

Daniel Brito de Araujo

Avaliação da reserva ovariana e do anticorpo anti-corpo lúteo em mulheres adultas com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância

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
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Ferreira Borba Neto

SÃO PAULO
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Araujo, Daniel Brito de

Avaliação da reserva ovariana e do anticorpo anti-corpo lúteo em mulheres adultas com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância / Daniel Brito de Araujo. --São Paulo, 2013.

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: Eduardo Ferreira Borba Neto.

Descritores: 1.Lúpus eritematoso sistêmico 2.Testes de função ovariana 3.Fertilidade 4.Ciclofosfamida 5.Metotrexato 6.Hormônio anti-Mülleriano 7.Anticorpo anti-corpo lúteo.

USP/FM/DBD-096/13

DEDICATÓRIA

A minha amada Danise, que a seu modo único conseguiu tornar minha vida mais feliz e completa.

Aos meus pais, João Carlos e Valdete, por todo o amor e dedicação e por me ensinarem a ser quem sou.

A GRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Clóvis Silva, ser humano incrível exemplo de médico e pesquisador, por me guiar nesta jornada, e por me dar muito mais atenção do que eu possa ter merecido.

Ao Prof. Dr. Eduardo Borba, co-orientador e amigo. Não tenho como lhe agradecer por ter me acolhido no momento em que iniciei esta fase de minha vida, mas principalmente pelos ensinamentos e por toda sua paciência.

Ao Prof. Dr. Wiliam HabibChahade, mestre e amigo, que sempre me instigou a pensar e sempre confiou em minha capacidade, o que para mim, é o verdadeiro papel do mentor.

Ao Dr.LucasYamakami, colega de empreitada. Sem tua dedicação e apoio este projeto ainda estaria engatinhando.

A Profa. Dra, Eloísa Bonfá, por todas as oportunidades e pela confiança depositada em todos os momentos.

Aos colegas do Serviço de Reumatologia do IAMSPE: Sílvio, Sônia, Elaine, Rina, José Carlos, Renata, Nafice, Felice, Roberta, Gleide, Catarina, Duca, Yoshiko e as “Soninhas”, com quem tenho o prazer de conviver diariamente, pelo aprendizado, compreensão e carinho em todos os momentos.

Aos preceptores e professores da Reumatologia do HC, em especial ao Prof. Dr. Célio Gonçalves e ao Prof. Dr. Samuel Shinjo, pelo apoio e amizade, e pelos bons momentos que me proporcionaram nestes últimos anos.

A Dra. Vilma Viana por todo o suporte técnico, paciência e leitura crítica de meus resultados.

Aos meus colegas Elisa, Leandro, Themis, Marla e Paula, pela confiança depositada e apoio.

Muitas pessoas dispenderam tempo e esforço, sem os quais esse projeto não teria tido êxito: Dra. Andréa Rocha, Cristina Maria Nazareth, Elaine Pires Leon, Prof Ulysses Dória Filho, Mariza Kazue Umetsu Yoshikawa e Angélica Belem. A todos meu muito obrigado.

Eu não poderia esquecer pessoas que foram extremamente importantes em minha formação, entre elas Professoras Tânia Hellwig e Gilca Costa, por todo o carinho nos anos de graduação. Aos Professores Umberto Oliveira e Rogério Marques por me obrigarem a crescer. E os Professores Fábio Braga e Sandra Bertoldi, por me ensinarem a enxergar além.

Aos meus amigos: Rodrigo Rovere, Fábio Vieira, Rodrigo Bertolino, Anderson Machado, José Luis Carvalho e Carlos Bragaia, por tornarem a minha vida mais feliz, e que, portanto muito me ajudaram no desenvolvimento deste e de todos os trabalhos.

A minha família por tudo o que significam e por toda a alegria que me proporcionam.

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 pela Federico Foundation, Suiça; e para Eduardo Borba pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ#301411/2009-3) e pela Federico Foundation, Suiça.

Esta dissertação 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. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed.

São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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.....	5
3	Pacientes e Métodos.....	6
3.1	Pacientes.....	6
3.2	Métodos.....	7
3.3	Análise estatística.....	11
4	Resultados.....	12
4.1	Pacientes com LES versus controle.....	12
4.2	Reserva ovariana e imunossupressores em pacientes com LES <i>versus</i> controles.....	14
4.3	Reserva ovariana e anti-CoL nos pacientes com LESp.....	16
5	Discussão.....	19
6	Conclusões.....	22
7	Referências.....	23
8	Anexos.....	27

ABREVIATURAS

AINHs	Anti-inflamatórios não hormonais
aCL	Anticardiolipina
LAC	Anticoagulante lúpico
anti-CoL	Anticorpo anti-corpo lúteo
AMH	Hormônio anti-Mülleriano
CFA	Contagem de folículos antrais
CIC	Ciclofosfamida
ELISA	Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima
FOP	Falência ovariana prematura
FSH	Hormônio folículo estimulante
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IMC	Índice de massa corpórea
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LESp	Lúpus eritematoso sistêmico de início na infância
LH	Hormônio luteinizante
PBS	Tampão fosfato salino
SLEDAI-2K	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000</i>
SLICC-ACR/DI	<i>SLE International Collaborating Clinics/ACR Damage Index</i>

TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas, ciclos menstruais, reserva ovariana e anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) de início pediátrico e controles saudáveis.....	13
Tabela 2 – Características demográficas, ciclos menstruais e reserva ovariana em pacientes em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) de início pediátrico de acordo com o uso de ciclofosfamida endovenosa (CIC) e controles saudáveis.....	15
Tabela 3 – Características demográficas, ciclos menstruais e reserva ovariana em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) de início pediátrico em relação à presença do anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL).....	17
Tabela 4 – Características clínicas e imunológicas, atividade de doença, dano cumulativo e tratamento em pacientes com LES (LES) de início pediátrico em relação à presença do anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL).....	18

FIGURAS

Figura 1 – Gráfico mostrando correlação negativa entre dose cumulativa de metotrexate e níveis séricos do hormônio anti-Mülleriano (AMH)..... 16

RESUMO

ARAUJO 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.

Objetivo: avaliar marcadores de reserva ovariana e a presença de anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) de início na infância. **Métodos:** A presença do anti-CoL foi avaliada através de immunoblot em cinquenta e sete mulheres com LES e 21 controles saudáveis. A reserva ovariana foi estimada através das dosagens do hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estradiol, hormônio anti-Mülleriano (AMH) e da contagem de folículos antrais (CFA). Foram também avaliados dados demográficos, alterações menstruais, atividade da doença, dano cumulativo e tratamento. **Resultados:** a mediana da idade atual foi similar nos pacientes com LES em relação aos controles (27,7 vs. 27,7 anos, $p=0,414$). A mediana do AMH (1,1 vs. 1,5ng/mL, $p=0,037$) da CFA (6 vs. 16 $p<0,001$) forma significantemente menores nos pacientes com LES quando comparados aos controles, porém sem alterações menstruais significantes. A presença do anti-CoL foi observada apenas nos pacientes com LES (16% vs. 0%, $p=0,103$) e não foi relacionada com dados demográficos, parâmetros de reserva ovariana, atividade da doença, dano cumulativo ou tratamento. Avaliação dos pacientes tratados com ciclofosfamida mostrou níveis elevados de FSH quando comparados com os pacientes que não receberam ciclofosfamida e com controles (8,8 vs. 5,7 vs. 5,6IU/L, $p=0,032$) e níveis menores de AMH e CFA (0,4 vs. 1,5 vs. 1,5ng/mL, $p=0,004$; 4,0 vs. 6,5 vs. 16IU/L, $p=0,001$; respectivamente). Dezenove pacientes foram tratados com metotrexate sem histórico de uso de ciclofosfamida sendo evidenciada uma correlação negativa entre a dose cumulativa de metotrexate e os níveis de AMH ($p=0,027$, $r=-0,507$). **Conclusões:** este estudo identificou que altas doses ciclofosfamida e metotrexato são causas relevantes de disfunção ovariana subclínica durante a idade reprodutiva em mulheres com LES de início na infância.

Descritores: Lúpus eritematoso sistêmico; Testes de função ovariana; Fertilidade; Ciclofosfamida; Metotrexato; Hormônio anti-Mülleriano; Anticorpo anti-corpo lúteo

SUMMARY

ARAUJO DB. *Evaluation of ovarian reserve and anti-corpus luteum antibody in adult women with child-onset systemic lupus erythematosus*[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Objective: To assess ovarian reserve markers and anti-corpus luteum antibodies (anti-CoL) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients with onset before adulthood. **Methods:** Fifty-seven SLE female patients and 21 healthy controls were evaluated for anti-CoL by immunoblot. Ovarian reserve was assessed by: follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol, anti-Müllerian hormone (AMH) and antral follicle count (AFC). Demographic data, menstrual abnormalities, disease activity, damage and treatment were also analyzed. **Results:** The median of current age was similar in SLE patients and controls (27.7. vs. 27.7 years, p=0.414). The median of AMH (1.1 vs. 1.5ng/mL, p=0.037) and AFC (6 vs. 16, p<0.001) were significantly reduced in SLE patients versus controls without significant menstrual abnormalities. Anti-CoL was solely observed in SLE patients (16% vs. 0%, p=0.103) and not associated with demographic data, ovarian reserve parameters, disease activity/damage and treatment. Further evaluation of patients treated with cyclophosphamide revealed a higher median of FSH levels compared to SLE patients not treated with cyclophosphamide and controls (8.8 vs. 5.7 vs. 5.6IU/L, p=0.032) and a lower median AMH levels and AFC (0.4 vs. 1.5 vs. 1.5ng/mL, p=0.004; 4.0 vs. 6.5 vs. 16IU/L, p=0.001; respectively). Nineteen patients were treated with methotrexate without cyclophosphamide use, and a negative correlation was observed between cumulative methotrexate dose and AMH levels (p=0.027, r=-0.507). **Conclusions:** The present study identifies high doses of cyclophosphamide and methotrexate as relevant causes of subclinical ovarian dysfunction during reproductive ages in SLE patients with onset before adulthood.

Descriptors: Lupus erythematosus, systemic; Ovarian function tests; Fertility; Cyclophosphamide; Methotrexate; Anti-Mullerian hormone; Anti-corpus luteum antibody

1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença auto-imune do tecido conectivo, multissistêmica, clinicamente heterogênea possuindo uma ampla variedade de apresentações clínicas¹. Esta doença é conhecida por sua predileção pelo sexo feminino, afetando principalmente mulheres jovens em idade reprodutiva, o que levanta questões relacionadas à sua capacidade reprodutiva e potencial de fertilidade futuros.

O diagnóstico cada vez mais precoce, decorrente de um melhor reconhecimento clínico da doença, estabelecimento de critérios classificatórios e a introdução de testes laboratoriais mais específicos, além do surgimento de modalidades terapêuticas mais efetivas para o controle da doença, têm contribuído para uma melhora do prognóstico com uma maior sobrevida dos pacientes com LES. Essa maior sobrevida faz com que cada vez mais aumente o interesse em complicações de longo prazo decorrentes da própria doença ou daquelas decorrentes das terapêuticas utilizadas, contribuindo assim para uma melhor qualidade de vida nesses pacientes². Uma das complicações de longo prazo relacionadas tanto à atividade da doença quanto a terapia utilizada no LES é a que diz respeito à diminuição da reserva ovariana.

A reserva ovariana depende enormemente da quantidade e qualidade dos folículos primordias, o que é sucessivamente perdida durante a fase fetal tardia. Mulheres têm entre 1 e 2 milhões de folículos primordiais ao nascimento, sendo que esse número diminui para cerca de 400.000 folículos no início da puberdade. A cada ciclo menstrual, cerca de 1.000 folículos são recrutados, sendo que destes habitualmente apenas um único evolui como folículo dominante e ovula, e os demais sofrem atresia². A avaliação da reserva ovariana, por sua vez, é realizada através de métodos indiretos que estimam a população folicular³.

Fatores de risco associados à diminuição da população de folículos em mulheres com LES incluem: disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal^{3,4}, autoimunidade^{5,6}, atividade da doença^{2,3,7} e uso de imunossupressores⁸⁻¹².

Redução na reserva ovariana foi demonstrada em populações com LES de início na infância¹³ e com LES adulto^{8-12,14,15}, todavia em apenas um estudo foi realizada uma avaliação global da reserva ovariana¹⁶ enquanto que os demais foram limitados à avaliação de alterações menstruais, níveis de hormônio folículo estimulante (FSH)^{4,16,17} e alguns relatos mais recentes incluíram a contagem de folículos antrais (CFA) e/ou a dosagem do hormônio anti-Mülleriano (AMH)^{10-12,16}. Entretanto, não existem dados relativos à pacientes com LES em idade fértil com doença de início na faixa etária pediátrica no que diz respeito a estes dois últimos parâmetros. Além disso, a avaliação do impacto do anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL) na diminuição do pool de folículos ovarianos através do uso desses importantes biomarcadores de disfunção gonadal ainda não foi estudada nesta população¹⁸.

Os níveis de FSH, hormônio luteinizante (LH) e estradiol têm sido classicamente utilizados para avaliação da função gonadal. Entretanto, sabe-se atualmente que seus níveis na circulação sanguínea pouco refletem a dinâmica folicular, visto não existir forte correlação com a população de folículos primordiais, tidos como representantes da reserva funcional ovariana¹⁹⁻²¹. Atualmente, os dois exames considerados como melhores marcadores de reserva ovariana em mulheres pré-menopausas são: o AMH e a CFA ultra-sonográfica²¹⁻²⁵.

O AMH foi inicialmente identificado como um fator que determina a regressão dos ductos müllerianos no embrião do sexo masculino. É um hormônio glicoprotéico da superfamília dos fatores de crescimento de transformação β, expresso nos ovários de

meninas a partir da 36^a semana de vida intra-uterina e com maiores concentrações a partir da puberdade²⁵. Em mulheres é produzido por células da granulosa de folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais, atuando como modulador do próprio recrutamento folicular e, também, na regulação da esteroidogênese, determinando o crescimento dos folículos primordiais, além de estar envolvido no recrutamento de folículos antrais sensíveis ao FSH²⁵.

Considerando que o AMH somente é produzido por folículos ovarianos em crescimento, estimando assim a quantidade e a atividade das unidades recrutáveis de um pool inicial de folículos em estágios precoces de maturação seus níveis séricos podem ser usados como marcador de reserva ovariana. Esse hormônio é considerado como o marcador sérico mais fidedigno para a predição da reserva ovariana^{25,26}. Contrapondo-se ao FSH e ao estradiol, o AMH apresenta, ainda, a vantagem de uma reduzida variabilidade de suas concentrações séricas ao longo do ciclo menstrual²⁰, o que lhe confere uniformidade na avaliação e maleabilidade quanto ao momento de dosagem.

Uma forma menos invasiva de avaliar o potencial de resposta dos ovários é a contagem ultra-sonográfica dos folículos antrais. Embora o reconhecimento de seu valor não seja unânime, estudos mostram que a CFA apresenta nítida correlação positiva com as concentrações dos marcadores séricos conhecidos, principalmente o AMH^{25,26}.

Um outro aspecto relevante na disfunção gonadal das doenças auto-imunes parece ser a presença do anti-CoL. Este foi evidenciado em 22% das mulheres adultas com LES e foi associado com irregularidades menstruais e níveis elevados de FSH sugerindo um marcador precoce de disfunção ovariana, antecedendo a falência ovariana prematura (FOP)⁵.

A ausência de estudos em mulheres adultas com LES de início na faixa etária pediátrica (LESp) avaliando reserva ovariana e a possível associação com a presença de auto-anticorpos anti-ovarianos com esses novos marcadores de disfunção gonadal estimulou a realização da presente pesquisa.

2. OBJETIVOS

1. Avaliação global da reserva ovariana em mulheres adultas em idade fértil com LESp comparadas com controles saudáveis.
2. Avaliação de possíveis associações entre o uso de imunossupressores e marcadores da reserva ovariana.
3. Avaliação de possíveis associações entre a presença do anti-CoL e marcadores da reseva ovariana.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Tipo de estudo e populações avaliadas: Um estudo transversal foi realizado entre novembro de 2009 e junho de 2012 com uma população de 1.001 pacientes seguidos regularmente no ambulatório de LES da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Neste período, a população em seguimento continha de 113 mulheres adultas com LESP. Destas 113 pacientes, 57 foram incluídas no estudo sendo 56 excluídas pelos seguintes motivos: gestação atual (n=5), hipofisite linfocítica (n=1), doença renal terminal (n=1), contra-indicação ou recusa em suspender o contraceptivo hormonal (n=38), cirurgia pélvica prévia (n=3) e não concordância em participar do estudo (n=8). Foram também incluídos 21 controles saudáveis da comunidade. Todos os sujeitos no presente estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Critérios de inclusão: Mulheres em idade reprodutiva (entre 18 e 40 anos) que preencham os critérios de classificatórios para LES do *American College of Rheumatology* com doença de início pediátrico (idade de início até os 18 anos)²⁷. Controles saudáveis que não apresentaram critérios de exclusão.

Critérios de exclusão: Gravidez ou lactação atual, disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, doença renal terminal, contra-indicação ou recusa em suspender o uso de contraceptivos hormonais por ao menos 12 meses ou até ao

menos retorno da menstruação por 3 meses consecutivos, tireoidopatias, histórico de cirurgia ou irradiação pélvica ou neoplasia, uso de anti-inflamaórios não hormonais (AINHs) nos últimos 3 meses e uso de análogos do hormônio liberador da gonadotrofina (GnRH-a).

3.2 Métodos

Dados demográficos e parâmetros gerais: Foram avaliados idade de início da doença, idade atual, tempo de duração da doença, idade da menarca da paciente, idade ginecológica (tempo entre idade da menarca e idade atual) e índice de massa corpórea (IMC) (peso em Kg dividido por altura em metros ao quadrado). Além disso, a classe socioeconômica foi 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 Mercados, que se baseia na escolaridade do chefe de família e itens presentes na casa²⁸.

Avaliação clínica, laboratorial e tratamento das pacientes com LESp: Foi realizada uma revisão cuidadosa dos prontuários incluindo dados prévios clínicos, laboratoriais e terapêuticos. Manifestações do LES foram definidas como: lesões mucocutâneas (exantema malar ou discóide, úlceras orais e/ou fotossensibilidade), envolvimento articular (artrite não erosiva), doença neuropsiquiátrica (convulsão ou psicose), comprometimento renal (proteinúria $\geq 0,5\text{g}/24\text{h}$, presença de cilindros, hematúria persistente ≥ 10 hemácias por campo e/ou insuficiência renal), serosite

(pleurite ou pericardite) e anormalidades hematológicas (anemia hemolítica, leucopenia com leucócitos $<4.000/\text{mm}^3$, linfopenia com linfócitos $<1.500/\text{mm}^3$ em duas ou mais ocasiões, e trombocitopenia com plaquetas $<100.000/\text{mm}^3$, desde que excluídas causas infecciosas e/ou medicamentosas).

Anti-DNA de dupla hélice foi detectado através de imunofluorescência indireta usando *Critchidia luciliae* como substrato. Ensaio de hemaglutinação com extraído de timo de coelho foi usado para avaliar a presença de anticorpos contra RNP e Sm. Detecção de anticorpos contra antígenos salino-solúveis, Ro/SS-A e La/SS-B, foi realizada através de contraimunoeletroforese contra extrato salino de baço de cachorro^{29,30}. A presença de anticorpos anticardiolipina IgG e IgM foi analisada por ELISA³¹ e o anticoagulante lúpico através dos *guidelines* da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia³². Anticorpos contra proteína P ribossomal (anti-P) foram detectados por *Western blotting* usando como substrato frações ribossomais purificadas extraídas de hepatócitos de ratos³³.

No momento da realização do exame ultrassonográfico e da coleta de sangue foram avaliados a atividade da doença através do *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000* (SLEDAI-2K)³⁴ e o dano cumulativo através do *SLE International Collaborating Clinics/ACR Damage Index* (SLICC/ACR-DI)³⁵.

Foram estudadas as drogas utilizadas para o tratamento do LES (corticosteróides, difosfato de cloroquina, sulfato de hidroxicloroquina, metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina e micofenolato mofetil), bem como a dose cumulativa e a dose atual no momento da realização do exames. Além disto, tempo e duração da terapêutica com ciclofosfamida foram determinados.

Avaliação dos ciclos menstruais: As pacientes foram orientadas a anotar os ciclos menstruais (últimos três ciclos consecutivos). Ciclo menstrual normal foi definido como aquele tendo um intervalo entre 25 e 35 dias com duração de 3 a 7 dias de fluxo^{36,37}, 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 FOP^{4,16,17,36,38}.

Determinação dos níveis séricos hormonais e da avaliação da reserva ovariana: Os hormônios foram coletados na fase folicular precoce (entre o 2º e o 4º dia da menstruação), e testados em duplicita no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42). FSH (normal 3,5-12,5 IU/L), LH (normal 2,4-12,6 U/L), estradiol (normal ≤ 166 pg/mL), foram analisados através da técnica de radioimunoensaio usando kit comercial (*Cobas®*, *Roche, Mannheim, Germany*). Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio recomendados pelo fabricante foram limitados a 5,7% e 3,6%, respectivamente. O AMH (normal >1 ng/mL) foi mensurados através do ensaio de imunoadsorção ligado a enzima (ELISA) em duplicita (*AMH Gen II ELISA*, *Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA*), no Laboratório de Investigação Médica (LIM) da Disciplina de Reumatologia da FMUSP, sendo os coeficientes de variação intra e inter-análise limitados a 12,3% e 14,2% respectivamente.

Detectção do anticorpo anti-corpo lúteo: A dosagem do anticorpo anti-corpo lúteo foi realizada no LIM da Disciplina de Reumatologia da FMUSP, usando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blott*, como descrito por Pasoto et al.⁵. Resumidamente: os extratos de células e tecidos de corpo lúteo bovino são submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na presença de sulfato dissódico usando o gel de acrilamida a 12%. Procede-se então à transferência eletroforética dos extratos a uma membrana de nitrocelulose cortada em tiras, as quais são incubadas em solução bloqueadora de leite desnatado a 5% em tampão fosfato salino (PBS) por duas horas a temperatura ambiente sob agitação contínua. As tiras são 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 são incubadas com IgG de cabra anti-IgG humana misturada com fosfatase alcalina. A reação é visualizada adicionando fosfato 5-bromo-4-cloro-3-indolil (BCIP) e nitroazul de tetrazólio.

Ultra-sonografia: Esta foi realizada na fase folicular precoce (entre o 2º e o 4º dias do ciclo menstrual), em todas as pacientes e controles sexualmente ativas pelo mesmo examinador usando um transdutor endovaginal de 6.5 MHz (*HD3, Philips Ultrasound, Bothell, WA, USA*), no Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da FMUSP. O examinador não tinha conhecimento nem das características clínicas nem de parâmetros gonadais dos sujeitos examinados. O exame consistiu na contagem do número de folículos antrais (folículos entre 2 e 10 mm) além da medida dos volumes ovarianos. O volume ovariano foi medido em três planos perpendiculares e calculado através da fórmula da elipsóide (Volume = D1 x D2 x D3 x

$\pi/6$), sendo D1, D2 e D3 os três diâmetros máximos nos planos longitudinal, ântero-posterior e transverso.

3.3. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como mediana (variação) para variáveis contínuas e número (%) para variáveis categóricas. Os dados foram comparados utilizando-se o teste de Mann Whitney para variáveis contínuas para avaliar diferenças entre as pacientes com LES e o grupo controle e entre os subgrupos com e sem anti-CoL. As diferenças entre variáveis categóricas foram avaliadas através do teste exato de Fisher. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar o impacto de doses cumulativas dos imunossupressores em relação aos parâmetros de reserva ovariana. O teste de análise de variância de Kruskal-Wallis foi empregado para avaliar diferenças em mais de dois grupos independentes. Nas análises que mostraram diferença foi empregada análise *post-hoc* para definir entre quais grupos ocorreram estas diferenças. Em todos os testes estatísticos o nível de significância da variável independente foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Pacientes com LES versus controles

A Tabela 1 inclui as características demográficas, alterações dos ciclos menstruais, resultados dos testes de reserva ovariana e anti-CoL das pacientes com LESp e controles saudáveis. A mediana da idade atual [27,7 (18,3-39,8) vs. 27,7 (18,1-40,0) anos, $p=0,414$] e do IMC, assim como as frequências de caucasianos e de classe socioeconômica foram similares nas pacientes com LESp e nos controles saudáveis ($p>0,05$). A mediana da idade da menarca foi similar em ambos os grupos [13 (10-17) vs. 13 (11-15) anos, $p=0,205$], embora quando avaliados o subgrupo de pacientes que apresentaram menarca após o início da doença a mediana da idade da menarca tenha sido显著mente maior no LESp quando comparado aos controles [14 (11-17) vs. 13 (11-15) anos, $p=0,029$]. Não foram encontradas diferenças no que diz respeito a alterações menstruais entre LESp e controles (Tabela 1). A avaliação dos parâmetros relacionados com a reserva ovariana mostrou que o AMH foi显著mente menor no LESp versus controles [1,1 (0-6,3) vs. 1,5 (0,1-5) ng/mL, $p=0,037$], assim como a CFA [6 (0-27) vs. 16 (5-36), $p<0,001$]. Os níveis de FSH, LH e estradiol foram similares em ambos os grupos ($p>0,05$). O anti-CoL foi observado apenas no LESp (16% vs. 0%, $p=0,103$, Tabela 1).

Tabela 1 - Características demográficas, ciclos menstruais, reserva ovariana e anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) de início pediátrico e controles saudáveis

Variáveis	LES (n=57)	Controles (n=21)	P
Características demográficas			
Idade atual, anos	27,7 (18,3-39,8)	27,7 (18,1-40)	0,41
IMC, Kg/m ²	23,8 (17,2-48,8)	25,3 (19,3-35,8)	0,56
Caucasianos	21 (37)	12 (57)	0,13
Classe socioeconômica C ou D	44 (77)	15 (71)	0,77
Ciclos menstruais			
Idade da menarca, anos	13 (10-17)	13 (11-15)	0,21
Idade da menarca após início da doença [§]	14 (11-17)	13 (11-15)	0,029
Tempo entre menarca e idade atual, anos	14 (4,2-25,7)	16,5 (5-28)	0,53
Qualquer alteração menstrual	13 (37)	6 (29)	0,77
Amenorréia	4 (7)	0 (0)	0,57
Duração do fluxo, dias	5 (0-15)	5 (2-10)	0,94
< 3 dias	3 (5)	1 (5)	1,0
> 7 dias	3 (5)	3 (14)	0,34
Intervalo do fluxo, dias	30 (0-75)	30 (15-40)	0,58
< 24 dias	0 (0)	1(5)	0,27
> 35 dias	3 (5)	1(5)	1,0
FOP	1 (2)	0 (0)	1,0
Reserva ovariana			
FSH, IU/L	6,4 (0,6-80,6)	5,6 (2,2-14,4)	0,34
Níveis elevados	15 (27)	2 (10)	0,13
LH, IU/L	6,2 (0,1-47,7)	4,4 (2,1-10,3)	0,41
Níveis elevados	24 (43)	5 (24)	0,19
Estradiol, pg/mL	45 (15-1271)	34 (24-128)	0,14
Níveis diminuídos	4 (7)	0 (0)	0,57
AMH, ng/mL	1,1 (0-6,3)	1,5 (0,1-5)	0,037
Níveis diminuídos	28 (49)	5 (24)	0,07
Volume ovariano, mm ³ *	9,6 (4,3-188,9)	10,4 (4,7-34,5)	0,64
CFA**	6 (0-27)	16 (5-36)	<0,001
CFA (2-10 mm)**	44 (98)	19 (100)	1,0
Anti-CoL			
	9 (16)	0 (0)	0,10

Valores expressos em n (%) ou mediana (intervalo), IMC – índice de massa corporal, FOP – falência ovariana prematura, FSH – hormônio folículo estimulante, LH – hormônio luteinizante, AMH – hormônio anti-Mülleriano, CFA – contagem de folículos antrais, [§]n= 14 pacientes com LES, *n = 47 pacientes com LES e 19 controles, **n = 45 pacientes com LES e 19 controles.

4.2. Reserva ovariana e imunossupressores em pacientes com LESp versus controles

A mediana da idade atual [27,3 (18,3-39,8) vs. 29,4 (18,9-39,3) vs. 27,7 (18,1-40,0) anos, p=0,754] e do IMC foi similar nos pacientes com LESp tratados com ciclofosfamida, LESp que nunca receberam ciclofosfamida e nos controles. Nenhuma diferença foi observada na idade da menarca [13 (11-16) vs. 13 (10-17) vs. 13 (11-15) anos, p=0,23] e no tempo entre a menarca e a idade atual [13,3 (7,3-25,7) vs. 16,8 (4,2-25,3) vs. 16,5 (5-28) anos, p=0,731].

A mediana da última dose de ciclofosfamida das 21 pacientes com LESp foi de 45 meses (0-119,9). Apenas duas pacientes receberam ciclofosfamida antes da menarca. Em relação aos parâmetros de reserva ovariana, a mediana dos níveis de FSH foi显著mente elevada no LESp com ciclofosfamida quando comparados com aqueles que não receberam ciclofosfamida e com os controles [8,8 (0,6-80,6) vs. 5,7 (2,3-15,8) vs. 5,6 (2,2-14,4) IU/L, p=0,032]. A mediana dos níveis de estradiol foi显著mente reduzida [35 (15-1271) vs. 47,5 (19-127) vs. 34 (24-128) pg/mL, p=0,027] entre pacientes que receberam ciclofosfamida e os controles quando comparados aos pacientes que não receberam ciclofosfamida. A mediana dos níveis de AMH foram显著ativamente menores no LESp que recebeu ciclofosfamida quando comparado com os pacientes que não receberam ciclofosfamida e com os controles [0,4 (0-3,5) vs. 1,48 (0-6,3) vs. 1,5 (0,1-5) ng/mL, p=0,004]. A mediana da CFA foi显著antemente menor nos pacientes com LESp com e sem tratamento com ciclofosfamida quando comparados com os controles saudáveis [4 (0-27) vs. 6,5 (1-23) vs. 16 (5-36) IU/L, p=0,001] (Tabela 2).

Tabela 2 - Características demográficas, ciclos menstruais e reserva ovariana em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) de início pediátrico de acordo com o uso de ciclofosfamida endovenosa (CIC) e controles saudáveis

Variáveis	LES com CIC (n=21)	LES sem CIC (n=36)	Controles (n=21)	p [‡]
Características demográficas				
Idade atual, anos	27,3 (18,3-39,8)	29,4 (18,9-39,3)	27,7 (18,1-40,0)	0,75
IMC, Kg/m ²	23,9 (19,4-48,8)	23,9 (17,2-37,9)	25,3 (19,3-35,8)	0,73
Ciclos menstruais				
Idade da menarca, anos	13 (11-16)	13 (10-17)	13 (11-15)	0,23
Tempo entre menarca e idade atual, anos	13,3 (7,3-25,7)	16,8 (4,2-25,3)	16,5 (5-28)	0,73
Reserva ovariana				
FSH, IU/L	8,8 (0,6-80,6)	5,7 (2,3-15,8)	5,6 (2,2-14,4)	0,032
LH, IU/L	7,6 (0,1-47,7)	5,9 (2,8-14,5)	4,4 (2,1-10,3)	0,13
Estradiol, pg/mL	35 (15-1.271)	47,5 (19-127)	34 (24-128)	0,027
AMH, ng/mL	0,4 (0-3,5)	1,5 (0-6,3)	1,5 (0,1-5)	0,004
Volume ovariano, mm ³ *	9,0 (4,3-188,9)	9,7 (5,2-42,6)	10,4 (4,7-34,5)	0,67
CFA**	4 (0-27)	6,5 (1-23)	16 (5-36)	0,001

Valores expressos em n (%) ou mediana (intervalo), IMC – índice de massa corporal, FOP – falência ovariana prematura, FSH – hormônio folículo estimulante, LH – hormônio luteinizante, AMH – hormônio anti-Mülleriano, CFA – contagem de folículos antrais, [‡]p calculado por análise de variância de Kruskal-Wallis,* n = 16 pacientes com LES tratados com CIC, 31 não tratados com CIC e 19 controles, **n = 17 pacientes com LES tratados com CIC, 28 não tratados com CIC e 19 controles,

No que diz respeito ao uso de outros imunossupressores, 19 pacientes, sem histórico de uso de ciclofosfamida, foram tratados com metotrexato. Neste grupo foi encontrada uma correlação negativa entre a dose de metotrexato e os níveis de AMH ($p=0,027$, $r=-0,507$) (Figura 1), sem diferença na CAF ($p=0,107$). Não foram observadas outras correlações entre as doses cumulativas de prednisona, micofenolato mofetil e azatioprina e os níveis de AMH ou a CAF ($p>0,05$).

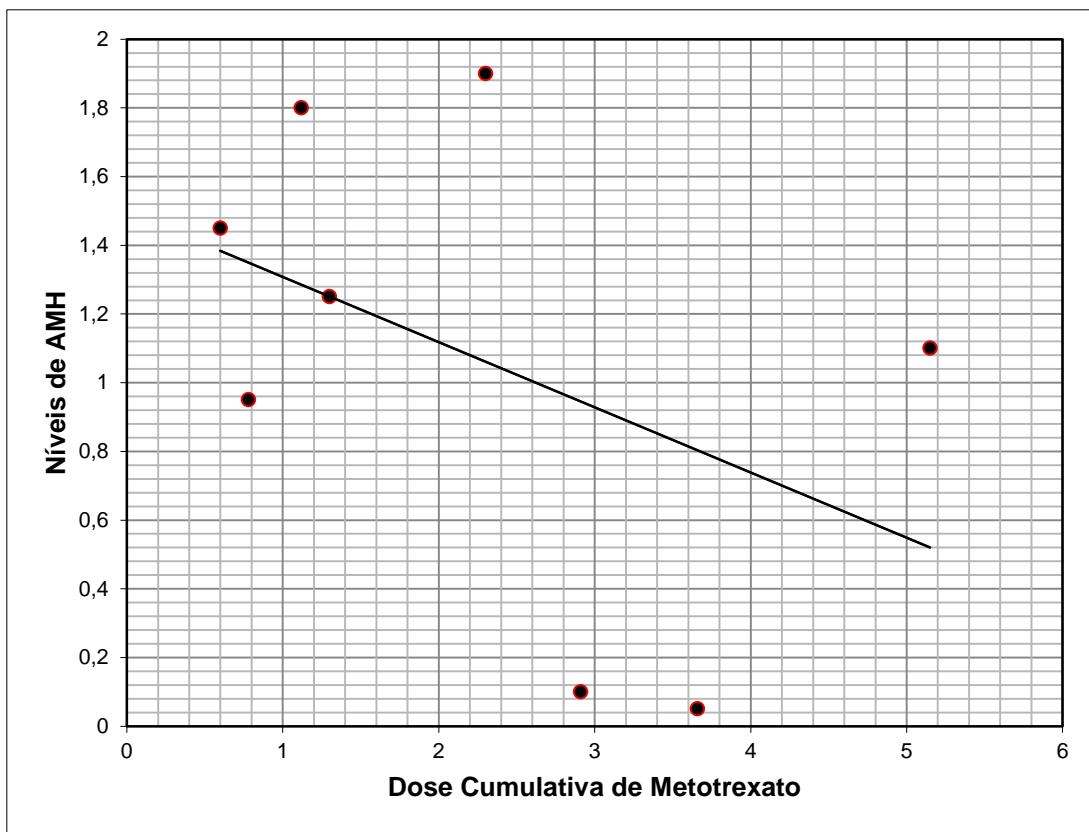


Figura 1 - Gráfico mostrando correlação negativa entre dose cumulativa de metotrexato e níveis séricos do hormônio anti-Mülleriano (AMH)

A mediana dos níveis de AMH foi similar nos pacientes que receberam micofenolato mofetil comparados com os que não receberam [0,6 (0-3,4) vs. 1,3 (0-6,3), p=0,14], assim como nos pacientes tratados com azatioprina [0,8 (0-6,3) vs. 1,7 (0-3,4), p=0,65] e metotrexato [1,4 (0-5,9) vs. 0,65 (0-6,3), p=0,529].

4.3 Reserva ovariana e anti-CoL nos pacientes com LESp

Não foram encontradas diferenças no que diz respeito à idade atual, idade de início e duração da doença entre os pacientes com anti-CoL positivo e aqueles nos quais o anti-CoL foi negativo (Tabela 3). Os parâmetros relacionados ao ciclo menstrual também foram similares em ambos os grupos ($p>0,05$). A avaliação da

reserva ovariana através do FSH, LH e estradiol não mostrou nenhuma diferença entre os LESp com e sem anti-CoL ($p>0,05$, Tabela 3). Os níveis discretamente diminuídos do AMH ($p=0,392$) e da CFA ($p=0,08$) não apresentaram diferença estatística (Tabela 3).

Tabela 3 - Características demográficas, ciclos menstruais e reserva ovariana em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) de início pediátrico em relação à presença do anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL)

Variáveis	Anti-CoL positivo (n=9)	Anti-CoL negativo (n=48)	P
Características demográficas			
Idade atual, anos	27,3 (18,9-36,9)	27,6 (18,3-39,8)	0,86
Idade de início da doença, anos	16,6 (11-18)	16,1 (6-18)	0,66
Duração da doença, anos	13,4 (5,6-20,3)	13,2 (2,1-25,4)	0,74
IMC, Kg/m ²	22,5 (19,7-34,1)	24 (17,2-48,8)	0,58
Caucasianos	3 (33)	18 (38)	1,0
Classe socioeconômica C ou D	8 (89)	36 (75)	0,67
Ciclos menstruais			
Qualquer alteração menstrual	2 (22)	11 (23)	1,0
Amenorréia	0 (0)	2 (4)	1,0
Duração do fluxo, dias	5 (1-7)	5 (0-15)	0,80
< 3 dias	2 (22)	3 (6)	0,17
> 7 dias	0 (0)	3 (6)	1,0
Intervalo do fluxo, dias	30 (28-30)	30 (0-75)	0,78
> 35 dias	0 (0)	3 (6)	1,0
FOP			
Reserva ovariana			
FSH, IU/L	7 (4,3-18,6)	6,9 (0,6-80,6)	0,38
Níveis elevados	2 (22)	8 (17)	0,65
LH, IU/L	7,6 (2,8-14,2)	5,9 (0,1-47,7)	0,41
Níveis elevados	5 (56)	19 (40)	0,47
Estradiol, pg/mL	48,0 (26-133)	43,5 (15-1271)	0,22
Níveis diminuídos	0 (0)	5 (10)	0,58
AMH, ng/mL	0,5 (0-2,9)	1,15 (0-6,3)	0,39
Níveis diminuídos	5 (56)	22 (46)	0,72
Volume ovariano, mm ³ *	7,5 (4,7-14,3)	9,6 (4,3-188,9)	0,09
CFA**	2 (1-11)	6 (0-27)	0,08
CFA (2-10 mm)**	7 (100)	37 (97)	1,0

Valores expressos em n (%) ou mediana (intervalo), IMC – índice de massa corporal, FOP – falência ovariana prematura, FSH – hormônio foliculo estimulante, LH – hormônio luteinizante, AMH – hormônio anti-Mülleriano, CFA – contagem de folículos antrais, *n = 7 pacientes com LES positivos 40 negativos para anti-CoL **n = 7 pacientes com LES positivos 38 negativos para anti-CoL.

Características clínicas e imunológicas, assim como as medianas do SLEDAI-2K [2,0 (0-8) vs. 0 (0-13), p=0,077] e do SLICC-ACR/DI [0,7 (0-2) vs. 0,9 (0-4) p=0,692] foram comparáveis em ambos os grupos, assim como as frequências dos tratamentos (p>0,05, Tabela 4).

Tabela 4 - Características clínicas e imunológicas, atividade de doença, dano cumulativo e tratamento em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) de início pediátrico em relação à presença do anticorpo anti-corpo lúteo (anti-CoL)

Variáveis	Anti-CoL positivo (n=9)	Anti-CoL negativo (n=48)	p
Características clínicas			
Cutâneo	8 (88)	42 (88)	1,0
Articular	8 (88)	43 (90)	1,0
Serosite	1 (11)	17 (35)	0,25
Renal	4 (44)	26 (54)	0,72
Neuropsiquiátrico	2 (22)	13 (27)	1,0
Hematológico	7 (78)	30 (63)	0,47
Características imunológicas			
Anti-Sm	4 (44)	15 (31)	0,46
Anti-Ro	4 (44)	22 (45)	1,0
Anti-La	0 (0)	4 (8)	1,0
Anti-P	3 (33)	19 (40)	1,0
Anti-RNP	2 (22)	14 (29)	1,0
Anti-dsDNA	5 (55)	35 (73)	0,43
Anticoagulante lúpico	2 (22)	7 (15)	0,62
Anticardiolipina IgG	1 (11)	8 (17)	1,0
Anticardiolipina IgM	0 (0)	3 (6)	1,0
Atividade e dano do LES			
SLEDAI-2K	2 (0-8)	0 (0-13)	0,08
SLICC-ACR/DI	0,7 (0-2)	0,9 (0-4)	0,69
Tratamento			
Prednisona	9 (100)	48 (100)	1,0
Dose atual, mg/dia	12,5 (5-40)	15 (2,5-40)	0,47
Dose cumulativa, g	37,6 (4-161)	47,3 (9,5-199,5)	0,37
Ciclofosfamida intravenosa	2 (22)	19 (40)	0,46
Dose atual, g/ciclo	-	1	-
Dose cumulativa, g	6,4 (5,8-7)	13,4 (1-26,4)	0,07
Tempo desde última dose, meses	22,8 (20,9-24,7)	47,9 (0-119,9)	0,23
Azatioprina	6 (67)	37 (77)	0,67
Dose atual, mg/dia	150 (100-200)	150 (100-200)	0,93
Dose cumulativa, g	67,4 (4,8-676,4)	157 (2,7-863)	0,53
Micofenolato mofetil	3 (33)	18 (38)	1,0
Dose atual, mg/dia	2,5 (2-3)	2 (1-3,5)	0,56
Dose cumulativa, g	1.936 (899-3.992)	1.962 (29,5-13.414)	1,0
Methotrexato	5 (56)	20 (42)	0,49
Dose atual, mg/dia	17,5 (15-50)	16,3 (15-20)	0,69
Dose cumulativa, g	1,3 (0,3-4,7)	1,2 (0,3-14,8)	0,87

Valores expressos em n (%) ou mediana (intervalo), SLEDAI-2K – *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000*, SLICC/ACR-DI – *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR Damage Index*.

5. DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo que identificou que pacientes com LEsp apresentam uma diminuição subclínica da reserva ovariana associada ao uso de ciclofosfamida e metotrexato.

As grandes vantagens deste trabalho foram: realização de uma avaliação completa da reserva ovariana em pacientes pós-puberais comparados com um grupo controle saudável e todas as avaliações terem sido realizadas na fase folicular precoce do ciclo menstrual, o que proporcionou uma estimativa mais acurada da população folicular^{2,3}. Critérios de seleção rigorosos de nossos pacientes e controles, com a exclusão de pacientes com cirurgia ginecológica prévia, daqueles com alterações do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e doença renal terminal são extremamente importantes visto que essas anormalidades podem influenciar os testes de reserva ovariana^{3,39}.

Foram também excluídos pacientes com uso de AINHs nos últimos três meses, visto que estas medicações podem estar relacionadas à síndrome do folículo luteinizado não rompido^{3,40}. Além disso, a avaliação dos parâmetros hormonais foi realizada sem que os pacientes estivessem sob o efeito de nenhum hormônio exógeno para evitar possíveis vieses, uma vez que estudos recentes indicam que os níveis de AMH podem estar diminuídos em mulheres em uso de contraceptivos hormonais^{41,42}. Aquelas pacientes e controles que faziam uso de contraceptivos hormonais e que manifestaram o desejo em participar do estudo, e que não tinham nenhuma contraindicação, suspenderam a medicação por ao menos 12 meses ou até o retorno da menstruação por ao menos três ciclos consecutivos, sendo fornecido

método contraceptivo de barreira. Contudo, os critérios de exclusão restritos levaram a um número limitado de pacientes e controles.

A causa da diminuição na quantidade e/ou qualidade dos folículos ovarianos pode estar relacionada à ooforite autoimune². A produção de autoanticorpos específicos contra o corpo lúteo ovariano foi reportada previamente pelo nosso grupo em pacientes adultos com LES, onde foram avaliados apenas os níveis de FSH⁵. Entretanto, em outro estudo em adultos com LES avaliados pelo mesmo parâmetro o anti-CoL não foi definido como um marcador de disfunção gonadal⁶. Devemos salientar que o anti-CoL foi detectado aqui apenas no grupo de LESP, e que com freqüência semelhante a estudo anterior⁹. Além disto, a única paciente do presente estudo que apresentou FOP, não tinha anti-CoL, provavelmente devido à baixa expressão do antígeno alvo no ovário atrófico. Embora, o pequeno grupo de pacientes com anti-CoL impeça uma conclusão definitiva sobre seu papel na disfunção ovariana, parece-nos que este autoanticorpo tem pouco impacto na população folicular. Esse achado está em concordância com outro aspecto relevante de estudos de saúde reprodutiva do nosso serviço, o de que anticorpos anti-espermatozóide (direcionados contra a cabeça, porção média e/ou cauda do espermatozóide) não estão associados com anormalidades espermáticas em adultos e adolescentes com LES⁴³⁻⁴⁷.

O novo achado de dose cumulativa do metotrexato associado à redução dos níveis de AMH sugere que doses altas desse imunossupressor podem estar correlacionadas com atresia folicular. Na última década, altas doses de metotrexato eram recomendadas para o tratamento de pacientes com LESP, principalmente naqueles casos com doença refratária⁴⁸ e pode ser o responsável por esse achado. De fato, foi demonstrado previamente que uma única injeção de dose alta de

metotrexato (5.0 g/m^2) causou a destruição de folículos ovarianos primordiais em ratos⁴⁹, embora baixas doses terapêuticas do metotrexato não tenham efeito sobre o desempenho reprodutivo³.

Este estudo confirma que os ovários são altamente suscetíveis aos efeitos tóxicos da terapia com ciclofosfamida, a qual induz um dano persistente e duradouro à população folicular levando à alterações significativas nos parâmetros de fertilidade e estendemos esse achado para um grupo de pacientes em idade fértil com diagnóstico na faixa etária pediátrica. A mediana da dose cumulativa de metotrexato foi muito mais alta em nossos pacientes, contrastando com as recomendações atuais de doses baixas desse agente gonadotóxico no tratamento das pacientes com LESp⁵⁰. Esse agente alquilante tem um impacto negativo na função reprodutiva, destruindo os folículos primordiais, com comprometimento da maturação folicular, depleção folicular e eventual exaustão³. Nossos achados estão de acordo com estudos prévios em adultos e adolescentes com LES usando FSH, LH, estradiol^{4,16,17,36}, AMH^{10-12,14} e/ou CFA¹⁶.

Assim sendo, o presente estudo identificou altas doses de ciclofosfamida e metotrexato como sendo causas relevantes de disfunção ovariana subclínica durante a idade reprodutiva em pacientes com LES de início na faixa etária pediátrica. Este estudo reforça a necessidade de proteção gonadal durante a utilização da ciclofosfamida, assim como aconselhamento sobre fertilidade e planejamento familiar para LESp.

6. CONCLUSÕES

1. Redução subclínica da reserva ovariana foi evidenciada em pacientes adultas com LESp.
2. Ciclofosfamida e metotrexato reduziram a reserva ovariana nas mulheres com LESp.
3. Anti-CoL não apresentou impacto na reserva ovariana.

7. REFERÊNCIAS

1. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2007;369:587-96.
2. Silva CA, Brunner HI. Gonadal functioning and preservation of reproductive fitness with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16:593-9.
3. 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.
4. Silva CA, Deen ME, Febrônio MV, Oliveira SK, Terreri MT, Sacchetti SB, et al. Hormone profile in juvenile systemic lupus erythematosus with previous or current amenorrhea. *Rheumatol Int*. 2010;31:1037-43.
5. 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.
6. 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.
7. Pasoto SG, Mendonca BB, Bonfa E. Menstrual disturbances in patients with systemic lupus erythematosus without alkylating therapy: clinical, hormonal and therapeutic associations. *Lupus*. 2002;11:175-80.
8. Boumpas DT, Austin HA, 3rd, Vaughan EM, Yarboro CH, Klipper JH, Balow JE. Risk for sustained amenorrhea in patients with systemic lupus erythematosus receiving intermittent pulse cyclophosphamide therapy. *Ann Intern Med*. 1993;119:366-9.
9. Mok CC, Lau CS, Wong RW. Risk factors for ovarian failure in patients with systemic lupus erythematosus receiving cyclophosphamide therapy. *Arthritis Rheum*. 1998;41:831-7.
10. Mok CC, Chan PT, To CH. Anti-müllerian hormone and ovarian reserve in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2013;65:206-10.
11. Lawrenz B, Henes J, Henes M, Neunhoeffer E, Schmalzing M, Fehm T, et al. Impact of systemic lupus erythematosus on ovarian reserve in premenopausal women: evaluation by using anti-Müllerian hormone. *Lupus*. 2011;20:1193-7.
12. Browne H, Armstrong A, Decherney A, Babb R, Illei G, Segars J, et al. Assessment of ovarian function with anti-Müllerian hormone in systemic lupus erythematosus patients undergoing hematopoietic stem cell transplant. *Fertil Steril*. 2009;91(4 Suppl):1529-32.
13. Brunner HI, Bishnoi A, Barron AC, Houk LJ, Ware A, Farhey Y, et al. Disease outcomes and ovarian function of childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2006;15:198-206.

-
14. Ghaleb RM, Fahmy KA. Anti-Müllerian hormone: A marker for ovarian function in systemic lupus erythematosus patients treated with cyclophosphamide. *Joint Bone Spine.* 2012 (*in press*).
 15. Appenzeller S, Blatya PF, Costallat LTL. Ovarian failure in SLE patients using pulse cyclophosphamide: comparison of different regimes. *Rheumatology Int.* 2008;28:567-71.
 16. Aikawa NE, Sallum AM, Pereira RM, Suzuki L, Viana VS, Bonfá E, et al. Subclinical impairment of ovarian reserve in juvenile systemic lupus erythematosus after cyclophosphamide therapy. *Clin Exp Rheumatol.* 2012;30:445-9.
 17. Silva CAA, Hilario 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.
 18. Maheshwari A, Fowler P, Bhattacharya S. Assessment of ovarian reserve--should we perform tests of ovarian reserve routinely? *Hum Reprod.* 2006;21:2729-35.
 19. 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.
 20. Fanchin R, Taieb J, Lozano DH, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod.* 2005;20:923-7.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 2006;12:685-718.
 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. Visser JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;234:81-6.
 27. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725.
-

-
28. Almeida PM, Wickerhauser. 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.
29. Kurata N, Tan EM. Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum*. 1976;19:574-80.
30. Elkon KB, Culhane L. Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with the sicca syndrome and lupus erythematosus. *J Immunol*. 1984;132:2350-6.
31. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis*. 1987;46:1-6.
32. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost*. 1995;74:1185-90.
33. Bonfa E, Golombok SJ, Kaufman LD, Skelly S, Weissbach H, Brot N, et al. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med*. 1987;317:265-71.
34. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol*. 2002;29:288-91.
35. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1996;39:363-9.
36. Medeiros PB, Febrônio MV, Bonfa E, Borba EF, Takiuti AD, Silva CA. Menstrual and hormonal alterations in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009;18:38-43.
37. 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.
38. Silva CA, Hilario MO, Febrônio MV, Oliveira SK, Almeida RG, Fonseca AR, et al. Pregnancy outcome in juvenile systemic lupus erythematosus: a Brazilian multicenter cohort study. *J Rheumatol*. 2008;35:1414-8.
39. Aikawa NE, Sallum AME, Leal MM, Bonfa E, Pereira RMR, Silva CAA. Menstrual and hormonal alterations in juvenile dermatomyositis. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2010;28:571-5.
40. Micu MC, Micu R, Ostensen M. Luteinized unruptured follicle syndrome increased by inactive disease and selective cyclooxygenase 2 inhibitors in women with inflammatory arthropathies. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63:1334-8.
41. 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.
42. Arbo E, Votori 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.
 43. Silva CA, Hallak J, Pasqualotto FF, Barba MF, Saito MI, Kiss MH. Gonadal function in male adolescents and young males with juvenile onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002;29:2000-5.
 44. Suehiro RM, Borba EF, Bonfa E, Okay TS, Cocuzza M, Soares PM, et al. Testicular Sertoli cell function in male systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47:1692-7.
 45. Vecchi AP, Borba EF, Bonfá E, Cocuzza M, Pieri P, Kim CA, et al. Penile anthropometry in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus.* 2011;20:512-8.
 46. Soares PM, Borba EF, Bonfa E, Hallak J, Corrêa AL, Silva CA. Gonad evaluation in male systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2007;56:2352-61.
 47. Rabelo-Júnior CN, Bonfá E, Carvalho JF, Cocuzza M, Saito O, Abdo CH, et al. Penile alterations with severe sperm abnormalities in antiphospholipid syndrome associated with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2013;32:109-13.
 48. Lehman TJ, Edelheit BS, Onel KB. Combined intravenous methotrexate and cyclophosphamide for refractory childhood lupus nephritis. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:321-3.
 49. Gol M, Saygili U, Koyuncuoglu M, Uslu T. Influence of high-dose methotrexate therapy on the primordial follicles of the mouse ovary. *J Obstet Gynaecol Res.* 2009;35:429-33.
 50. Bertsias GK, Tektonidou M, Amoura Z, Aringer M, Bajema I, Berden JH, et al. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:1771-82.

8. ANEXOS

- Anexo I** - “**High doses of cyclophosphamide and methotrexate are relevant causes of subclinical ovarian dysfunction in lupus patients with onset before adulthood**”
Submetido à revista Arthritis Care and Research
- Anexo II** - “**Alveolar hemorrhage - distinct features of juvenile and adult onset systemic lupus erythematosus**”
Publicado na revista Lupus
- Anexo III** - “**Severe hemorrhagic corpus luteum complicating anticoagulation in antiphospholipid syndrome**”
Publicado na revista Lupus
- Anexo IV** - “**Função sexual em doenças reumáticas**”
Publicado na revista Acta Reumatológica Portuguesa



**HIGH DOSES OF CYCLOPHOSPHAMIDE AND METHOTREXATE
ARE RELEVANT CAUSES OF SUBCLINICAL OVARIAN
DYSFUNCTION IN LUPUS PATIENTS WITH ONSET BEFORE
ADULTHOOD**

Journal:	<i>Arthritis Care and Research</i>
Manuscript ID:	ACR-13-0200
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	28-Feb-2013
Complete List of Authors:	Silva, Clovis; Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Pediatrics
Key Words:	systemic lupus erythematosus, fertility, ovarian reserve, anti-corpus luteum, cyclophosphamide

SCHOLARONE™
Manuscripts

Subclinical ovarian dysfunction in C-SLE**HIGH DOSES OF CYCLOPHOSPHAMIDE AND METHOTREXATE ARE RELEVANT CAUSES OF SUBCLINICAL OVARIAN DYSFUNCTION IN LUPUS PATIENTS WITH ONSET BEFORE ADULTHOOD**

Daniel B. de Araujo^{1,2}, Lucas Y. S. Yamakami³, Eloisa Bonfá¹, Vilma S. T. Viana¹, Sandra G. Pasoto¹, Paulo C. Serafin³, Eduardo F. Borba^{1*}, Clovis A. Silva^{1,4*}

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

² Department of Rheumatology, Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, São Paulo, Brazil.

³ Gynecology Department, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

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

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

* Eduardo F. Borba and Clovis A. Silva contributed equally to this work.

Corresponding author:

Clovis Artur Almeida Silva

Faculdade de Medicina da USP, Reumatologia

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

FAX: 00 55 11 2661-8503, e-mail: clovis.silva@hc.fm.usp.br

1
2
3 **Funding:** This study was supported by grants from Fundação de Amparo à
4 Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP# 11/12471-2 to CAS), Conselho
5 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ #301411/2009-3
6 to EB, #303165/2008-1 to EFB and #302724/2011-7 to CAS), Federico
7 Foundation (to EB, EFB and CAS) and by Núcleo de Apoio à Pesquisa “Saúde
8 da Criança e do Adolescente” da USP (NAP-CriAd) to CAS.
9
10
11
12

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only

Abstract

Objective: To assess ovarian reserve markers and anti-corpus luteum antibodies (anti-CoL) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients with onset before adulthood.

Methods: Fifty-seven SLE female patients and 21 healthy controls were evaluated for anti-CoL by immunoblot. Ovarian reserve was assessed by: follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol, anti-Müllerian hormone (AMH) and antral follicle count (AFC). Demographic data, menstrual abnormalities, disease activity, damage and treatment were also analyzed.

Results: The median of current age was similar in SLE patients and controls (27.7 vs. 27.7 years, $p=0.414$). The median of AMH (1.1 vs. 1.5ng/mL, $p=0.037$) and AFC (6 vs. 16, $p<0.001$) were significantly reduced in SLE patients versus controls without significant menstrual abnormalities. Anti-CoL was solely observed in SLE patients (16% vs. 0%, $p=0.103$) and not associated with demographic data, ovarian reserve parameters, disease activity/damage and treatment. Further evaluation of patients treated with cyclophosphamide revealed a higher median of FSH levels compared to SLE patients not treated with cyclophosphamide and controls (8.8 vs. 5.7 vs. 5.6IU/L, $p=0.032$) and a lower median AMH levels and AFC (0.4 vs. 1.5 vs. 1.5ng/mL, $p=0.004$; 4.0 vs. 6.5 vs. 16IU/L, $p=0.001$; respectively). Nineteen patients were treated with methotrexate without cyclophosphamide use, and a negative correlation was observed between cumulative methotrexate dose and AMH levels ($p=0.027$, $r=-0.507$).

Conclusions: The present study identifies high doses of cyclophosphamide and methotrexate as relevant causes of subclinical ovarian dysfunction during reproductive ages in SLE patients with onset before adulthood, reinforcing the need of gonadal protection during treatment.

1
2
Keywords: systemic lupus erythematosus, fertility, ovarian reserve, anti-corpus
3 luteum, cyclophosphamide.
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only

SIGNIFICANCE AND INNOVATIONS

- Ovarian reserve is diminished in SLE patients with onset before adulthood during reproductive ages.
- High doses of cyclophosphamide and methotrexate are relevant causes of subclinical ovarian dysfunction in this population.

For Peer Review Only

Introduction

Female systemic lupus erythematosus (SLE) patients are living longer, including those with childhood onset (1), and transfer from pediatric to adult health care have raised concerns about their ovarian reserve and future fertility.(2-6)

Ovarian reserve depends largely on primordial follicles quantity and quality, which are successively lost since later fetal life. Females have about 1 to 2 million primordial follicles at birth, decreasing to 400,000 follicles at the beginning of puberty. A thousand of primordial follicles are recruited during a menstrual cycle, however often only one follicle reaches full maturity and ovulation, and all other follicles undergo atresia (7). The assessment of ovarian reserve is performed by an indirect evaluation of tests that estimate follicle population (8).

Risk factors associated with reduction of follicle population in SLE patients are hypothalamic-pituitary-gonad axis dysfunction (6, 8) autoimmunity (9, 10), disease activity (7, 8, 11) and immunosuppressive drugs (12-16).

Reduction of ovarian reserve has been demonstrated in childhood-onset SLE (c-SLE) (17) and adult SLE (a-SLE) populations (12-16, 18, 19), however only one study performed a global ovarian reserve evaluation (5) whereas all others were limited to menstrual alterations, follicle stimulating hormone (FSH) levels (3, 5, 6) and few recent reports included antral follicle count (AFC) and/or anti-Müllerian hormone (AMH) levels (5, 14-16). However, there are no data regarding SLE patients with onset before adulthood during childbearing age regarding these two later parameters. In addition, the contribution of anti-corpus luteum antibodies (anti-CoL) for diminished follicle ovarian pool using these important biomarkers of gonadal dysfunction (20) is not available.

We have therefore performed a complete assessment of ovarian function, including hormonal profile, ovarian ultrasound and anti-CoL in SLE patients with onset before adulthood and healthy controls.

1
2
3 **Materials and Methods**
4
5
6
7

8 **Patients and controls**
9
10

11 A cross-section study was performed from November 2009 to June 2012,
12 113 consecutive female SLE patients with onset before adulthood (≤ 18 years)
13 (1), were followed at Rheumatology Division of our University Hospital. All
14 patients fulfilled the American College of Rheumatology SLE classification
15 criteria (21). Exclusion criteria were: current pregnancy, breastfeeding,
16 hypothalamus-pituitary-gonadal axis dysfunction, end-stage renal disease,
17 contraindication or unwillingness to stop hormonal contraceptive for at least 12
18 months or until resumption of menses for at least three consecutive menstrual
19 cycles, gynecological surgery, current nonsteroidal antiinflammatory drugs, use
20 of gonadotrophin release hormone agonist (GnRH-a), and did not agree to
21 participate in this study. Fifty-six were excluded: current pregnancy (n=5),
22 lymphocytic hypophysitis (n=1), end-stage renal disease (n=1), contraindication
23 or unwillingness to stop hormonal contraceptive (n=38), previous hysterectomy
24 (n=3) or did not agree to participate in this study (n=8).
25
26

27 The control group included 21 healthy female. The Brazilian socio-
28 economic classes were classified according the *Associação Brasileira dos*
29 *Institutos de Pesquisa de Mercados* (22). The Local Ethics Committee of our
30 University Hospital approved the study and an informed consent was obtained
31 from all participants (protocol 0878/09).
32
33

34 **Study Procedures**
35
36

37 Patient's medical records were carefully reviewed for clinical,
38 immunological and therapeutic findings. A blood sample was collected by
39 venipuncture at the early follicular phase (between second and fourth day of
40 menses), except from those presenting amenorrhea, in which a sample was
41 taken randomly. Amenorrhea was defined as absence of menstrual period for at
42 least 4 months, without any exogenous hormonal interference.
43
44

Ovarian function parameters

Gynecologic evaluation: Ages at menarche of patients and controls were registered based on recollection. Menstrual flow duration and cycle length were evaluated prospectively for at least 3 consecutive months. Normal cycle was defined as flow duration varying from 3 to 7 days and length from 25 to 35 days (2, 23). Menstrual disturbances were based on alterations in one or more of these parameters during evaluation. The mean cycle length and flow duration were also calculated. Amenorrhea and sustained amenorrhea were defined as absence of menstrual period for at least 4 months after menarche and persisting for more than 12 months, respectively. Patients with sustained amenorrhea in whom menstruation did not resume and had FSH levels > 40 IU/L were defined as premature ovarian failure (POF) (2-6, 24). Secondary sexual characteristics were classified according to Tanner pubertal changes (25).

Determination of ovarian reserve: 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. Follicle-stimulating hormone (FSH) (reference levels: 3.5-12.5 IU/L), luteinizing hormone (LH) (reference levels: 2.4-12.6 U/L) and estradiol (reference levels: ≤ 166 pg/mL) were measured by radioimmunoassay using a commercial kit (Cobas® Roche, Mannheim, Germany). Intra- and inter-assay coefficients of variation were recommended by the manufacturer and were limited to 5.7 and 3.6%, respectively. Anti-Müllerian hormone (AMH) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (AMH Gen II ELISA, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) in duplicated samples. Intra- and inter-assay coefficients of variation were limited to 12.3% and 14.2%, respectively. Values lower than 1 ng/mL was regarded as reduced (26).

Detection of anti-corpus luteum antibody: Reactivity of serum from patients and controls to the 67 kDa protein from corpus luteum was evaluated by immunoblotting in duplicate samples, as described previously (9). Briefly, crude

tissue and cell extracts obtained from bovine corpus luteum (100 µg/well) were submitted to polyacrylamide gel electrophoresis under denaturating and reducing conditions (β 2-mercaptoethanol SDS-PAGE). Proteins were then electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane. Membrane strips were further incubated with blocking buffer (5% skimmed milk in PBS) and immunopropbed by incubation with serum samples diluted 1/10. Reactivity was tagged with anti-human IgG alkaline phosphatase conjugate and visualized using appropriate chromogenic substrates.

Transvaginal ultrasound: Ultrasound was performed in all sexually active SLE 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 ovarian volumes, using an ellipsoid calculation ($L \times W \times T \times \pi/6$) and the mean of ovarian volumes was calculated (27). Follicles of 2 to 10 mm were considered to AFC (28).

Clinical and laboratory assessments and treatment

SLE manifestations were defined as: cutaneous lesions (malar or discoid rash, oral ulcers or photosensitivity), articular involvement (non-erosive arthritis), neuropsychiatry disease (seizure or psychosis), renal involvement (proteinuria ≥ 0.5 g/24 h, presence of cellular casts, and/or persistent hematuria ≥ 10 red blood cells per high power field), serositis (pleuritis or pericarditis), and hematologic abnormalities (hemolytic anemia, leukopenia with a white blood cell count $<4000/\text{mm}^3$, lymphopenia $<1500/\text{mm}^3$ on two or more occasions and thrombocytopenia with platelet count $<100,000/\text{mm}^3$ in the absence of drugs or infection).

Disease activity was measured using the SLE Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K)(29) and cumulative damage using the SLE International Collaborating Clinics/ACR Damage Index (SLICC/ACR-DI) (30). Body mass index (BMI) was defined by weight in kilograms/height in meters² (kg/m²).

Anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) was detected by indirect immunofluorescence using *Crithidia luciliae* as substrate. A hemagglutination assay with rabbit thymus extract was used to determine the presence of antibodies to RNP and Sm proteins. Detection of autoantibodies to saline-soluble antigens, Ro/SS-A and La/SS-B, was performed by counterimmunoelectrophoresis against dog spleen saline extract (31, 32). Nonspecific reference sera were included in each assay to characterize autoantibody specificity. Presence of anticardiolipin antibodies (aCL) IgG and IgM was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (33). Lupus anticoagulant (LAC) was detected according to the guidelines of the International Society on Thrombosis and Hemostasis (34). The anti-ribosomal P protein antibodies were detected by Western blotting technique using purified ribosomal fraction isolated from rat hepatocytes as substrate (35).

Data concerning the cumulative and current dosage of prednisone, methotrexate, azathioprine, IVCYC, cyclosporine and mycophenolate mofetil were determined.

Statistical analysis: Results were presented as the mean \pm standard deviation (SD) or median (range) for continuous and number (%) for categorical variables. Data were compared by Mann–Whitney test in continuous variables to evaluate differences among SLE and control group, and among SLE subgroups. For categorical variables, differences were assessed by Fisher's exact test. Kruskal-Wallis one-way analysis of variance was used to compare SLE patients with IVCYC, without IVCYC and healthy controls, followed by a *post-hoc* analysis to determine where the difference occurred between the groups. Spearman rank correlation coefficient was used for correlations between cumulative dose of immunosuppressive drugs and ovarian reserve parameters. In all statistical tests, the level of significance of independent variable was set at 5% ($P < 0.05$).

Results

Patients with SLE versus controls

All SLE patients and healthy controls were Tanner pattern 5 according to pubertal changes. Table 1 includes demographic features, menstrual cycles, ovarian reserve tests, and anti-CoL in SLE patients with onset before adulthood and healthy controls. The median of current age (27.7 (18.3-39.8) vs. 27.7 (18.1-40.0) years, p=0.414) and BMI, and the frequencies of Caucasian race and socio-economic class were similar in SLE patients and controls (p>0.05). The median of age at menarche was similar in both groups (13 (10-17) vs. 13 (11-15) years, p=0.205), although the median age at menarche after disease onset was significantly higher in SLE compared to controls (14 (11-17) vs. 13 (11-15) years, p=0.029). No differences were evidenced regarding menstrual disturbances between SLE patients and controls (Table 1). Regarding ovarian reserve parameters, the median of AMH (1.1 (0-6.3) vs. 1.5 (0.1-5) ng/mL, p=0.037) and AFC (6 (0-27) vs. 16 (5-36), p<0.001) were significantly reduced in SLE patients versus controls. The levels of FSH, LH and estradiol were similar in SLE patients and controls (p>0.05). The anti-CoL was solely observed in SLE patients (16% vs. 0%, p=0.103, Table 1).

Ovarian reserve and immunosuppressive agents in SLE patients

The median of current age (27.3 (18.3-39.8) vs. 29.4 (18.9-39.3) vs. 27.7 (18.1-40.0) years, p=0.754) and BMI were similar in SLE patients treated with IVCYC, SLE patients not treated with IVCYC and controls. No differences were also observed in the age at menarche (13 (11-16) vs. 13 (10-17) vs. 13 (11-15) years, p=0.23) and time between menarche and current age (13.3 (7.3-25.7) vs. 16.8 (4.2-25.3) vs. 16.5 (5-28) years, p=0.731).

The median of last IVCYC dose of 21 SLE patients was 45 months (0-119.9). Only two patients used IVCYC before menarche. Regarding the ovarian reserve, the median of FSH levels was significantly higher in SLE patients treated with IVCYC compared to SLE patients not treated with IVCYC and controls (8.8 (0.6-80.6) vs. 5.7 (2.3-15.8) vs. 5.6 (2.2-14.4) IU/L, p=0.032). The median of estradiol levels was significantly reduced (35 (15-1271) vs. 47.5 (19-127) vs. 34 (24-128) pg/mL, p=0.027) between SLE patients with IVCYC and controls when compared to those SLE patients without IVCYC. The median of AMH levels was significantly lower in SLE patients treated with IVCYC compared to those not treated with IVCYC and healthy controls (0.4 (0-3.5) vs.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
1.48 (0-6.3) vs. 1.5 (0.1-5) ng/mL, p=0.004). The median of AFC was significantly lower in SLE patients with and without IVCYC compared to healthy controls (4 (0-27) vs. 6.5 (1-23) vs. 16 (5-36) IU/L, p=0.001) (Table 2).

With regard to other immunosuppressive agents 19 patients were treated with methotrexate and never used IVCYC. A negative correlation was observed in this group between cumulative methotrexate dose and AMH levels (p=0.027, r=-0.507), with no difference in AFC (p=0.107). No correlations were observed between cumulative doses of prednisone, mycophenolate mofetil, and azathioprine and AMH levels and AFC (p>0.05).

The median of AMH were similar in patients that received mycophenolate mofetil compared those who did not receive this medication (0.6 (0-3.4) vs. 1.3 (0-6.3), p=0.143), as well as in SLE patients treated with azathioprine (0.8 (0-6.3) vs. 1.7 (0-3.4), p=0.636) and methotrexate (1.4 (0-5.9) vs. 0.65 (0-6.3), p=0.529).

Ovarian reserve and anti-CoL in SLE patients

The median of current age, age at disease onset and disease duration were similar in patients with and without anti-CoL (Table 3). Menstrual cycle parameters were alike in both groups (p>0.05). The assessment of ovarian reserve according to FSH, LH and estradiol did not show any difference between SLE patients with and without anti-CoL (p>0.05, Table 3). The lower median AMH levels (p=0.392) and AFC (p=0.081) did not reach statistical significance (Table 3).

Clinical and immunological features, as well as the median of SLEDAI-2K (2.0 (0-8) vs. 0 (0-13), p=0.077) and SLICC-ACR/DI (0.7 (0-2) vs. 0.9 (0-4) p=0.692) were similar in both groups. The frequencies of treatments were alike in both groups (p>0.05, Table 4).

Discussion

To our knowledge, this was the first study to identify that SLE patients with onset before adulthood have a subclinical impaired ovarian reserve related to high IVCYC and methotrexate use.

The main strength of the present study was a full ovarian reserve assessment in post-pubertal patients and controls at early follicular phase of menstrual cycle that provide a more accurate estimation of follicle population (7, 8). The rigorous selection criteria of our patients and controls without recent gynecologic surgeries, hypothalamic-pituitary-ovary axis dysfunction and end-stage renal disease are important, since these abnormalities may influence ovarian reserve tests (8, 24).

We also excluded subjects using non-hormonal anti-inflammatory drugs in the last three months, since this medication could be related to luteinized unruptured follicle syndrome (8, 36). Additionally, we evaluated hormonal parameters without the effect of any exogenous hormone to avoid possible bias, since recent studies indicate that AMH levels can be decreased in women using contraceptives (37, 38). These populations required hormonal contraceptives washout for at least 12 months or resumption of up to three consecutive menstrual cycles, for those patients we provided contraceptive barrier methods. However, the restricted exclusion criteria resulted in limited number of patients and controls.

The cause of reduced follicle quantity and/or quality may be related to autoimmunity oophoritis (7). Ovary specific autoantibodies production was previously reported by our group in a-SLE patients evaluating only FSH levels (9). In contrast, anti-CoL was not found to be a marker of gonadal dysfunction and menstrual disturbances in other study of a-SLE assessed by the same parameter (10). Of note, anti-CoL was detected herein solely in SLE patients, and similarly to previous data (9), the only patient in our series with premature ovarian failure was negative for the anti-CoL antibody, probably due to lower expression of the target antigen in atrophic ovaries. However, the small representation of this group of patients precludes a definitive conclusion about their role in ovarian dysfunction.

In male patients, anti-sperm antibodies (against parts of the spermatozoa head, mid-piece, and/or tail) were not associated with sperm abnormalities in our cohort of a-SLE and c-SLE patients (39-43).

The novel findings of cumulative dose of methotrexate and reduction of AMH levels suggest that high dose of this immunosuppressive drug may be associated with follicular atresia. In the last decade, high dose methotrexate was still recommended in c-SLE treatment, particularly for refractory disease (44) and may account for this finding. In fact, a single injection of high methotrexate dose (5.0 g/m^2) was demonstrated to cause destruction of primordial follicles in mice ovaries (45), although low-dose methotrexate therapy has no effect on reproductive fitness (8).

We confirmed previous data that ovary is highly susceptible to the toxic effects of IVCYC therapy which induces a persistent or long-lasting damage to follicles population leading to significant fertility parameters alterations and extended this finding to SLE patients with onset before adulthood during reproductive years. The median cumulative IVCYC dose was very high in our SLE patients, contrasting with the current recommendation of low doses of this gonadotoxic agent in the lupus treatment. This alkylating agent impairs reproductive function due to ovarian primordial follicle damage, impairment of follicle maturation, follicle depletion and eventual exhaustion (8). Our findings are in accordance with previous studies in a-SLE and c-SLE using FSH, LH, estradiol (2, 3, 5, 6), AMH (14-16, 18) and/or AFC (5).

Furthermore, adjunctive GnRH-a treatment attenuates depletion of ovarian reserve associated with cyclophosphamide therapy in SLE patients (46), and should be indicated for postpubertal females in order to guarantee the possibility of reproduction after immunosuppressive therapy (7, 8, 47).

In conclusion, the present study identifies high dose cyclophosphamide and methotrexate as relevant causes of subclinical ovarian dysfunction during reproductive ages in SLE patients with onset before adulthood, reinforcing the need of gonadal protection, fertility counseling and future family planning.

References

- 1
- 2
- 3 1. Silva CA, Avcin T, Brunner HI. Taxonomy for systemic lupus erythematosus with onset before adulthood. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:1787-93.
- 4
- 5 2. Medeiros PB, Febronio MV, Bonfa E, Borba EF, Takiuti AD, Silva CA. Menstrual and hormonal alterations in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009;18:38-43.
- 6
- 7 3. Silva CAA, Hilario MO, Febronio 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.
- 8
- 9 4. Silva CA, Hilario MO, Febronio MV, Oliveira SK, Almeida RG, Fonseca AR, et al. Pregnancy outcome in juvenile systemic lupus erythematosus: a Brazilian multicenter cohort study. *J Rheumatol* 2008;35:1414-8.
- 10
- 11 5. Aikawa NE, Sallum AM, Pereira RM, Suzuki L, Viana VS, Bonfá E et al. Subclinical impairment of ovarian reserve in juvenile systemic lupus erythematosus after cyclophosphamide therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30:445-9.
- 12
- 13 6. Silva CA, Deen ME, Febronio MV, Oliveira SK, Terreri MT, Sacchetti SB et al. Hormone profile in juvenile systemic lupus erythematosus with previous or current amenorrhea. *Rheumatol Int* 2010;31:1037-43.
- 14
- 15 7. Silva CA, Brunner HI. Gonadal functioning and preservation of reproductive fitness with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16:593-9.
- 16
- 17 8. 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.
- 18
- 19 9. 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.
- 20
- 21 10. 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;14:618-624.
- 22
- 23 11. Pasoto SG, Mendonca BB, Bonfa E. Menstrual disturbances in patients with systemic lupus erythematosus without alkylating therapy: clinical, hormonal and therapeutic associations. *Lupus* 2002;11:175-80.
- 24
- 25 12. Boumpas DT, Austin HA, 3rd, Vaughan EM, Yarboro CH, Klippel JH, Balow JE. Risk for sustained amenorrhea in patients with systemic lupus erythematosus receiving intermittent pulse cyclophosphamide therapy. *Ann Intern Med* 1993;119:366-9.
- 26
- 27 13. Mok CC, Lau CS, Wong RW. Risk factors for ovarian failure in patients with systemic lupus erythematosus receiving cyclophosphamide therapy. *Arthritis Rheum* 1998; 41:831-7.
- 28
- 29 14. Mok CC, Chan PT, To CH. Anti-müllerian hormone and ovarian reserve in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2013;65:206-10.
- 30
- 31 15. Lawrence B, Henes J, Henes M, Neunhoeffer E, Schmalzing M, Fehm T et al. Impact of systemic lupus erythematosus on ovarian reserve in premenopausal women: evaluation by using anti-Müllerian hormone. *Lupus* 2011;20:1193-7.
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
16. Browne H, Armstrong A, Decherney A, Babb R, Illei G, Segars J, et al. Assessment of ovarian function with anti-Müllerian hormone in systemic lupus erythematosus patients undergoing hematopoietic stem cell transplant. *Fertil Steril* 2009;91:1529-32.
 17. Brunner HI, Bishnoi A, Barron AC, Houk LJ, Ware A, Farhey Y et al. Disease outcomes and ovarian function of childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2006;15:198-206.
 18. Ghaleb RM, Fahmy KA. Anti-Müllerian hormone: A marker for ovarian function in systemic lupus erythematosus patients treated with cyclophosphamide. *Joint Bone Spine* 2012 (*in press*).
 19. Appenzeller S, Blatyta PF, Costallat LTL. Ovarian failure in SLE patients using pulse cyclophosphamide: comparison of different regimes. *Rheumatology International* 2008;28:567-71.
 20. Maheshwari A, Fowler P, Bhattacharya S: Assessment of ovarian reserve--should we perform tests of ovarian reserve routinely? *Hum Reprod* 2006; 21:2729-35.
 21. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Aikawa NE, Sallum AME, Leal MM, Bonfa E, Pereira RMR, Silva CAA. Menstrual and hormonal alterations in juvenile dermatomyositis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2010;28:571-5.
 25. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969;44:291-303.
 26. Nelson SM, Yates RW, Lyall H, Jamieson M, Traynor I, Gaudoin M et al. Anti-Müllerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. *Hum Reprod* 2009;24:867-75.
 27. 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.
 28. 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.
 29. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB: Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 2002;29:288-91.
 30. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996; 39:363-9.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
31. Kurata N, Tan EM. Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum* 1976;19:574-80.
 32. Elkon KB, Culhane L. Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with the sicca syndrome and lupus erythematosus. *J Immunol* 1984;132:2350-6.
 33. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987;46:1-6.
 34. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995;74:1185-90.
 35. Bonfa E, Golombek SJ, Kaufman LD, Skelly S, Weissbach H, Brot N et al. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med* 1987;317:265-71.
 36. Micu MC, Micu R, Ostensen M. Luteinized unruptured follicle syndrome increased by inactive disease and selective cyclooxygenase 2 inhibitors in women with inflammatory arthropathies. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011;63:1334-8.
 37. 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.
 38. 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.
 39. Silva CA, Hallak J, Pasqualotto FF, Barba MF, Saito MI, Kiss MH. Gonadal function in male adolescents and young males with juvenile onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002;29:2000-5.
 40. Suehiro RM, Borba EF, Bonfa E, Okay TS, Cocuzza M, Soares PM et al. Testicular Sertoli cell function in male systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:1692-7.
 41. Vecchi AP, Borba EF, Bonfá E, Cocuzza M, Pieri P, Kim CA et al. Penile anthropometry in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2011; 20:512-8.
 42. Soares PM, Borba EF, Bonfa E, Hallak J, Corrêa AL, Silva CA. Gonad evaluation in male systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007, 56:2352-61.
 43. Rabelo-Júnior CN, Bonfá E, Carvalho JF, Cocuzza M, Saito O, Abdo CH et al. Penile alterations with severe sperm abnormalities in antiphospholipid syndrome associated with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2013;32:109-13.
 44. Lehman TJ, Edelheit BS, Onel KB. Combined intravenous methotrexate and cyclophosphamide for refractory childhood lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:321-3.
 45. Gol M, Saygili U, Koyuncuoglu M, Uslu T. Influence of high-dose methotrexate therapy on the primordial follicles of the mouse ovary. *J Obstet Gynaecol Res* 2009;35:429-33.

- 1
2
3 46. Marder W, McCune WJ, Wang L, Wing JJ, Fisseha S, McConnell DS et
4 al. Adjunctive GnRH-a treatment attenuates depletion of ovarian reserve
5 associated with cyclophosphamide therapy in premenopausal SLE
6 patients. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28:624-27.
7 47. Clowse MEB, Behera MA, Anders CK, Copland S, Coffman CJ, Leppert
8 PC et al. Ovarian preservation by GnRH agonists during chemotherapy:
9 a meta-analysis. *Journal of Womens Health* 2009;18:311-19.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only

1
 2
 3 **Table 1 – Demographic features, menstrual cycles, ovarian reserve, and anti-corpus luteum**
 4 **antibody (anti-CoL) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients with onset before**
 5 **adulthood and healthy controls.**

Variables	SLE (n=57)	Controls (n=21)	P
Demographic features			
Current age, years	27.7 (18.3-39.8)	27.7 (18.1-40)	0.414
BMI, Kg/m ²	23.8 (17.2-48.8)	25.3 (19.3-35.8)	0.562
Caucasian	21 (37)	12 (57)	0.127
Socio-economic class C or D	44 (77)	15 (71)	0.767
Menstrual cycles			
Age at menarche, years	13 (10-17)	13 (11-15)	0.205
Age at menarche after disease onset [§]	14 (11-17)	13 (11-15)	0.029
Time between menarche and current age, years	14 (4.2-25.7)	16.5 (5-28)	0.528
Any menstrual disturbances	13 (37)	6 (29)	0.767
Amenorrhea	4 (7)	0 (0)	0.569
Flow duration, days	5 (0-15)	5 (2-10)	0.935
< 3 days	3 (5)	1 (5)	1.0
> 7 days	3 (5)	3 (14)	0.335
Cycle length, days	30 (0-75)	30 (15-40)	0.580
< 24 days	0 (0)	1(5)	0.269
> 35 days	3 (5)	1(5)	1.0
POF	1 (2)	0 (0)	1.0
Ovarian reserve			
FSH, IU/L	6.4 (0.6-80.6)	5.6 (2.2-14.4)	0.335
Elevated levels	15 (27)	2 (10)	0.131
LH, IU/L	6.2 (0.1-47.7)	4.4 (2.1-10.3)	0.405
Elevated levels	24 (43)	5 (24)	0.187
Estradiol, pg/mL	45 (15-1271)	34 (24-128)	0.137
Decreased levels	4 (7)	0 (0)	0.568
AMH, ng/mL	1.1 (0-6.3)	1.5 (0.1-5)	0.037
Decreased levels	28 (49)	5 (24)	0.069
Ovarian volumes, mm ³ *	9.6 (4.3-188.9)	10.4 (4.7-34.5)	0.640
AFC**	6 (0-27)	16 (5-36)	<0.001
AFC (2-10 mm)**	44 (98)	19 (100)	1.0
Anti-CoL	9 (16)	0 (0)	0.103

43 Values expressed in n (%) or median (range), BMI - body mass index, POF - premature ovarian
 44 failure, FSH - follicle stimulating hormone, LH - luteinizing hormone, AMH - anti-Müllerian hormone,
 45 AFC - antral follicle count, [§]n= 14 SLE patients, *n = 47 SLE patients and 19 controls, **n = 45 SLE
 46 patients and 19 controls.
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60

1
2
3 **Table 2 – Demographic features, menstrual cycles and ovarian reserve in systemic lupus**
4 **erythematosus (SLE) patients with onset before adulthood according to intravenous**
5 **cyclophosphamide (IVCYC) use**

Variables	SLE with IVCYC (n=21)	SLE without IVCYC (n=36)	Controls (n=21)	p*
Demographic features				
Current age, years	27.3 (18.3-39.8)	29.4 (18.9-39.3)	27.7 (18.1-40.0)	0.754
BMI, Kg/m ²	23.9 (19.4-48.8)	23.9 (17.2-37.9)	25.3 (19.3-35.8)	0.728
Menstrual cycles				
Age at menarche, years	13 (11-16)	13 (10-17)	13 (11-15)	0.23
Time between menarche and current age, years	13.3 (7.3-25.7)	16.8 (4.2-25.3)	16.5 (5-28)	0.731
Ovarian reserve				
FSH, IU/L	8.8 (0.6-80.6)	5.7 (2.3-15.8)	5.6 (2.2-14.4)	0.032
LH, IU/L	7.6 (0.1-47.7)	5.9 (2.8-14.5)	4.4 (2.1-10.3)	0.131
Estradiol, pg/mL	35 (15-1271)	47.5 (19-127)	34 (24-128)	0.027
AMH, ng/mL	0.4 (0-3.5)	1.5 (0-6.3)	1.5 (0.1-5)	0.004
Ovarian volume, mm ³ *	9.0 (4.3-188.9)	9.7 (5.2-42.6)	10.4 (4.7-34.5)	0.665
AFC**	4 (0-27)	6.5 (1-23)	16 (5-36)	0.001

25 Values expressed in n (%), mean \pm SD or median, JSLE – juvenile systemic lupus erythematosus,
26 SLEDAI-2K - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000, SLICC/ACR-DI - Systemic
27 Lupus International Collaborating Clinics/ACR Damage Index. *p calculated by Kruskal-Wallis one-way
28 analysis-of-variance, *n = 16 SLE patients with IVCYC, 31 without IVCYC, and 19 controls **n = 17
29 SLE patients with IVCYC, 28 SLE without IVCYC, and 19 controls.

1
 2
3 Table 3 – Demographic features, menstrual cycles, and ovarian reserve in systemic lupus
4 erythematosus (SLE) patients with onset before adulthood according to the presence of anti-
5 corpus luteum antibody (anti-CoL)

Variables	With anti-CoL (n=9)	Without anti-CoL (n=48)	P
Demographic features			
Current age, years	27.3 (18.9-36.9)	27.6 (18.3-39.8)	0.861
Age at disease onset, years	16.6 (11-18)	16.1 (6-18)	0.662
Disease duration, years	13.4 (5.6-20.3)	13.2 (2.1-25.4)	0.743
BMI, Kg/m ²	22.5 (19.7-34.1)	24 (17.2-48.8)	0.577
Caucasian	3 (33)	18 (38)	1.0
Socio-economic class C or D	8 (89)	36 (75)	0.667
Menstrual cycles			
Any menstrual disturbances	2 (22)	11 (23)	1.0
Amenorrhea	0 (0)	2 (4)	1.0
Flow duration, days	5 (1-7)	5 (0-15)	0.796
< 3 days	2 (22)	3 (6)	0.173
> 7 days	0 (0)	3 (6)	1.0
Cycle length, days	30 (28-30)	30 (0-75)	0.780
> 35 days	0 (0)	3 (6)	1.0
POF	0 (0)	1 (2)	1.0
Ovarian reserve			
FSH, IU/L	7 (4.3-18.6)	6.9 (0.6-80.6)	0.375
Elevated levels	2 (22)	8 (17)	0.650
LH, IU/L	7.6 (2.8-14.2)	5.9 (0.1-47.7)	0.412
Elevated levels	5 (56)	19 (40)	0.470
Estradiol, pg/mL	48.0 (26-133)	43.5 (15-1271)	0.224
Decreased levels	0 (0)	5 (10)	0.582
AMH, ng/mL	0.5 (0-2.9)	1.15 (0-6.3)	0.392
Decreased levels	5 (56)	22 (46)	0.722
Ovarian volumes, mm ³ *	7.5 (4.7-14.3)	9.6 (4.3-188.9)	0.097
AFC**	2 (1-11)	6 (0-27)	0.081
AFC (2-10 mm)**	7 (100)	37 (97)	1.0

Values expressed in n (%) or median (range), BMI - body mass index, FSH - follicle stimulating hormone, LH - luteinizing hormone, AMH - anti-Müllerian hormone, AFC - antral follicle count, *n = 7 positive and 40 negative anti-CoL SLE patients, **n = 7 positive and 38 negative anti-CoL SLE patients.

Table 4 – Clinical and Immunological features, disease activity and damage, and treatment in systemic lupus erythematosus (SLE) patients with onset before adulthood according to the presence of anti-corpus luteum antibody (anti-CoL)

Variables	With anti-CoL (n=9)	Without anti-CoL (n=48)	p
Clinical features			
Cutaneous	8 (88)	42 (88)	1.0
Articular	8 (88)	43 (90)	1.0
Serositis	1 (11)	17 (35)	0.247
Renal	4 (44)	26 (54)	0.722
Neuropsychiatric	2 (22)	13 (27)	1.0
Hematological	7 (78)	30 (63)	0.471
APS	1 (11)	8 (17)	1.0
Immunological features			
Anti-Sm	4 (44)	15 (31)	0.463
Anti-Ro	4 (44)	22 (45)	1.0
Anti-La	0 (0)	4 (8)	1.0
Anti-P	3 (33)	19 (40)	1.0
Anti-RNP	2 (22)	14 (29)	1.0
Anti-dsDNA	5 (55)	35 (73)	0.428
Lupus anticoagulant	2 (22)	7 (15)	0.623
IgG anticardiolipin	1 (11)	8 (17)	1.0
IgM anticardiolipin	0 (0)	3 (6)	1.0
SLE activity and damage			
SLEDAI-2K	2 (0-8)	0 (0-13)	0.077
SLICC-ACR/DI	0.7 (0-2)	0.9 (0-4)	0.692
Treatment			
Prednisone	9 (100)	48 (100)	1.0
Current dose, mg/day	12.5 (5-40)	15 (2.5-40)	0.470
Cumulative dose, g	37.6 (4-161)	47.3 (9.5-199.5)	0.370
Intravenous cyclophosphamide	2 (22)	19 (40)	0.461
Current dose, g/day	-	1	-
Cumulative dose, g	6.4 (5.8-7)	13.4 (1-26.4)	0.072
Time since last dose, months	22.8 (20.9-24.7)	47.9 (0-119.9)	0.231
Azathioprine	6 (67)	37 (77)	0.674
Current dose, mg/day	150 (100-200)	150 (100-200)	0.928
Cumulative dose, g	67.4 (4.8-676.4)	157 (2.7-863)	0.528
Mycophenolate mofetil	3 (33)	18 (38)	1.0
Current dose, mg/day	2.5 (2-3)	2 (1-3.5)	0.559
Cumulative dose, g	1936 (899-3992)	1962 (29.5-13 414)	1.0
Methotrexate	5 (56)	20 (42)	0.485
Current dose, mg/day	17.5 (15-50)	16.3 (15-20)	0.686
Cumulative dose, g	1.3 (0.3-4.7)	1.2 (0.3-14.8)	0.869

Values expressed in n (%), mean ± SD or median, APS - antiphospholipid syndrome, SLEDAI-2K – Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000, SLICC/ACR-DI - Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR Damage Index.

Alveolar hemorrhage: distinct features of juvenile and adult onset systemic lupus erythematosus

D B Araujo, E F Borba, C A Silva, L MM Campos, R MR Pereira, E Bonfa and S K Shinjo

Lupus published online 16 March 2012

DOI: 10.1177/0961203312441047

The online version of this article can be found at:

<http://lup.sagepub.com/content/early/2012/03/16/0961203312441047>

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

Additional services and information for *Lupus* can be found at:

Email Alerts: <http://lup.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://lup.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

>> [OnlineFirst Version of Record - Mar 16, 2012](#)

[What is This?](#)

PAPER

Alveolar hemorrhage: distinct features of juvenile and adult onset systemic lupus erythematosus

DB Araujo^{1,2}, EF Borba¹, CA Silva^{1,3}, LMA Campos³, RMR Pereira¹, E Bonfa¹ and SK Shinjo¹

¹Rheumatology Division, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil; ²Rheumatology Department, Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, Brazil; and ³Pediatric Rheumatology Unit, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

We compared outcomes of alveolar hemorrhage (AH) in juvenile (JSLE) and adult onset SLE (ASLE). From 263 JSLE and 1522 ASLE, the AH occurred in 13 (4.9%) and 15 (1.0%) patients, respectively ($p < .001$). Both groups had comparable disease duration (2.6 ± 3.0 vs. 5.6 ± 7.0 years, $p = .151$) and median SLEDAI scores [17.5 (2 to 32) vs. 17.5 (3 to 28), $p = 1.000$]. At AH onset, a higher frequency of JSLE were already on a high prednisone dose (> 0.5 mg/kg/day) compared to ASLE (54% vs. 15%, $p = .042$). The mean drop of hemoglobin was significantly lower in JSLE (2.9 ± 0.9 vs. 5.5 ± 2.9 g/dL, $p = .006$). Although treatments with methylprednisolone, plasmapheresis, intravenous immunoglobulin and cyclophosphamide were similar in both groups ($p > .050$), regarding outcomes, there was a trend in high frequency of mechanical ventilation use (85% vs. 47%, $p = .055$) and also significant mortality (69% vs. 13%, $p = .006$) in JSLE compared to ASLE. The sepsis frequency was comparable in both groups (50% vs. 27%, $p = .433$). We have identified that AH in JSLE has a worse outcome most likely related to respiratory failure. The AH onset in JSLE already treated with high-dose steroids raises the concern of inadequate response to this treatment and reinforces the recommendation of early aggressive alternative therapies in this group of patients. *Lupus* (2012) 0, 1–6.

Key words: Alveolar hemorrhage; juvenile systemic lupus erythematosus; mortality; systemic lupus erythematosus; pulmonary

Introduction

Alveolar hemorrhage (AH) in systemic lupus erythematosus (SLE) is a rare and life-threatening manifestation.¹ This complication is characterized by sudden onset of dyspnoea, shortness of breath, hypoxemia, hemoptysis, and drop in serum hemoglobin level with concomitant appearance of diffuse alveolar or interstitial infiltrates.^{2–8}

The precise mechanism of AH in SLE is not completely defined but seems to involve immune-mediated disruption of small blood vessels with granular immune deposits³ and complement,⁵ uremia, pulmonary infection, and coagulopathies.³ Treatment of this severe pulmonary manifestation includes high corticosteroid doses, cytotoxic agents,

intravenous human immunoglobulin, and plasmapheresis.³

The great majority of AH reports in SLE are isolated cases and small series, mainly in adult onset populations (ASLE),^{1–9} whereas data regarding juvenile onset SLE (JSLE) are scarce and limited to few cases. Moreover, a systematic evaluation of AH outcomes, clinical and laboratory manifestations, and therapies in both populations is lacking in the literature.

Therefore, the aim of this study was to compare the AH outcome, initial clinical and laboratory features and treatment in JSLE and ASLE.

Patients and methods

This retrospective study included JSLE and ASLE consecutive patients regularly followed in the Lupus Clinic of the Rheumatology Division and Pediatric Rheumatology Unit of the Children's

Correspondence to: SK Shinjo, Rheumatology Division, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455-3º andar, sala 3150, CEP 01246-903, São Paulo, Brazil
Email: samuel.shinjo@gmail.com

Received 5 November 2011; accepted 13 February 2012

Institute of Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil.

All patients met the American College of Rheumatology¹⁰ classification criteria for SLE. Patients with disease onset before the age of 18 were classified as JSLE. The local Ethics Committee approved the study.

From January 1990 to January 2010, medical records of 1785 SLE patients (263 JSLE and 1522 ASLE) were extensively reviewed. AH was defined according to presence of at least three of the following pulmonary symptoms: hemoptysis, dyspnoea, tachycardia, hypoxemia and/or cough,^{11,12} new infiltrates on chest radiograph or computed tomography scan,^{11,12} sudden drop of hemoglobin of at least 1.5 g/dL without other source of bleeding⁹ and blood return on bronchoalveolar lavage (BAL) with hemosiderin-laden macrophages.^{11,12} Acute pulmonary edema, pulmonary embolism, bronchiectasis and pulmonary infections with bleeding were excluded. Clotting disorders at AH diagnosis with international normalized ratio >2.0 were also excluded.⁹

Systematic analysis at AH diagnosis included demographical data (age at disease onset, age at AH event, interval of time between SLE and AH diagnosis), gender, ethnicity, previous SLE clinical manifestations (mucocutaneous, articular, neuropsychiatric, serositis, hematological, and renal involvements), autoantibody profiles, and therapy. Lupus manifestations¹⁰ were defined as: cutaneous disease (malar or discoid rash, mucosal ulcers or photosensitivity); renal involvement (proteinuria ≥ 0.5 g/24 h, presence of cellular casts, hematuria with >10 red blood cells/hpf excluding infection or stone, >5 /hpf leukocytes excluding infection, and serum creatinine ≥ 1.4 mg%); articular involvement (non-erosive arthritis involving two or more peripheral joints); neuropsychiatric disease (psychosis and/or seizure); serositis, and hematologic complications (hemolytic anemia, leukopenia with a white blood cell count $<4000/\text{mm}^3$ or lymphopenia $<1500/\text{mm}^3$ on two or more occasions and thrombocytopenia with platelet count $<100,000/\text{mm}^3$ in the absence of drugs).

SLE activity and cumulative damage at AH diagnosis were also recorded for all patients according to SLE Disease Activity Index (SLEDAI)¹⁹ and Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR – Damage Index (SLICC/ACR-DI),²⁰ respectively. Data concerning treatment at AH diagnosis, specific therapy for AH and outcome were also evaluated.

Antinuclear antibodies were detected by indirect immunofluorescence (IIF) using HEp-2 cells as

substrate. Anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) antibody was also detected by IIF using *Critchidia luciliae*. A hemagglutination assay with rabbit thymus extract was used to determine the presence of antibodies to RNP and Sm proteins.¹³ Detection of autoantibodies to saline-soluble antigens Ro/SS-A and La/SS-B, was performed by counterimmunoelectrophoresis against dog spleen saline extract.^{14,15} Nonspecific reference sera were included in each assay to determine autoantibody specificity. Presence of anticardiolipin antibodies IgG and IgM were analyzed by ELISA, as described elsewhere.¹⁶ IgG anti-ribosomal P protein antibodies were detected by Western blotting technique using purified ribosomal fraction isolated from rat hepatocytes as substrate.¹⁷ Lupus anticoagulant antibodies were detected in the blood according to the guidelines of the International Society on Thrombosis and Hemostasis.¹⁸

Results are presented as the mean \pm standard deviation or median (range) for continuous variables and as the number (%) for categorical variables. Data were compared by Student's *t*-test or by the Mann-Whitney test for continuous variables to evaluate differences between ASLE and JSLE groups with AH. For categorical variables, differences were assessed by Fisher's exact test. *p* values less than 0.05 were considered significant.

Results

Twenty-eight patients (13 JSLE and 15 ASLE) had 30 AH events. Two adult patients had AH recurrence which was not included in this analysis. AH was diagnosed in 1.6% of SLE patients, and the frequency was significantly higher in JSLE patients ($13/263 = 4.9\%$) compared to ASLE patients ($15/1522 = 1.0\%$), (*p* < .001).

Demographical, cumulative clinical manifestations, and autoantibody profiles of these JSLE and ASLE patients are shown in Table 1. Although, as expected, JSLE had a younger age at AH diagnosis than ASLE (15.3 ± 2.7 vs. 28.7 ± 10.3 years, *p* < .001), both groups had similar disease duration (2.6 ± 3.0 vs. 5.6 ± 7.0 years, *p* = .151). AH was the first SLE manifestation in two JSLE (15.4%) and in six ASLE (40.0%) patients. No differences were observed regarding gender and ethnicity (Table 1).

Cumulative clinical manifestations (mucocutaneous, articular, serositis, neuropsychiatric, hematological, and renal involvements) and frequencies of anti-Sm, anti-ribosomal P protein, anti-RNP,

Table 1 Demographic, cumulative clinical manifestations and autoantibodies in juvenile (JSLE) and adult (ASLE) systemic lupus erythematosus patients with alveolar hemorrhage (AH)

Variables	<i>JSLE</i> (n=13)	<i>ASLE</i> (n=15)	P
Demographic data			
Age at SLE onset, yrs	12.7±4.2	23.1±5.5	<.001
Age at AH onset, yrs	15.3±2.7	28.7±10.3	<.001
Time between SLE and AH diagnosis, yrs	2.6±3.0	5.6±7.0	0.151
Caucasian	9 (69)	6 (40)	0.151
Female gender	10 (77)	13 (87)	0.639
Cumulative clinical manifestations			
Mucocutaneous involvement			
Malar rash	9 (69)	12 (80)	0.670
Discoid lesion	1 (8)	0	0.464
Photosensitivity	9 (69)	9 (60)	0.705
Oral ulcers	3 (23)	3 (20)	1.000
Arthritis	9 (69)	11 (73)	1.000
Hematological involvement			
Hemolytic anemia	4 (31)	1 (7)	0.153
Leucopenia, <4000/mm ³	7 (54)	4 (27)	0.246
Lymphopenia, <1500/mm ³	8 (62)	4 (27)	0.135
Thrombocytopenia, <100,000/mm ³	3 (23)	4 (27)	1.000
Neuropsychiatric involvement			
Serositis (pleuritis or pericarditis)	6 (46)	6 (40)	1.000
Renal involvement	10 (77)	12 (80)	1.000
Autoantibody profiles			
Anti-dsDNA	11 (85)	7 (47)	0.055
Anti-Sm	5 (39)	4 (27)	0.699
Anti-ribosomal P	2 (15)	3 (20)	1.000
Anti-RNP	2 (15)	5 (33)	0.396
Anti-Ro	1 (8)	2 (13)	1.000
Anti-La	1 (8)	0	0.464
IgM/IgG anticardiolipin	1 (8)	2 (13)	1.000
Lupus anticoagulant	0	0	1.000

Results are presented in n (%) and mean± standard deviation (SD)
AH: alveolar hemorrhage; ASLE: adult systemic lupus erythematosus;
JSLE: juvenile systemic lupus erythematosus.

anti-Ro, anti-La, lupus anticoagulant, and IgM/IgG anticardiolipin) were alike in JSLE and ASLE patients with AH ($p > .050$). The higher frequency of anti-dsDNA in JSLE patients compared to ASLE did not reach statistical significance (85% vs. 47%, $p = .055$) as shown in Table 1.

Frequencies of pulmonary manifestation in JSLE and ASLE were: hemoptysis (100% vs. 73.3%, $p = .102$); dyspnoea (100% vs. 93.3%, $p = 1.000$); cough (100% vs. 40.0%, $p = .001$); tachycardia (100% vs. 100% $p = 1.000$); and hypoxemia (100% vs. 100% $p = 1.000$). New infiltrates were observed on chest radiograph/computed tomography scan in all patients, whereas blood return was noted on BAL in 18.1% JSLE and 36.4% ASLE patients ($p = .635$). The mean drop of hemoglobin was significantly lower in JSLE compared to ASLE (2.9±0.9 vs. 5.5±2.9 g/dL, $p = .006$). No

Table 2 Alveolar hemorrhage (AH) manifestations, disease activity/damage, treatment and outcomes in juvenile (JSLE) and adult (ASLE) systemic lupus erythematosus patients

Variables	<i>JSLE</i> (n=13)	<i>ASLE</i> (n=15)	P
AH manifestations			
Pulmonary symptoms	13 (100)	15 (100)	1.000
New infiltrates*	13 (100)	15 (100)	1.000
BAL	2 (15)	4 (27)	0.655
Drop of hemoglobin (g/dL)	2.9±0.9	5.5±2.9	0.006
Disease activity/damage at AH diagnosis			
SLEDAI >8	10 (77)	10 (67)	0.686
SLEDAI	17.5 (3–28)	17.5 (2–32)	1.000
SLICC-ACR/DI >1	3 (23)	4 (27)	1.000
SLICC-ACR/DI	0 (0–1)	0 (0–3)	1.000
Current treatment at AH diagnosis			
Prednisone	11/13 (85)	7/13 (54)	0.202
>0.5 mg/kg/day	7/13 (54)	2/13 (15)	0.041
Chloroquine diphosphate	11/13 (85)	9/13 (69)	0.645
Azathioprine	6/13 (46)	5/13 (39)	1.000
Mycophenolate mofetil	2/13 (15)	2/13 (15)	1.000
Methotrexate	0	1/13 (8)	1.000
CYC	1/13 (8)	1/13 (8)	1.000
Treatment of AH			
MP	13 (100)	15 (100)	1.000
Prednisone	13 (100)	15 (100)	1.000
CYC	9 (69)	7 (47)	0.276
IVIG	5 (39)	2 (13)	0.198
Plasmapheresis	2 (15)	3 (20)	1.000
Outcome of AH			
Mechanical ventilation	11 (85)	7 (47)	0.055
Sepsis	6 (50)	4 (27)	0.433
Macrophage activating syndrome	3 (23)	0	0.087
Death	9 (69)	2 (13)	0.006

Results are presented in n (%), mean± standard deviation (SD) or median (range).

*chest radiography and/or computed tomography; BAL: bronchoalveolar lavage with hemosiderin-laden macrophages; CYC: intravenous cyclophosphamide; IVIG: intravenous human immunoglobulin; MP: intravenous methylprednisolone; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SLICC/ACR-DI: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR – Damage Index.

differences were detected in frequencies of the other AH manifestations, such as pulmonary symptoms (hemoptysis, dyspnoea, tachycardia, hypoxemia and/or cough) and BAL with hemosiderin-laden macrophages ($p > .050$) (Table 2).

Concomitant extra-pulmonary manifestations identified at AH diagnosis in JSLE and ASLE patients were nephritis (63.6% vs. 90.0%, $p = .311$), cutaneous manifestations (27.3% vs. 60.0%, $p = .198$), arthritis (18.2% vs. 50.0%, $p = .183$), serositis (27.3% vs. 30.0%, $p = 1.000$), psychosis (9.1% vs. 30.0%, $p = .311$) and hematological abnormalities (81.8% vs. 40.0%, $p = .080$). Thrombocytopenia at AH event was particularly

Table 3 Cause of death in juvenile and adult systemic lupus erythematosus patients

<i>Juvenile SLE</i>	<i>Outcome</i>	<i>Treatment</i>
DA (renal, thrombocytopenia)	AH, RI	MP, IVIG
DA (psychosis, pericarditis)	AH, RI, shock septic, dialysis	MP, CYC, IVIG, Atb
DA (renal), pneumoniae	AH, RI, thrombocytopenia, dialysis	MP, CYC, Atb
DA (renal)	AH, RI, pancytopenia	MP, CYC, IVIG
DA (cutaneous vasculitis, thrombocytopenia)	AH, RI, pneumomediastinum, pneumothorax, shock septic	MP, rituximab (2° cycle), Atb
DA (renal, thrombocytopenia, serositis, convulsions)	AH, RI	CYC, MP, Atb
DA (renal, thrombocytopenia), sepsis	AH, RI	MP, CYC
DA?, dyspnea	AH, RI	MP, plasmapheresis, CYC
DA (renal)	AH, RI, MAS	MP, IVIG
Adult SLE	Outcome	Treatment
Shock septic	AH	MP, Atb
Decompensated chronic renal dialysis	AH	?

AH: alveolar hemorrhage; Atb: antibiotic therapy; CYC: intravenous cyclophosphamide; DA: disease activity; IVIG: intravenous human immunoglobulin; MAS: macrophage activation syndrome; MP: intravenous methylprednisolone; RI: respiratory insufficiency; SLE: systemic lupus erythematosus.

more frequently observed in JSLE (81.8 % vs. 23.1%; $p=.012$).

Median SLEDAI scores were alike in ASLE and JSLE groups [17.5 (2 to 32) vs. 17.5 (3 to 28), $p=1.000$] as well as median SLICC-ACR/DI scores ($p=1.000$). Current therapy at AH diagnosis was alike in both groups ($p>.050$), but high dose of prednisone (>0.5 mg/kg/day) was more frequently observed in JSLE compared to ASLE (54% vs. 15%, $p=.041$) as shown in Table 2.

Regarding AH treatment, all patients in both groups received intravenous methylprednisolone followed by high prednisone dose (1 mg/kg/day). Other therapies in JSLE and ASLE were: intravenous human immunoglobulin (39% vs. 13%, $p=.198$), plasmapheresis (20% vs. 15%, $p=1.000$) and intravenous cyclophosphamide (69% vs. 47%, $p=.276$) (Table 2).

Regarding outcomes, a trend of high frequency of mechanical ventilation use was observed in JSLE compared to ASLE (85% vs. 47%, $p=.055$). The apparent high frequency of sepsis identified in JSLE did not reach statistical significance compared to ASLE (50% vs. 27%, $p=.433$). Macrophage activation syndrome (MAS) with macrophage hemophagocytosis in bone marrow aspirate was only identified in JSLE compared to ASLE patients with AH diagnosis (23% vs. 0%, $p=.087$). Death occurred in 11 of the 28 SLE patients (39.3%) and the frequency of death was significantly higher in JSLE (69% vs. 13%, $p=.006$) (Table 2). The causes of death are described in Table 3.

Regarding longer-term outcome, two adult SLE had AH recurrence, one of them one week after the event and the other after one month. Moreover,

there were nine deaths (69.2%) out of 13 JSLE and three with currently stable disease. In relation to ASLE there were two deaths and seven with stable disease. We have no current information about one JSLE and six ASLE patients.

Discussion

The present study was the first to identify distinct features of AH in young lupus patients after the comparison of clinical manifestations, treatment, and outcome among ASLE and JSLE patients.

AH is a rare manifestation of SLE and most of the available reports are based on single cases and small series.¹⁻⁹ Recently, a study reported predictors of AH mortality in SLE but the authors have not evaluated distinctive features of pediatric lupus patients due to the small representation of these patients in their sample.²¹ In the present study, AH was simultaneously evaluated in a large cohort of JSLE and ASLE allowing discrimination of the unique characteristics associated with this complication in these two subgroups of patients.

The AH frequency identified herein was within the range previously reported in the literature (0.2–5.4%).^{2-7,22,23} Of note, the frequency of AH was almost five times greater in JSLE than ASLE in our population, and as expected, young female patients seem to be more affected.^{2,23}

As previously observed, we find an average time between SLE onset and AH diagnosis of approximately three years in ASLE.²³ Studies identified AH as one of the first manifestations of the disease in more than 30% of the cases,^{11,20} which is

confirmed by our findings in the adult population but not in juvenile patients.

Concomitant systemic activity was observed for the majority of patients, noticeably renal involvement and positive anti-dsDNA antibodies confirming previous reports.^{7,20,23} Liu et al.⁷ and Abud-Mendoza et al.²⁰ described active nephritis in 100% and 66% of their SLE patients with AH,^{7,20} and neuropsychiatric manifestations in 60% and 58%. In contrast to their findings, a low frequency of neuropsychiatric manifestation was observed in our cohort in both groups. The restricted definition of SLEDAI criteria used in the present study is the most likely explanation for this discrepancy.

Prompt recognition of AH seems to be a major step for a better prognosis. Dyspnoea, hypoxemia, hemoptysis, and appearance of diffuse alveolar or interstitial infiltrates are indeed highly suspicious for AH and were observed in similar frequencies in both groups.^{11,12} Interestingly, a drop in serum hemoglobin was a distinct parameter, with a significantly more pronounced decrease in ASLE, raising the possibility that the better outcome for this group of patients may be related to an earlier diagnosis facilitated by the severity of this clinical finding.

AH treatment remains empirical due to the lack of randomized trials and includes corticosteroids associated with cytotoxic agents, human immunoglobulin and/or plasmapheresis.³ In our study, all SLE patients received intravenous methylprednisolone and almost half of these patients also received either plasmapheresis or intravenous human immunoglobulin, followed by immunosuppressor (mainly cyclophosphamide). High-dose pulse corticosteroids followed by intravenous cyclophosphamide seems to be the cornerstone of treatment and plasmapheresis has been considered in refractory cases.

As a consequence of immunosuppressive therapy, SLE patients are prone to severe infections. In our study, almost a quarter of ASLE patients and half of JSLE patients had sepsis. This finding may account for the worst prognosis observed in JSLE with AH. In fact, Santos-Ocampo et al.² reported a 100% survival in seven patients with AH and SLE who received high-spectrum antibiotic treatment at the beginning of their management.²

In addition, MAS was only detected in approximately one quarter of JSLE, but is considered a severe, potentially life-threatening complication that could also be responsible for the mortality in our study. Among juvenile rheumatic diseases,

MAS occurs more frequently in systemic onset juvenile idiopathic arthritis, as reported previously in our patients.^{24,25} However, recently this syndrome has been increasingly reported in JSLE,^{26,27} with an estimated prevalence of 0.9–4.6%.²⁸ Since MAS can determine a rapidly fatal course, prompt recognition and immediate therapeutic intervention are imperative. Despite this, two of our three JSLE patients with MAS died.

Previous studies support the concept that JSLE is more active and associated with more accrual damage than ASLE.^{29–32} Hoffman et al.,³² for instance, reported more renal involvement and encephalopathy, and greater presence of anti-ribosomal P, anti-dsDNA and antihistone antibodies in juvenile than adult-onset SLE patients. Brunner et al.²⁹ showed that juvenile patients had more active disease at presentation and over time than ASLE, especially active renal disease. Moreover, children received more intensive drug therapy and accrue more damage, often related to steroid toxicity.²⁹ Costallat and Coimbra³⁰ demonstrated that juvenile patients had a poorer prognosis with more seizures, gastrointestinal involvement, nephrotic syndrome, and a higher rate of mortality than ASLE patients. In contrast to these authors, our patients were comparable, in respect of clinical and autoantibody profiles. It may be that the focus of the present study is alveolar hemorrhage and, therefore, both groups had severe-onset disease course and were comparable.

The overall mortality observed herein was near 40%. That is in accordance with previous reports (ranging from 36% to 90%)^{4,5,7,11,20,22} but in the present study we clearly identified a decrease in the survival in young SLE patients with AH. Since the total number of deaths was small, it was not possible to compare the mortality causes between JSLE and ASLE. However, our study showed that, in the case of JSLE, the mortality was associated with disease activity and respiratory insufficiency secondarily to AH. In contrast, the death in two ASLE was more related to systemic infection (septic shock) and decompensated chronic renal dialysis.

In conclusion, AH is rarely observed in the early stages of SLE and has an unpredictable course but seems to be more prevalent and fatal in JSLE, most likely related to respiratory failure. A high frequency of AH onset in JSLE already treated with high-dose steroids, raises the concern of inadequate response to this treatment and reinforces the recommendation of early aggressive alternative therapies in these patients.

Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ grants #303165/2008-1 to EFB, #300248/2008-3 to CAS, #300559/2009-7 to RMRP, #301411/2009-3 to EB) and Federico Foundation Grant (to EFB, CAS, RMRP, EB, SKS).

Conflict of interest

None declared.

References

- 1 Osler W. On the visceral manifestations of the erythema group of diseases. *Am J Med Sci* 1904; 127: 1–23.
- 2 Santos-Ocampo AS, Mandell BF, Fessler BJ. Alveolar hemorrhage in systemic lupus erythematosus – presentation and management. *Chest* 2000; 118: 1083–1090.
- 3 Schwab EP, Schumacher HR, Freundlich B, et al. Pulmonary alveolar hemorrhage in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1993; 23: 8–15.
- 4 Zamora MR, Warner ML, Tuder R, et al. Diffuse alveolar hemorrhage and systemic lupus erythematosus: clinical presentation, histology, survival and outcome. *Medicine* 1997; 76: 192–202.
- 5 Barile LA, Jara LJ, Medina-Rodriguez, et al. Pulmonary hemorrhage in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6: 445–448.
- 6 Koh WH, Thumboo J, Boey ML. Pulmonary hemorrhage in oriental patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6: 713–716.
- 7 Liu MF, Lee JH, Weng TH, et al. Clinical experience of 13 cases with severe pulmonary hemorrhage in systemic lupus erythematosus with active nephritis. *Scand J Rheumatol* 1998; 27: 291–295.
- 8 Marino CT, Pertschuk LP. Pulmonary hemorrhage in systemic lupus erythematosus. *Arch Intern Med* 1991; 141: 201–203.
- 9 Kwok SK, Moon SJ, Ju JH, et al. Diffuse alveolar hemorrhage in systemic lupus erythematosus: risk factors and clinical outcome: results from affiliated hospitals of Catholic University of Korea. *Lupus* 2011; 20: 102–107.
- 10 Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.
- 11 Lee JG, Joo KW, Chung WK, et al. Diffuse alveolar hemorrhage in lupus nephritis. *Clin Nephrol* 2000; 54: 282–288.
- 12 Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 363–369.
- 13 Tan EM, Peebles C. Quantitation of antibodies to Sm antigen and nuclear ribonucleoprotein by hemagglutination. In: Rose NR, Friedman H (eds), *Manual of Clinical Immunology*, 2nd edn. Washington, DC: American Society of Microbiology; 1980. p. 866–870.
- 14 Kurata N, Tan EM. Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum* 1976; 19: 574–580.
- 15 Elkron KB, Culhane L. Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with the sicca syndrome and lupus erythematosus. *J Immunol* 1984; 132: 2350–2356.
- 16 Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, et al. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 1–6.
- 17 Bonfá E, Golombok SJ, Kaufman LD, et al. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med* 1987; 317: 265–271.
- 18 Brandt JT, Triplett DA, Alving B, et al. Criteria for diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185–1190.
- 19 Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 630–640.
- 20 Abud-Mendoza C, Diaz-Jouanen E, Alarcón-Segovia D. Fatal pulmonary hemorrhage in systemic lupus erythematosus. Occurrence without hemoptysis. *J Rheumatol* 1985; 12: 558–561.
- 21 Martínez-Martínez MU, Abud-Mendoza C. Predictors of mortality in diffuse alveolar haemorrhage associated with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2011; 20: 568–574.
- 22 Eagen JW, Memoli VA, Roberts JL, et al. Pulmonary hemorrhage in systemic lupus erythematosus. *Medicine* 1978; 57: 545–560.
- 23 Badsha H, Teh CL, King KO, et al. Pulmonary hemorrhage in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2004; 33: 414–421.
- 24 Silva CA, Silva CH, Robazzi TC, et al. Macrophage activation syndrome associated with systemic juvenile idiopathic arthritis. *J Pediatr (Rio J)* 2004; 80: 517–522.
- 25 Aikawa NE, Carvalho JF, Bonfá E, et al. Macrophage activation syndrome associated with etanercept in a child with systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Isr Med Assoc J* 2009; 11: 635–636.
- 26 Parodi A, Davi S, Pringe AB, et al. Macrophage activation syndrome in juvenile systemic lupus erythematosus. A multinational multicenter study of thirty-eight patients. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 3388–3399.
- 27 Campos LM, Omori CH, Lotito AP, et al. Acute pancreatitis in juvenile systemic lupus erythematosus: a manifestation of macrophage activation syndrome? *Lupus* 2010; 19: 1654–1658.
- 28 Fukaya S, Yasuda S, Hashimoto T, et al. Clinical features of haemophagocytic syndrome in patients with systemic autoimmune diseases: analysis of 30 cases. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 1686–1691.
- 29 Brunner HI, Gladman DD, Ibañez D, et al. Difference in disease features between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 556–562.
- 30 Costallat LT, Coimbra AM. Systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory aspects related to age at disease onset. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12: 603–607.
- 31 Tucker LB, Menon S, Schaller JG, et al. Adult- and childhood-onset systemic lupus erythematosus: a comparison of onset, clinical features, serology, and outcome. *Br J Rheumatol* 1995; 34: 866–872.
- 32 Hoffman IEA, Lauwersys BR, De Keyser F, et al. Juvenile-onset systemic lupus erythematosus: different clinical and serological pattern than adult-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 412–415.

CASE REPORT

Severe hemorrhagic corpus luteum complicating anticoagulation in antiphospholipid syndrome

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

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

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

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

Introduction

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

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

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

Case reports

Case 1

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

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

Email: jotafc@gmail.com

Received 18 April 2010; accepted 10 August 2010

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

Case 2

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

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

Case 3

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

Discussion

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

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

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

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

In patients with APS, there is a strong relationship between the intensity of anticoagulant effect and the risk of bleeding.⁴ The goal of therapy in APS patients is to reduce recurrent thrombosis. Randomized controlled trials have demonstrated that the risk of bleeding doubled when INR was >3.0.⁴ In our service, all patients are monitored each month and the INR sometimes, though rarely, reaches high levels (>3.0), as observed in our cases, particularly in patients who are being treated for arterial thrombotic events. Additionally, all the other 177 women were of reproductive age, were using long-term warfarin and had a mean INR of 2.80 ± 0.91 . In those 177 women, we observed severe bleeding in four patients (2.2%) with levels of INR >3.0: gastrointestinal hemorrhage in one patient, central nervous system hemorrhage in two others and pulmonary hemorrhage in the fourth patient.

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

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

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

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

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

Funding

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

References

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

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

FUNÇÃO SEXUAL EM DOENÇAS REUMÁTICAS

Daniel Brito de Araujo*, Eduardo Ferreira Borba**, Carmita Helena Najjar Abdo***, Lílian de Ávila Lima Souza***,
Claudia Goldenstein-Schainberg****, Wiliam Habib Chahade*****, Clovis Artur Almeida Silva*****

Resumo

A função sexual está intimamente associada a uma qualidade de vida satisfatória. A atividade sexual tem impacto na satisfação sexual do paciente, em diversos aspectos da vida pessoal e em suas relações. Doenças auto-imunes sistêmicas afetam diversos órgãos e sistemas, podendo determinar disfunção sexual em pacientes, particularmente com: artrite reumatóide, espondiloartropatias, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica, síndrome de Sjögren, vasculites e miopatias inflamatórias idiopáticas. Os artigos que descrevem função sexual nas doenças reumáticas, principalmente com populações expressivas, são escassos. Disfunção sexual em mulheres e homens com doenças reumáticas é multifatorial devido a doença crônica, atividade da doença e drogas. Uma abordagem multidisciplinar é essencial para oferecer medidas preventivas para estes pacientes. Os autores fizeram uma revisão da literatura baseados nos dados

do Medline, Lilacs e Pubmed e utilizando as palavras chave: função sexual, sexualidade, saúde reprodutiva e doenças reumáticas.

Palavras-chave: Função sexual; Disfunção Sexual; Doenças Reumáticas; Doenças Auto-imunes; Saúde Reprodutiva.

Abstract

Sexual function is closely related to satisfactory quality of life. The sexual activity has an impact in the sexual satisfaction of patient, several aspects of personal life and in their relationships. Systemic autoimmune diseases affect various organs and systems and they can determine sexual dysfunction in patients, particularly with: rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, Sjögren syndrome, vasculitis and idiopathic inflammatory myopathies. Manuscripts describing sexual function in these diseases, mainly with large population, are scarce. Sexual dysfunction in females and males with rheumatic diseases is multifactorial due to chronic disease aspects, disease activity and drugs. A multidisciplinary approach is essential in order to offer preventive measures for these patients. The authors did a literature review based on Medline, Lilacs and Pubmed data using the keywords: sexual function, sexuality, reproductive health and rheumatic diseases.

Keywords: Sexual Function; Sexual Dysfunction; Sexuality; Rheumatic Diseases; Reproductive Health.

Introdução

A função sexual (FS) é um importante componente da qualidade de vida, sendo muito mais ampla do que o intercurso sexual propriamente dito. Na verdade, envolve mecanismos endocrinológicos, vas-

Disciplina de Reumatologia, Unidade de Reumatologia Pediátrica do Departamento de Pediatria e Departamento de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e Departamento de Reumatologia do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo

*Médico Assistente do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo. Pós-graduando em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)

**Professor Livre Docente da Disciplina de Reumatologia da FMUSP. Médico Assistente da Disciplina de Reumatologia da FMUSP

***Professora Livre Docente do Departamento de Psiquiatria da FMUSP

****Mestre em Ciências pela FMUSP

*****Doutora em Reumatologia pela FMUSP. Médica Responsável pela Reumatologia Pediátrica da Disciplina de Reumatologia da FMUSP

*****Doutor em Reumatologia pela FMUSP. Diretor do Serviço de Reumatologia do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo. Mestre e Doutor em Reumatologia pela FMUSP

*****Professor Livre Docente do Departamento de Pediatria da FMUSP. Responsável pela Unidade de Reumatologia Pediátrica do Departamento de Pediatria da FMUSP

culares, neurológicos e músculo-esqueléticos, além de ser influenciada por vários fatores psíquico-sociais como aspectos familiares, religiosos, parceiro sexual e fatores individuais como auto-estima e imagem corporal^{1,2}.

Por sua vez, a disfunção sexual (DS) é definida como a incapacidade de participar do ato sexual com satisfação e compromete desejo e/ou excitação e/ou orgasmo^{3,4}. Os principais fatores de risco para DS que explicam sua alta prevalência nas diferentes fases da vida são os de origem orgânica, psíquico-sociais e sócio-demográficos³⁻⁵, com destaque para a idade, renda familiar e educação^{3,5}. Estudos epidemiológicos demonstram ainda clara relação entre DS e deficiências hormonais, hipertensão arterial, diabetes, cardiopatias, neuropatias, alcoolismo, tabagismo e uso de drogas ilícitas, bem como uso de alguns medicamentos^{4,5}.

A prevalência da DS em homens é realmente alta quando da avaliação de disfunção erétil (DE), ejaculação precoce, distúrbios do orgasmo, desejo sexual reduzido e desordens dolorosas sexuais^{3,5}. O mesmo é observado nas mulheres quando da avaliação de diminuição da libido, distúrbios do orgasmo, falta de lubrificação vaginal e dor durante o intercurso sexual como causas para DS⁴.

A DS não compromete apenas a satisfação sexual, mas também a satisfação de vida global, determinando uma menor qualidade de vida, baixa auto-estima, depressão, ansiedade e prejuízos na relação interpessoal e dos parceiros^{3,6,7}. De fato, evidências sugerem que a relação causal entre DS e baixa qualidade de vida, baixa auto-estima, depressão, ansiedade e problemas de relacionamento interpessoal são complexos e podem ser recíprocos⁷.

Uma doença crônica, e mesmo a sua terapêutica, podem exercer um grande impacto na FS, interferindo não só em seu aspecto orgânico, mas também no psicológico. Indivíduos com doenças crônicas podem perder o interesse sexual ou tornarem-se sexualmente inativos devido a um conceito equivocado sobre sua capacidade em participar do ato sexual por baixa auto-estima e preocupações quanto à imagem corporal⁸.

A depressão sabidamente associa-se à diminuição da libido e da habilidade em iniciar o intercurso sexual, DE e disfunção ejaculatória, dispareunia, ausência de orgasmo, perda do prazer ou aversão ao intercurso sexual, levando à deterioração na qualidade do relacionamento sexual desses pacientes^{1,3,4,6,7}. Estes tornam-se ansiosos sobre sua

habilidade de satisfazer o parceiro e, por vezes, com medo antecipatório de falhar, acabam evitando o intercurso⁹. Além da depressão, fadiga, estresse e ansiedade freqüentemente acompanham doenças crônicas, podendo contribuir sobremaneira na gênese da DS^{1,9}.

Apesar do impacto das doenças crônicas na FS, pouco tem se estudado do ponto de vista reumatológico, ainda que as doenças reumáticas sejam bastante prevalentes em pacientes jovens ou de meia-idade, período em que há maior atividade sexual.

As principais causas da DS nos pacientes com doenças reumáticas incluem dor, fadiga, rigidez, ressecamento de mucosas, incapacidade funcional, depressão, ansiedade, imagem corporal negativa, auto-estima reduzida, diminuição da libido, alterações hormonais, e tratamento medicamentoso com seus diversos eventos adversos^{1,8-10}.

A atividade inflamatória da doença é responsável por alterações físicas tais como artrite, anemia da doença crônica, vasculite de órgãos genitais ou envolvimento cardíaco e pulmonar que podem levar à DS. Além das alterações agudas provocadas diretamente pela condição reumática, as respectivas sequelas também podem provocar danos crônicos com repercussão sobre o intercurso sexual.

A terapêutica *per si* também determina alterações no funcionamento sexual. Os glicocorticoides podem ser responsáveis diretos pela diminuição da libido, decorrente de alterações hormonais, além de grandes mudanças físicas como hirsutismo, distribuição anômala da gordura corporal e aumento de peso, que conduzem a alterações da imagem corporal e baixa auto-estima. Alterações da libido e da ejaculação já foram relacionadas ao uso de alguns antiinflamatórios não-hormonais e ao metotrexate¹⁰. Outro ponto a ser considerado é a alta prevalência de comorbidades como depressão, doenças cardiovasculares, tireoidianas e renais em pacientes reumatológicos, que comprovadamente levam a DS¹.

O reumatologista ainda possui pouco conhecimento quanto à avaliação da saúde sexual¹. De fato, somente 33% dos pacientes no Reino Unido foram questionados por profissional de saúde sobre as alterações sexuais provocadas pela artrite reumatóide (AR)¹¹. Recentemente a DS nos pacientes reumatológicos vem ganhando destaque frente à importância da atividade sexual na qualidade de vida destes, o que nos levou a rever este aspecto.

Os autores fizeram uma revisão da literatura ba-

seados nos dados do Medline, Lilacs e Pubmed e utilizando as palavras chave: função sexual, sexualidade, saúde reprodutiva e doenças reumáticas. As principais doenças que serão abordadas no presente artigo de revisão são: AR, espondiloartropatias (EAs), lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose sistêmica (EE), síndrome de Sjögren (SS), vasculites e miopatias inflamatórias idiopáticas (MII).

Artrite Reumatóide

A AR é uma doença inflamatória crônica sistêmica que determina graus variáveis de incapacitação funcional articular, exercendo assim um profundo impacto nos aspectos da vida social, econômica, psicológica e sexual dos pacientes^{8,10,12}.

Alguns autores abordaram a influência da AR sobre a vida sexual dos pacientes e identificaram DS entre 31% a 76% dos pacientes¹³⁻¹⁶. Comprovadamente levam a dificuldades no relacionamento com o parceiro e estão relacionados principalmente a dois domínios: dificuldade no desempenho do intercurso sexual (limitação, incapacidade e falta de preparo para o ato) e diminuição do *drive* sexual (diminuição do desejo e da satisfação)¹².

A dor articular pode limitar determinadas posições sexuais, principalmente quando há comprometimento de joelhos e coxo-femurais o que restringe os movimentos^{8,9,11,14,17,18}. A diminuição do desejo ocorre em 50% a 60% dos pacientes com AR, sendo causada tanto pela indisposição em participar do intercurso sexual por fadiga e/ou depressão^{8,14,16,17} quanto pela aversão à interação sexual pelo medo antecipatório de sentir dor¹⁸. Ambas determinam uma redução na frequência sexual em mais de 70% dos pacientes^{8,14,17}. Sabe-se que quanto maior o nível da dor, depressão e incapacidade física, maiores os seus efeitos sobre a atividade sexual, independentemente do gênero¹⁶.

Diminuição do desejo e menor freqüência sexual decorrente do declínio na energia física e da dor articular foram observadas em mulheres após o início da doença⁸, das quais cerca de 60% referiram que nem elas nem seus parceiros estavam satisfeitos com o relacionamento sexual. A falta de lubrificação vaginal decorrente da síndrome *sicca* secundária também pode ser causa, uma vez que determina disparesunia, diminuindo desejo e prazer^{8,10,11,14,17}.

Ainda existem dúvidas quanto à associação en-

tre *status* androgênico e FS, uma vez que o hipogonadismo ou a disfunção testicular não prejudicam necessariamente a atividade sexual. Estudos em AR ainda são contraditórios quanto à diminuição dos níveis de testosterona¹⁹, dehidroepiandrostenediona (DHEA) e DHEA-S (metabólito sulfatado da dehidroepiandrostenediona)^{19,20}. AR como causa de hipogonadismo ou disfunção testicular com DE e diminuição da libido foi identificada em dois estudos^{15,20}. Porém outro estudo com mulheres com AR não assinalou diferenças significativas nos níveis de estrógeno e progesterona entre as pacientes com AR e os controles²¹.

Como outras doenças crônicas, a AR pode também estar implicada em alterações na dinâmica do relacionamento entre os parceiros, algumas vezes alterando o *status* de marido e mulher para paciente e cuidador^{8,11,16,18}. Hill *et al*¹¹ avaliaram os efeitos da AR sobre relacionamento, atividade sexual e causas dessas dificuldades. Eles demonstraram que 35% dos pacientes acreditam que a doença interfere na relação com o parceiro devido a problemas como diminuição das atividades diárias e sociais, alterações emocionais e alterações financeiras. Alguns trabalhos estudaram as variáveis psicológicas, evidenciando que essas são mais importantes para a satisfação na AR do que as variáveis objetivas de doença^{12,22}. A depressão foi relacionada à perda do desejo e da satisfação sexuais^{10,12,14,16,22}.

Apesar de estudos sugerirem impacto negativo da AR sobre a atividade sexual, esses resultados não são sustentados em trabalhos controlados^{14,18} e podem ser decorrentes da alta porcentagem de problemas性uais na população geral⁴. Por outro lado, reforçam a necessidade de maior conhecimento sobre as alterações性uais e problemas específicos relacionados à doença.

Espondiloartropatias

Estudos avaliando problemas性uais em pacientes com EAs ainda são escassos. A limitação na mobilidade das articulações intervertebrais da coluna lombar é apontada como importante causa frente à inabilidade física durante o intercurso e certamente contribui para a insatisfação sexual²³⁻²⁵.

Desconforto sexual significativo foi identificado em 7% e moderado em 27% dos pacientes com EAs²⁶. Homens com EAs apresentam funções erétil e orgâsmica significativamente diminuídas em

relação aos controles saudáveis²⁴. Embora não apresentem alteração do desejo sexual, a satisfação com o intercurso e a satisfação geral também são menores, sendo a rigidez matinal maior que 4 horas, única condição encontrada que se relacionou diretamente com a DE²⁴. Uma comparação de homens com EAs e controles sadios também mostrou diferença significativa em relação ao *drive* sexual, ereção, problemas de afirmação e satisfação geral, e identificou que dor, rigidez matinal, fadiga e limitação funcional estavam associadas com disfunção sexual, depressão e ansiedade²⁵. Por outro lado, outros estudos não mostraram diferença entre pacientes com EAs e controles saudáveis ao considerarem o impacto das espondiloartropatias sobre o funcionamento sexual^{18,23}.

Alguns trabalhos evidenciaram que pacientes com EAs apresentam hipogonadismo associado à DE e diminuição da libido, com redução nos níveis de androgênio, quando comparados com os controles^{15,27}. Porém, essas alterações dos hormônios sexuais não foram confirmadas por outros pesquisadores^{28,29}.

Mais de 50% dos homens com EAs referem impacto negativo da doença sobre suas vidas性uais, com maior limitação funcional decorrente de problemas físicos, referentes principalmente à vitalidade, energia, fadiga, saúde mental e saúde em geral². Problemas no relacionamento familiar, determinados por alterações no intercurso sexual, na satisfação e no desejo sexual também foram identificados em mais de 50% dos pacientes com EAs³⁰.

Não existe estudo conduzido especificamente para pacientes com artrite psoriásica (APs). Porém, é importante ressaltar que na APs, não só o componente articular da doença, mas o envolvimento cutâneo exerce impacto negativo no bem-estar físico, emocional e social do indivíduo, devido à menor auto-estima e imagem corporal negativa, além do estigma social decorrente dessas lesões³¹. De fato, uma análise de quase 18 mil pacientes psoriásicos revelou que 31% apresentavam comprometimento articular³². Impacto negativo na vida sexual ocorreu em 27% na faixa etária entre 18 e 54 anos e em 13% naqueles com idades superiores à 55 anos³².

Nas espondiloartropatias relacionadas à doença inflamatória intestinal (DII), estudos sobre DS mostraram que disparesunia é freqüente³³ e que a depressão é o principal fator determinante de DS³⁴.

Lúpus Eritematoso Sistêmico

O LES é uma doença multissistêmica auto-imune que pode determinar DS de diversas formas. A fadiga que ocorre no LES é um dos principais determinantes para diminuição do *drive* sexual e é sabido que este sintoma ocorre principalmente na doença ativa, mas também naqueles com doença bem controlada, podendo ser exacerbada na presença de anemia³⁵. Depressão e ansiedade, que fazem parte do espectro do lúpus neuropsiquiátrico, exercem impacto negativo na sexualidade, na auto-estima e na qualidade do relacionamento interpessoal.

Existem relatos de que a franca atividade inflamatória da doença pode causar hipogonadismo em homens com LES^{36,37}. Porém, nem o hipogonadismo nem a disfunção testicular necessariamente reduzem a atividade sexual⁹. Por outro lado, pacientes lúpicas apresentam maior incidência de alterações ginecológicas, tais como irregularidade menstrual, endometriose e infecção vaginal, que podem interferir diretamente no funcionamento sexual³⁵.

Um dos primeiros estudos que investigou a interferência do LES no desempenho sexual foi o de Innan *et al.*³⁷ Eles identificaram distúrbios sexuais em 19% dos homens com LES. Posteriormente, estudo com 120 pacientes com LES (114 mulheres) demonstrou alta prevalência de problemas na FS, na fase aguda da doença, em pacientes antes sexualmente ativos³⁸. Nessa avaliação, detectaram-se problemas leves na FS em 10% e graves em 4%, e que 20% tinham problemas com a auto-imagem³⁸.

Mulheres com LES apresentam maior taxa de abstinência sexual quando comparadas a controles (26% *versus* 4%, respectivamente), menor freqüência de atividade sexual (incluindo menor freqüência de masturbação e carícias genitais), diminuição na lubrificação vaginal, e ajuste sexual geral mais pobre, além de apresentarem mais depressão³⁵. Aumento no desconforto ou dor vaginal durante o intercurso e dificuldade na penetração devido à menor elasticidade vaginal também foram identificados, porém *drive* sexual, motivação, excitação subjetiva, obtenção do orgasmo e satisfação foram similares aos controles³⁵.

Recentemente, dois de nossos estudos em FS de pacientes com LES merecem destaque^{39,40}. Numa avaliação de 35 homens brasileiros com LES e 35 controles pareados por idade e estadiamento puberal, DS foi evidenciada em 20% dos pacientes

versus nenhum dos controles. Além de maiores freqüências de DE, ejaculação precoce, anorgasmia e insatisfação sexual foram reportadas nos pacientes em relação aos controles³⁹. O outro estudo avaliou 52 adolescentes do sexo feminino com LES juvenil e 52 mulheres adolescentes saudáveis pareadas por idade e estadiamento puberal. A freqüência de atividade sexual foi significativamente menor nas pacientes com LES juvenil *versus* controles. Em contraste, as percentagens de disfunção sexual, lubrificação vaginal reduzida, desempenho diminuído, orgasmo reduzido e insatisfação com a vida sexual foram significativamente maiores nas pacientes com LES juvenil comparadas com o grupo controle⁴⁰.

Esclerose Sistêmica

A ES é certamente, entre as doenças reumatológicas, a que promove maiores alterações da imagem corporal, devido ao comprometimento cutâneo freqüentemente grave. Ambas as formas, limitada e difusa, determinam quadros pulmonares que levam à fadiga e à dispneia, com diminuição do *drive* sexual^{17,41}.

O comprometimento dos órgãos genitais com fibrose vaginal e consequente diminuição da elasticidade, além do ressecamento, podem dificultar a penetração ou provocar dor. Maior incidência de dispareunia foi encontrada nas pacientes com ES, estando associada ao aumento do ressecamento vaginal e presença de ulcerações e fissuras^{17,41}. Além disso, o espessamento cutâneo pode levar a contraturas articulares, podendo comprometer também os quadris e dificultar assumir determinadas posições⁴¹. Outros sintomas como artralgias/artrites e fraqueza muscular decorrente da atrofia também podem impactar negativamente a FS¹⁷.

O dano vascular precoce envolvendo pequenos vasos na ES pode afetar todas as fases do funcionamento sexual que dependem da integridade dos mecanismos vasogênicos⁴², desde alterações na excitação, DE até alterações da resposta orgásrica.

De fato, a DE é extremamente freqüente, porém sempre foi subestimada sendo sua primeira descrição na ES feita por Lally e Jimenez⁴³. Estudos apontam uma prevalência de DE variando entre 12% e 80% dos homens com ES^{44,45}. Embora sua patogênese não seja totalmente conhecida, esta parece ser decorrente muito mais de fatores orgânicos do que de fatores puramente psicogênicos,

sendo determinada por fluxo sanguíneo prejudicado frente à vasculopatia e alterações fibróticas do corpo cavernoso, com diminuição da pressão sanguínea peniana^{9,46}. Estudos mostraram que na ES não existe relação entre DE e níveis de testosterona ou de gonadotrofinas^{44,45}, mas relacionam-se com maior incidência de fenômeno de Raynaud⁴⁵, corroborando a etiologia vasculogênica.

Diminuição do desejo sexual foi identificada em estudo de ES, além de diminuição no número de intercursos sexuais e diminuição no número e na intensidade dos orgasmos dos pacientes¹⁷. A participação da doença ficou bem evidente ao se constatar diminuição do número de intercursos性uais mensais e do índice de satisfação sexual quando comparados ao ano anterior ao início da doença¹⁷.

Síndrome de Sjögren

A principal característica da SS é o comprometimento glandular, devido à presença de processo inflamatório linfocítico⁴⁷. A SS primária (SSp) afeta principalmente mulheres, com picos de incidência entre os 20 e 30 anos e um segundo pico volta dos 50 anos, durante a menopausa⁴⁷. Dessa forma, afeta o desempenho sexual tanto de mulheres jovens quanto de mulheres no climatério/menopausa com piora dos sintomas de ressecamento vaginal.

A diminuição da produção do muco cervical leva ao ressecamento vaginal, determinando vaginite atrófica, que por si só causa dispareunia e prurido. A dispareunia é identificada em 40 a 60% das pacientes com SSp, porém a freqüência do intercurso sexual não está necessariamente diminuída⁴⁸⁻⁵⁰. De fato, apesar da maior prevalência de dispareunia nas pacientes com SSp (40%) do que em controles (3%), não foi encontrada diferença na atividade sexual entre os grupos⁴⁸. Esse estudo mostrou ainda que cerca de metade das pacientes com este sintoma apresentavam etiologia óbvia para a queixa, tal como trauma e inflamação, e não foi relacionada primariamente a manifestações clínicas ou sorológicas da SSp⁴⁸. Soma-se a estes dados o fato de que pacientes com SSp também apresentam maior incidência de endometriose, que sabidamente está relacionada à dispareunia e distúrbios da FS, interferindo negativamente no relacionamento interpessoal da paciente⁵⁰.

Alguns estudos em animais sugerem a hipótese

de influência dos andrógenos na SSp, pois foi identificada diminuição desses hormônios em mulheres com a doença^{51,52}. O DHEA-S é menor na SSp em relação a controles e existe uma correlação positiva entre seus níveis séricos e alterações do bem-estar geral, mas negativa nos escores de excitação, desejo e satisfação⁴⁹. Baixos níveis de DHEA-S são relacionados à diminuição na qualidade da vida sexual dessas pacientes⁴⁹. Porém, ainda existem controvérsias sobre o impacto dos níveis hormonais nas manifestações da doença já que em estudos como o de Hartkamp et al. não houve melhora da fadiga, bem-estar mental e humor deprimido em mulheres com SSp que receberam DHEA quando comparadas aos controles⁵³.

Vasculites

As vasculites englobam um grupo bastante heterogêneo de doenças que apresentam como característica comum a inflamação da parede dos vasos.

A doença de Behçet (DB) é uma vasculite multissistêmica caracterizada principalmente por ulcerações recorrentes de mucosas⁵⁴. As ulcerações orais e genitais podem ser extensas e muito dolorosas, afetando mais freqüentemente língua, lábios, gengivas e mucosa oral⁵⁴. As lesões genitais no homem ocorrem mais freqüentemente no escroto, afetando raramente o pênis, e na mulher principalmente na vulva, vagina e colo uterino⁵⁴. Ulcerações genitais podem provocar dispareunia na mulher e dor escrotal nos homens. Outro aspecto importante, além da dor, é que a presença destas ulcerações pode ser interpretada pelo parceiro como sinal de doença venérea, prejudicando o relacionamento interpessoal e a auto-imagem. Estudo com homens com envolvimento neurológico pela DB identificou prevalência de DE, de várias etiologias, em 63% dos pacientes⁵⁵. Presença de DS em mulheres com DB mostrou escores significativamente piores em todos os domínios avaliados (desejo, excitação, lubrificação, orgasmo, satisfação e dor) *versus* controles⁵⁶. Entretanto, foi identificada somente uma relação entre disfunção sexual e humor depressivo, sem relação com a presença de ulcerações genitais⁵⁶.

A poliarterite nodosa freqüentemente envolve o trato genital, tanto masculino quanto feminino⁵⁷. Além de causar dor testicular, pode mais raramente comprometer pênis⁵⁸, colo uterino e ovários⁵⁷, situações que levam à dispareunia. Além do envol-

vimento sistêmico e da disfunção causada pela atividade da doença, o processo vasculítico pode afetar os órgãos genitais, comprometendo diretamente o desempenho sexual por dor, hipersensibilidade e necrose local, e indiretamente pelas alterações hormonais por vasculite ovariana e testicular⁵⁷.

Outras vasculites sistêmicas como a arterite de Takayasu, arterite de células gigantes, granulomatose de Wegener merecem mais estudos frente ao seu caráter sistêmico, por alterarem a qualidade de vida física e emocional, e possivelmente interferem de diferentes formas na FS dos pacientes.

Miopatias inflamatórias idiopáticas

As MII, entre elas dermatomiosite do adulto, dermatomiosite juvenil e polimiosite, são doenças autoimunes sistêmicas caracterizadas por inflamação muscular crônica e fraqueza muscular progressiva. Um recente estudo multicêntrico brasileiro avaliou 25 pacientes do sexo masculino com MII e 25 controles pareados por idade e estadiamento puberal. As freqüências de atividade sexual, número de parceiras com gestações espontâneas após início da doença e uso de preservativo masculino foram significativamente menores nos pacientes com MII *versus* controles⁵⁹.

Conclusões

As doenças reumáticas que apresentam períodos de franca atividade inflamatória promovem alterações específicas que certamente prejudicam a FS dos pacientes. Mesmo nas fases de controle e remissão do processo inflamatório, podem determinar limitações e seqüelas importantes que determinam DS. O atendimento ao paciente deve incluir discussão dos aspectos da sexualidade e contracepção e prevenção das doenças sexualmente transmissíveis.

Entretanto, a real dimensão e influência destas doenças sobre a FS ainda necessita de maiores esclarecimentos no sentido de promover estratégias para conduzir de maneira mais apropriada a DS, melhorando a qualidade de vida e o bem-estar destes pacientes. Futuros estudos com populações expressivas de pacientes com doenças reumatológicas e aplicação de instrumentos validados serão necessários.

Correspondência para:

Daniel Brito de Araújo
 Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo
 Departamento de Reumatologia
 Rua Pedro de Toledo, 1800
 São Paulo – SP
 CEP: 04.039-004
 E-mail: araujodb@gmail.com

Referências

1. Nusbaum MR, Hamilton C, Lenahan P. Chronic illness and sexual functioning. *Am Fam Physician* 2003; 67:347-354.
2. Cakar E, Dincer U, Kiralp MZ et al. Sexual problems in male ankylosing spondylitis patients: relationship with functionality, disease activity, quality of life, and emotional status. *Clin Rheumatol* 2007; 26:1607-1613.
3. Abdo, CH. The male sexual quotient: a brief, self-administered questionnaire to assess male sexual satisfaction. *J Sex Med* 2007; 4:382-389.
4. Abdo CH, Oliveira Jr WM, Moreira Jr ED, Fittipaldi JA. Prevalence of sexual dysfunction and correlated conditions in a sample of brazilian women - results of the brazilian study on sexual behavior. *Intern J Impotence Res* 2003; 16:160-166.
5. Lewis RW, Fugi-Meyer KS, Bosch R et al. Epidemiology risk factors of sexual dysfunction. *J Sex Med* 2004; 1:35-39.
6. Guest JF, Das Gupta R. Health-related quality of life in a UK-based population of men with erectile dysfunction. *Pharmacoconomics* 2002; 20:109-117.
7. Symonds T, Roblin D, Hart K, Althof S. How does premature ejaculation impact a man's life? *J Sex Marital Ther* 2003; 29:361-370.
8. Østensen M. New insights into sexual functioning and fertility in rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004; 18:219-232.
9. Yoshino S, Uchida S. Sexual problems of women with rheumatoid arthritis. *Arch Phys Med Rehabil* 1981; 62:122-123.
10. Ehrlich GE. Assessment of sexual function in patients with rheumatic disorders. *J Rheumatol* 1998; 25:821-822.
11. Hill J, Bird H, Thorpe R. Effects of rheumatoid arthritis on sexual activity and relationships. *Rheumatology* 2003; 42:280-286.
12. Abdel-Nasser AH, Ali EI. Determinants of sexual disability and dissatisfaction in female patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2006; 25:822-830.
13. Ferguson K, Figley B. Sexuality and rheumatic disease: a prospective study. *Sex Disabil* 1979; 2:130-138.
14. Blake DJ, Maisiak R, Alarcon GS, Holley HL, Brown S. Sexual quality of life of patients with arthritis compared to arthritis free controls. *J Rheumatol* 1987; 14:570-576.
15. Gordon D, Beastall GH, Thomson JA, Sturrock RD. Androgenic status and sexual function in males with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *QJM* 1986; 60:671-679.
16. Kraaimaat FW, Bakker AH, Janssen E, Bijlsma JW. Intrusiveness of rheumatoid arthritis on sexuality in male and female patients living with a spouse. *Arthr Care Res* 1996; 9:120-125.
17. Bhaduria S, Moser DK, Clements PJ et al. Genital tract abnormalities and female sexual function impairment in systemic sclerosis. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:580-587.
18. Elst P, Sybesma T, van der Stadt RJ, Prins APA, Hissink Muller W, den Butter A. Sexual problems in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1984; 27:217-220.
19. Tengstrand B, Carlstrom K, Hafstrom I. Bioavailable testosterone in men with rheumatoid arthritis-high frequency of hypogonadism. *Rheumatology* 2002; 41:285-289.
20. Gordon D, Beastall GH, Thomson JA, Sturrock RD. Prolonged hypogonadism in male patients with rheumatoid arthritis during flares in disease activity. *Br J Rheumatol* 1988; 27:440-444.
21. Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Monachesi M, Accardo S. Sex hormone status in women suffering from rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1986; 13:1019-1023.
22. van Lankveld W, Ruiterkamp G, Naring G, de Rooij DJ. Marital and sexual satisfaction in patients with RA and their spouses. *Scand J Rheumatol* 2004; 33:405-408.
23. Yim SY, Lee IY, Lee JH et al. Quality of marital life in Korean patients with spondyloarthropathy. *Clin Rheumatol* 2003; 22:208-212.
24. Pirildar T, Müezzinoglu T, Pirildar S. Sexual Function in Ankylosing Spondylitis - A Study of 65 Men. *J Urol* 2004; 171:1598-1600.
25. Dincer U, Cakar E, Kiralp MZ, Dursun H. Assesment of sexual dysfunction in male patients with Ankylosing Spondylitis. *Clin Rheumatol* 2007; 27:561-566.
26. Wordsworth BP, Mowat AG. A review of 100 patients with ankylosing spondylitis with particular reference to socioeconomic effects. *Br J Rheumatol* 1986; 25:175-180.
27. Tapia-Serrano R, Jimenez Balderas FJ, Murrieta S, Bravo-Gatica C, Guerra R, Mintz G. Testicular function in active ankylosing spondylitis. Therapeutic response to human chorionic gonadotrophin. *J Rheumatol* 1991; 18:841-848.
28. Giltay EJ, Popp-Snijders C, van Schaardenburg D, Dekker-Saeys BJ, Gooren LJ, Dijkmans BA. Serum testosterone levels are not elevated in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1998; 25:2389-2394.
29. Mitra D, Elvins DM, Collins AJ. Testosterone and testosterone free index in mild ankylosing spondylitis: relationship with bone mineral density and vertebral fractures. *J Rheumatol* 1999; 26:2414-2417.
30. Özgül A, Peker F, Taskaynatan MA, Tan AK, Dinçer K, Kalyon TA. Effect of ankylosing spondylitis on health-related quality of life and different aspects of social life in young patients. *Clin Rheumatol* 2006; 25:168-174.
31. Husted JA, Gladman DD, Farewell VT, Cook RJ. Health-related quality of life of patients with psoriatic arthri-

- tis: a comparison with patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 45:151-158.
32. Krueger G, Koo J, Lebwohl M, Menter A, Stern RS, Rostad T. The Impact of Psoriasis on Quality of Life. Results of a 1998 National Psoriasis Foundation Patient-Membership Survey. *Arch Dermatol*. 2001; 137:280-284.
 33. Moody G, Probert CS, Srivastava EM, Rhodes J, Mayberry JF. Sexual dysfunction amongst women with Crohn's disease: a hidden problem. *Digestion* 1992; 52:179-183.
 34. Timmer A, Bauer A, Dignass A, Rogler G. Sexual function in persons with inflammatory bowel disease: a survey with matched controls. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5:87-94.
 35. Curry SL, Levine SB, Corty E, Jones PK, Kurit DM. The impact of systemic lupus erythematosus on women's sexual functioning. *J Rheumatol* 1994; 21:2254-2260.
 36. Mok CC, Lau CS. Profile of sex hormones in male patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000; 9:252-257.
 37. Inman RD, Javonovic L, Markenson JA, Longcope C, Dawood MY, Lockshin MD. Systemic lupus erythematosus in men. Genetic and endocrine features. *Arch Intern Med* 1982; 142:1813-1815.
 38. Stein H, Walters K, Dillon A, Schulzer M. Systemic Lupus Erythematosus - A Medical and Social Profile. *J Rheumatol* 1986; 13:570-576.
 39. Silva CA, Bonfá E, Borba EF et al. Saúde reprodutiva em homens com lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol* 2009; 49:207-22.
 40. Silva CA, Febrônio MV, Bonfá E, Pereira RM, Pereira EA, Takiuti AD. Função sexual e saúde reprodutiva em mulheres adolescentes com lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol* 2009 (in press).
 41. Sampaio-Barros PD, Samara AM, Marques Neto JE. Gynaecologic history in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2000; 19:184-7.
 42. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. N Eng J Med 2009; 360:1989-2003.
 43. Lally EV, Jimenez SA. Impotence in progressive systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1981; 95:150-155.
 44. Nowlin NS, Brick JE, Weaver DJ et al. Impotence in scleroderma. *Ann Intern Med* 1986; 104:794-798.
 45. Hong P, Pope JE, Ouimet JM, Rullan E, Seibold JR. Erectile dysfunction associated with scleroderma: a case-control study of men with scleroderma and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2004; 31:508-513.
 46. Walker UA, Tyndall A, Ruszat R. Erectile dysfunction in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68:1083-1085.
 47. Fox RI. Sjögren's syndrome. *Lancet* 2005; 366:321-331.
 48. Skopouli F, Papanikolaou S, Malamou-Mitsi V, Papanikolaou N, Moutsopoulos H. Obstetric and gynaecological profile in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1994; 53:569-573.
 49. Valtysdottir ST, Wide L, Hällgren R. Mental wellbeing and quality of sexual life in women with primary Sjögren's syndrome are related to circulating dehydroepiandrosterone sulphate. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:875-879.
 50. Haga HJ, Gjesdal CG, Irgens LM, Østensen M. Reproduction and gynaecological manifestations in women with primary Sjögren's syndrome: a case-control study. *Scand J Rheumatol* 2005; 34:45-48.
 51. Valtysdottir ST, Wide L, Hällgren R. Low serum dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S) in women with primary Sjögren's syndrome as an isolated sign of impaired HPA-axis function. *J Rheumatol* 2001; 28:1259-1265.
 52. Sullivan D, Bélanger A, Cermak JM et al. Are Women with Sjögren's Syndrome Androgen-Deficient? *J Rheumatol* 2003; 30:2413-2419.
 53. Hartkamp A, Geenen R, Godaert GL et al. Effect of dehydroepiandrosterone administration on fatigue, well-being, and functioning in women with primary Sjögren syndrome: a randomized controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:91-97.
 54. Marshall SE. Behcet's disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004; 18:291-311.
 55. Erdo_ru T, Koçak T, Serdar_ lu P, Kadio_ lu A, Tellalo_ lu S. Evaluation and therapeutic approaches of voiding and erectile dysfunction in neurological Behcet's syndrome. *J Urol* 1999; 162:147-153.
 56. Koçak M, Ba_ar MM, Vahapo_ lu G, Mert HC, Güngör S. The effect of Behcet's disease on sexual function and psychiatric status of premenopausal women. *J Sex Med* 2009; 6:1341-1348.
 57. Fraenkel-Rubin M, Ergas D, Sthoeger ZM. Limited polyarteritis nodosa of the male and female reproductive systems: diagnostic and therapeutic approach. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:362-364.
 58. Karademir K, Senkul T, Atasoyu E, Yildirim S, Nalbant S. Ulcerative necrosis of the glans penis resulting from polyarteritis nodosa. *J Clin Rheumatol* 2005; 11:167-169.
 59. Silva CA, Moraes AJ, Leal MM et al. Aspectos da saúde reprodutiva em homens com miopatia inflamatória. Um estudo multicêntrico. *Rev Bras Reumatol* 2009 (in press).