Andrea Rocha de Saboia Mont' Alverne

Redução da reserva ovariana em pacientes com
arterite de Takayasu

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

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Processos Imunes e Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva
Co-orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira

SÃO PAULO
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mont'Alverne, Andrea Rocha de Saboia

Redução da reserva ovariana em pacientes com arterite de Takayasu / Andrea
Rocha de Saboia Mont'Alverne. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e
Infecciosos.

Orientador: Clovis Artur Almeida da Silva.

Coorientador: Rosa Maria Rodrigues Pereira.

Descritores: 1.Arterite de Takayasu 2.Vasculite 3.Testes de função ovariana
4.Fertilidade 5.Hormônio antimülleriano 6.Corpo lúteo/imunologia

USP/FM/DBD-34/14

Dedicatórias

Ao meu marido, Thiago, meu amor e fã número um da
minha empreitada acadêmica.

Ao meu pai, Pedro, por todos os porquês respondidos,
sempre com paciência e ternura.

À minha mãe, Ana, por me ensinar a sonhar e por ter
sonhado junto comigo.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva, o melhor orientador que eu poderia ter: competente, firme e, ao mesmo tempo, doce, carinhoso e sempre bem humorado. Obrigada por todos os ensinamentos e pela segurança transmitida. O senhor fez com que essa caminhada fosse muito mais leve e feliz.

À Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira, minha co-orientadora, pela enorme contribuição com sua expertise nesta rara doença.

À Profa. Dra. Eloisa Bonfá, pelas sugestões preciosas na confecção dos artigos científicos.

Ao Dr. Lucas Yamakami, por sua incansável dedicação, sem a qual este trabalho não teria se concretizado.

Ao Dr. Daniel Brito de Araújo, por ter desbravado os caminhos que depois eu viria a seguir.

À Dra. Vilma Viana e Elaine Pires Leon, por terem realizado as análises laboratoriais com todo primor e carinho.

Ao Prof. Dr. Célio Gonçalves e ao Prof. Dr. Samuel Shinjo, pela acolhida e confiança depositada.

À Marta Pereira, pela paciência e ajuda fundamental com a FAPESP.

Ao Dr. Fernando Souza, Dr. Ulysses Dória Filho, Cristina Maria Nazareth, Mariza Yoshikawa e Daniela Mencaroni pela contribuição em fases diversas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wiliam Habib Chahade e todos aqueles que fazem parte do Serviço de Reumatologia do HSPE, por terem me formado reumatologista.

Aos amigos que fiz em São Paulo e aos amigos cearenses que aqui já estavam, por terem feito eu me sentir em casa nesta cidade que hoje eu amo. Em especial ao meu amigo-irmão Rodrigo, por ter aberto as portas do seu apartamento para mim sempre que precisei.

Aos meus irmãos Pedro e Fernanda, pelo brilho nos olhos que sempre me estimula.

Aos meus sogros Paulo e Jacqueline, pais que a vida me deu, pela torcida incondicional.

E a todas as mulheres que participaram deste estudo, sem as quais nada seria possível.

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.

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 Annelise 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 Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	8
3. Pacientes e Métodos.....	10
3.1. Pacientes.....	11
3.2. Dados Demográficos e Parâmetros Gerais.....	13
3.3. Avaliação Clínica e Laboratorial das Pacientes com AT.....	13
3.4. Avaliação Ginecológica.....	15
3.5. Avaliação Laboratorial da Reserva Ovariana.....	16
3.6. Avaliação Ultrassonográfica da Reserva Ovariana.....	17
3.7. Detecção do anti-CoL.....	18
3.8. Análise Estatística.....	19
4. Resultados.....	20
4.1. Pacientes com AT versus Controles.....	21
4.2. AT e Reserva Ovariana.....	22
5. Discussão.....	28
6. Conclusão.....	32
7. Referências.....	34

Anexos

Lista de Abreviaturas

Anti-CoL	Anticorpo anti-corpo lúteo
AT	Arterite de Takayasu
BCIP	Substratos cromogênicos fosfato 5-bromo-4-cloro-3-indolil
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CFA	Contagem de folículos antrais
CFE	Ciclofosfamida endovenosa
ELISA	Ensaio de imunoadsorção ligado a enzima
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FOP	Falência ovariana prematura
FSH	Hormônio folículo-estimulante
HAM	Hormônio anti-Mülleriano
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
IMC	Índice de massa corpórea
LES	Lupus eritematoso sistêmico
LH	Hormônio luteinizante
MTX	Metotrexato
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Proteína C reativa
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
VHS	Velocidade de hemossedimentação

Lista de Tabelas

Tabela 1-	Características demográficas e clínicas, ciclos menstruais, dados obstétricos, reserva ovariana e anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL) em pacientes com arterite de Takayasu (AT) e controles saudáveis.....	24
Tabela 2-	Dados da doença, provas de fase aguda, imagem vascular e tratamento em pacientes com arterite de Takayasu (AT) de acordo com níveis normais ou baixos do hormônio anti-Mülleriano (HAM).....	27

Lista de Figuras

Figura 1-	Distribuição dos valores de hormônio anti-Mülleriano em pacientes com arterite de Takayasu (AT) utilizando dois ensaios diferentes de ELISA.....	26
------------------	--	----

Resumo

Objetivo: Avaliar marcadores de reserva ovariana e a presença de anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL) em pacientes com arterite de Takayasu (AT) e possível associação com parâmetros clínicos, laboratoriais e uso de imunossupressores. **Métodos:** 20 pacientes com AT e 24 controles saudáveis foram avaliados para anti-CoL (immunoblot). A reserva ovariana foi avaliada por: hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estradiol, hormônio anti-Mülleriano (HAM) e contagem de folículos antrais (CFA). HAM foi dosado por ELISA utilizando dois diferentes testes. Dados demográficos, obstétricos, alterações menstruais, aspectos clínicos, imagens vasculares e tratamento foram também analisados. **Resultados:** A média da idade atual foi similar em pacientes e controles ($31,2 \pm 6,1$ vs. $30,4 \pm 6,9$ anos, $p = 0,69$). As frequências de HAM baixo foram idênticas em pacientes com AT com ambos os testes de ELISA e maiores quando comparadas ao grupo controle (50% vs. 17%, $p=0,02$, 50% vs. 19%, $p=0,048$). Observou-se uma correlação positiva entre os dois testes de ELISA em pacientes ($r=0,93$, $p < 0,0001$) e em controles saudáveis ($r=0,93$, $p < 0,0001$). Pacientes com AT apresentaram menor CFA (11 vs. 16, $p=0,13$) e maior frequência de CFA reduzida (41% vs. 22%, $p=0,29$), contudo sem significância estatística. Não foram encontradas diferenças entre os dois grupos em relação às outras características demográficas e clínicas, dados obstétricos e demais parâmetros da reserva ovariana ($p > 0,05$). Anti-CoL foi observado apenas em uma paciente com AT (5% vs. 0%, $p = 0,45$). Avaliação adicional das mulheres com AT comparando as com baixos níveis de HAM ($< 1,0$ ng/mL) *versus* aquelas com níveis de HAM normais ($\geq 1,0$ ng/mL) não mostrou diferença entre os dois grupos em relação a duração da doença, atividade de doença, provas de fase aguda, exames de imagem vascular e tratamento ($p > 0,05$). **Conclusão:** O presente estudo foi o primeiro a sugerir que as pacientes com AT podem apresentar reserva ovariana diminuída.

Descritores: Arterite de Takayasu; Vasculite; Testes de função ovariana; Fertilidade; Hormônio antimülleriano; Corpo lúteo/imunologia.

Abstract

Objective: To assess ovarian reserve markers and anti-corpus luteum antibodies (anti-CoL) in Takayasu arteritis (TA) patients and a possible association with clinical and laboratory parameters and the use of immunosuppressive drugs. **Methods:** 20 TA and 24 healthy controls were evaluated for anti-CoL (immunoblot). Ovarian reserve was assessed by: follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol, anti-Müllerian hormone (AMH) and antral follicle count (AFC). AMH was measured by ELISA using two different kits. Demographical data, menstrual abnormalities, obstetric data, clinical features, vascular imaging and treatment were also analyzed. **Results:** The mean current age was similar in TA patients and controls (31.2 ± 6.1 vs. 30.4 ± 6.9 years, $p=0.69$). The frequencies of decreased levels of AMH in TA patients were identical using both kits and higher when compared to controls (50% vs. 17%, $p=0.02$; 50% vs. 19%, $p=0.048$). A positive correlation was observed between the two kits in TA patients ($r=+0.93$; $p<0.0001$) and in healthy controls ($r=+0.93$; $p<0.0001$). The apparent lower AFC (11 vs. 16, $p=0.13$) and the higher frequency of low AFC (41% vs. 22%, $p=0.29$) in TA compared to controls did not reach statistical significance. No differences between the two groups were found concerning other demographic and clinical characteristics, obstetric data and other parameters of ovarian reserve ($p > 0.05$). Anti-CoL was solely observed in TA patients (5% vs. 0%, $p=0.45$). Further evaluation of TA patients comparing patients with low AMH levels ($<1.0\text{ng/mL}$) versus normal AMH levels ($\geq 1.0\text{ng/mL}$) revealed no differences regarding disease duration, disease activity, acute phase reactants, vascular imaging and treatment between these two groups ($p>0.05$). **Conclusions:** The present study was the first to suggest that TA patients may have diminished ovarian reserve.

Descriptors: Takayasu arteritis; Vasculitis; Ovarian function tests; Fertility; Anti-Müllerian hormone; Corpus luteum/immunology.

1. INTRODUÇÃO

A arterite de Takayasu (AT) é uma doença inflamatória de etiologia desconhecida classificada como uma vasculite primária. Envolve artérias de grande e médio calibres, incluindo aorta e seus ramos principais, além das artérias pulmonares e coronárias¹⁻⁴. Na fisiopatologia da AT ocorre inflamação da parede vascular, podendo causar espessamento, estenose, dilatação e/ou formação de aneurismas nos vasos acometidos⁵. Os sinais e sintomas refletem o quadro de inflamação sistêmica ou a isquemia de um órgão ou membro: claudicação, angiodinia, ausência de pulsos periféricos, sopros, hipertensão arterial grave, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, dentre outros^{5,6}. Sua incidência nos Estados Unidos é de 2,6 casos por milhão de habitantes, tendo sido descrita em diferentes grupos étnicos e regiões geográficas⁶.

A AT geralmente inicia-se na terceira década de vida⁷ e acomete principalmente mulheres, com uma razão entre os sexos de 1,2-29:1^{6,8,9}. Esta predileção por mulheres jovens em idade reprodutiva desperta o interesse no potencial futuro da fertilidade e na reserva ovariana destas pacientes.

Reserva ovariana é um termo utilizado para descrever o potencial funcional dos ovários. É determinada pelo tamanho do *pool* de folículos ovarianos e pela qualidade dos seus oócitos¹⁰. O tamanho deste *pool* de folículos é estabelecido precocemente, ainda durante a vida fetal feminina. Aproximadamente na quinta semana de gestação, células germinativas

migram para as cristas gonadais, iniciando o desenvolvimento ovariano. Ocorre então uma intensa multiplicação mitótica das células germinativas, gerando as oogônias que, por sua vez, originarão os oócitos primários. Cada oócito é rodeado por células somáticas, formando os chamados folículos primordiais. Ao nascimento, cerca de 1 milhão de oócitos estão presentes nos ovários. Este número diminui durante a infância, resultando num *pool* de 300.000 a 500.000 folículos primordiais na menarca. Ao longo da vida, os folículos primordiais entram em crescimento. A maioria destes sofrerá atresia, a menos que sejam recrutados pelo hormônio folículo-estimulante (FSH), o que ocorrerá apenas após a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal na puberdade. Entre o grupo de folículos recrutados, somente um torna-se dominante e ovulará sob a influência do hormônio luteinizante (LH). Este processo continua por toda a vida, até a exaustão do *pool* de folículos primordiais, resultando na menopausa¹¹.

A forma mais objetiva de quantificar a reserva ovariana é através da contagem histológica dos folículos primordiais. Contudo, as evidências atualmente disponíveis mostram que a distribuição folicular no córtex ovariano é extremamente heterogênea, o que implica que a retirada de um fragmento através de biópsia, além de invasiva e potencialmente danosa, não é representativa do *pool* folicular real^{12,13}. Desta forma, a estimativa da reserva ovariana deve ser realizada por métodos indiretos, sendo estes hormonais (dosagem sérica de FSH, LH, estradiol e hormônio anti-

Mülleriano) e ultrassonográficos (medida do volume ovariano e contagem de folículos antrais).

Apesar de amplamente utilizados na avaliação da função gonadal, as dosagens séricas de FSH, LH e estradiol apresentam como principais desvantagens uma grande variabilidade inter e intraciclo menstrual e limitada acurácia no diagnóstico de baixa reserva ovariana. Como estes hormônios fazem parte de um sistema de *feedback*, seus valores não são independentes uns dos outros e, além disso, alterações nos seus níveis séricos ocorrem apenas tardiamente no processo de envelhecimento reprodutivo¹¹. A medida do volume ovariano através da ultrassonografia também tem demonstrado algumas limitações práticas, como uma grande variação na definição do volume ovariano normal nas mulheres em idade reprodutiva e alta variabilidade inter e intraexaminador¹⁵⁻¹⁷. Assim, os melhores exames disponíveis atualmente para avaliação da reserva ovariana em mulheres na menacme são dosagem sérica do hormônio anti-Mülleriano (HAM) e contagem ultrassonográfica do número de folículos antrais (CFA)^{11,15,18,19,20}.

O HAM, também chamado de substância inibidora Mülleriana, é uma glicoproteína dimérica da superfamília dos fatores de crescimento de transformação β , bem conhecida por seu papel essencial no processo de diferenciação do sexo fetal^{11,21}. Nas mulheres, o HAM é expresso a partir da 36ª semana de vida intra-uterina, exclusivamente pelas células da granulosa dos folículos ovarianos primários, pré-antrais e antrais iniciais, tornando-se

indetectável após a menopausa. Participa de duas etapas reguladoras críticas da foliculogênese: inibe o recrutamento inicial a partir do *pool* de folículos primordiais e atua na seleção cíclica para a dominância folicular ao diminuir a sensibilidade dos folículos em crescimento ao FSH^{11,21-25}.

A expressão do HAM, especificamente na fase folicular precoce, e a sua função na regulação do crescimento folicular sugerem que o mesmo pode ser um marcador sensível da reserva ovariana. Além disto, como o seu nível sérico independe da atividade das gonadotrofinas, ele permanece estável ao longo de todo o ciclo menstrual, podendo ser dosado a qualquer momento²⁶⁻²⁸.

Considerando-se que o número de folículos antrais é proporcional ao tamanho do *pool* de folículos primordiais de onde os mesmos foram recrutados, acredita-se que a CFA possa representar quantitativamente o envelhecimento ovariano. A CFA tem apresentado nítida correlação positiva com as concentrações dos marcadores séricos conhecidos, principalmente o HAM^{16,20,29}. A maioria dos estudos, todavia, avalia a CFA como um preditor do número de oócitos recrutados nos protocolos de estimulação ovariana controlada e das taxas de cancelamento de fertilizações *in vitro*, e não como marcador de reserva ovariana^{16,20}.

Em pacientes com doenças auto-imunes, diversos fatores exercem influência sobre a reserva ovariana, dentre eles: patologias do aparelho

genital, disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, atividade da doença, uso de imunossupressores e a própria autoimunidade³⁰⁻⁴¹.

Corroborando com o possível papel da autoimunidade como causador de disfunção ovariana, estudos realizados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) sugerem uma relação entre anticorpos circulantes contra componentes do ovário e ooforite auto-imune³²⁻³⁴. Em 1999, Pasoto e colaboradores descreveram o anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL), presente em 22% das pacientes lúpicas e associado a alterações menstruais e a níveis elevados de FSH³².

Em relação à avaliação da reserva ovariana em pacientes com doenças auto-imunes, um estudo prévio do nosso grupo sugeriu a ocorrência de disfunção ovariana subclínica em pacientes com LES juvenil que haviam utilizado ciclofosfamida endovenosa (CFE), demonstrada através de maiores níveis séricos de FSH⁴⁰. Um estudo mais recente também mostrou comprometimento subclínico da reserva ovariana nas pacientes adultas com LES de início pediátrico quando comparadas a controles saudáveis e associação com o uso de CFE e dose cumulativa de metotrexato (MTX)⁴². Posteriormente, Yamakami e colaboradores encontraram uma baixa CFA em pacientes com síndrome antifosfolípide primária⁴³.

Só existe um único estudo na literatura abordando a reserva ovariana em pacientes com vasculites sistêmicas primárias⁴⁴. Neste, Clowse e

colaboradores evidenciaram baixos níveis de HAM em pacientes com granulomatose com poliangiíte que haviam utilizado ciclofosfamida via oral⁴⁴.

Apesar da AT ocorrer com maior frequência nas mulheres em idade reprodutiva, não existe, até o momento, nenhum artigo científico avaliando a função gonadal nestas pacientes e sua relação com mecanismos inflamatórios ligados à doença, à autoimunidade ou mesmo associados aos regimes terapêuticos empregados, o que estimulou a realização do presente estudo.

2. OBJETIVOS

1. Avaliação global da reserva ovariana em pacientes com AT comparadas com controles saudáveis.
2. Avaliar possível associação entre redução da reserva ovariana e atividade de doença e uso de imunossupressores em pacientes com AT.
3. Verificar possível associação entre presença do anti-CoL e marcadores de reserva ovariana em pacientes com AT.

3. MÉTODOS

3.1. Pacientes

Um estudo transversal foi realizado entre julho de 2011 e dezembro de 2012 com pacientes do sexo feminino e diagnóstico de AT. Estas pacientes foram seguidas regularmente no ambulatório de vasculites da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O grupo controle incluiu mulheres 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.

Critérios de Inclusão

Mulheres entre 18 e 45 anos que preenchiam os critérios classificatórios para AT do *American College of Rheumatology*⁴⁵. Foram incluídos controles saudáveis da população na mesma faixa etária e que não apresentassem nenhum dos critérios de exclusão.

Crterios de Excluso

Gestao ou lactao atual, disfuno do eixo hipotlamo-hipfise-gnada, uso de contraceptivos hormonais nos ltimos seis meses, histrico de cirurgia ou neoplasia ginecolgica, presena de outra doena autoimune, no concordncia em participar do estudo e avaliao gonadal incompleta.

Aps a aplicao dos crterios de incluso, a populao selecionada foi constituda de 52 mulheres com AT. Destas, 32 foram excludas por: uso de contraceptivo hormonal (n=15), no concordncia em participar do estudo (n=7), avaliao incompleta (n=4), presena de granulomatose com poliangite associada (n=2), gestao atual (n=2), hiperprolactinemia (n=1) e tratamento atual para neoplasia ginecolgica (n=1). Desta forma, o estudo foi realizado com 20 pacientes com AT e 24 controles saudveis.

Todas as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido informado e o presente estudo foi aprovado pela Comisso de tica para Anlise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clnica do Hospital das Clnicas e da FMUSP (CAPPesq - 0476/11).

3.2. Dados Demográficos e Parâmetros Gerais

Foram avaliados idade atual, raça, índice de massa corpórea (IMC) (peso em Kg dividido por altura em metros ao quadrado) e classe socioeconômica, classificada como A, B, C, D ou E, de acordo com o critério proposto pela Associação Brasileira de Anunciantes e Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercados⁴⁶.

3.3. Avaliação Clínica e Laboratorial das Pacientes com AT

Os prontuários de todas as pacientes foram revisados criteriosamente, incluindo dados clínicos, laboratoriais, terapêuticos e de exames de imagem. A idade de início da doença e o tempo de duração da mesma foram calculados levando-se em consideração o começo das manifestações clínicas atribuídas à AT.

A atividade de doença foi avaliada segundo os critérios do *National Institutes of Health* propostos por Kerr em 1994⁶ e que abrangem quatro

domínios: manifestações sistêmicas como febre ou musculoesqueléticas sem outro fator causal identificado; elevação da velocidade de hemossedimentação (VHS); sintomas de inflamação vascular ou isquemia, como claudicação, sopros, carotidínia, dentre outros; imagem vascular característica. O surgimento ou piora de dois ou mais destes achados configura “atividade de doença”⁶.

A VHS foi realizada pelo método de Westergreen (valor normal até 20 mm na primeira hora) e a proteína C reativa (PCR) foi dosada por nefelometria (valor normal até 5 mg/L).

Os exames de imagem vascular foram avaliados de acordo com a classificação angiográfica da *International TA Conference in Tokyo 1994* em seis tipos diferentes de acordo com o acometimento arterial: tipo I (ramos do arco aórtico), tipo IIa (aorta ascendente, arco aórtico e seus ramos), tipo IIb (aorta ascendente, arco aórtico e seus ramos e aorta torácica descendente), tipo III (aorta torácica descendente, aorta abdominal e/ou artérias renais), tipo IV (somente aorta abdominal e/ou artérias renais) e tipo V (combinação dos achados dos tipos IIb e IV)⁴⁷. Os padrões de envolvimento vascular foram descritos como oclusão (obstrução total do lúmen), estenose (estreitamento do lúmen) e aneurisma⁴.

Foram estudadas as drogas utilizadas para o tratamento da AT (corticosteróides, metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida, micofenolato mofetil, leflunomida e agentes biológicos), bem como a dose cumulativa e a

dose atual no momento da realização dos exames. Também foram avaliados tratamentos cirúrgicos e procedimentos endovasculares.

3.4. Avaliação Ginecológica

Todas as pacientes e controles foram submetidas a exame ginecológico completo, realizado no Centro de Reprodução Humana da Disciplina de Ginecologia da FMUSP, e avaliadas quanto a presença de caracteres sexuais secundários segundo a classificação de Tanner⁴⁸. As participantes foram questionadas sobre a idade da menarca, com a qual foi calculado o tempo de duração do menacme (idade ginecológica) e orientadas a anotar os últimos três ciclos menstruais consecutivos. Ciclo menstrual normal foi definido como aquele tendo um intervalo entre 25 e 35 dias com duração de três a sete dias de fluxo^{36,38}, com ciclos irregulares correspondendo à alteração do intervalo e/ou duração. Amenorréia foi definida como interrupção da menstruação por um período correspondente a um total de quatro ciclos anteriores e amenorréia sustentada como aquela persistente por mais de 12 meses. Pacientes com amenorréia sustentada nos quais a menstruação não retornou e que apresentaram valores de FSH > 40 UI/L foram classificadas como falência ovariana prematura (FOP)³⁶⁻³⁸.

Os antecedentes obstétricos basearam-se em informações das participantes e foram confirmados em dados coletados nos prontuários.

3.5. Avaliação Laboratorial da Reserva Ovariana

Amostras de sangue foram coletadas na fase folicular inicial (entre o 2º e o 4º dias do ciclo menstrual). Todos os soros foram centrifugados e armazenados a -70 °C até a análise. As dosagens de FSH, LH e estradiol foram realizados por radioimunoensaio (Cobas®, Roche, Mannheim, Germany) e testados em duplicata no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular da FMUSP (LIM/42). Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio recomendados pelo fabricante foram limitados a 5,7% e 3,6%, respectivamente. Considerou-se concentração sérica de FSH elevada quando maior ou igual a 10 UI/L (indicativa de baixa reserva ovariana)⁴⁹⁻⁵¹. A dosagem do HAM foi realizado no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Reumatologia da FMUSP (LIM/17), através do ensaio de imunoadsorção ligado a enzima (ELISA)(*AMH Gen II ELISA, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA*), em duplicata, nas 20 pacientes com AT e 24 controles. Os coeficientes de variação intra e inter-análise foram limitados a 5,4% e 5,6% respectivamente. Posteriormente, o HAM também foi dosado

através de outro kit comercial (US AMH/MIS AnshLabs ELISA), em duplicata, utilizando-se os soros armazenados das 20 pacientes com AT e de 22 controles saudáveis (os soros de dois controles não estavam mais disponíveis). Os coeficientes de variação intra e inter-análise foram limitados a 3,1% e 2,7% respectivamente. Níveis de HAM menores que 1,0 ng/mL foram considerados como reduzidos conforme sugestão dos fabricantes dos dois testes de ELISA^{52,53}.

3.6. Avaliação Ultrassonográfica da Reserva Ovariana

Uma ultrassonografia transvaginal para CFA e medida do volume ovariano foi realizada no mesmo dia da coleta de sangue (fase folicular inicial) somente nas participantes que relatavam já ter tido relação sexual vaginal previamente (17 pacientes com AT e 23 controles). Os exames foram realizados 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. Os ovários foram medidos em três planos perpendiculares e seus volumes calculados através da fórmula da elipsoide (volume = diâmetro longitudinal x diâmetro anteroposterior x diâmetro transversal x

0,523). O volume médio de ambos os ovários foi obtido para cada participante. Para a CFA foram considerados folículos de 2 a 10 mm de diâmetro médio⁴⁹. Os valores de CFA foram classificados da seguinte forma: 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)¹⁹.

3.7. Detecção do anti-CoL

A dosagem do anticorpo anti-corpo lúteo foi realizada no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Reumatologia da FMUSP (LIM/17), usando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blott*, como descrito por Pasoto et al³². Os extratos de células e tecidos de corpo lúteo bovino foram submetidos à SDS-PAGE na presença de sulfato dissódico, usando o gel de poliacrilamida a 12%. Procedeu-se então à transferência eletroforética dos extratos a uma membrana de nitrocelulose cortada em tiras, as quais foram incubadas em solução bloqueadora de leite desnatado a 5% em tampão fosfato salino (PBS) por duas horas, em temperatura ambiente e sob agitação contínua. As tiras foram então incubadas com soro diluído (1:10) em PBS contendo 15% de soro bovino

adulto inativado, 3% de leite desnatado e 0,05% de polissorbato 20. Após a lavagem, as tiras foram incubadas com IgG de cabra anti-IgG humana misturada com fosfatase alcalina. A reação foi visualizada adicionando-se os substratos cromogênicos fosfato 5-bromo-4-cloro-3-indolil (BCIP) e nitroazul de tetrazólio.

3.8. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão para variáveis contínuas paramétricas ou medianas (variação) para variáveis contínuas não paramétricas, e como número (porcentagem) para variáveis categóricas. O teste t de *Student* 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 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

4.1. Pacientes com AT *versus* Controles

Todas as participantes apresentaram exame ginecológico geral sem alterações e foram consideradas pós-púberes (estágio 5 de Tanner). A Tabela 1 inclui as características demográficas, manifestações clínicas, ciclos menstruais, dados obstétricos, parâmetros da reserva ovariana e anti-CoL de pacientes e controles. A média da idade atual foi similar em pacientes com AT e controles ($31,2 \pm 6,1$ vs. $30,4 \pm 6,9$ anos, $p=0,69$), assim como a média do IMC e as frequências de caucasianos e classe socioeconômica C e D ($p>0,05$). A frequência de hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi significativamente maior nas pacientes com AT em relação aos controles (55% vs. 4%, $p=0,0003$). Não foram encontradas diferenças quanto à idade da menarca, idade ginecológica, frequência de alterações menstruais e dados obstétricos de ambos os grupos ($p>0,05$). Nenhuma paciente ou controle tentou engravidar por um período maior que um ano sem sucesso.

Observou-se uma correlação positiva entre os resultados obtidos com os kits ELISA AMH Gen II e EUA AMH/MIS AnshLabs ELISA em pacientes com AT ($r = + 0,93$, $p < 0,0001$) e nos controles saudáveis ($r = + 0,93$, $p < 0,0001$). As mesmas 10 pacientes com AT e 4 controles apresentaram HAM diminuído ($< 1,0$ ng/mL) nos dois ensaios. As frequências de HAM reduzidos foram significativamente maiores nas pacientes com AT com os

kits AMH Gen II ELISA (50% vs. 17%, $p=0,02$) e EUA AMH / MIS AnshLabs ELISA (50% vs. 19%, $p=0,048$) em relação aos controles. A mediana dos níveis de HAM (Gen II ELISA) foi significativamente reduzida nas 20 pacientes com AT comparadas aos 24 controles [0,7 (0,2-3,5) vs. 2,7 (0,1-6,6) ng/mL, $p=0,008$]. A mediana dos níveis de HAM (EUA AMH / MIS AnshLabs ELISA) em 20 pacientes com AT em comparação com 22 controles saudáveis apesar de menor, não alcançou significância estatística [1,0 (0,1-4,6) vs. 2,3 (0-6,6) ng/mL, $p=0,12$] (Tabela 1). A Figura 1 inclui a distribuição dos valores de HAM em pacientes com AT utilizando os dois ensaios ELISA diferentes.

A CFA, o volume ovariano médio e os níveis séricos de FSH, LH e estradiol foram semelhantes nos dois grupos ($p>0,05$). Anti-CoL foi observado em apenas uma paciente com AT e em nenhum controle ($p=0,45$).

4.2. AT e Reserva Ovariana

Uma avaliação mais detalha das características clínicas da AT das pacientes com baixos níveis de HAM *versus* as pacientes com níveis

normais de HAM, revelou que frequência de atividade da doença (20% vs. 20%, $p=1,0$), média do tempo de duração da doença ($9,7 \pm 7$ vs. $6,8 \pm 5$ anos, $p=0,31$), mediana dos valores de VHS [16 (7-19) vs. $18,5 \pm (5-51)$ mm/1^a hora, $p=0,6$], e média dos níveis de PCR ($5,6 \pm 3,4$ vs. $7,5 \pm 6,7$ mg/L, $p=0,4$) foram semelhantes nos dois grupos (Tabela 2).

Quanto à classificação angiográfica das pacientes com AT, 11 (55%) eram do tipo V, 4 (20%) do tipo I, 2 (10%) do tipo IV e 1 dos tipos IIa (5%), IIb (5%) e III (5%). Não foi observada diferença estatística quanto aos padrões de imagem vascular em pacientes com AT de acordo com a reserva ovariana normal ou baixa ($p>0,05$, Tabela 2).

Em relação ao tratamento empregado, observamos que as doses cumulativas de prednisona [4 (0-41,1) vs. 9,2 (0-27,3) gramas, $p=0,8$] e de metotrexato ($2,6 \pm 2,7$ vs. $2,3 \pm 1,4$ gramas, $p=0,8$) foram comparáveis nos dois grupos. Os demais imunossupressores foram utilizados em menor frequência na nossa população de pacientes com AT (Tabela 2). Ciclofosfamida foi utilizada em apenas uma paciente, pertencente ao grupo de baixa reserva ovariana. Não houve correlação entre as doses cumulativas de prednisona e metotrexato com os níveis de HAM ou com CFA ($p>0,05$).

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas, ciclos menstruais, dados obstétricos, reserva ovariana e anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL) em pacientes com arterite de Takayasu (AT) e controles saudáveis

Variáveis	AT (n=20)	Controles (n=24)	p
Dados demográficos e clínicos			
Idade atual, anos	31,2 ± 6,1	30,4 ± 6,9	0,69
IMC, Kg/m ²	24,2 ± 4,6	24,9 ± 4,5	0,61
HAS	11 (55)	1 (4)	0,0003
Caucasianos	16 (80)	13 (54)	0,11
Classe socioeconômica C ou D	16 (80)	15 (58)	0,19
Ciclos menstruais			
Idade da menarca, anos	13 (9-16)	12 (11-18)	0,49
Idade ginecológica, anos	18,8 ± 6,7	17,8 ± 6,7	0,63
Qualquer alteração menstrual	10 (50)	7 (29)	0,21
Amenorreia	1 (5)	0 (0)	0,45
Duração do fluxo, dias	4,5 (0-8)	5 (2-10)	0,25
< 3 dias	3 (15)	1 (4)	0,31
> 7 dias	2 (10)	3 (12,5)	1,0
Intervalo do fluxo, dias	30 (0-35)	30 (15-40)	0,85
< 24 dias	4 (20)	1 (4)	0,16
> 35 dias	0 (0)	2 (8)	0,49
Dados obstétricos			
Nuliparidade	9 (45)	13 (54)	0,76
Número de nascidos vivos	1 (0-3)	0 (0-2)	0,28
Abortos	0 (0-2)	0 (0-2)	0,34

Continua...

Continuação...

Reserva ovariana			
FSH, IU/L	6,8 ± 2,7	6,5 ± 2,6	0,69
Níveis elevados (> 10 IU/L)	1 (5)	2 (8)	1,0
LH, IU/L	4 (2,4-9,3)	5 (2,1-10,6)	0,79
Estradiol, pg/mL	41,5 (23-91)	34 (24-128)	0,44
HAM Gen 2, ng/mL	0,7 (0,2-3,5)	2,7 (0,1-6,6)	0,008
Níveis reduzidos (<1 ng/ml)	10 (50)	4 (17)	0,02
HAM AnshLabs, ng/mL*	1,0 (0,1-4,6)	2,3 (0-6,6)	0,12
Níveis reduzidos (<1 ng/ml)	10 (50)	4 (19)	0,048
Volume ovariano, mm ³ **	5,4 (2-14,1)	5,2 (1,4-17,3)	0,79
CFA**	11 (3-40)	16 (5-37)	0,13
CFA baixa (≤ 10)	7 (41)	5 (22)	0,29
CFA muito baixa (≤ 5)	2 (12)	2 (9)	1,0
Anti-CoL	1 (5)	0 (0)	0,45

Valores expressos em n (%), média ± desvio padrão e mediana (intervalo), IMC – índice de massa corporal, FSH – hormônio folículo estimulante, LH – hormônio luteinizante, HAM – hormônio anti-Mülleriano, CFA – contagem de folículos antrais, Anti-CoL – anticorpo anti-corpo lúteo, *n = 20 AT and 22 controles, **n = 17 AT e 23 controles.

Figura 1 - Distribuição dos valores de hormônio anti-Mülleriano em pacientes com arterite de Takayasu (AT) utilizando dois ensaios diferentes de ELISA.

Tabela 2 – Dados da doença, provas de fase aguda, imagem vascular e tratamento em pacientes com arterite de Takayasu (AT) de acordo com níveis normais ou baixos do hormônio anti-Mülleriano (HAM)

Variáveis	AT com HAM <1 ng/mL (n=10)	AT com HAM ≥1 ng/mL (n=10)	p
Dados da doença			
Atividade de doença	2 (20)	2 (20)	1,0
Duração da doença, anos	9,7 ± 7	6,8 ± 5	0,31
HAS	4 (40)	7 (70)	0,4
Provas de fase aguda*			
VHS, mm/1 ^a hora	16 (7 - 19)	18.5 (5 – 51)	0,6
PCR, mg/L	5,6 ± 3,4	7,5 ± 6,7	0,4
Imagem vascular			
Classificação angiográfica			
Tipo V	7 (70)	4 (40)	0,4
Padrão vascular			
Estenose/ Oclusão	10 (100)	10 (100)	1,0
Aneurisma	3 (30)	1 (10)	0,6
Tratamento			
Prednisona	5 (50)	8 (80)	0,34
Dose cumulativa, gramas	4 (0 – 41,1)	9.2 (0 – 27,3)	0,8
Metotrexato	7 (70)	8 (80)	1,0
Dose cumulativa, gramas	2,6 ± 2,7	2,3 ± 1,4	0,8
Azatioprina	4 (40)	2 (20)	0,6
Ciclofosfamida	1 (10)	0 (0)	1,0
Micofenolato mofetil	3 (30)	1 (10)	0,6
Leflunomida	2 (20)	1 (10)	1,0
Infliximabe	1 (10)	0 (0)	1,0
Cirurgia / procedimento endovascular	3 (30)	3 (30)	1,0

Valores expressos em n (%), média ± desvio padrão e mediana (intervalo). HAS – hipertensão arterial sistêmica, VHS – velocidade de hemossedimentação, PCR- proteína C reativa. , *n = 9 pacientes com HAM baixo e n=10 pacientes com HAM normal.

5. DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo a identificar que mulheres com AT podem apresentar uma vida reprodutiva mais curta, com reserva ovariana reduzida.

Uma grande vantagem do presente estudo foi ter realizado uma avaliação completa da reserva ovariana, utilizando todos os métodos disponíveis para a estimativa da população folicular de pacientes e controles. Além disso, todos os exames foram realizados na fase folicular precoce do ciclo menstrual, tornando os resultados obtidos mais fidedignos. À exceção do HAM, os demais marcadores hormonais e ultrassonográficos da função gonadal apresentam uma maior variabilidade inter e intraciclo menstrual, sendo aquele o melhor momento para sua aferição. Os critérios rigorosos de inclusão e exclusão das participantes também foram pontos relevantes da nossa casuística, visto que procuramos afastar fatores externos que pudessem influenciar a avaliação da reserva ovariana.

Pacientes com AT e controles que haviam feito uso de qualquer hormônio exógeno nos últimos seis meses foram excluídas, uma vez que estudos recentes indicam que os níveis de HAM podem estar diminuídos em mulheres em uso de contraceptivos hormonais^{54,55}. Estes critérios de inclusão e exclusão restritos resultaram, porém, em um tamanho reduzido da população a ser estudada.

A criteriosa avaliação da reserva ovariana realizada no presente estudo mostrou que as pacientes com AT apresentaram níveis mais baixos de HAM em relação aos controles. O uso de dois ensaios diferentes de

ELISA, com resultados semelhantes em relação à frequência de redução do HAM, descartou a possibilidade de instabilidade relacionada ao ensaio AMH Gen II ELISA reportada recentemente⁵⁶. Nossos dados mostraram ainda uma forte correlação entre ambos os ensaios. Importante ressaltar que as pacientes com AT apresentaram mais frequentemente níveis reduzidos de HAM e menor, mas não significativa, CFA. O menor número de pacientes com AT que realizaram a ultrassonografia transvaginal é a explicação mais provável para este achado. Além disso, a utilidade clínica da CFA é limitada, uma vez que apresenta baixa sensibilidade no diagnóstico de reserva ovariana diminuída, apesar da alta especificidade⁴⁹.

Diversos fatores podem influenciar a reserva ovariana em pacientes com doenças reumatológicas autoimunes, como a idade, a própria autoimunidade e as drogas utilizadas no tratamento^{30,31,39}. As médias das idades de pacientes com AT e controles foram muito semelhantes na nossa casuística, o que sugere a existência de algum fator relacionado à própria doença influenciando os baixos níveis de HAM encontrados nestas mulheres. A ooforite autoimune também parece não ter influenciado os resultados obtidos no presente estudo, ao contrário do que foi relatado anteriormente em mulheres com LES e anti-CoL positivo³².

O principal fator responsável por disfunção gonadal e infertilidade em pacientes do sexo feminino com doenças reumáticas parece ser o tratamento medicamentoso, em especial os agentes alquilantes como a ciclofosfamida^{30,31,39}. Estudos anteriores do nosso grupo envolvendo

pacientes femininas com LES e dermatomiosite, mostraram que o uso de imunossupressores, particularmente CFE e glicocorticóides, influenciaram os ciclos menstruais e a reserva ovariana^{39,40}. Uma possível relação entre as doses cumulativas de MTX e baixos níveis de HAM também foi sugerida mais recentemente⁴². Nas mulheres com AT da nossa casuística, apenas uma fez uso de CFE. A maioria utilizou MTX e glicocorticóides, os quais não pareceram estar relacionados com a baixa reserva ovariana encontrada. Além disso, em adultos e adolescentes com LES, a atividade de doença foi descrita como um dos fatores responsáveis por alterações da função reprodutiva³⁷, diferentemente da falta de associação observada no presente estudo.

A saúde reprodutiva futura das mulheres com AT é desconhecida e as questões que envolvem planejamento familiar devem ser discutidas sempre, especialmente com as pacientes jovens com baixa reserva ovariana. Corroborando com esta ideia, um estudo recente mostrou que mulheres saudáveis com mais de 40 anos de idade e níveis muito baixos de HAM ainda apresentam chance de engravidar⁵⁷.

Portanto, o presente estudo foi o primeiro a sugerir que as pacientes com AT podem apresentar reserva ovariana diminuída. Avaliações da função sexual e de infecções genitais (*Chlamydia trachomatis* e vírus do papiloma humano) serão posteriormente avaliadas na população desta rara vasculite primária de envolvimento predominante de grandes vasos.

6. CONCLUSÕES

1. Redução subclínica da reserva ovariana foi evidenciada em pacientes com AT.
2. Redução da reserva ovariana não foi associada com atividade de doença e com uso de imunossupressores em pacientes com AT.
3. A presença de anti-CoL não influenciou a reserva ovariana em pacientes com AT.

7. REFERÊNCIAS

1. Kerr GS: Takayasu's arteritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1995; 21:1014-58.
2. Castellanos AZ, Campos LA, Liphaut BL, Marino JC, Kiss MH, Silva CA. Takayasu's arteritis. *An Pediatr (Barc)*. 2003;58(3):211-6.
3. Campos LM, Castellanos AL, Afiune JY, Silva Kiss MH, CA. Takayasu's arteritis with aortic aneurysm associated with Sweet's syndrome in childhood. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(1):168-9.
4. Jales-Neto LH, Levy-Neto M, Bonfa E, de Carvalho JF, Pereira RM. Juvenile-onset Takayasu arteritis: peculiar vascular involvement and more refractory disease. *Scand J Rheumatol*. 2010;39(6):506-10.
5. Johnston SL, Lock RJ, Gompels MM. Takayasu arteritis: a review. *J Clin Pathol* 2002; 55: 481–6.
6. Kerr GS, Hallahan CW, Giordano J, Leavitt RY, Fauci AS, Rottem M, et al. Takayasu arteritis. *Ann Intern Med* 1994;120:919–29.
7. Liang P, Hoffman GS. Advances in the medical and surgical treatment of Takayasu arteritis. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 16-24.
8. Deutsch V, Wexler L, Deutsch H. Takayasu's arteritis. An angiographic study with remarks on ethnic distribution in Israel. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1974;122:13-28.

9. Mont'Alverne AR, Paula LE, Shinjo SK. Features of the onset of Takayasu's arteritis according to gender. *Arq Bras Cardiol.* 2013;101(4):359-63
10. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update.* 2002;8:141-54.
11. Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction.* 2006;131(1):1-9.
12. 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.
13. 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.
14. Larsen EC, Müller J, Rechnitzer C, Schmiegelow K, Andersen AN. Diminished ovarian reserve in female childhood cancer survivors with regular menstrual cycles and basal FSH <10 IU/l. *Hum Reprod.* 2003;18:417-22.

15. Bukulmez O, Arici A. Assessment of ovarian reserve. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2004;16(3):231-7.
16. 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.
17. 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.
18. Domingues TS, Rocha AM, Serafini PC. Tests for ovarian reserve: reliability and utility. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010;22(4):271-6.
19. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. A prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril.* 2010;93:855-64.
20. 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.
21. Kalaiselvi VS, P S, K P, Krishna G P. The anti mullerian hormone- a novel marker for assessing the ovarian reserve in women with regular menstrual cycles. *J Clin Diagn Res*. 2012;6(10):1636-9.
22. Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2005;45:20-4.
23. 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.
24. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*. 2002;124(5):601-9.
25. Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod*. 2003;18:323-7.
26. La Marca A, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod*. 2006;21:3103-7.

27. Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy Ch, Englert Y. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod.* 2007;22(7):1837-40.
28. 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.
29. Panchal S, Nagori C. Comparison of anti-mullerian hormone and antral follicle count for assessment of ovarian reserve. *J Hum Reprod Sci.* 2012;5(3):274-8.
30. Silva CA, Brunner HI. Gonadal functioning and preservation of reproductive fitness with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2007;16:593-9.
31. 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.
32. 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.
- 33.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.
- 34.Moncayo R, Moncayo HE. A new endocrinological and immunological syndrome in SLE: elevation of human chorionic gonadotropin and of antibodies directed against ovary and endometrium antigens. Lupus 1995; 4: 39–45.
- 35.Ostensen M, Brucato A, Carp H, Chambers C, Dolhain RJ, Doria A, Förger F, Gordon C, Hahn S, Khamashta M, Lockshin MD, Matucci-Cerinic M, Meroni P, Nelson JL, Parke A, Petri M, Raio L, Ruiz-Irastorza G, Silva CA, Tincani A, Villiger PM, Wunder D, Cutolo M. Pregnancy and reproduction in autoimmune rheumatic diseases. Rheumatology (Oxford) 2011;50:657-64
- 36.Silva CA, Leal MM, Leone C, Simone VP, Takiuti AD, Saito MI, Kiss MH. Gonadal function in adolescents and young women with juvenile systemic lupus erythematosus. Lupus 2002;11:419-25.
- 37.Silva CA, Hilário MO, Febrônio MV, Oliveira SK, Terreri MT, Sacchetti SB, Sztajn bok FR, Marini R, Quintero MV, Bica BE, Pereira RM, Bonfá

- E, Ferriani VP, Robazzi TC, Magalhães CS. Risk factors for amenorrhea in juvenile systemic lupus erythematosus (JSLE): a Brazilian multicentre cohort study. *Lupus* 2007;16: 531-6.
38. Medeiros P, Febrônio M, Bonfá E, Borba E, Takiuti A, Silva CA. Menstrual and hormonal alterations in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009;18:38-43.
39. 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.
40. Aikawa NE, Sallum AM, Pereira RM, Suzuki L, Viana VS, Bonfa E, Silva CA. Subclinical impairment of ovarian reserve in juvenile systemic lupus erythematosus after cyclophosphamide therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30:445-9.
41. Silva CA, Yamakami LY, Aikawa NE, Araujo DB, Carvalho JF, Bonfá E. Autoimmune primary ovarian insufficiency. *Autoimmun Rev* 2014 (in press)
42. 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.

- 43.Yamakami LYS. Avaliação da reserva ovariana em pacientes com síndrome antifosfolípide primária [TESE]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.
- 44.Clowse ME, Copland SC, Hsieh TC, Chow SC, Hoffman GS, Merkel PA, Spiera RF, Davis JC Jr, McCune WJ, Ytterberg SR, St Clair EW, Allen NB, Specks U, Stone JH; WGET Research Group. Ovarian reserve diminished by oral cyclophosphamide therapy for granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63(12):1777-81.
- 45.Arend WP, Michel BA, Bloch DA, Hunder GG, Calabrese LH, Edworthy SM, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1129-34.
- 46.Almeida PM, Wickerhauser W. Critério de classe econômica da Associação Brasileira de Anunciantes (ABA) e Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercado (ABIPEME). In: Almeida PM, Wickerhauser W editors. *O Critério ABA/ABIPEME*, ABIPEME (São Paulo); 1991. p. 1-29.
- 47.Hata A, Noda M, Moriwaki R, Numano F (1996) Angiographic findings of Takayasu Arteritis: new classification. *Int J Cardiol* 54(suppl):S155–S63.

48. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969;44:291-303.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. Shebl O, Ebner T, Sir A, Schreier-Lechner E, Mayer RB, Tews G, Sommergruber M. Age-related distribution of basal serum AMH level in women of reproductive age and a presumably healthy cohort. *Fertil Steril*. 2011 Feb;95(2):832-4.
53. Lunsford AJ, Whelan K, McCormick K, McLaren JF. Antimüllerian hormone as a measure of reproductive function in female childhood cancer survivors. *Fertil Steril* 2014;101(1):227-31.
54. 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.

55.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.

56.Clark CA, Laskin CA, Cadesky K. Anti-Mullerian hormone: reality check. *Hum Reprod* 2014;29:184-5.

57.Tokura Y, Yoshino O, Ogura-Nose S, Motoyama H, Harada M, Osuga Y, et al. The significance of serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels in patients over age 40 in first IVF treatment. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:821-5.

ANEXO I

BRIEF COMMUNICATION

REDUCED OVARIAN RESERVE IN TAKAYASU ARTERITIS PATIENTS

Andrea Rocha S. Mont'Alverne¹, Rosa Maria R. Pereira¹, Lucas Yugo S. Yamakami², Vilma Santos T. Viana¹, Edmund Chada Baracat², Eloisa Bonfá¹, Clovis Artur Silva^{1,3}

¹Division of Rheumatology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

² Gynecology Department, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Pediatric Rheumatology Unit, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Andrea Rocha S. Mont'Alverne, MD; Rosa Maria R. Pereira, MD, PhD; Lucas Yugo S. Yamakami MD, PhD; Vilma Santos T. Viana, PhD; Edmund Chada Baracat, MD, PhD; Eloisa Bonfá, MD, PhD; Clovis Artur Silva, MD, PhD

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 #300559/2009-7 to RMRP, #301411/2009-3 to EB and #302724/2011-7 to CAS), Federico Foundation (to RMRP, EB and CAS) and by Núcleo de Apoio à Pesquisa "Saúde da Criança e do Adolescente" da USP (NAP-CriAd-SP) to CAS.

Address correspondence to:

Prof. Rosa Maria R. Pereira

Faculdade de Medicina da USP, Reumatologia

Av Dr Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3105, São Paulo - SP - Brazil, 01246-903.

e-mail: rosamariarp@yahoo.com

ABSTRACT

Objective: To assess ovarian reserve markers in Takayasu arteritis (TA) patients.

Methods: 20 TA and 24 healthy controls were evaluated for ovarian reserve by: follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol and antral follicle count (AFC). Anti-Müllerian hormone (AMH) was measured by ELISA using two different kits. Demographical data, menstrual abnormalities, disease parameters and treatment were also analyzed.

Results: The median current age was similar in TA patients and controls (31.2 ± 6.1 vs. 30.4 ± 6.9 years, $p=0.69$). The frequencies of decreased levels of AMH in TA patients were identical using both kits and higher when compared to controls (50% vs. 17%, $p=0.02$; 50% vs. 19%, $p=0.048$). A positive correlation was observed between the two kits in TA patients ($r=+0.93$; $p<0.0001$) and in healthy controls ($r=+0.93$; $p<0.0001$). The apparent lower AFC (11 vs. 16, $p=0.13$) and the higher frequency of low AFC (41% vs. 22%, $p=0.29$) in TA compared to controls did not reach statistical significance. Other hormones were similar in both groups ($p>0.05$). Further evaluation of TA patients with low AMH levels (<1.0 ng/mL) *versus* normal AMH levels (>1.0 ng/mL) revealed that the frequency of current disease activity ($p=1.0$) and the median of ESR ($p=0.6$), CRP ($p=0.4$), prednisone cumulative dose ($p=0.8$) and methotrexate cumulative dose ($p=0.8$) were comparable in both groups. Cyclophosphamide use was reported in only one patient with reduced ovarian reserve, whereas none of the remaining patients received gonadotoxic drug.

Conclusions: The present study was the first to suggest that TA patients may have diminished ovarian reserve.

Key Indexing Terms: Takayasu arteritis, fertility, ovarian reserve, anti-Müllerian hormone, antral follicle count.

INTRODUCTION

Takayasu arteritis (TA) is a rare idiopathic systemic chronic vasculitis that involves large arteries^{1,2}. This disease occurs mainly in female gender during the reproductive age and ovarian reserve and future fertility are major topic of interest.

Aging, surgery and hypothalamic-pituitary-gonad axis dysfunction have been found to influence the quantity and quality of primordial follicles in ovaries and, ultimately, the ovarian reserve³⁻⁵.

Other conditions such as autoimmune oophoritis⁵ and immunosuppressive drugs, particularly intravenous cyclophosphamide (IVCYC), may also result in diminished ovarian reserve⁶⁻¹¹. Female TA patients are susceptible to these factors 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 TA patients and healthy controls. The possible association between reduction of ovarian reserve and disease parameters and treatment were also analyzed.

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls

We have screened 52 consecutive female patients with TA, followed at the Vasculitis Outpatient Clinic of the Rheumatology Division of Clinics Hospital, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, from July 2011 to

December 2012. All patients aged between 18 and 45 years and fulfilled the American College of Rheumatology classification criteria¹².

Exclusion criteria were: current pregnancy, hypothalamus-pituitary-gonadal axis dysfunction, use of hormonal contraceptive in the last six months, gynecological surgery, gynecological cancer, presence of an additional autoimmune disease, did not agree to participate in this study and incomplete gonadal evaluation. Thirty-two were excluded: use of hormonal contraceptive(n=15), did not agree to participate(n=7), incomplete assessment(n=4), presence of granulomatosis with polyangiitis(n=2), current pregnancy(n=2), hyperprolactinemia(n=1) and current treatment for gynecological cancer(n=1). Therefore, a cross sectional study was conducted in 20 patients with TA and 24 healthy controls according to the same exclusion criteria. The Local Ethics Committee of our University Hospital approved the study and an informed consent was obtained from all participants. The Brazilian socio-economic classes were classified according the *Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercados*¹³.

Age at menarche and time between menarche and current age were evaluated. Obstetric data were recorded based on individual's recollection. Amenorrhea was defined as absence of menstrual period for at least 3 consecutive cycles. Normal cycle was defined as flow duration varying 3-7 days and length 25-35 days^{7,9}. Menstrual disturbances were based on alterations in one or more of these parameters during evaluation. Patients with amenorrhea (> 1 year) in whom menstruation did not resume and had FSH levels>40IU/L were defined as premature ovarian failure (POF).

Secondary sexual characteristics were classified according to Tanner pubertal changes¹⁴.

Ovarian Reserve Tests

Complete ovarian function was assessed by evaluation of serum hormones levels on the early follicular phase of the menstrual cycle or randomly for those with defined amenorrhea, blinded to the other parameters of ovarian function. FSH (reference levels 3.5-12.5 IU/L), luteinizing hormone (LH) (2.4-12.6 IU/L) and estradiol (≤ 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.

Anti-Müllerian hormone (AMH) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (AMH Gen II ELISA, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) in duplicated samples in 20 TA patients and 24 controls. Intra and inter-assay coefficients of variation were limited to 5.4% and 5.6%, respectively. AMH was also evaluated by ultrasensitive AMH/Müllerian inhibiting substance enzyme linked chemiluminescent immunoassay (US AMH/MIS AnshLabs ELISA) in duplicated samples in 20 TA patient and 22 controls. Intra and inter-assay coefficients of variation were limited to 3.1% and 2.7%, respectively. AMH level <1.0 ng/mL was considered as reduced according to manufacturer suggestion^{15,16}.

Transvaginal ultrasound was performed in all sexually active TA patients and controls by an expert sonographer (LYSY) using a 6.5 MHz

endovaginal transducer (HD3, Philips Ultrasound, Bothell, WA, USA) blinded to the other parameters of gonadal function at study entry. 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 the mean ovarian volumes ($L \times W \times T \times \pi/6$)¹⁷. Follicles of 2 to 10mm were considered to antral follicle count (AFC)¹⁸. AFC levels were divided in a clinically suitable classification as: equal to or lower than 10 (low) and lower than 5 follicles (very low).

Laboratory evaluation and treatment of TA patients

Current disease activity was defined based on National Institutes of Health criteria or modified Kerr's criteria¹⁹. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was performed according to Westergreen method and C-reactive protein (CRP) according to nephelometry. Data concerning the cumulative and current dosage of all medications were determined.

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 TA and controls. Categorical variables were assessed by Fisher's exact test. Spearman rank correlation coefficient was used for correlations between cumulative dose of immunosuppressive drugs and ovarian reserve parameters and between AMH Gen II ELISA and US AMH/MIS AnshLabs ELISA kits in TA patients and healthy controls. The level of significance was set at 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

TA patients and healthy controls

All of TA patients and controls were post-pubertal (Tanner stage 5). The mean of current age was similar in TA and controls (31.2 ± 6.1 vs. 30.4 ± 6.9 years, $p=0.69$), as well as BMI, and the frequencies of Caucasian race and socio-economic class ($p>0.05$). The frequency of arterial hypertension was significantly higher in TA patients compared to controls (55% vs. 4%, $p=0.0003$). No differences were evidenced in menstrual cycle and obstetric data in both groups ($p>0.05$, Table 1). None of the nulliparous TA patients and controls tried to get pregnant and failed to conceive. The number of live births and abortion were similar in TA and controls ($p=0.28$; $p=0.34$; Table 1) and there was no case of stillbirth.

A positive correlation was observed between AMH Gen II ELISA assay and US AMH/MIS AnshLabs ELISA assay in TA patients ($r= + 0.93$; $p<0.0001$) and in healthy controls ($r= + 0.93$; $p<0.0001$). The same 10 TA patients and 4 healthy controls had decreased AMH (< 1.0 ng/mL) in both kits. Frequencies of decreased levels of AMH were significantly increased in TA according to AMH Gen II ELISA kits (50% vs. 17%, $p=0.02$) and US AMH/MIS AnshLabs ELISA (50% vs. 19%, $p=0.048$). The median of AMH (Gen II ELISA) was significantly reduced in 20 TA patients *versus* 24 controls [0.7 ($0.2-3.5$) vs. 2.7 ($0.1-6.6$) ng/mL, $p=0.008$] whereas the lower median of AMH (US AMH/MIS AnshLabs ELISA) in 20 TA patients compared to 22 controls, did not reach statistical significance [1.0 ($0.1-4.6$) vs. 2.3 ($0-6.6$) ng/mL,

p=0.12] (Table 1). Figure 1 includes data plot for AMH using two different ELISA assays.

The apparent lower AFC [11 (3-40) vs. 16 (5-37), p=0.13) and the higher frequency of low AFC (41% vs. 22%, p=0.29) in TA compared to controls also did not reach statistical significance. Ovarian volume and levels of FSH, LH, estradiol were alike in both groups (p>0.05) (Table 1).

Ovarian reserve in TA patients

Further evaluation of TA patients with low AMH levels versus normal AMH levels revealed no differences in the age at TA diagnosis (24.7 ± 7.4 vs. 21.3 ± 6.5 years, p=0.29), time lag between TA diagnosis and AMH assessment (9.7 ± 7.0 vs. 6.8 ± 5.0 years, p=0.31) and current disease activity (20% vs. 20%, p=1.0). Only one 38 years-old TA patient had concomitant low AMH and high FSH levels, whereas all other with low AMH levels had FSH within normal levels.

The median of ESR [16 (7-19) vs. 18.5 (5-51) mm/1sthour, p=0.6], CRP (5.6 ± 3.4 vs. 7.5 ± 6.7 mg/L, p=0.4), prednisone cumulative dose [4 (0-41.1) vs. 9.2 (0-27.3) grams, p=0.8) and methotrexate cumulative dose (2.6 ± 2.7 vs. 2.3 ± 1.4 grams, p=0.8) were comparable in patients with low AMH levels versus normal AMH levels. Cyclophosphamide use was reported in only one patient with reduced ovarian reserve whereas none of the remaining patients received gonadotoxic drug. No correlations were observed between cumulative doses of prednisone and methotrexate with AMH levels and AFC (p>0.05).

DISCUSSION

To our knowledge, this was the first study to identify that TA patients may have a shortened reproductive lifespan.

The main advantage of the present study was a complete ovarian reserve assessment in post-pubertal TA patients and controls at early follicular phase of menstrual cycle that provided a more accurate estimation of follicle population^{3,4}. The rigorous selection criteria of our patients and controls lower than 45 years²⁰ and without recent gynecologic surgeries, pregnancy, hypothalamic-and pituitary-ovary axis dysfunction are relevant since these alterations may influence ovarian reserve tests^{4,10}.

In addition, we evaluated hormonal profile without the effect of any exogenous hormone for at least six months to avoid possible bias, since recent studies indicate that AMH levels can be decreased in women using contraceptives²¹. This restricted inclusion and exclusion criteria resulted, however, in small sample size.

This careful evaluation suggested that TA patients have lower AMH levels compared to controls. The use of two different kits with similar results regarding the frequency of reduced AMH ruled out the possibility of instability in terms of values of AMH Gen II ELISA recently reported²². Moreover, our data showed a very strong correlation between both assays assessments. Of note, AMH levels were more often decreased in TA patients with a low but not significant AFC. The smaller number of subjects that performed transvaginal ultrasound evaluation is the most likely explanation for this non-significant

finding. The clinical utility of AFC is limited since it has low sensitivity, in spite of high specificity²³.

Ovarian reserve in autoimmune rheumatic diseases may be influenced by age, autoimmunity and therapy^{3,4,10}. The comparable age among patients and controls exclude this confounding variable and reinforces the finding of a premature reduced ovarian reserve in TA patients²⁰.

Diminished follicle ovarian pool was probably not related to TA therapy. Different from female SLE and dermatomyositis patients^{3,4,10,11} in whom immunosuppressive agents, particularly IVCYC, and glucocorticoids influenced the menstrual cycles and ovarian reserve. Additionally, disease activity was reported to contribute to alter reproductive function in adult and adolescent SLE⁸ contrasting to the lack of association observed herein.

The future reproductive health of TA patients is unknown and family planning must be discussed with all patients, especially in young patients with low ovarian reserve. In this regard, a recent study showed that healthy women over age 40 with extreme low levels of AMH still had a chance of pregnancy²⁴.

In conclusion, the present report was the first to suggest that TA patients may have diminished ovarian reserve.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Elaine P. Leon for technical support and Dr. Ulysses Doria Filho for statistical analysis.

REFERENCES

1. Castellanos AZ, Campos LA, Liphaus BL, Marino JC, Kiss MH, Silva CA. Takayasu's arteritis. *An Pediatr (Barc)* 2003;58:211-6.
2. Campos LM, Castellanos AL, Afiune JY, Kiss MH, Silva CA. Takayasu's arteritis with aortic aneurysm associated with Sweet's syndrome in childhood. *Ann Rheum Dis* 2005;64:168-9.
3. Silva CA, Brunner HI. Gonadal functioning and preservation of reproductive fitness with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2007;16:593-9.
4. 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.
5. Silva CA, Yamakami LY, Aikawa NE, Araujo DB, Carvalho JF, Bonfá E. Autoimmune primary ovarian insufficiency. *Autoimmun Rev* 2014 (in press)
6. Ostensen M, Brucato A, Carp H, Chambers C, Dolhain RJ, Doria A, et al. Pregnancy and reproduction in autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50:657-64
7. Silva CA, Leal MM, Leone C, Simone VP, Takiuti AD, Saito MI, et al. Gonadal function in adolescents and young women with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2002;11:419-25.
8. Silva CA, Hilário MO, Febrônio MV, Oliveira SK, Terreri MT, Sacchetti SB, et al. Risk factors for amenorrhea in juvenile systemic lupus erythematosus (JSLE): a Brazilian multicentre cohort study. *Lupus* 2007;16:531-6.
9. Medeiros P, Febrônio M, Bonfá E, Borba E, Takiuti A, Silva CA. Menstrual and hormonal alterations in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009;18:38-43.
10. 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.
11. Aikawa NE, Sallum AM, Pereira RM, Suzuki L, Viana VS, Bonfa E, et al. Subclinical impairment of ovarian reserve in juvenile systemic lupus erythematosus after cyclophosphamide therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30:445-9.
12. Arend WP, Michel BA, Bloch DA, Hunder GG, Calabrese LH, Edworthy SM, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1129-34.
13. Almeida PM, Wickerhauser W. Critério de classe econômica da Associação Brasileira de Anunciantes (ABA) e Associação Brasileira dos Institutos de Pesquisa de Mercado (ABIPEME). In: Almeida PM, Wickerhauser W editors. *O Critério ABA/ABIPEME*, ABIPEME (São Paulo); 1991. p. 1-29.
14. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969;44:291-303.
15. Shebl O, Ebner T, Sir A, Schreier-Lechner E, Mayer RB, Tews G, Sommergruber M. Age-related distribution of basal serum AMH level in women of reproductive age and a presumably healthy cohort. *Fertil*

- Steril. 2011;95(2):832-4.
16. Lunsford AJ, Whelan K, McCormick K, McLaren JF. Antimüllerian hormone as a measure of reproductive function in female childhood cancer survivors. *Fertil Steril* 2014;101(1):227-31.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Kerr GS, Hallahan CW, Giordano J, Leavitt RY, Fauci AS, Rottem M, et al. Takayasu arteritis. *Ann Intern Med* 1994;120:919–29.
 20. Satwik R, Kochhar M, Gupta SM, Majumdar A. Anti-mullerian hormone cut-off values for predicting poor ovarian response to exogenous ovarian stimulation in in-vitro fertilization. *J Hum Reprod Sci* 2012;5:206-12.
 21. 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.
 22. Clark CA, Laskin CA, Cadesky K. Anti-Mullerian hormone: reality check. *Hum Reprod* 2014;29:184-5.
 23. 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.
 24. Tokura Y, Yoshino O, Ogura-Nose S, Motoyama H, Harada M, Osuga Y, et al. The significance of serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels in patients over age 40 in first IVF treatment. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:821-5.

Table 1 - Demographic and clinical features, menstrual cycles, obstetric data, ovarian reserve in Takayasu arteritis (TA) patients and healthy controls

Variables	TA (n=20)	Controls (n=24)	p
Demographic and clinical features			
Current age, years	31.2 ± 6.1	30.4 ± 6.9	0.69
BMI, Kg/m ²	24.2 ± 4.6	24.9 ± 4.5	0.61
Arterial hypertension	11 (55)	1 (4)	0.0003
Caucasian race	16 (80)	13 (54)	0.11
Socio-economic class C or D	16 (80)	15 (58)	0.19
Menstrual cycles			
Age at menarche, years	13 (9-16)	12 (11-18)	0.49
Gynecologic age, years	18.8 ± 6.7	17.8 ± 6.7	0.63
Any menstrual disturbances	10 (50)	7 (29)	0.21
Amenorrhea	1 (5)	0 (0)	0.45
Flow duration, days	4.5 (0-8)	5 (2-10)	0.25
< 3 days	3 (15)	1 (4)	0.31
> 7 days	2 (10)	3 (12.5)	1.0
Cycle length, days	30 (0-35)	30 (15-40)	0.85
< 24 days	4 (20)	1 (4)	0.16
> 35 days	0 (0)	2 (8)	0.49
Obstetric data			
Nulliparity	9 (45)	13 (54)	0.76
Number of live births	1 (0-3)	0 (0-2)	0.28
Abortion	0 (0-2)	0 (0-2)	0.34
Ovarian reserve			
FSH, IU/L	6.8 ± 2.7	6.5 ± 2.6	0.69
Elevated levels (>10 IU/L)	1 (5)	2 (8)	1.0
LH, IU/L	4 (2.4-9.3)	5 (2.1-10.6)	0.79
Estradiol, pg/mL	41.5 (23-91)	34 (24-128)	0.44
AMH Gen II, ng/mL	0.7 (0.2-3.5)	2.7 (0.1-6.6)	0.008
Decreased levels (<1ng/ml)	10 (50)	4 (17)	0.02
AMH AnshLabs, ng/mL*	1.0 (0.1-4.6)	2.3 (0-6.6)	0.12
Decreased levels (<1ng/mL)	10 (50)	4 (19)	0.048
Ovarian volumes, mm ³ **	5.4 (2-14.1)	5.2 (1.4-17.3)	0.79
AFC**	11 (3-40)	16 (5-37)	0.13
Low AFC (≤10)	7 (41)	5 (22)	0.29
Very low (≤5)	2 (12)	2 (9)	1.0

Values expressed in n (%), mean ± standard deviation or median (range), BMI - body mass index, gynecologic age - time between menarche and current age, FSH - follicle stimulating hormone, LH - luteinizing hormone, AMH - anti-Müllerian hormone, AFC - antral follicle count, *n = 20 TA patients and 22 controls, **n = 17 TA patients and 23 controls.

Figure 1 - Data plot for anti-Müllerian hormone using two different ELISA assays

ANEXO II

Running Title: Ovarian reserve in Behçet's disease

Brief report

DIMINISHED OVARIAN RESERVE IN BEHÇET'S DISEASE PATIENTS

Andrea R.S. Mont'Alverne¹, Lucas Y.S. Yamakami², Célio R. Gonçalves¹,
Edmund C. Baracat², Eloisa Bonfá¹, Clovis A. Silva^{1,3}

¹Division of Rheumatology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

² Gynecology Department, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Pediatric Rheumatology Unit, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Competing interest: none

Corresponding author:

Prof. Eloisa Bonfá

Faculdade de Medicina da USP, Reumatologia

Av Dr Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3105, São Paulo - SP - Brazil, 01246-903.

e-mail: eloisa.bonfa@hc.fm.usp.br

ABSTRACT

Objective: To assess ovarian reserve markers in Behçet's disease (BD) patients.

Methods: Ten BD and 22 healthy controls were evaluated for ovarian reserve by: follicle stimulating hormone(FSH), luteinizing hormone(LH), estradiol and antral follicle count(AFC). Anti-Müllerian hormone(AMH) was measured by ELISA using two different kits. Demographical data, menstrual abnormalities, disease parameters and treatment were also analyzed.

Results: The median current age was similar in BD patients and controls [34(20-40) vs. 31.3(20-42)years, $p=0.33$). A positive correlation was observed between AMH Gen II ELISA assay and AMH/MISAnshLabs ELISA assay in BD patients ($r=+0.98$; $p<0.0001$) and in healthy controls ($r=+0.93$; $p<0.0001$). The mean of AMH by Gen II (0.93 ± 0.8 vs. 2.59 ± 1.8 ng/mL, $p=0.01$) and AMH/MIS AnshLabs ELISA (1.07 ± 0.86 vs. 2.51 ± 1.8 ng/mL, $p=0.02$) were significantly reduced in BD patients *versus* controls. A trend of decreased AMH (< 1.0 ng/mL) was observed in BD patients compared to controls (50% vs. 19%, $p=0.09$) in both kits. The mean of FSH was significantly higher in BD compared to controls (9.1 ± 3.6 vs. 6.5 ± 2.7 , $p=0.04$). No differences were evidenced regarding LH, estradiol, inhibin B, ovarian volumes and AFC in both groups ($p>0.05$). Current disease activity was only observed in BD patients with low AMH levels, however without statistical significance (40% vs. 0%, $p=0.44$). Cyclophosphamide use was reported in only one patient with low AMH and high FSH levels.

Conclusions: The present study was the first to suggest that BD patients may have diminished ovarian reserve. The contribution of disease activity remains to be determined.

Key Indexing Terms: Behçet's disease, fertility, anti-Müllerian hormone, antral follicle count.

INTRODUCTION

Behçet's disease (BD) is a primary systemic vasculitis characterized by a wide clinical spectrum, such as recurrent oral and genital ulcerations, uveitis, vascular, neurological, articular, renal and gastrointestinal manifestations [1]. Novel therapeutic approaches have improved health-related quality of life and ovarian reserve is therefore of great interest for these patients.

Current age, hypothalamic-pituitary-gonad axis dysfunction, gynecological surgery, autoimmune oophoritis [2,3] and immunosuppressive agents, particularly cyclophosphamide (CYC), may affect reproductive function [4-10]. Recently, a study based on structured interview in females and males BD patients showed that major organ involvement and CYC were significantly associated with infertility [11]. However, to our knowledge there is no systematic study assessing the ovary reserve in these patients.

We have performed a complete assessment of ovarian reserve, including hormonal profile and ovarian ultrasound in BD patients and healthy controls. The possible association between reduction of ovarian reserve and disease parameters and treatment were also analyzed.

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls

We have screened 32 consecutive female patients with BD, followed at the Vasculitis Outpatient Clinic of the Rheumatology Division of Clinics Hospital, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, from July 2011 to

December 2013. All patients aged between 20 and 45 years and fulfilled the criteria for BD diagnosis [12].

Exclusion criteria were: current pregnancy, hypothalamus-pituitary-gonadal axis dysfunction, use of hormonal contraceptive in the last six months, gynecological surgery, gynecological cancer, presence of an additional autoimmune disease, did not agree to participate in this study and incomplete gonadal evaluation. Twenty-two were excluded: use of hormonal contraceptive (n=13), did not agree to participate (n=6), incomplete assessment (n=2) and current pregnancy (n=1). Therefore, a cross sectional study was conducted in 10 BD patients and 22 healthy controls according to the same exclusion criteria. The Local Ethics Committee of our University Hospital approved the study and an informed consent was obtained from all participants.

Age at menarche and time between menarche and current age were evaluated. Obstetric data were recorded based on individual's recollection. Amenorrhea was defined as absence of menstrual period for at least 3 consecutive cycles. Normal cycle was defined as flow duration varying 3-7 days and length 25-35 days [6,9,10]. Menstrual disturbances were based on alterations in one or more of these parameters during evaluation. Patients with amenorrhea (> 1 year) in whom menstruation did not resume and had FSH levels >40 IU/L were defined as premature ovarian failure (POF).

Ovarian Reserve Tests

Complete ovarian function was assessed by evaluation of serum hormones levels on the early follicular phase of the menstrual cycle or

randomly for those with defined amenorrhea, blinded to the other parameters of ovarian function. FSH (reference levels 3.5-12.5 IU/L), luteinizing hormone (LH) (2.4-12.6 IU/L) and estradiol (≤ 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.

Anti-Müllerian hormone (AMH) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (AMH Gen II ELISA, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) in duplicated samples in patients and controls. Intra and inter-assay coefficients of variation were limited to 5.4% and 5.6%, respectively. AMH was also evaluated by ultrasensitive AMH/Müllerian inhibiting substance ELISA (US AMH/MIS AnshLabs ELISA) in duplicated samples. Intra and inter-assay coefficients of variation were limited to 3.1% and 2.7%, respectively. AMH level <1.0 ng/mL was considered as reduced according to manufacturer suggestion [13].

Inhibin B levels were measured by ELISA in duplicate sample using commercial kit (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas, USA). Intra and inter-assay coefficients of variation were limited to 3.5% and 5.6%, respectively. The reference value was 10-320 pg/mL.

Transvaginal ultrasound was performed in all sexually active BD patients and controls by an expert sonographer (LYSY) using a 6.5 MHz endovaginal transducer (HD3, Philips Ultrasound, Bothell, WA, USA) blinded to the other parameters of gonadal function at study entry. 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 the mean ovarian volumes ($L \times W \times T \times \pi/6$) [14]. Follicles of 2 to 10 mm were considered to antral follicle count (AFC) [14]. AFC levels were divided in a clinically suitable classification as: equal to or lower than 10 (low) and lower than 5 follicles (very low).

Laboratory evaluation and treatment of BD patients

Current disease activity was defined based on Behçet's Disease Current Activity Form validated to Brazilian Portuguese language [15]. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was performed according to Westergreen method and C-reactive protein (CRP) according to nephelometry. Data concerning the cumulative and current dosage of all medications were determined.

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 BD and controls. Categorical variables were assessed by Fisher's exact test. Spearman rank correlation coefficient was used for correlations between AMH Gen II ELISA and US AMH/MIS AnshLabs ELISA kits in BD patients and healthy controls, and between cumulative dose of prednisone and ovarian reserve parameters. The level of significance was set at 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

BD patients and healthy controls

Table 1 includes demographic data, clinical features, menstrual cycles, obstetric data and ovarian reserve in BD patients and healthy controls. No differences were evidenced in demographic data, menstrual cycles and obstetric data in BD patients and controls ($p>0.05$) (Table 1).

A positive correlation was observed between AMH Gen II ELISA assay and US AMH/MIS AnshLabs ELISA assay in BD patients ($r= + 0.98$; $p<0.0001$) and in healthy controls ($r= + 0.93$; $p<0.0001$). The mean of AMH by Gen II ELISA (0.93 ± 0.8 vs. 2.59 ± 1.8 ng/mL, $p=0.01$) and by US AMH/MIS AnshLabs ELISA (1.07 ± 0.86 vs. 2.51 ± 1.8 ng/mL, $p=0.02$) were significantly reduced in BD patients *versus* controls. A trend of decreased AMH (<1.0 ng/mL) was observed in BD patients and controls (50% vs. 19%, $p=0.09$) in both kits. The mean of FSH was significantly higher in BD compared to controls (9.1 ± 3.6 vs. 6.5 ± 2.7 , $p=0.04$). No differences were evidenced regarding LH, estradiol, inhibin B, ovarian volumes and AFC in both groups ($p>0.05$) (Table 1).

Ovarian reserve in BD patients

Current disease activity was only observed in BD patients with low AMH levels, however without statistical significance (40% vs. 0%, $p=0.44$). ESR > 20 mm 1st/hour (20% vs. 20%, $p=1.0$) and CRP > 5 mg/L (20% vs. 0%, $p=1.0$) were also similar in both groups. The frequencies of CYC (20% vs. 40%, $p=1.0$), chlorambucil (20% vs. 20%, $p=1.0$), azathioprine (40% vs. 40%,

p=1.0), methotrexate (40% vs. 0%, p=0.44) and colchicine (100% vs. 100%, p=1.0) were alike in BD patients with low AMH levels compared to normal levels. No correlations were observed between cumulative dose of prednisone and AMH levels (p=0.51) and AFC (p=0.56).

DISCUSSION

To our knowledge, this was the first study to demonstrate that BD patients may have diminished ovarian reserve.

The advantage of the present study was a complete evaluation of ovarian reserve during early follicular phase that provides a more accurate estimation of ovarian function [2-4,6,7]. The exclusion criteria without gynecologic surgeries and hypothalamic-pituitary-ovary axis dysfunction are important since these abnormalities may reduce total follicle population [2,4]. Moreover, none of our BD patients had stent grafting of abdominal aortic aneurysms, a known cause of ovarian blood flow reduction and infertility [16].

Furthermore, the restricted selection criteria of BD patients and controls without contraceptive for at least six months are relevant, since this drug may affect gonadal evaluation [3]. However, the strict exclusion criteria resulted in a limited number of patients hampering the interpretation of the main contributing factor that induced diminished ovarian reserve in BD patients.

AMH is produced by granulosa cells and is considered as an early and sensitive marker of diminished ovarian reserve [3]. Recently it has been suggested a possible instability of AMH Gen II assay [17]. Our evaluation, using two different kits with similar results and strong correlation with each

other, make our findings of diminished ovarian reserve in BD more reliable. In addition, concomitant elevated levels of FSH in these patients reinforce this hypothesis. Although patients with BD have presented lower AFC compared to controls, these results were not significant, probably due the small number of subjects that performed transvaginal ultrasound evaluation. Of note, despite its high specificity, the low sensibility of AFC makes its clinical use limited [18].

Ovarian reserve in autoimmune chronic diseases may be influenced by many conditions such age, disease status and therapy [2,4]. Disease activity was reported to affect reproductive health in male BD with orchitis [19]. In the present study it was observed in 40% of diminished ovarian reserve patients compared to none of those without this abnormality, but this finding did not reach statistical significance. With regard to drugs, previous reports from our group involving female patients with systemic lupus erythematosus [6,7,9] and juvenile dermatomyositis [10] identified CYC as most important factor influencing ovarian follicle pool. The same finding was also observed in male patients with autoimmune rheumatic chronic diseases treated with high dose CYC [19-24]. In contrast, the frequency of this alkylating agent in BD was similar in patients with and without low AMH levels, probably due to the small sample size.

In conclusion, this is the first report to suggest that BD patients may have diminished ovarian reserve during reproductive ages. The contribution of disease activity remains to be determined. Further study with larger number of BD patients is necessary to confirm this finding.

ACKNOWLEDGEMENTS: 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 by Núcleo de Apoio à Pesquisa “Saúde da Criança e do Adolescente” da USP (NAP-CriAd-SP) to CAS. We thank Elaine P. Leon and Vilma T. Viana for technical support and Dr. Ulysses Doria Filho for statistical analysis.

DISCLOSURES:

Andrea R.S. Mont’Alverne – none

Lucas Y.S. Yamakami – none

Célio R. Gonçalves – none

Edmund C. Baracat – none

Eloisa Bonfá – none

Clovis A. Silva – none

REFERENCES

1. Aikawa NE, Gonçalves C, Silva CA, Gonçalves C, Bonfá E, de Carvalho JF (2001) Late response to anti-TNF- α therapy in refractory mucocutaneous lesions of Behçet's disease. *Rheumatol Int* 31:1097-9.
2. Silva CA, Brunner HI (2007) Gonadal functioning and preservation of reproductive fitness with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 16:593-9.
3. Silva CA, Yamakami LY, Aikawa NE, Araujo DB, Carvalho JF, Bonfá E (2014) Autoimmune primary ovarian insufficiency. *Autoimmun Rev* (in press).
4. Silva CA, Bonfa E, Østensen M (2010) Maintenance of fertility in patients with rheumatic diseases needing antiinflammatory and immunosuppressive drugs.

- Arthritis Care Res (Hoboken) 62:1682-90.
5. Ostensen M, Brucato A, Carp H et al (2011) Pregnancy and reproduction in autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)* 50:657-64.
 6. Aikawa NE, Sallum AM, Pereira RM, et al. Subclinical impairment of ovarian reserve in juvenile systemic lupus erythematosus after cyclophosphamide therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30:445-9.
 7. Silva CA, Leal MM, Leone C et al (2002) Gonadal function in adolescents and young women with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 11:419-425.
 8. Silva CA, Hilário MO, Febrônio MV, et al (2007) Risk factors for amenorrhea in juvenile systemic lupus erythematosus (JSLE): a Brazilian multicentre cohort study. *Lupus* 16:531-536.
 9. Medeiros P, Febrônio M, Bonfá E, Borba E, Takiuti A, Silva CA (2009) Menstrual and hormonal alterations in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 18:38-43.
 10. Aikawa NE, Sallum AM, Leal MM, Bonfá E, Pereira RM, Silva CA (2010) Menstrual and hormonal alterations in juvenile dermatomyositis. *Clin Exp Rheumatol* 28:571-5.
 11. Uzunaslán D, Saygin C, Hatemi G, Tascilar K, Yazici H (2013) No appreciable decrease in fertility in Behçet's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* (in press).
 12. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. International Study Group for Behçet's Disease (1990) *Lancet* 335:1078-80.
 13. Satwik R, Kochhar M, Gupta SM, Majumdar A (2012) Anti-mullerian hormone cut-off values for predicting poor ovarian response to exogenous ovarian stimulation in in-vitro fertilization. *J Hum Reprod Sci* 5:206-212.
 14. Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW, te Velde ER, Broekmans FJ (2007) 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* 87:764-75.
 15. Neves FS, Moraes JC, Kowalski SC, Goldenstein-Schainberg C, Lage LV, Gonçalves CR (2007) Cross-cultural adaptation of the Behçet's Disease Current Activity Form (BDCAF) to Brazilian Portuguese language. *Clin Rheumatol* 26:1263-7.
 16. Cil AP, Karabulut AA, Koçak M (2010). Assessment of ovarian stromal artery Doppler characteristics and serum hormone levels in patients with Behçet

- disease. *Diagn Interv Radiol* 16:288-92.
17. Clark CA, Laskin CA, Cadesky K (2014) Anti-Mullerian hormone: reality check. *Hum Reprod* 29:184-5.
 18. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2012) Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril* 98:1407-15.
 19. Silva CA, Cocuzza M, Borba EF, Bonfá E (2012) Cutting-edge issues in autoimmune orchitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 42:256-63.
 20. Silva CA, Hallak J, Pasqualotto FF, Barba MF, Saito MI, Kiss MH (2002) Gonadal function in male adolescents and young males with juvenile onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 29:2000-5.
 21. Soares PM, Borba EF, Bonfa E, Hallak J, Correa AL, Silva CA (2007) Gonad evaluation in male systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 56:2352-61.
 22. Suehiro RM, Borba EF, Bonfa E, et al (2008) Testicular Sertoli cell function in male systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 47:1692-7.
 23. Moraes AJ, Pereira RM, Cocuzza M, Casemiro R, Saito O, Silva CA (2008) Minor sperm abnormalities in young male post-pubertal patients with juvenile dermatomyositis. *Braz J Med Biol Res* 41:1142-7.
 24. Moraes AJ, Bonfa E, Cocuzza M, Borges CT, Saito O, Silva CA (2010) Gonad evaluation in male dermatomyositis. A pilot study. *Clin Exp Rheumatol* 28:441-2.

Table 1 – Demographic data, clinical features, menstrual cycles, obstetric data and ovarian reserve in Behçet disease (BD) patients and healthy controls

Variables	BD (n=10)	Controls (n=22)	p
Demographic data and clinical features			
Current age, years	34 (20-40)	31.3 (20-42)	0.33
BMI, Kg/m ²	24.9 ± 5.6	25.2 ± 4.5	0.88
Caucasian race	5 (50)	12 (54)	1.0
Socio-economic class C or D	7 (70)	13 (59)	0.70
Menstrual cycles			
Age at menarche, years	13.5 (9-15)	12 (11-18)	0.14
Gynecologic age, years	20.4 ± 6.1	18.8 ± 6.1	0.50
Any menstrual disturbances	5 (50)	7 (32)	0.43
Amenorrhea	0 (0)	0 (0)	-
Flow duration, days	5 (1-10)	5 (2-10)	0.55
< 3 days	1 (10)	1 (4.5)	0.53
> 7 days	2 (20)	3 (13.6)	0.63
Cycle length, days	30 (27-40)	30 (15-40)	0.55
< 24 days	0 (0)	1 (4.5)	1.0
> 35 days	2 (20)	2 (9)	0.57
Obstetric data			
Nulliparity	3 (30)	10 (45)	0.46
Number of live births	1 (0-5)	0 (0-2)	0.42
Abortion	0 (0-2)	0 (0-2)	0.77
Ovarian reserve			
FSH, IU/L	9.1 ± 3.6	6.5 ± 2.7	0.04
Elevated levels (>10 IU/L)	4 (40)	2 (9)	0.05
LH, IU/L	4.8 ± 2.5	5.5 ± 2.6	0.51
Estradiol, pg/mL	44 (20-82)	33.5 (24-128)	0.51
Inhibin B (pg/mL)	56.7 ± 29.7	46.3 ± 25.4	0.32
AMH Gen II, ng/mL	0.93 ± 0.8	2.59 ± 1.8	0.01
Decreased levels (<1ng/ml)	5 (50)	4 (19)	0.09
AMH AnshLabs, ng/mL	1.07 ± 0.86	2.51 ± 1.8	0.02
Decreased levels (<1ng/mL)	5 (50)	4 (19)	0.09
Ovarian volumes, mm ³ **	4.2 (2.7-8.7)	5.2 (1.4-17.3)	0.37
AFC**	11.6 ± 8	16.8 ± 8.8	0.21
Low AFC (≤10)	3 (50)	5 (24)	0.31
Very low (≤5)	1 (17)	2 (9)	0.54

Values expressed in n (%), mean ± standard deviation or median (range), BMI - body mass index, gynecologic age - time between menarche and current age, FSH - follicle stimulating hormone, LH - luteinizing hormone, AMH - anti-Müllerian hormone, AFC - antral follicle count, **n = 6 BD patients and 21 controls.