anti- $\beta 2$ -GPI were detected in 67%, 83% and 11% of these patients. Regarding ovarian reserve tests, the frequencies of low AFC (≤ 10) and very low AFC (≤ 5) were significantly higher in PAPS patients than controls (56% vs. 22%, $p=0.042$; 37% vs. 9%, $p=0.045$). Trends of higher frequencies of reduced (<1.0 ng/mL), low (<0.5 ng/mL) and negligible (<0.2 ng/mL) AMH levels were found PAPS patients ($p=0.08$; $p=0.07$ and $p=0.07$; respectively). FSH, LH and estradiol were similar in PAPS patients and controls. Anti-CoL was solely observed in two PAPS patients (11% vs. 0%; $p=0.177$).

Limitations, reasons for caution: The limited number of patients, due to rigorous inclusion criteria and the low frequency of PAPS.

Wider implications of the findings: The present study identifies increased risk of low ovarian reserve in PAPS patients reinforcing fertility counseling and future family planning in this population.

Study funding/competing interest(s): This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 11/12471-2 to CAS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ #301411/2009-3 to EB and #302724/2011-7 to CAS), Federico Foundation (to EB and CAS) and Núcleo de Apoio à Pesquisa “Saúde da Criança e do Adolescente” da USP (NAP-CriAd) to CAS.

73 **Keywords:** Antiphospholipid syndrome, autoimmune diseases, anti-Müllerian hormone,
74 antral follicle count, ovarian reserve test.

Introduction

Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune thrombophilic condition that occurs associated with other autoimmune diseases, particularly systemic lupus erythematosus (SLE), or may be isolated condition, known as primary APS (PAPS) (Wilson *et al.*, 1999). Female PAPS patients have increased risk of pregnancy complications and there are concerns about other impacts on their reproductive health (Lim and Crowther, 2007; Wilson *et al.*, 1999).

Aging, smoking and surgery have been found to influence the quantity and quality of primordial follicles in ovaries and, ultimately, the ovarian reserve (Broekmans *et al.*, 2009; The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2012). Other conditions such as autoimmune oophoritis (Bakalov *et al.*, 2005; La Marca *et al.*, 2010), ovarian ischemia (Atabekoğlu *et al.*, 2012; Hehenkamp *et al.*, 2007) and haemorrhage (Yamakami *et al.*, 2011) may also result in diminished ovarian reserve. Female PAPS are susceptible to these complications but there is no systematic study assessing this ovary abnormality in these patients.

Therefore, we have performed a complete assessment of ovarian reserve, including hormonal profile and ovarian ultrasound, in PAPS patients and healthy controls and its possible association anti-corpus luteum antibody (anti-CoL).

Patients and Methods

Patients and controls

We have screened 85 female patients between 18 to 40 years old with APS. Exclusion criteria were current pregnancy or breastfeeding, unwillingness or contraindication (i.e. increased risk of ovarian bleeding) to stop hormonal contraceptive, previous ovarian surgery, previous chemotherapy or pelvic radiotherapy, current use of gonadotropin release hormone agonist (GnRH-a), presence of an additional autoimmune disease and end-stage renal disease, and those who declined to participate in the study. Of the 85 patients, 67 patients were excluded due to association with other autoimmune diseases (n=42), contraindication or unwillingness to stop hormonal contraceptive (n=21), current pregnancy or breastfeeding (n=3) and previous ovarian surgery (n=1). Therefore, a cross sectional study was conducted in 18 PAPS (Wilson *et al.*, 1999) patients regularly followed at Antiphospholipid Outpatient Clinic of the Rheumatology Division of Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo from April 2010 to March 2013. Control group included 24 healthy volunteers recruited in primary care services according to the same inclusion and exclusion criteria. All participants who were using hormonal contraceptive agreed to stop it for at least six months and at least two consecutive menstruations.

Demographic data, PAPS manifestations and treatment

Patient's medical records were carefully reviewed concerning clinical, immunological and treatment findings. PAPS manifestations were defined as: vascular thrombosis (one or more clinical episodes of arterial, venous or small vessel thrombosis in any tissue or organ) or pregnancy morbidity (fetal death, premature birth before 34th week of gestation because eclampsia, severe pre-eclampsia or placental insufficiency

or three or more consecutive spontaneous abortions) (Wilson *et al.*, 1999). All patients were in long-term warfarin treatment. Brazilian socio-economic stratification was carried out according the *Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercados* criteria (Almeida PM and Wickerrhauser H, 1991). Body mass index (BMI) was defined by weight in kilograms/height in meters² (kg/m²).

Gynecologic evaluation

Age at menarche and time between menarche and current age were evaluated. Obstetric data were recorded based on individual's recollection and medical records reviewing.

Ovarian Reserve Tests

Blood samples were drawn by venipuncture in the early follicular phase (menstrual cycle day 2 through 4). All sera were processed in a centrifuge and stored at -70°C until analysis. FSH (reference levels: 3.5-12.5 IU/L), luteinizing hormone (LH) (reference levels: 2.4-12.6 IU/L) and estradiol (reference levels: ≤ 166 pg/mL) were measured by radioimmunoassay using a commercial kit (Cobas®, Roche, Mannheim, Germany). Intra and inter-assay coefficients of variation were recommended by the manufacturer and were limited to 5.7 and 3.6%, respectively. FSH were considered elevated when levels were equal or greater than 10 IU/L (Esposito *et al.*, 2002; Kahapola Arachchige *et al.*, 2012; The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2012).

AMH was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (AMH Gen II ELISA, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) in duplicated samples. Intra and inter-assay coefficients of variation were limited to 5.4% and 5.6%, respectively. AMH levels were classified by cutoff values: lower than 1.0 ng/mL (reduced), lower than 0.5 ng/mL (low) and lower than 0.2 ng/mL (negligible) (Gleicher *et al.*, 2010; Jayaprakasan *et al.*, 2010).

All participants underwent transvaginal ultrasound to determine AFC and mean ovarian volume on the same day of blood drawn. Transvaginal ultrasound was not performed in women who have not been engaged on vaginal intercourse. All ultrasound measurements were performed by skilled reproductive specialist (LYSY) using a 6.5 MHz endovaginal transducer (HD3, Philips Ultrasound, Bothell, WA, USA) blinded to women diagnosis and blood tests results. Ovaries were scanned in axial and longitudinal planes, and at least two measurements of length (L), width (W) and thickness (T) were obtained and used to calculate ovarian volume, using the formula of an ellipsoid ($L \times W \times T \times 0.523$). Mean ovarian volume of each woman was then calculated. Two perpendicular measurements of follicles were carried out to calculate the mean follicular diameter. Follicles measuring 2 to 10 mm in both ovaries were added for the AFC (Hendriks *et al.*, 2007; The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2012). AFC levels were divided in a clinically suitable classification as: equal to or lower than 10 but greater than 5 follicles (low) and lower than 5 follicles (very low) (Jayaprakasan *et al.*, 2010).

Detection of anti-CoL and other autoantibodies

Determination of patients' and controls' serum samples to the 67 kDa protein from corpus luteum was evaluated by immunoblotting as described previously (Pasoto *et al.*, 1999). Briefly, crude tissue and cell extracts obtained from bovine corpus luteum (100 mg/well) were submitted to polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing and reducing conditions (β 2-mercaptoethanol SDS-PAGE). Proteins were then electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane. Membrane strips were further incubated with blocking buffer (5% skimmed milk in PBS) and immunoprobed by incubation with serum samples diluted 1/10. Reactivity was tagged with anti-human IgG alkaline phosphatase conjugate and visualized using appropriate chromogenic substrates.

Lupus anticoagulant (LAC) was detected according to the guidelines of the International Society on Thrombosis and Hemostasis (Brandt *et al.*, 1995). Presence of anticardiolipin antibodies (aCL) and anti β 2-GPI, IgG and IgM, were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Gharavi *et al.*, 1987). Additional autoantibodies included anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) (indirect immunofluorescence using *Crithidia luciliae* substrate), anti-RNP and Sm proteins (hemagglutination assay with rabbit thymus extract).

Ethical approval

The Local Ethics Committee approved this study and an informed consent was obtained from all participants

Statistical analysis

Results were presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) or median (range) for continuous and percentage for categorical variables. Data were compared by t-test and Mann–Whitney test in continuous variables to evaluate differences among PAPS and control group. For categorical variables, differences were assessed by Fisher’s exact test. The level of significance was set at 5% ($p < 0.05$).

Results

Arterial thrombosis, venous thrombosis and pregnancy morbidity were observed in 17%, 83% and 33% of the PAPS patients. Lupus anticoagulant, anticardiolipin and anti- $\beta 2$ -GPI were detected in 67%, 83% and 11% of these patients. All PAPS patients had negative autoantibodies anti-dsDNA, anti-Sm and anti-RNP.

Table 1 includes demographic features, gynecologic history, ovarian reserve tests, and anti-CoL status in PAPS patients and controls. The mean of current age was similar between PAPS and controls (33.0 ± 5.0 vs. 30.4 ± 7.0 years old; $p = 0.189$). BMI, smoking and the remaining demographic features were similar in both groups ($p > 0.05$). The median of previous deliveries were significantly higher in PAPS patients compared to controls [1 (0-6) vs. 0 (0-2), $p = 0.02$], with a lower frequency of women that did not have pregnancy in the former group (17% vs. 54%, $p = 0.02$).

Regarding ovarian reserve tests, the frequencies of low and very low AFC were significantly higher in PAPS patients compared to controls (56% vs. 22%, $p = 0.042$; 37% vs. 9%, $p = 0.045$, respectively). Trends to higher frequencies of reduced, low and negligible AMH levels were found in PAPS patients ($p = 0.08$; $p = 0.07$ and $p = 0.07$;

respectively). FSH, LH and estradiol were similar in PAPS patients and controls ($p>0.05$). Anti-CoL was solely observed in two PAPS patients (11%vs. 0%; $p=0.177$), one presented reduced ovarian reserve (Table 1).

Discussion

To our knowledge, this is the first study to reveal that more than half of women suffering from PAPS had diminished ovarian reserve.

The main strength of this study was the use of reliable ovarian reserve markers, including AFC and serum AMH, which were obtained at early follicular phase of menstrual cycle to avoid the reported AMH levels small intra-menstrual cycle variation (Cook *et al.*, 2000; Wunder *et al.*, 2008). Also, this study required hormonal contraceptives wash out for at least 6 months and resumption of up to two consecutive menstrual cycles. These precautions were taken to obtain more consistent ovarian reserve tests results since AMH concentrations are decreased during hormonal contraceptive use (Arbo *et al.*, 2007; Kallio *et al.*, 2013; Kristensen *et al.*, 2012). The low frequency of PAPS and these restricted criteria resulted in a reduced sample size, the main limitation of the present study.

With these strict criteria we observed a reduced ovarian reserve in PAPS patient demonstrated by a significant reduction in AFC and a trend in AMH levels. The former may have the advantage to assess more developed follicles, that are, perhaps, more sensitive to changes in ovarian microvasculature.

Ovarian reserve in autoimmune chronic diseases may be influenced by age, environmental factors such as smoking, thrombosis, autoimmunity, therapy and genetic (Aikawa *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010; Silva and Brunner, 2007). Age and smoking do not seem to be a relevant factor in the present study since both groups were alike regarding these parameters, with a very low frequency of tobacco use in patients and controls. Additionally, none of our patients had clinical ovarian thrombosis, although this manifestation is rarely described in PAPS (André *et al.*, 2004), indicating the possibility of ovarian subclinical endothelial dysfunction. Indeed, the peripheral distribution of primordial follicles and ovarian blood supply makes them more susceptible to microvasculature ischemia. This subclinical abnormality may also explain the morphofunctional penile alterations observed in our male PAPS and SLE related APS patients (Rabelo-Júnior *et al.*, 2013; Rabelo-Júnior *et al.*, 2012).

Autoimmunity unlikely influenced the low ovarian reserve observed herein, which contrast with our female SLE patients that had anti-CoL associated with ovarian dysfunction (Pasoto *et al.*, 1999). Antibodies directed to pre-ovulatory follicle cells and not to corpus luteum specific antigens may have a greater impact on ovarian reserve in PAPS and deserve further study. Anti-sperm antibodies also did not contribute to sperm abnormalities in our SLE (Silva *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2007; Suehiro *et al.*, 2008), PAPS (Rabelo-Júnior *et al.*, 2012) and SLE related APS patients (Rabelo-Júnior *et al.*, 2013).

Diminished follicle ovarian pool was probably not related to PAPS therapy, since chronic anticoagulation does not affect gonadal function. Different from other autoimmune diseases, our patients did not use immunosuppressive agents, especially

cyclophosphamide (Aikawa *et al.*, 2010; Aikawa *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2010; Silva and Brunner, 2007) and glucocorticosteroids (Silva *et al.*, 2011), that may induce low ovarian reserve.

The presence of a higher parity in PAPS group is probably a consequence of the PAPS pregnancy morbidity (Wilson *et al.*, 1999). The higher frequency of “no pregnancy” in the control group may reflect an unanticipated selection of women interested in ovarian reserve assessment. Nevertheless, this control group strengthened our finding of reduced ovarian reserve in PAPS, because they were not high fertility women, which would favor a more significant difference.

In conclusion, the present report is the first to identify a high prevalence of diminished ovarian reserve in PAPS patients reinforcing fertility counseling and future family planning. Further study is necessary as to the mechanisms by which PAPS causes ovarian impairment as well as the most appropriate treatment for these patients.

Author's roles

Lucas Y. S. Yamakami contributed substantially to (1) conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, (2) draft the article and (2) final approval of the version to be published.

Paulo C. Serafini contributed substantially to (1) to conception and design, (2) revise it critically for important intellectual content and (3) final approval of the version to be published.

Daniel B. de Araujo contributed substantially to (1) conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, (2) draft the article and (2) final approval of the version to be published.

Eloisa Bonfá contributed substantially to (1) to conception and design, (2) revise it critically for important intellectual content and (3) final approval of the version to be published.

Elaine P. Leon contributed substantially to (1) acquisition of data, analysis and interpretation of data, (2) draft the article and (2) final approval of the version to be published.

Edmund C. Baracat contributed substantially to (1) to conception and design, (2) revise it critically for important intellectual content and (3) final approval of the version to be published.

Clovis A. Silva contributed substantially to (1) to conception and design, (2) revise it critically for important intellectual content and (3) final approval of the version to be published.

293 **Acknowledgements**

294

295 Our gratitude to Vilma S.T. Viana and Sandra G. Pasoto for technical support,
296 and Ulysses Doria-Filho for the statistical analysis.

297

298 **Funding:** This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa
299 do Estado de São Paulo (FAPESP # 11/12471-2 to CAS), Conselho Nacional de
300 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ #301411/2009-3 to EB and
301 #302724/2011-7 to CAS), Federico Foundation (to EB and CAS) and Núcleo de Apoio à
302 Pesquisa “Saúde da Criança e do Adolescente” da USP (NAP-CriAd) to CAS.

References

- Aikawa NE, Sallum AM, Leal MM, Bonfá E, Pereira RM and Silva CA. Menstrual and hormonal alterations in juvenile dermatomyositis. *Clin Exp Rheumatol* 2010; **28**:571-575.
- Aikawa NE, Sallum AM, Pereira RM, Suzuki L, Viana VS, Bonfá E and Silva CA. Subclinical impairment of ovarian reserve in juvenile systemic lupus erythematosus after cyclophosphamide therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2012; **30**:445-449.
- André M, Delèvaux I, Amoura Z, Corbi P, Courthaliac C, Aumaître O and Piette JC. Ovarian vein thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2004; **50**:183-186.
- Arbo E, Vetori DV, Jimenez MF, Freitas FM, Lemos N and Cunha-Filho JS. Serum anti-mullerian hormone levels and follicular cohort characteristics after pituitary suppression in the late luteal phase with oral contraceptive pills. *Hum Reprod* 2007; **22**:3192-3196.
- Atabekoğlu C, Taşkin S, Kahraman K, Gemici A, Taşkin EA, Ozmen B, Berker B and Sönmezer M. The effect of total abdominal hysterectomy on serum anti-Müllerian hormone levels: a pilot study. *Climacteric* 2012; **15**:393-397.
- Bakalov VK, Anasti JN, Calis KA, Vanderhoof VH, Premkumar A, Chen S, Furmaniak J, Smith BR, Merino MJ and Nelson LM. Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46,XX spontaneous premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2005; **84**:958-965.

- 326 Brandt JT, Triplett DA, Alving B and Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus
327 anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus
328 Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation
329 Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; **74**:1185-1190.
- 330 Broekmans FJ, Soules MR and Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical
331 consequences. *Endocr Rev* 2009; **30**:465-493.
- 332 Cook CL, Siow Y, Taylor S and Fallat ME. Serum müllerian-inhibiting substance levels
333 during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2000; **73**:859-861.
- 334 Esposito MA, Coutifaris C and Barnhart KT. A moderately elevated day 3 FSH
335 concentration has limited predictive value, especially in younger women. *Hum*
336 *Reprod* 2002; **17**:118-123.
- 337 Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA and Hughes GR. Anticardiolipin antibodies:
338 isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987; **46**:1-6.
- 339 Gleicher N, Weghofer A and Barad DH. Anti-Müllerian hormone (AMH) defines,
340 independent of age, low versus good live-birth chances in women with severely
341 diminished ovarian reserve. *Fertil Steril* 2010; **94**:2824-2827.
- 342 Hehenkamp WJ, Volkers NA, Broekmans FJ, de Jong FH, Themmen AP, Birnie E,
343 Reekers JA and Ankum WM. Loss of ovarian reserve after uterine artery
344 embolization: a randomized comparison with hysterectomy. *Hum Reprod* 2007;
345 **22**:1996-2005.
- 346 Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW, te Velde ER and Broekmans FJ. Ultrasonography as a
347 tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of
348 ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril* 2007; **87**:764-775.

- 349 Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I and Raine-Fenning N. A
350 prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-
351 dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor
352 response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2010; **93**:855-864.
- 353 Kahapola Arachchige KM, Wardrop R, Lim EM, Stuckey B and Hadlow N. Waiting for an
354 elevated FSH--too late a marker of reduced ovarian reserve? *Aust N Z J Obstet*
355 *Gynaecol* 2012; **52**:460-464.
- 356 Kallio S, Puurunen J, Ruukonen A, Vaskivuo T, Piltonen T and Tapanainen JS.
357 Antimüllerian hormone levels decrease in women using combined contraception
358 independently of administration route. *Fertil Steril* 2013; **99**:1305-1310.
- 359 Kristensen SL, Ramlau-Hansen CH, Andersen CY, Ernst E, Olsen SF, Bonde JP,
360 Vested A and Toft G. The association between circulating levels of antimüllerian
361 hormone and follicle number, androgens, and menstrual cycle characteristics in
362 young women. *Fertil Steril* 2012; **97**:779-785.
- 363 La Marca A, Brozzetti A, Sighinolfi G, Marzotti S, Volpe A and Falorni A. Primary
364 ovarian insufficiency: autoimmune causes. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010;
365 **22**:277-282.
- 366 Lim W and Crowther MA. Antiphospholipid antibodies: a critical review of the literature.
367 *Curr Opin Hematol* 2007; **14**:494-499.
- 368 Pasoto SG, Viana VS, Mendonca BB, Yoshinari NH and Bonfa E. Anti-corpus luteum
369 antibody: a novel serological marker for ovarian dysfunction in systemic lupus
370 erythematosus? *J Rheumatol* 1999; **26**:1087-1093.

- 371 Almeida PM and Wickerrhauser H. Critério de classe econômica da Associação
372 Brasileira de Anunciantes (ABA) e Associação Brasileira dos Institutos de
373 Pesquisa de Mercado (ABIPEME). In Almeida PM e Wickerrhauser H (eds) O
374 critério ABA/ABIPEME, ABIPEME. 1991. São Paulo, SP, pp. 1-29.
- 375 Rabelo-Júnior CN, Bonfá E, Carvalho JF, Cocuzza M, Saito O, Abdo CH and Silva CA.
376 Penile alterations with severe sperm abnormalities in antiphospholipid syndrome
377 associated with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2013; **32**:109-113.
- 378 Rabelo-Júnior CN, Freire de Carvalho J, Lopes Gallinaro A, Bonfá E, Cocuzza M, Saito
379 O and Silva CA. Primary antiphospholipid syndrome: morphofunctional penile
380 abnormalities with normal sperm analysis. *Lupus* 2012; **21**:251-256.
- 381 Silva CA, Bonfa E and Østensen M. Maintenance of fertility in patients with rheumatic
382 diseases needing antiinflammatory and immunosuppressive drugs. *Arthritis Care*
383 *Res (Hoboken)* 2010; **62**:1682-1690.
- 384 Silva CA and Brunner HI. Gonadal functioning and preservation of reproductive fitness
385 with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2007; **16**:593-599.
- 386 Silva CA, Deen ME, Febrônio MV, Oliveira SK, Terreri MT, Sacchetti SB, Sztajnbok FR,
387 Marini R, Quintero MV, Bica BE *et al.* Hormone profile in juvenile systemic lupus
388 erythematosus with previous or current amenorrhea. *Rheumatol Int* 2011;
389 **31**:1037-1043.
- 390 Silva CA, Hallak J, Pasqualotto FF, Barba MF, Saito MI and Kiss MH. Gonadal function
391 in male adolescents and young males with juvenile onset systemic lupus
392 erythematosus. *J Rheumatol* 2002; **29**:2000-2005.

- 393 Soares PM, Borba EF, Bonfa E, Hallak J, Corrêa AL and Silva CA. Gonad evaluation in
394 male systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007; **56**:2352-2361.
- 395 Suehiro RM, Borba EF, Bonfa E, Okay TS, Cocuzza M, Soares PM and Silva CA.
396 Testicular Sertoli cell function in male systemic lupus erythematosus.
397 *Rheumatology (Oxford)* 2008; **47**:1692-1697.
- 398 The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Testing
399 and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril*
400 2012; **98**:1407-1415.
- 401 Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R,
402 Derksen R, Harris EN, Hughes GR *et al.* International consensus statement on
403 preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of
404 an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; **42**:1309-1311.
- 405 Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, Kretschmer R and Birkhäuser MH. Statistically
406 significant changes of antimüllerian hormone and inhibin levels during the
407 physiologic menstrual cycle in reproductive age women. *Fertil Steril* 2008; **89**:927-
408 933.
- 409 Yamakami LY, de Araujo DB, Silva CA, Baracat EC and de Carvalho JF. Severe
410 hemorrhagic corpus luteum complicating anticoagulation in antiphospholipid
411 syndrome. *Lupus* 2011; **20**:523-526.

412

Table – Demographic features, gynecologic history, ovarian reserve tests, and anti-corpus luteum antibody (anti-CoL) in primary antiphospholipid syndrome (PAPS) patients and controls.

Variables	PAPS n=18	Controls n=24	p
Demographic features			
Current age, years	33.0 ± 5.0	30.4 ± 7.0	0.19
BMI, Kg/m ²	27.0 ± 5.4	24.9 ± 4.5	0.18
Smoking	6	4	1.00
Hypertension	17	4	0.30
Caucasian	67	54	0.53
Socio-economic class C or D	67	58	0.75
Gynecologic history			
Age at menarche, years	12 (9-15)	12 (11-18)	0.98
Time between menarche and current age, years	20.7 ± 5.0	17.9 ± 6.8	0.14
Parity	1 (0-6)	0 (0-2)	0.02
No pregnancy	17	54	0.02
Ovarian reserve			
FSH, IU/L	6.1 (3.8-20.1)	5.8 (2.2-14.4)	0.85
FSH ≥ 10	17	8	0.64
LH, IU/L	5.6 (1.9-9.9)	4.9 (2.1-10.6)	0.56
Estradiol, pg/mL	39 (26-75)	34 (24-128)	0.74
AMH, ng/mL	1.6 (0-4.2)	2.8 (0.1-6.6)	0.16
AMH < 1.0	44	16	0.08
AMH < 0.5	39	13	0.07
AMH < 0.2	28	4	0.07
AFC*	12.4 ± 12.3	17.3 ± 8.9	0.16
AFC ≤ 10*	56	22	0.04
AFC ≤ 5*	37	9	0.04
Mean ovarian volume, mm ³ *	5.1 (2.9-9.3)	5.1 (1.4-17.3)	0.70
Anti-CoL	11	0	0.18

Values expressed in mean ± standart deviation, median (range) or n (%). BMI - body mass index, FSH - follicle stimulating hormone, LH - luteinizing hormone, AMH - anti-Müllerian hormone, AFC - antral follicle count, *n = 16 PAPS patients and 23 controls.

CASE REPORT

Severe hemorrhagic corpus luteum complicating anticoagulation in antiphospholipid syndrome

LYS Yamakami¹, DB de Araujo^{2,3}, CA Silva^{2,4}, EC Baracat¹ and JF de Carvalho²

¹Division of Gynecology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil; ²Division of Rheumatology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil; ³Rheumatology Department, Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, Brazil; and ⁴Pediatric Rheumatology Unit, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

Antiphospholipid syndrome (APS) is a disorder of coagulation that causes thrombosis as well as pregnancy-related complications, occurring due to the autoimmune production of antibodies against phospholipid. Full anticoagulation is the cornerstone therapy in patients with thrombosis history, and this can lead to major bleeding. During a 3-year period, 300 primary and secondary APS patients were followed up at the Rheumatology Division of the authors' University Hospital. Of them, 255 (85%) were women and 180 (60%) were of reproductive age. Three of them (1%) had severe hemorrhagic corpus luteum while receiving long-term anticoagulation treatment and are described in this report. All of them were taking warfarin, had elevated international normalized ratio (>4.0) and required prompt blood transfusion and emergency surgery. Therefore, we strongly recommend that all women with APS under anticoagulation should have ovulation suppressed with either intramuscular depot-medroxyprogesterone acetate or oral desogestrel. *Lupus* (2011) **20**, 523–526.

Key words: anticoagulation; antiphospholipid syndrome; contraception; hemorrhagic corpus luteum; hemoperitoneum

Introduction

Antiphospholipid syndrome (APS) is characterized by thrombosis and/or pregnancy morbidity accompanied by the presence of antiphospholipid antibodies.¹ Although it is an autoimmune disease, the main therapy is based on long-term anticoagulation. This treatment prevents arterial and venous thrombosis and pregnancy complications; however, there is a risk of increased inadvertent bleeding.^{2–4} Of note, severe ovarian hemorrhage has been rarely described in APS patients under anticoagulation treatment.^{5–8}

During a 3-year period (January 2007 to January 2010), 300 primary and secondary APS patients were followed up at the Rheumatology Division, Hospital das Clínicas of Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Of them, 255

(85%) were women and 180 (60%) were of reproductive age and fulfilled the classification criteria for definite APS.¹ In spite of previous indication of contraceptives, three of them (1%) had severe hemorrhagic corpus luteum while receiving long-term anticoagulation treatment and are described in this report.

Case reports

Case 1

A 27-year-old patient was admitted to the emergency room (ER) with acute and severe abdominal pain. She was diagnosed with Sjögren syndrome and APS, based on xerostomia, xerophthalmia, one intrauterine fetal death, one right iliac venous thrombosis, three strokes and positive lupus anticoagulant (on two different occasions), anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies. She was treated with warfarin, chloroquine and folic acid, as well as topical treatments for Sjögren syndrome. Menstrual cycles were regular and the last period had been 10 days ago. She had not been sexually

Correspondence to: Jozélio Freire de Carvalho, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, n° 455, 3° andar, sala 3190-Cerqueira César, São Paulo-SP-Brazil, CEP 05403-010
Email: jotafo@gmail.com

Received 18 April 2010; accepted 10 August 2010

active for 4 years and no contraceptive method was used. On physical examination, she had lower abdominal and bilateral adnexal tenderness. Blood pressure was 122/84 mmHg and heart rate was 90 bpm. Blood examination showed hemoglobin 8.2 g/dl, white cell counts $15 \times 10^6/l$ and platelet count $319 \times 10^6/l$. The international normalized ratio (INR) was 4.9. Transvaginal ultrasound showed a large heterogeneous mass with a volume of 237 ml behind the uterus, continuous to the right ovary, and pelvis free fluid, leading to a diagnosis of hemorrhagic corpus luteum. The patient received four units of fresh frozen plasma; however, her hemoglobin level dropped to 6.0 g/dl. At that moment she was immediately taken to the operating room and Pfannenstiel laparotomy revealed a massive hemoperitoneum originating from both right and left ovaries. The left ovary was preserved after careful hemostasis; however, the right ovary was removed due to continuous bleeding. The postoperative recovery was uneventful and the patient was discharged with low weight heparin and progestin-only pill (desogestrel 75 µg/day).

Case 2

A 27-year-old woman was admitted to the ER with severe abdominal pain and distention. She had systemic lupus erythematosus and APS. Clinical manifestations of these diseases included vasculitis, arthritis, anemia and arterial thrombosis of the right toes. She presented positive antinuclear antibodies (1/640), and anti-double-stranded DNA(dsDNA), anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies. She was treated with warfarin, azathioprine, prednisone, calcium and vitamin D. Her menstrual cycles were irregular and her last period had been 29 days ago. She had stopped taking depot-medroxyprogesterone acetate (DMPA) last year due to weight gain. On examination, her abdomen was distended with severe lower abdominal pain and rebound tenderness. Blood pressure was 115/81 mmHg and heart rate was 130 bpm. Blood examination showed hemoglobin 8.3 g/dl, white cell counts $12 \times 10^6/l$, platelet count $444 \times 10^6/l$ and INR 4.7. Transvaginal ultrasound showed a heterogeneous mass close to the right ovary with dimensions of 120 ml and pelvis free fluid. Urinary pregnancy test was negative. The diagnosis was internal bleeding due to hemorrhagic corpus luteum of the right ovary. She received three units of fresh frozen plasma and vitamin K and was taken to the operating room. Pfannenstiel laparotomy revealed a small ruptured right ovarian cyst approximately 1.5 cm in diameter

with a single bleeding point. Hemostasis was performed and the postoperative course was uneventful. Anticoagulation with low weight heparin was started on the first postoperative day and she was discharged and continued treatment with desogestrel (75 µg/day).

Case 3

A 34-year-old patient was admitted to the ER with pelvic pain. She had positive lupus anticoagulant (twice in different intervals), antinuclear antibodies (1/1200), five spontaneous abortions and one intrauterine fetal death around the 24th week of gestation. Based on these laboratory and clinical manifestations, she was diagnosed with primary APS. She received warfarin, cyclobenzaprine, fluoxetine, hydrochlorothiazide and nifedipine. Menstrual cycles were regular and no contraceptive method was used. Physical examination revealed pale skin and abdominal tenderness with distention. Blood pressure was 93/62 mmHg and heart rate was 130 bpm. Blood examination showed INR 5.1. Hypovolemic shock was diagnosed due to severe abdominal bleeding and she was immediately taken to the operating room. Midline laparotomy was performed and showed a massive hemoperitoneum with clots of approximately 1.2 kg. There was a ruptured right ovarian cyst and oophorectomy was performed due to continuous bleeding. During surgery, the patient received fresh frozen plasma. The postoperative recovery was uneventful and anticoagulation with low weight heparin was started on the first postoperative day. She was discharged and continued treatment with desogestrel (75 µg/day).

Discussion

To the best of the authors' knowledge, this is the first study to have shown 1% prevalence of a life-threatening condition with severe hemorrhagic corpus luteum during anticoagulation treatment in a large population of APS followed in a University Hospital.

Hemorrhage is the most important complication of patients on anticoagulant treatment. Clinical studies have demonstrated an increased risk of massive bleeding by 0.3 to 0.5% per year compared with controls.⁴ Intracranial and retroperitoneal bleeding are the main sites related to severe hemorrhage. In addition, other sites are also known to be involved in hospitalization and transfusion, and a few cases could be avoided. In fact, hemorrhagic

corpus luteum is one of these cases, and occurs in women with ovulatory cycles. As APS affects especially young women of reproductive age and anticoagulant treatment is the main therapy, it represents an important risk for ovarian hemorrhage, and is infrequently reported.^{5–8}

Remarkably, the diagnosis of hemorrhagic corpus luteum was made based on clinical and ultrasound findings. The most common image is hemoperitoneum, rather than the hemorrhagic cyst itself.⁹ Interestingly, we found fluid collection with high echogenicity surrounding the uterus and adnexa when pelvic ultrasound was performed (Cases 1 and 2). Moreover, we also found a heterogeneous mass in the pelvis, which corresponded to blood clots.

In patients with APS, there is a strong relationship between the intensity of anticoagulant effect and the risk of bleeding.⁴ The goal of therapy in APS patients is to reduce recurrent thrombosis. Randomized controlled trials have demonstrated that the risk of bleeding doubled when INR was >3.0 .⁴ In our service, all patients are monitored each month and the INR sometimes, though rarely, reaches high levels (>3.0), as observed in our cases, particularly in patients who are being treated for arterial thrombotic events. Additionally, all the other 177 women were of reproductive age, were using long-term warfarin and had a mean INR of 2.80 ± 0.91 . In those 177 women, we observed severe bleeding in four patients (2.2%) with levels of INR >3.0 : gastrointestinal hemorrhage in one patient, central nervous system hemorrhage in two others and pulmonary hemorrhage in the fourth patient.

Of note, our immediate management was to perform surgical hemostasis by laparotomy, particularly in severe cases with hypovolemic shock. Therefore, laparoscopy was not indicated for our patients. However, cases have been reported in which the hemoperitoneum was reduced with suction via laparoscopy and the indicated procedures were then completed. This would seem to reduce the risk of operative bleeding.⁶

The majority of hemorrhagic ovarian cysts are detected around 2 to 4 days after ovulation and during corpus luteum formation.¹⁰ In this period, granulosa cells are invaded by capillaries, leading to intrafollicular hemorrhage. In fact, the corpus luteum has one of the highest blood flows per unit mass in the body. If the bleeding is excessive, the pressure increases and causes rupture of the follicle wall.¹⁰

Based on this mechanism, women of reproductive age during anticoagulant treatment are required to

suppress ovulation. This can be achieved by means of hormonal contraceptives. The combined pill (estrogen and progestin components), the most used method, is associated with a three to fourfold greater risk of venous thrombosis, even at low doses,^{11,12} and is contraindicated in APS patients. DMPA, given as 150 mg intramuscularly every 3 months, is an effective ovulation inhibitor and is allowed in women with high thromboembolic risk.¹³ The main adverse events associated with this drug are weight gain, irregular bleeding, amenorrhea and mood changes, which may result to the suspension of the therapy.¹⁴ In fact, one of our cases was treated with DMPA and had an adverse event. Another option to suppress ovulation is the progestin-only pill (desogestrel). In contrast to other progestin-only pills (with which ovulation occurs in 30–40% of users), desogestrel allows ovulation in only 1% of women, providing ovulation inhibition compared with DMPA and combined pills.^{15,16}

In conclusion, we report three cases of women who had serious intra-abdominal bleeding from a physiologic corpus luteum, requiring prompt transfusion and surgery. All were treated with warfarin for primary and secondary APS and had elevated INR. Therefore, we strongly recommend that all women with APS on anticoagulation treatment should suppress ovulation with either intramuscular DMPA or oral desogestrel.

Funding

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ (grants 300248/2008-3 to CAS and 300665/2009-1 to JFC) and Federico Foundation to CAS and JFC.

References

- 1 Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295–306.
- 2 Fihn SD, McDonnell M, Martin D, *et al.* Risk factors for complications of chronic anticoagulation. A multicenter study. Warfarin Optimized Outpatient Follow-up Study Group. *Ann Intern Med* 1993; 118: 511–520.
- 3 Palareti G, Leali N, Coccheri S, *et al.* Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception-cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy. *Lancet* 1996; 348: 423–428.
- 4 Schulman S, Beyth RJ, Kearon C, Levine MN. American College of Chest Physicians. Hemorrhagic complications of anticoagulant and thrombolytic treatment: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 133: 257S–298S.

- 5 Castellino G, Cuadrado MJ, Godfrey T, Khamashta MA, Hughes GR. Characteristics of patients with antiphospholipid syndrome with major bleeding after oral anticoagulant treatment. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 527–530.
- 6 Crétel E, Cacoub P, Huong DL, Gompel A, Amoura Z, Piette JC. Massive ovarian haemorrhage complicating oral anticoagulation in the antiphospholipid syndrome: a report of three cases. *Lupus* 1999; 8: 482–485.
- 7 Gupta N, Dadhwal V, Deka D, Jain SK, Mittal S. Corpus luteum hemorrhage: rare complication of congenital and acquired coagulation abnormalities. *J Obstet Gynaecol Res* 2007; 33: 376–380.
- 8 al-Sayegh FA, Ensworth S, Huang S, Stein HB, Klinkhoff AV. Hemorrhagic complications of long-term anticoagulant therapy in 7 patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1997; 24: 1716–1718.
- 9 Hertzberg BS, Kliewer MA, Paulson EK. Ovarian cyst rupture causing hemoperitoneum: imaging features and the potential for misdiagnosis. *Abdom Imaging* 1999; 24: 304–308.
- 10 McClure N, Macpherson AM, Healy DL, Wreford N, Rogers PA. An immunohistochemical study of the vascularization of the human Graafian follicle. *Hum Reprod* 1994; 9: 1401–1405.
- 11 Spitzer WO, Lewis MA, Heinemann LA, Thorogood M, MacRae KD. Third generation oral contraceptives and risk of venous thromboembolic disorders: an international case-control study. Transnational Research Group on Oral Contraceptives and the Health of Young Women. *BMJ* 1996; 312: 83–88.
- 12 Lidegaard Ø, Edstrøm B, Kreiner S. Oral contraceptives and venous thromboembolism: a five-year national case-control study. *Contraception* 2002; 65: 187–196.
- 13 Sönmezer M, Atabekoğlu C, Cengiz B, Dökmeci F, Cengiz SD. Depot-medroxyprogesterone acetate in anticoagulated patients with previous hemorrhagic corpus luteum. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2005; 10: 9–14.
- 14 Bakry S, Merhi ZO, Scalise TJ, Mahmoud MS, Fadiel A, Naftolin F. Depot-medroxyprogesterone acetate: an update. *Arch Gynecol Obstet* 2008; 278: 1–12.
- 15 Rice CF, Killick SR, Dieben T, Coelingh Bennink H. A comparison of the inhibition of ovulation achieved by desogestrel 75 micrograms and levonorgestrel 30 micrograms daily. *Hum Reprod* 1999; 14: 982–985.
- 16 Korver T, Klipping C, Heger-Mahn D, Duijkers I, van Osta G, Dieben T. Maintenance of ovulation inhibition with the 75-microg desogestrel-only contraceptive pill (Cerazette) after scheduled 12-h delays in tablet intake. *Contraception* 2005; 71: 8–13.

Copyright of *Lupus* is the property of Sage Publications, Ltd. and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

Avaliação da Reserva Ovariana em Técnicas de Reprodução Assistida

Assessment of ovarian reserve in Assisted Reproductive Technology

Lucas Yugo Shiguehara Yamakami*, Rafaela Alkimin, Carlos Roberto Izzo, Paulo Serafini, Edmund Chada Baracat

Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

São Paulo, SP, Brasil.

Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

RESUMO

A reserva ovariana é um fator determinante na fertilidade de um casal e, quando reduzida, traz consequências negativas às técnicas de reprodução assistida. Assim, métodos capazes de avaliá-la podem apresentar papel importante na conduta a ser tomada antes do tratamento. No entanto, o papel exato de cada um dos vários testes disponíveis atualmente é confuso e, não raramente, mais atrapalha que ajuda o médico e o casal. O objetivo desta revisão é estudar criticamente os métodos disponíveis para a avaliação da reserva ovariana e sua aplicabilidade como fator prognóstico de pacientes que serão submetidas a técnicas de reprodução assistida. Para tal, os seguintes testes foram pesquisados: dosagem na fase folicular precoce de hormônio folículo-estimulante, estradiol, inibina B e hormônio anti-mülleriano; testes dinâmicos com citrato de clomifeno, FSH exógeno e agonista do GnRH e avaliação ultra-sonográfica dos ovários, representada pela contagem de folículos antrais e medida do volume ovariano. Concluiu-se que os testes com melhor acurácia na predição de resposta ovariana são a contagem de folículos antrais, a dosagem do hormônio anti-mülleriano e os testes dinâmicos com citrato de clomifeno e agonista do GnRH. No entanto, nenhum teste mostrou-se capaz de prever as chances de gestação após tratamento de reprodução assistida.

Palavras-chave: reserva ovariana, estimulação da ovulação, técnica de reprodução assistida.

ABSTRACT

Ovarian reserve is an important factor for fertility in a couple and, when reduced, has negative impact on assisted reproductive technology. Therefore, methods for assessment of ovarian reserve could be used to determine the appropriate management. However, the true mean of which one of these tests is still questionable and they may be more confusing than elucidative to both physician and couple. The objective of this review is to critically study the ovarian reserve tests as a prognosis factor in patients treated with assisted reproductive technology. We studied the following tests: dosage in the early follicular phase of follicle-stimulating hormone, estradiol, inhibin B and anti-müllerian hormone; dynamic tests using clomiphene citrate, exogenous FSH and

GnRH agonist and ultra-sound evaluation (antral follicle count and ovarian volume measurement). We concluded that the more accurate tests are antral follicle count, anti-müllerian hormone dosage, clomiphene citrate challenge test and GnRH agonist stimulating test. However, there are no tests capable to predict the chance of pregnancy after assisted reproductive treatment.

Key-words: ovarian reserve, ovulation induction, assisted reproductive technique.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com a participação crescente da mulher em atividades sócio-econômicas, houve uma mudança clara em relação ao período da gestação. Atualmente, parte significativa das mulheres tenta adiar ao máximo a gravidez, até o limite que ela ou seu médico julgam possível. No entanto, muitas enfrentam dificuldades, mesmo frente a técnicas de reprodução assistida (TRA), decorrentes do envelhecimento ovariano (Coccia & Rizzello, 2008).

Sabe-se que a reserva ovariana reduzida é uma das principais causas de insucessos em TRA (Broekmans et al., 2006). Um método ideal de avaliação da reserva ovariana deveria ser capaz de prever a chance de gravidez, bem como contra-indicar um tratamento mais complexo em situações em que o prognóstico reprodutivo é sombrio. No entanto, muitos são os métodos atualmente disponíveis e, da mesma forma, muitas são as dúvidas que pairam sobre eles no que tange a sua acurácia (Coccia & Rizzello, 2008).

O objetivo da presente do presente artigo é revisar criteriosamente os métodos de avaliação da reserva ovariana e sua aplicabilidade como fator prognóstico em TRA.

MÉTODOS

Foi pesquisado na base de dados Medline/Pubmed as citações bibliográficas com os termos "ovarian reserve" ou "follicular reserve" e "assisted reproductive technology", publicadas nos últimos dez anos.

Avaliação da Reserva Ovariana

Na literatura, os principais testes usados na avaliação da reserva folicular ovariana são:

- Dosagens hormonais na fase folicular precoce de hormônio folículo-estimulante (FSH), Estradiol (E2), Inibina B e hormônio anti-mülleriano (HAM).
 - Testes dinâmicos: teste do citrato de clomifeno (TCC), teste com FSH exógeno (EFORT) e teste de estimulação com agonistas do GnRH (GAST).
 - Avaliação ultra-sonográfica: contagem de folículos antrais (CFA) e medida do volume ovariano
 - Biópsia ovariana com contagem de folículos primordiais
- No intuito de permitir uma comparação adequada entre os testes e como não há valores de estabelecidos de normalidade para a maioria deles, deu-se preferência para utilização do cálculo de área sob a curva (ASC) obtidos através de regressão logística *receiver operating characteristics* (curva ROC) (Broekmans et al., 2006; Sun et al., 2008). Neste sentido, valores de ASC próximos a 1,0 indicam teste com melhor acurácia, enquanto valores próximos a 0,5 indicam testes com poder de discriminação ruim. O uso da razão de verossimilhança (RV) também é importante. A RV representa a razão entre a chance do teste ser positivo (ou negativo) quando houver alteração real e a chance do teste ter o mesmo resultado sem que exista esta alteração. A RV indica quanto o teste aumenta ou diminui a probabilidade de determinado problema (chance pós-teste). Assim, RV igual a 1 significa que o teste não tem valor preditivo para o desfecho de interesse. Quando este valor é > 1 , o teste aumenta a probabilidade do desfecho; quando é < 1 , reduz esta probabilidade. Valores de $RV > 10$ e $< 0,1$, para testes positivos e negativos, respectivamente, são representativos de testes com alta acurácia (Broekmans et al., 2006).

RESULTADOS

Os resultados dos principais estudos podem ser vistos na tabela.

FSH

A dosagem do FSH sérico no início da fase proliferativa é o teste mais realizado em reprodução humana para avaliação da reserva ovariana (Abdalla & Thum, 2004). Diversos estudos avaliaram sua acurácia na predição de sucesso em TRA (tabela). Os estudos que mostraram melhor capacidade discriminativa encontraram valor de ASC de 0,83, resultado inferior ao obtido com outros métodos como CFA e HAM.

E2

Os estudos publicados não caracterizam o E2 como bom preditor de reserva ovariana (tabela). A ASC calculada aproximou-se de 0,50 na maioria dos estudos.

Inibina B

Considerada inicialmente como grande marcador de reserva ovariana, a inibina B mostrou ter valor limitado na predição de sucesso de FIV. O trabalho que encontrou melhor acurácia da inibina B na predição da resposta ovariana mostrou ASC de 0,81, inferior ao obtido com outros testes.

HAM

O HAM tem sido apontado como marcador promissor de reserva ovariana. Dentre as vantagens existentes estão o fato de poder ser realizado em qualquer fase do ciclo, ter pequena variação entre os ciclos e boa reprodutibilidade. A maioria dos trabalhos cujo desfecho foi resposta ovariana mostrou boa acurácia do teste, com $ASC > 0,90$. No entanto, em relação a taxa de gestação, a acurácia do HAM não foi alta, com valores de $ASC < 0,8$.

TCC

O TCC consiste na administração exógena de 100mg de citrato de clomifeno por 5 dias a partir do 5º dia do ciclo menstrual. Os níveis hormonais de FSH são medidos nos dias 2 ou 3 do ciclo menstrual (níveis basais) e no décimo dia do ciclo (nível após estímulo). Níveis elevados de FSH após estímulo indicam menor reserva ovariana (Johnson et al., 2006). Os trabalhos mostraram boa acurácia do TCC em determinar resposta ovariana.

EFORT

O EFORT é realizado através da administração de 300 UI de FSH recombinante no 3º dia do ciclo menstrual e avaliação de níveis basais de FSH, estradiol e inibina B e após 24h. Níveis mais baixos de estradiol e inibina B e mais altos de FSH indicam menor reserva folicular (Johnson et al., 2006).

Mesmo que tivesse boa acurácia, a grande desvantagem deste teste é seu alto custo. Os poucos estudos encontrados mostraram uma ASC que varia de 0,75 a 0,86.

GAST

O GAST consiste em observar alterações nas concentrações de estradiol antes e após injeção subcutânea de análogo de GnRH (Johnson et al., 2006). Os trabalhos encontrados mostram um teste com boa acurácia, com ASC em torno de 0,9.

Volume Ovariano

O volume ovariano é um indicador indireto do tamanho da coorte de folículos e não é só influenciado pelo número de folículos, mas também por seus tamanhos. Neste sentido, alguns trabalhos já demonstraram que a quantidade de folículos grandes se mantém constante com o avançar da idade da mulher, ao contrário dos folículos de pequeno volume. Este fato pode justificar porque a CFA prediz melhor a resposta ovariana ao estímulo exógeno que o volume ovariano (Jayaprakasan et al., 2008). Desta maneira, apesar de alguns trabalhos mostrarem uma diferença no volume ovariano de mulheres com boa e má resposta, esta foi menos marcante que aquela observada com o HAM e a CFA (Jayaprakasan et al., 2008). Além disso, não foi encontrada correlação significativa entre volume ovariano e chance de gestação.

CFA

A CFA é exame simples e rápida e, apesar de operador-dependente, apresenta boa reprodutibilidade. O primeiro estudo que relaciona a CFA com a taxa de nascidos-vivos foi realizado por Maseelall e cols. e encontrou que quando a CFA era menor ou igual a 10 folículos, havia menor chance de sucesso do tratamento (Marseelall et al., 2008). Outros trabalhos mostraram resultados semelhantes, com ASC entre 0,85 e 0,99.

Biópsia Ovariana

Apesar de considerado padrão-ouro na avaliação da reserva ovariana, apresenta uma série de desvantagens. Do ponto de vista prático, é realizado através de biópsia do ovário. No entanto, a distribuição dos folículos nos ovários é heterogênea e um fragmento pode não representá-lo (Lambalk et al., 2004). Além disso, trata-se de procedimento invasivo que pode levar a aderências e diminuir ainda mais a reserva ovariana (Lass et al., 2004). Sendo assim, o uso da biópsia não é realizado para avaliação da reserva ovariana.

Discussão

Nos dias atuais, em que os casais postergam o início da prole, seria ideal encontrar um método capaz de predi-

Tabela: Resultados dos principais testes de avaliação da reserva ovariana.

Teste	Estudo	Ano	Tipo de estudo	Desfecho	ASC	RVS+	RVS-
FSH	Vladimirov et al.	2005	Prospectivo	RO	0,76	2,20	0,20
	Hendriks et al.	2005	Prospectivo	RO	0,83	NC	NC
	Kwee et al.	2006	Prospectivo	RO	0,83	NC	NC
	Barad et al.	2008	Retrospectivo	Gestação	0,55	NC	NC
	Sun et al.	2008	Revisão	Nascido-vivo	0,28	2,1	0,89
	Barad et al.	2009	Retrospectivo	RO	0,73	3,56	0,44
	Sun et al.	2008	Revisão	RO	0,77	NC	NC
	Riggs et al.	2008	Retrospectivo	RO	0,71	1,80	0,31
E2	Vladimirov et al.	2005	Prospectivo	RO	0,6	4,83	0,76
	Hendriks et al.	2005	Prospectivo	RO	0,51	NC	NC
	Riggs et al.	2008	Retrospectivo	RO	0,54	1,30	0,47
Inibina B	Vladimirov et al.	2005	Prospectivo	RO	0,79	3,62	0,08
	Hendriks et al.	2005	Prospectivo	RO	0,81	NC	NC
	Kwee et al.	2006	Prospectivo	RO	0,56	NC	NC
	Sun et al.	2008	Revisão	RO	0,71	6,5	0,65
	Riggs et al.	2008	Retrospectivo	RO	0,68	4,55	0,58
HAM	Tremellen et al.	2005	Prospectivo	RO	NC	5,33	0,24
	Ficicioglu et al.	2006	Prospectivo	RO	0,92	9,99	0,10
	Barad et al.	2009	Retrospectivo	Gestação	0,71	2,48	0,51
	Barad et al.	2009	Retrospectivo	RO	0,90	5,44	0,15
	Kwee et al.	2008	Prospectivo	Gestação	0,64	NC	NC
	Kwee et al.	2008	Prospectivo	RO	0,85	5,43	0,28
	Riggs et al.	2008	Retrospectivo	RO	0,81	3,95	0,22
	Jayaprakasan et al.	2008	Prospectivo	RO	0,90	3,70	0,10
	Sun et al.	2008	Revisão	RO	0,92	NC	NC
	Vladimirov et al.	2005	Prospectivo	RO	0,90	11,67	0,32
TCC	Kwee et al.	2006	Prospectivo	RO	0,88	14,60	0,28
	Kwee et al.	2008	Prospectivo	Gestação	0,75	NC	NC
	Sun et al.	2008	Revisão	RO	0,81	5,75	0,35
	Kwee et al.	2006	Prospectivo	Gestação	0,71		
EFORT E2	Kwee et al.	2006	Prospectivo	RO	0,75		
	Kwee et al.	2006	Prospectivo	Gestação	0,86		
EFORT inibina B	Kwee et al.	2006	Prospectivo	RO	0,88		
	Kwee et al.	2006	Prospectivo	Gestação	0,91		
GAST E2	Hendriks et al.	2005	Prospectivo	RO	0,91		
GAST inibina B	Hendriks et al.	2005	Prospectivo	RO	0,81		
CFA	Vladimirov et al.	2005	Prospectivo	RO	0,85	6,33	0,27
	Jayaprakasan et al.	2007	Prospectivo	Gestação	0,82	5,23	0,83
	Jayaprakasan et al.	2007	Prospectivo	RO	0,97	13,51	0,00
	Jayaprakasan et al.	2008	Prospectivo	RO	0,93	7,75	0,08
	Kwee et al.	2008	Prospectivo	RO	0,83		
	Sun et al.	2008	Revisão	RO	0,78	2,03	0,40
	Maseellal et al.	2009	Retrospectivo	Nascido-vivo		1,41	0,71
	Sun et al.	2008	Revisão	RO	0,82	4,26	0,23

Legenda: ASC: área sob a curva, RVS+: razão de verossimilhança positivo, RVS-: razão de verossimilhança negativo, FSH: hormônio folículo-estimulante, RO: resposta ovariana à indução, NC: não disponível, E2: estradiol, HAM: hormônio anti-mülleriano, TCC: teste do citrato de clomifeno, EFORT: teste com FSH exógeno, GAST: teste de estimulação com agonista do GnRH, CFA: contagem de folículos antrais, Vol.ovariano: volume ovariano

zer o potencial reprodutivo. Além disso, antes de TRA, a avaliação adequada da reserva ovariana seria de grande ajuda, tanto na escolha do tratamento quanto na determinação de seu prognóstico.

Um fator limitante na análise e comparação dos testes nos estudos publicados diz respeito à diferença de conceitos entre a avaliação de reserva ovariana e a avaliação da resposta ovariana ao estímulo. A primeira só deveria ser analisada em relação à capacidade do teste em prever taxa de gestação e taxa de nascido-vivo, enquanto a segunda pode ser estudada através do número folículos ou oócitos recrutados, duração da indução, quantidade de gonadotrofina utilizada e taxa de cancelamento por ciclo. No entanto, os trabalhos são heterogêneos quanto

aos desfechos estudados e, a maioria, apenas descreve a capacidade de predição da resposta ovariana ao estímulo e não a taxa de gestação ou nascido-vivo após FIV, sendo difícil a comparação entre eles.

Neste cenário, a melhor maneira de avaliá-los é através do cálculo da ASC. Tendo como base esta premissa, os testes que apresentaram maiores ASC (30,9) foram o HAM, a CFA, o TCC e o GAST.

No entanto, além da avaliação anterior, outras características devem ser consideradas para tornar um teste clinicamente viável, como a reprodutibilidade, a aplicabilidade, o custo e a sua disponibilidade. Deve-se ter em mente, por exemplo, que testes de imagem são operador-dependentes, que algumas medidas hormo-

nais variam dentro de um mesmo ciclo menstrual e entre ciclos menstruais diferentes e, também, que o uso de hormônios exógenos acarreta gastos e efeitos colaterais. Assim, na prática clínica, os testes mais acessíveis são a dosagem do HAM e a CFA.

Por fim, é de fundamental relevância ressaltar que os resultados expostos referem-se à predição de resposta ovariana ao estímulo, dado que muito interessa ao médico especialista em reprodução humana, mas que pouco ou nada importa ao casal que o procura.

CONCLUSÃO

Nenhum teste de reserva ovariana mostrou-se capaz de prever as chances de gestação após TRA. Mesmo aqueles que predizem com bom desempenho a chance de resposta ovariana, não refletem com acurácia a taxa de gestação e nascido-vivo.

Autor correspondente:

Lucas Yugo Shiguehara Yamakami
Rua Mato Grosso, 306 cj 1310. Higienópolis.
CEP 05410-020. São Paulo, SP, Brasil.
Tel.: (011) 2114-6633

Referências Bibliográficas

1. Abdalla H, Thum, MY. An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod.* 2004;19:893-8.
2. Barad DH, Weghofer A, Gleicher N. Comparing anti-Müllerian hormone (AMH) and follicle-stimulating hormone (FSH) as predictors of ovarian functions. *Fertil Steril.* 2009;91:1553-5.
3. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 2006;12:685-718.
4. Coccia ME, Rizzello F. Ovarian Reserve. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1127:27-30.
5. Fişcioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2006;85:592-6.
6. Hendriks DJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, Looman CW, de Jong FH, te Velde ER. Single and repeated GnRH agonist stimulation tests compared with basal markers of ovarian reserve in the prediction of outcome in IVF. *J Assisted Reprod and Genet.* 2005;22:65-73.
7. Jayaprakasan K, Hilwah N, Kendall NR, Hopkisson JF, Campbell BK, Johnson IR, Raine-Fenning NJ. Does 3D ultrasound offer any advantage in the pretreatment assessment of ovarian reserve and prediction of outcome after assisted reproduction treatment? *Hum Reprod.* 2007;22:1932-1941.
8. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. A prospective, comparative analysis of anti-müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril.* 2008; [in press].
9. Johnson NP, Bagrie EM, Coomarasamy A, Bhattacharya S, Shelling AN, Jessop S, Farquhar C, Khan KS. Ovarian reserve tests for predicting fertility outcomes for assisted reproductive technology: the International Systematic Collaboration of Ovarian Reserve Evaluation protocol for a systematic review of ovarian reserve test accuracy. *BJOG.* 2006;113:1472-80.
10. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Schoemaker J, Lambalk CB. The clomiphene citrate challenge test versus the exogenous follicle-stimulating hormone ovarian reserve test as a single test for identification of low responders and hyperresponders to in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2006;85:1714-22.
11. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Themmen A, de Jong F, Lambalk C. Evaluation of the anti-Müllerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2008;90:737-743.
12. Lambalk CB, de Koning CH, Flett A, Van Kasteren Y, Gosden R, Homburg R. Assessment of ovarian reserve. Ovarian biopsy is not a valid method for the prediction of ovarian reserve. *Human Reprod.* 2004;19:1055-1059.
13. Lass A. Assessment of ovarian reserve: is there still a role for ovarian biopsy in the light of new data? *Human Reprod.* 2004;19:467-9.
14. Maseelall PB, Hernandez-Rey AE, Oh C, Maagdenberg T, McCulloh DH, McGovern PG. Antral follicle count is a significant predictor of livebirth in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2009; 91:1595-7.
15. Riggs RM, Duran EH, Baker MW, Kimble TD, Hobeika E, Yin L, Matos-Bodden L, Leader B, Stadtmauer L. Assessment of ovarian reserve with anti-Müllerian hormone: a comparison of the predictive value of anti-Müllerian hormone, follicle-stimulating hormone, inhibin B, and age. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199:202.e1-8.
16. Sun W, Stegmann BJ, Henne M, Catherino WH, Segars JH. A new approach to ovarian reserve testing. *Fertil Steril.* 2008;90:2196-202.
17. Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN. Anti-müllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Zeal J Obst Gyn.* 2005;45:20-4.
18. Vladimirov IK, Tacheva DM, Kalinov KB, Ivanova AV, Blagoeva VD. Prognostic value of some ovarian reserve tests in poor responders. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;272:74-9.