

RICARDO MAISSE SUEHIRO

**Avaliação da função das células de Sertoli testiculares em
pacientes do sexo masculino com lúpus eritematoso
sistêmico**

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

Área de Concentração: Reumatologia

Orientador: Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Suehiro, Ricardo Maisse

Avaliação da função das células de Sertoli testiculares em pacientes do sexo masculino com lúpus eritematoso sistêmico / Ricardo Maisse Suehiro. -- São Paulo, 2008.

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

Área de concentração: Reumatologia.

Orientador: Clovis Artur Almeida da Silva.

Descritores: 1.Lúpus eritematoso sistêmico 2.Espermatozóides 3.Hormônios
4.Inibinas 5.Células de Sertoli 6.Homens

USP/FM/SBD-384/08

DEDICATÓRIA

À minha mãe, por sempre me apoiar em tudo e por seu caráter excepcional e amor incondicional.

À minha irmã Ana Paula, por seu exemplo de fé e perseverança.

Ao Kiko, por seu carinho, companheirismo, sinceridade e empatia.

Ao Marcelo, por ter acompanhado toda a minha trajetória nos últimos 11 anos, sempre ao meu lado.

À minha melhor amiga Vilma, por sua compreensão e maturidade.

Aos meus amigos Edu, Lúcia, Biba, Renata Lira, Maysa, Juliana, Beto, Fabinho e Júnior, Bibica e Tetê, Tio Léo, Marília, Nady, Michela, Isabel, Jessé, Ana Karina, Kaliana, Ari e Lú, Renata Luri, Mauro, André, Nanny, Luzinha, Lindiane, Chico, Adri Jesus e tantos outros que fazem ou fizeram parte da minha vida.

A Fábio, Mariana, Luciana, Elaine, Denise, Gisele, Malú, Renata, Anna, Anas e a todos os meus novos colegas de trabalho.

Ao meu pai e aos meus irmãos Tiemy e Takeshi.

Às minhas tias Marie, Hatsue, Águeda e Vera e aos meus tios Tim, Lú, Minoru, Noboru, Celso e Rem.

Às minhas avós, aos meus avôs e a todos os meus antepassados.

A Deus.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Clovis Artur Almeida da Silva, mais que meu orientador, um grande amigo e “pai”, exemplo de disciplina, competência e determinação, por sempre confiar em mim e incentivar o estudo e a pesquisa.

Às doutoras Adrina Maluf, Lúcia Campos, Bernadete Liphaut e Paola Lotito e aos amigos da Reumatologia Pediátrica: Ana Júlia, Mércia, Beth, Rosa, Georgiana, Daniela, Aline Islabão, Carlos, Nádia, Kátia, Renata, Aline Miranda, João, Fernanda, Clarissa e Roberta, pelo carinho e amizade.

À Dra. Eloísa Bonfá, co-orientadora, e ao Dr. Eduardo Borba pelas orientações e revisão do artigo.

À Dra. Telma Okay, ao Dr. Marcelo Cocuzza e à Dra. Polyanna Soares por todo o suporte.

Ao Dr. Ulisses Dória Filho pelo precioso auxílio com a análise estatística.

À Aline Braga e Kelly Athayde pelo apoio técnico.

A André Luiz Correa pela realização da ultra-sonografia testicular com Doppler.

A Amélia, Nivaldo e Milene, amigos do Instituto da Criança.

A Marisa, bibliotecária do Instituto da Criança, pela ajuda no levantamento bibliográfico.

Às funcionárias da Reumatologia, Fátima e Cláudia, pela sua colaboração.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. MÉTODOS	6
4. RESULTADOS	14
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÕES	26
7. ANEXOS.....	28
8. REFERÊNCIAS	34

RESUMO

Suehiro RM. *Avaliação da função das células testiculares de Sertoli em pacientes do sexo masculino com lúpus eritematoso sistêmico [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 38p.

Objetivo: Avaliar a função das células testiculares de Sertoli em homens com lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Métodos:** Trinta e quatro pacientes consecutivos foram prospectivamente selecionados para avaliar a função das células testiculares de Sertoli pelos níveis séricos da inibina B. Características clínicas, tratamento, análises dos espermatozoides, avaliação urológica, ultrassonografia testicular, hormônios e anticorpos anti-espermatozoides foram avaliados. **Resultados:** Os pacientes foram subdivididos em dois grupos: níveis séricos reduzidos (Grupo 1, n=8) e níveis séricos normais (Grupo 2, n=26) de inibina B. As medianas da concentração média de espermatozoides ($p=0,024$), da contagem total de espermatozoides ($p=0,023$) e da contagem total de espermatozoides móveis ($p=0,025$) foram menores no Grupo 1. Os níveis de inibina B foram positivamente correlacionados com a concentração de espermatozoides ($r=0,343$) e contagem total de espermatozoides móveis ($r=0,357$), e negativamente correlacionados com FSH ($r=0,699$) e LH ($r=0,397$). A mediana de inibina B sérica foi menor nos pacientes com LES tratados com pulsoterapia com ciclofosfamida endovenosa (CICIV) comparada aos não tratados com este medicamento ($p=0,031$). Avaliação dos 26 pacientes com LES e níveis normais de inibina B e FSH revelou que a mediana da relação inibina B/FSH foi menor nos pacientes lúpicos com oligozoospermia comparada aos pacientes com normozoospermia ($p=0,004$). Esta relação também foi menor nos pacientes com LES tratados com CICIV do que naqueles sem esta terapia ($p=0,04$). **Conclusão:** Este é o primeiro estudo que identificou uma alta frequência de disfunção das células testiculares de Sertoli em homens com LES associada a anormalidades dos espermatozoides. Outros estudos prospectivos são necessários para determinar se os níveis séricos de inibina e a relação inibina B/FSH serão um marcador útil e precoce de toxicidade pela CICIV neste pacientes.

SUMMARY

Suehiro RM. *Testicular Sertoli cell function evaluation in male systemic lupus erythematosus patients* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 38p.

Objective: To assess the testicular Sertoli cell function in male SLE patients. **Methods:** 34 consecutive patients were prospectively selected to evaluate the testicular Sertoli cell function by serum inhibin B levels. Clinical features, treatment, semen analysis, urologic evaluation, testicular ultrasound, hormones, and antisperm antibodies were determined. **Results:** Patients were subdivided into two Groups: low serum inhibin B (Group 1, n=8) and normal levels (Group 2, n=26). The medians of sperm concentration ($p=0.024$), total sperm count ($p=0.023$) and total motile sperm count ($p=0.025$) were lower in Group 1. Inhibin B levels were positively correlated with sperm concentration ($r=0.343$), total motile sperm count ($r=0.357$), and negatively correlated with FSH ($r=0.699$) and LH ($r=0.397$). The median serum inhibin B was lower in SLE patients treated with intravenous cyclophosphamide pulsetherapy (IVCYC) compared to those without this therapy ($p=0.031$). Further evaluation of the 26 SLE patients with normal inhibin B and FSH levels revealed that medians of inhibin B/FSH ratio were lower in SLE patients with oligozoospermia compared to normozoospermia ($p=0.004$). This ratio was also lower in SLE patients treated with IVCYC than those without this therapy ($p=0.04$). **Conclusions:** This is the first study to identify a high frequency of testicular Sertoli cell dysfunction in male SLE associated with sperm abnormalities. Further prospective studies are necessary to determine if inhibin levels and inhibin B/FSH ratio will be an earlier and useful marker of IVCYC toxicity in these patients.

1.

INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune sistêmica, que acomete os pacientes durante os anos reprodutivos, com uma baixa prevalência no sexo masculino (1,2). Novas opções terapêuticas têm melhorado a sobrevida dos pacientes com LES e reforçam a importância da qualidade de vida, incluindo aspectos relacionados à capacidade reprodutora e o potencial futuro de fertilidade.

A inibina é um hormônio glicoprotéico heterodimérico produzido quase exclusivamente pelas células testiculares de Sertoli (3,4). Ela é composta de uma subunidade α -dissulfeto ligada a subunidades β , de maneira que subunidades β_A formam inibina A e subunidades β_B formam inibina B (5,6). A inibina B é a forma fisiológica ativa de inibina na circulação e, portanto, é o marcador endócrino mais importante para monitorar a função gonadal em homens (3,5,6-8). O achado de que a castração resultou em níveis indetectáveis de inibina B, constatou que a inibina B circulante era produzida pelos testículos (3).

Além disso, a inibina B regula a liberação hipofisária do hormônio folículo-estimulante (FSH) por um mecanismo de feedback negativo (9), o que é demonstrado pelos relatos de uma forte correlação não apenas entre inibina B e FSH (10-12), mas também com hormônio luteinizante (LH) (12) em homens subférteis. As concentrações de inibina B podem fornecer uma informação útil sobre a função dos túbulos seminíferos (10) e parece ser um marcador direto

de espermatogênese (12). A inibina B tem também sido usada como um importante parâmetro de função das células de Sertoli em homens com doença de Hodgkin que sobrevivem após tratamento com quimioterapia (5).

Nós recentemente estudamos 35 homens com LES e identificamos anormalidades dos espermatozóides associadas à terapia com pulsoterapia com ciclofosfamida intravenosa (CICIV) e a níveis elevados de FSH. Entretanto, ainda não há nenhum estudo sistemático na literatura médica avaliando níveis de inibina B em pacientes com LES e sua relação com anormalidades do sêmen.

2.

OBJETIVOS

1 - Avaliar a função das células testiculares de Sertoli em homens com lúpus eritematoso sistêmico (LES).

2 – Avaliar a disfunção das células testiculares de Sertoli em homens com LES e sua associação com: características demográficas, manifestações clínicas, atividade da doença, dano cumulativo, terapêuticas utilizadas, exame urológico, ultra-sonografia testicular, perfil hormonal e anticorpos anti-espermatozóides.

3.

MÉTODOS



Pacientes com LES: Trinta e quatro pacientes lúpicos do sexo masculino e com idades entre 15-45 anos, acompanhados regularmente em dois Serviços Universitários de Reumatologia, foram selecionados para este estudo no período de janeiro de 2003 a janeiro de 2006 (13). Todos os pacientes preencheram os critérios de classificação para o diagnóstico de LES propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (14). Os critérios de exclusão foram hidrocele, hipospádia, criptorquidia, infecção testicular (por exemplo, caxumba), câncer testicular, orquite, vasculite testicular, disfunção ureteral, história prévia de cirurgia escrotal ou inguinal (por exemplo, varicocelectomia, vasectomia, herniorrafia, etc), diabetes mellitus, história prévia ou atual de uso de álcool ou tabagismo, e recusa a coletar amostra de sêmen ou avaliação incompleta. O Comitê de Pesquisa e Ética local aprovou este estudo e um consentimento informado foi obtido de todos os participantes e, quando necessário, de seus respectivos pais.

Função das células testiculares: A função das células testiculares foi determinada através dos níveis séricos de inibina B à admissão ao estudo, sendo realizada de maneira cega a análise do sêmen e dos outros parâmetros de função gonadal. Este hormônio foi mensurado pelo teste de imunoenensaio amplificado enzimaticamente (ELISA) em duplicata (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas, USA), no Laboratório de

Investigação Médica do Departamento da Pediatria. Os coeficientes de variação intra e inter-análise foram limitados a 3,5-5,6% e 6,2-7,6%, respectivamente. Os valores normais de acordo as faixas etárias foram: 74-470 pg/mL (12-17 anos de idade) e 60-300 pg/mL (18-50 anos de idade).

Perfil hormonal: As determinações hormonais foram realizadas no momento da entrada no estudo. Resultados anormais foram repetidos para confirmação. Os hormônios FSH, LH, prolactina, testosterona total, triiodotironina (T3), tetraiodotironina (T4), T4 livre e tirotropina (TSH) foram detectados através de imunofluorescência usando *kits DELPHIA^R time-resolved fluoroimmunoassay* (WALLAC Ou, Turku, Finland). Os coeficientes de variação intra e inter-análise foram limitados a 3,5% e 2,1%, respectivamente. Os valores normais foram: FSH (1 – 10,5 UI/L), LH (1 – 8,4 UI/L), prolactina (2 – 10 ng/ml), testosterona total (271 – 965 ng/dl), T3 (70 – 204 ng/dl), T4 (4,3 – 12,5 µg/dl), T4 livre (0,4 – 1,6 ng/dL), e TSH (0,5 – 6 µU/ml).

Avaliação urológica: Um exame clínico sistemático da genitália foi realizado nos pacientes pelo mesmo urologista e incluiu avaliação dos testículos, epidídimo, vaso deferente, escroto e pênis. As características sexuais foram avaliadas de acordo com os critérios de alterações puberais propostos por Marshall e Tanner (15). Os volumes testiculares foram medidos usando o orquidômetro de Prader, que consiste de 12 modelos elipsóides graduados de 1 a 25 ml (1 a 6, 8, 10, 12, 15, 20 e 25 ml) (16). O volume testicular normal em adolescentes pós-púberes e adultos

brasileiros pós-púberes varia entre 12 e 25 ml (17). Os pacientes foram examinados num quarto com temperatura superior a 22° Celsius, tanto nas posições em pé e supina, com e sem manobra de Valsalva. Varicocele foi graduada de acordo com o seguinte critério: grau I (pequena) - palpável apenas com manobra de Valsalva, grau II (média) - palpável como paciente em pé, e grau III (grande) - visível através da pele escrotal e palpável com o paciente em pé (18).

Ultra-sonografia testicular com Doppler: Ultra-sonografia testicular foi realizada em todos os pacientes por um ultra-sonografista experiente usando um *scanner* de 14-MHz (Logic 9-GE- Milwaukee, Wisconsin, USA), de maneira cega à análise dos espermatozóides e dos outros parâmetros da função gonadal. Os testículos foram escaneados nos planos axial e longitudinal e, pelo menos, duas medidas de largura, comprimento e espessura foram obtidas. A maior medida em cada dimensão foi gravada e usada para calcular o volume testicular de acordo com a fórmula para uma elipsóide (largura X comprimento X espessura X 0,52). O valor normal em adolescentes pós-púberes e homens adultos é 15 ± 8 ml (19).

Análise dos espermatozóides: A análise dos espermatozóides foi realizada, de acordo com as diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) (20,21) por dois biomédicos experientes, de maneira cega aos outros parâmetros da função gonadal. Todos os pacientes com LES eram solicitados a fornecer pelo menos uma amostra de sêmen coletado por

masturbação numa sala de coleta e processado dentro de uma hora de liquefação, após 48 a 72 horas de abstinência sexual, no período de até um mês após a admissão ao estudo. As amostras de sêmen foram submetidas a liquefação à temperatura de 37⁰C por 30 minutos. Concentração e motilidade dos espermatozóides foram avaliadas manualmente por meio de um microscópio óptico equipado com objetiva de contraste de fase de 20 vezes e aumento de 200 vezes. Imagens microscópicas foram transferidas para um sistema de vídeo computadorizado acoplado a um microscópio óptico e foram digitalizadas de acordo com um programa de software. As amostras eram analisadas pela contagem manual assim como pelo sistema de análise dos espermatozóides assistida por computador (CASA) sob uma ampliação de 400X, usando um HTM-2030 (Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA). Cada diapositivo foi escaneado para estimar o número de espermatozóides por campo equivalente a 1 ml, para obter um concentração de espermatozóide aproximada em milhões de espermatozóides por mililitro de sêmen. A motilidade dos espermatozóides foi determinada através da análise de pelo menos cinco campos microscópicos de maneira sistemática para classificar 200 espermatozóides. A motilidade de cada espermatozóide foi graduada em "a" (motilidade progressiva rápida), "b" (motilidade progressiva lenta ou vagarosa), "c" (motilidade não progressiva) e "d" (sem motilidade). A morfologia dos espermatozóides incluiu a avaliação da cabeça do espermatozóide, pescoço, peça intermediária e cauda por dois biomédicos, estes

desconheciam os outros parâmetros da função gonadal (20). Oligozoospermia foi definida quando a concentração espermática foi < 20 milhões/ml, astenozoospermia quando a motilidade dos espermatozóides ("a" + "b") $< 50\%$, teratozoospermia quando a morfologia normal dos espermatozóides foi $< 15\%$ segundo a OMS e oligoastenoteratozoospermia foi definida por alterações nas três variáveis (21). Morfologia dos espermatozóides foi também avaliada de acordo com os critérios estrito de Kruger, no qual morfologia normal $< 14\%$ está associada com subfertilidade (22).

Anticorpos anti-espermatozóides: Anticorpos anti-espermatozóides foram realizados no início do estudo e foram determinados pelo teste direto de "Immunobead" que utiliza reagentes contendo imunoglobulinas de coelho dirigidas contra anticorpos anti-espermatozóides humanos (IgA, IgG e IgM) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). Os testes diretos com anticorpos marcados detectam anticorpos que se ligam à superfície celular do espermatozóide (cabeça do espermatozóide, parte intermediária e/ou cauda). Pelo menos 50% dos espermatozóides móveis ("a"+"b") devem estar revestidos com anticorpos marcados antes do teste ser considerado clinicamente significativo (21). O controle de qualidade foi definido conforme recomendado pelo fabricante (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). O controle negativo deve ter um escore $< 10\%$ de ligação de anticorpos e o controle positivo um escore $> 20\%$ de ligação de anticorpos. Se os resultados fossem duvidosos, a análise era repetida com reagentes frescos.

Avaliação clínica, avaliação laboratorial e tratamento: Uma ampla avaliação clínica foi realizada por dois reumatologistas, seguida por uma revisão cuidadosa, incluindo dados clínicos, laboratoriais e terapêuticos prévios. As manifestações do LES foram definidas como: lesões cutâneas (*rash* discóide ou malar, úlceras orais, vasculites ou fotossensibilidade), comprometimento articular (artralgia ou artrite não erosiva), doença neuropsiquiátrica (convulsão, psicose, depressão ou neuropatia periférica), comprometimento renal (proteinúria $\geq 0.5\text{g}/24\text{h}$, presença de cilindros, hematúria persistente ≥ 10 hemácias/campo ou insuficiência renal), doença cardiopulmonar (serosite, miocardite, doença pulmonar restritiva ou hipertensão pulmonar) e anormalidades hematológicas (anemia hemolítica, leucopenia com uma contagem de leucócitos $< 4.000/\text{mm}^3$, linfopenia $< 1.500/\text{mm}^3$ em duas ou mais ocasiões, e/ou trombocitopenia com contagem de plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$ na ausência de drogas ou infecção). A atividade da doença e o dano cumulativo do LES foram avaliados em todos os pacientes no momento de entrada no estudo, usando o “SLE Disease Activity Index” (SLEDAI) (23) e o “Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR (SLICC/ACR) Damage Index”, respectivamente (24). Anticorpos anti-DNA dupla-hélice (anti-dsDNA) foram detectados por imunofluorescência indireta usando *Crithidia luciliae* como substrato.

Dados referentes ao período de tratamento (pré-puberal ou pós-puberal), dosagem atual e doses cumulativas das drogas (prednisona, difosfato de cloroquina, metotrexate, azatioprina, CICIV, ciclosporina e micofenolato mofetil) foram determinados. O tempo e a duração da terapia

com CICIV também foram avaliados. Um esquema de sete pulsos mensais de CICIV seguidos por infusões a cada três meses durante dois a três anos foi indicado para glomerulonefrite proliferativa focal ou difusa.

Auxílios à pesquisa científica: Esse estudo teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Grants 04/07832-2 e 05/52668-9 para CAAS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ (Grants 305468/2006-5 para EB e 302469/2005-2 para CAAS) e da *Federico Foundation* (Grant to EB).

Análise estatística: Resultados foram apresentados em mediana (variação) para variáveis contínuas e número (%) para variáveis categóricas. Os resultados foram comparados pelos testes “t” e *Mann-Whitney* para variáveis contínuas para determinar diferenças entre pacientes com LES de acordo com dois grupos: inibina B sérica reduzida ou normal. Para as variáveis categóricas, as diferenças foram calculadas pelos testes de qui-quadrado de *Pearson* e exato de *Fischer*. O coeficiente de *Pearson* foi usado para avaliar correlações entre inibina B e FSH séricos, inibina B e LH séricos, assim como entre inibina B sérica e análises dos espermatozóides. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4.

RESULTADOS



Função das células testiculares e perfil hormonal: Os 34 pacientes com LES foram subdivididos em dois grupos: níveis séricos reduzidos de inibina B (Grupo 1) e níveis normais (Grupo 2). Oito pacientes com LES (23,5%) apresentaram níveis séricos reduzidos de inibina B [Grupo 1, mediana de 11,05 pg/mL (7-48,67)] e 26 (76,5%) tiveram níveis séricos normais [Grupo 2, mediana 141,05 pg/mL (65,59-265,45)] ($p=0,0001$). Níveis elevados de FSH foram detectados em 100% dos pacientes do Grupo 1 comparados a nenhum no Grupo 2 ($p=0,0001$), como mostrado na Tabela 1. As medianas de FSH e LH foram significativamente maiores no Grupo 1 comparado ao Grupo 2 (17,7 versus 4,2 UI/L, $p=0,0001$; 8,1 versus 3,95 UI/L, $p=0,001$; respectivamente). As freqüências de níveis elevados de LH foram similares nos dois grupos (25% versus 7,7%, $p=0,229$). Os níveis de inibina B foram negativamente correlacionados com os níveis séricos de FSH ($r=-0,699$, $p=0,0001$) e LH ($r=-0,397$, $p=0,02$). Não foram encontradas diferenças significantes entre as medianas e as freqüências dos outros hormônios nos dois grupos estudados: prolactina, testosterona total, T3, T4, T4 livre e TSH (Tabela 1).

Função das células testiculares de Sertoli e anormalidades dos espermatozóides: As análises dos espermatozóides em pacientes com LES, de acordo com os níveis reduzidos ou normais, são mostradas na Tabela 2.

O exame macroscópico do sêmen não mostrou diferenças significantes entre as medianas de abstinência sexual, volume do sêmen e pH do sêmen nos Grupos 1 e 2 (Tabela 2).

A investigação microscópica dos espermatozóides demonstrou que o Grupo 1 tinha menores medianas de: concentração de espermatozóides ($2 \times 10^6/\text{ml}$ versus $56,5 \times 10^6/\text{ml}$, $p=0,024$), contagem total de espermatozóides (6×10^6 versus 133×10^6 , $p=0,023$) e contagem total de espermatozóides móveis (3×10^6 versus $69,5 \times 10^6$, $p=0,025$) comparado ao Grupo 2. As porcentagens de oligozoospermia e de níveis diminuídos de contagem total de espermatozóides foram maiores no Grupo 1 versus o Grupo 2 (75% versus 26,9%, $p=0,033$; 87,5% versus 26,9%, $p=0,004$). A análise mais detalhada da motilidade dos espermatozóides mostrou que apenas a mediana de espermatozóides não móveis foi significativamente maior no Grupo 1 comparada ao Grupo 2 (46,2% versus 33,2%, $p=0,035$). Não foram observadas diferenças significativas entre as medianas de morfologia dos espermatozóides pelo critério estrito de Kruger e pelo critério da OMS nos dois grupos estudados. Todos os outros parâmetros avaliados foram similares nos dois grupos (Tabela 2).

Os níveis séricos de inibina B foram positivamente correlacionados com a concentração de espermatozóides ($r=0,343$, $p=0,047$) e contagem total de espermatozóides móveis ($r=0,357$, $p=0,038$). As medianas de inibina B foram menores nos pacientes lúpicos com: oligozoospermia ($< 20 \times 10^6/\text{ml}$), níveis diminuídos de contagem total de espermatozóides ($< 40 \times 10^6$) e níveis diminuídos de contagem de espermatozóides móveis ($< 10 \times 10^6/\text{ml}$) em

relação aos pacientes com análises normais dos espermatozóides [65,6 pg/mL (7-147,9) versus 151,1 pg/mL (7-265,5), $p=0,001$; 57,1 pg/mL (7-147,9) versus 159,1 pg/mL (7-265,5), $p=0,001$; e 65,6 pg/mL (7-147,9) versus 138,3 pg/mL (7-265,5), $p=0,01$; respectivamente]. Os níveis de FSH foram negativamente correlacionados com contagem total de espermatozóides ($r=-0,347$, $p=0,044$) e contagem total de espermatozóides móveis ($r=-0,370$, $p=0,031$).

As medianas da relação inibina B/FSH foram menores nos pacientes lúpicos com oligozoospermia, níveis reduzidos de contagem total de espermatozóides e níveis reduzidos de contagem total de espermatozóides móveis do que em pacientes com análises normais dos espermatozóides [8,68 (0,53-42,29) versus 38,39 (0,37-210,57), $p=0,001$; 5,73 (0,39-42,29) versus 42,33 (0,37-210,57), $p=0,001$; e 8,68 (0,53-42,29) versus 35,58 (0,37-210,57), $p=0,01$; respectivamente].

A análise mais detalhada dos 26 pacientes lúpicos com níveis normais de inibina B (> 60 pg/mL) e níveis normais de FSH revelou que as medianas da relação inibina B/FSH foram menores nos pacientes lúpicos com oligozoospermia comparadas àqueles com normozoospermia [13,07 (8,69-42,29) versus 46,27 (13,7-210,57), $p=0,004$], assim como entre pacientes com níveis normais ou diminuídos de contagem total de espermatozóides [15,25 (8,69-42,29) versus 46,27 (12,96-210,57), $p=0,022$] e níveis normais ou diminuídos de contagem total de espermatozóides móveis [21,58 (8,69-42,29) versus 42,33 (12,96-210,57), $p=0,051$]. As medianas de inibina B foram menores nos pacientes lúpicos com

oligozoospermia comparadas aos pacientes com normozoospermia [81,14 pg/mL (65,59-147,91) versus 167,12 pg/mL (80,68-265,45), $p=0,009$], entretanto não foi observada diferença com relação as medianas dos níveis normais ou diminuídos da contagem total de espermatozóides [136,94 pg/mL (65,59-147,91) versus 167,12 pg/mL (75,19-265,45), $p=0,069$] e níveis normais ou baixos de contagem de espermatozóides móveis [136,94 pg/mL (65,59-265,45) versus 151,1 pg/mL (75,19-260,88), $p=0,059$]. Além disto, as medianas de FSH foram maiores nos pacientes lúpicos com oligozoospermia comparadas aos pacientes com normozoospermia [5,8 UI/L (3,4-9,7) versus 3,4 UI/L (1,0-9,5), $p=0,026$], enquanto nenhuma diferença foi observada com relação aos níveis normais ou reduzidos da contagem total de espermatozóides [5,3 UI/L (3,4-9,5) versus 3,4 UI/L (1,0-9,7), $p=0,06$] e os níveis normais ou reduzidos de contagem total de espermatozóides móveis [4,3 UI/L (3,4-8,92) versus 3,3 UI/L (1,0-9,7), $p=0,201$].

Anticorpos anti-espermatozóides: A frequência geral de anticorpos anti-espermatozóides nos pacientes com LES foi de 41%. A aparente menor frequência de anticorpos anti-espermatozóides positivos no Grupo 1 comparada ao Grupo 2 não atingiu significância estatística (12,5% versus 50%, $p=0,102$).

Avaliação urológica e ultra-sonografia testicular com Doppler: Todos os pacientes com LES eram P5 e G5, conforme os critérios de avaliação puberal de Marshall e Tanner (15). A avaliação do volume testicular, tanto

pelo método de Prader quanto pela ultra-sonografia, assim como a frequência de varicocele nos pacientes com LES, de acordo com os níveis de inibina B, são mostrados na Tabela 3. Na avaliação do volume testicular de Prader não foram encontradas diferenças significativas entre os pacientes com LES com níveis normais ou reduzidos de inibina B para as medianas de volumes dos testículos direito e esquerdo (15ml versus 15ml, $p=0,475$; 15ml versus 15ml, $p=0,344$; respectivamente). O volume testicular avaliado pela ultra-sonografia testicular não mostrou diferenças entre os Grupos 1 e 2 para as medianas de volumes dos testículos direito e esquerdo (10,7ml versus 11,8ml, $p=0,310$; 9,8ml versus 10,5ml, $p=0,556$; respectivamente). As frequências de graus I e II de varicocele pelo exame clínico (37,5% versus 19,2%, $p=0,355$) e pela ultra-sonografia testicular com Doppler (62,5% versus 30,7%, $p=0,211$) foram semelhantes nos dois grupos.

Características demográficas e clínicas, atividade e dano cumulativo do

LES: A distribuição das características demográficas mostrou que os Grupos 1 e 2 foram similares com relação às medianas de: idade atual [32,5 anos (23-42) versus 27,5 anos (15-45), $p=0,231$], idade de início da doença [22 anos (13-32) versus 20,5 anos (1,6-40), $p=0,440$], tempo de duração da doença [9,5 anos (1-20) versus 6 anos (1-21,5), $p=0,440$] e idade da primeira ejaculação [13 (12-15) anos versus 12,5 (12-15) anos, $p=0,141$].

As manifestações clínicas, alterações laboratoriais, escores de atividade e de dano cumulativo dos pacientes com LES foram uniformemente distribuídos nos Grupos 1 e 2, conforme são evidenciados na Tabela 4.

Avaliação do tratamento prévio e atual: Todos os pacientes receberam medicamentos após a puberdade, com a exceção de dois pacientes que utilizaram corticosteróide e difosfato de cloroquina no período pré-puberal. O tratamento medicamentoso do LES, de acordo com a inibina normal ou reduzida, é mostrado na Tabela 5.

A mediana de inibina B sérica foi menor nos pacientes com LES tratados com CICIV comparada com os que nunca receberam esta terapia [75,19 pg/mL (7-265,45) versus 138,31 pg/mL (7-260,88), $p=0,031$] e a maior frequência de uso de CICIV após a primeira ejaculação no Grupo 1 não evidenciou significância estatística (62,5% versus 30,8%, $p=0,211$). Tendências estatísticas em relação a maiores medianas de dose cumulativa e número de pulsoterapias com CICIV foram observadas no Grupo 1 comparadas ao Grupo 2 (26,5 g versus 14,1 g, $p=0,057$; e 20 versus 12 pulsoterapias administrados, $p=0,064$; respectivamente) (Tabela 5). A mediana da relação inibina B/FSH foi menor nos pacientes com LES tratados com CICIV comparada aos pacientes que nunca receberam esta terapia [12,96 (0,39-68,06) versus 35,58 (0,37-210,57), $p=0,014$]. Todos os 13 pacientes tratados com CICIV receberam esta droga após a primeira ejaculação e nenhum estava sob esta terapia no início do estudo. O tempo entre última dose da CICIV e avaliação da função das células de Sertoli foi de $5,11 \pm 3,72$ anos (variando de 0,4 a 12 anos).

Na análise dos 26 pacientes com níveis normais de inibina B (> 60 pg/mL), a mediana da relação inibina B/FSH foi menor nos pacientes com LES tratados com CICIV do que naqueles que nunca receberam esta terapia

[14,93 (11,12-68,06) versus 42,33 (8,69-210,57), $p=0,04$]. Em contraste, a mediana de inibina B foi similar nos pacientes com LES tratados com CICIV comparada aos pacientes que nunca receberam esta terapia [109,46 (65,59-265,45) versus 159,11 pg/mL (77,48-260,88), $p=0,12$]. Apenas uma tendência em relação aos níveis elevados de FSH em pacientes com LES tratados com CICIV comparados àqueles que não receberam este tratamento foi observada [5,5 UI/L (3,4-9,7) versus 3,35 (1,0-9,5), $p=0,052$].

Nenhuma diferença significativa foi observada comparando os dois grupos com relação ao tratamento com: prednisona, difosfato de cloroquina, metotrexate, azatioprina e micofenolato mofetil (Tabela 5). Apenas um paciente de cada grupo usou ciclosporina A ($p=0,421$).

5.

DISCUSSÃO



Este é o primeiro estudo na literatura médica que avaliou a disfunção das células testiculares de Sertoli a partir dos níveis séricos do hormônio inibina B e revelou que a redução da relação inibina/FSH parece ser um marcador mais sensível para identificar anormalidades dos espermatozoides, particularmente em pacientes tratados com ciclofosfamida endovenosa.

Durante anos, o FSH tem sido o indicador mais importante da função do epitélio seminífero e níveis elevados indicam dano testicular (16). Em pacientes com lúpus, níveis elevados de gonadotrofinas (FSH e LH) (25-29) e hipoandrogenismo (testosterona baixa e elevados FSH e LH) têm sido observados e a injúria gonadal talvez seja o principal fator causal (13).

Entretanto, a inibina B pode ser mais valiosa e é um marcador direto de disfunção testicular (12), uma vez que este hormônio é produzido exclusivamente pelos túbulos seminíferos. Os níveis de inibina B são maiores em pacientes normozoospermicos do que em homens com disfunção gonadal (7,10,11). Além disto, sua secreção é particularmente induzida durante estágios avançados da espermatogênese (30). Por outro lado, os níveis de GNRH, estradiol, e testosterona podem afetar diretamente o FSH. Um benefício adicional da mensuração da inibina B é permitir uma avaliação global da função do tecido testicular, enquanto a biópsia testicular por agulha pode não representar a totalidade de túbulos seminíferos (10).

Nossos dados e a observação prévia confirmam que a inibina B está relacionada com anormalidades dos espermatozóides em infertilidade masculina (12). Nesse sentido, a contagem, a concentração e a motilidade de espermatozóides em pacientes com lúpus foram associadas à disfunção das células de Sertoli. Como esperado, no LES esta correlação foi também verdadeira para FSH, uma vez que existe uma relação inversa entre a inibina B circulante e o FSH em homens com espermatogênese normal e anormal (10-12). Além disto, este “feedback” negativo foi relatado para inibina B e LH em homens inférteis (12) e também demonstrado no presente estudo.

A relação inibina B/FSH parece ser um marcador mais sensível do que FSH sérico ou da inibina B isolados para avaliar alterações da espermatogênese no LES, uma vez que identificou uma subpopulação de pacientes com anormalidades dos espermatozóides e níveis hormonais normais. Por outro lado, os volumes testiculares por ultra-sonografia ou pelo orquidômetro de Prader não foram marcadores sensíveis para detectar disfunção das células de Sertoli neste estudo, conforme foi evidenciado por outros autores (5,6,12).

A raridade de varicocele grau III e a semelhante reduzida freqüência de varicoceles graus I e II observadas nos dois grupos estudados sugerem que esta complicação não é a principal causa de anormalidades dos espermatozóides. De fato, as alterações nos espermatozóides e no eixo hipotalâmico-pituitário-testicular são mais comumente associadas às varicoceles volumosas (31).

Anticorpos anti-espermatozóides, ligados diretamente à superfície dos espermatozóides, foram observados em aproximadamente 10% dos homens inférteis (32). No LES, em torno de 50% dos nossos pacientes tinham estes anticorpos sem nenhuma evidência de efeito deletério na disfunção testicular (13,33). Reforçando este achado, a presença de anticorpos anti-espermatozóides não discriminou o grupo de inibina B baixa.

Por outro lado, nós identificamos a quimioterapia como uma importante causa de lesão persistente ou duradoura nas células de Sertoli, levando a significantes níveis reduzidos de inibina B. Nossos achados estão de acordo com estudos prévios em câncer que mostraram baixos níveis de inibina B, após quimioterapia com múltiplos medicamentos, incluindo tratamento com CICIV (34,35) e irradiação testicular (36). Além disso, os resultados deste estudo confirmam que a relação inibina B/FSH pode anteceder alterações hormonais isoladas (5).

A criopreservação do sêmen antes da CICIV não foi realizada em nenhum dos nossos pacientes em idade reprodutiva. Nosso estudo, contudo, enfatiza que a criopreservação do sêmen e a subsequente fertilização *in vitro* são a melhor opção atualmente para homens pós-púberes para garantir a possibilidade de reprodução após a terapia imunossupressora, particularmente com CICIV (37).

6.

CONCLUSÕES



1. Os pacientes com LES apresentaram disfunção das células de Sertoli testiculares.
2. A disfunção das células de Sertoli testiculares correlacionou-se com alterações dos espermatozoides, particularmente em pacientes tratados com ciclofosfamida intravenosa.
3. A relação inibina B/FSH parece ser um marcador útil e precoce da toxicidade de CICIV nestes pacientes, o que precisa ser confirmado prospectivamente por estudos futuros.

7.
ANEXOS

Tabela 1 – Perfil hormonal em pacientes com LES de acordo com os níveis séricos reduzidos (Grupo 1) ou normais (Grupo 2) de inibina B.

Variáveis	Grupo 1 (n=8)	Grupo 2 (n=26)	p
Inibina B (pg/mL)	11,05 (7-48,67)	138,31 (65,59-265,45)	0,0001
níveis baixos, n (%)	8 (100)	0	0,0001
FSH (UI/L)	17,7 (10,9-25)	4,2 (1,0-9,7)	0,0001
níveis elevados, n (%)	8 (100)	0	0,0001
LH (UI/L)	8,1 (5,5-15,6)	3,95 (1,4-15,1)	0,001
níveis elevados, n (%)	2 (25)	2 (7,7)	0,229
Prolactina (ng/ml)	7,9 (1,9-36,5)	9,8 (3,8-36,2)	0,340
níveis elevados, n (%)	2 (25)	7 (26,9)	1,0
Testosterona total (ng/dl)	412 (187-728)	519 (80-1,259)	0,417
níveis baixos, n (%)	2 (25)	3 (11,5)	0,570
T3 (ng/dl)	130 (115-166)	139 (85-210)	0,640
níveis elevados, n (%)	0	1 (3,8)	1,0
T4 (µg/dl)	8,5 (6,67-11,2)	9,0 (6,2-13,2)	0,542
níveis elevados, n (%)	1 (12,5)	0	1,0
T4 livre (ng/dL)	1,0 (1,0-1,3)	1,0 (0,7-1,46)	0,392
TSH (µU/ml)	1,6 (0,57-5,38)	2,0 (0,27-3,00)	0,598
níveis baixos, n (%)	1 (12,5)	0	0,235

Valores dos hormônios expressos em média, n – número de pacientes; valores normais: FSH (1 - 10.5 UI/L), LH (1 - 8.4 UI/L), Prolactina (2 – 10 ng/ml), Testosterona total (271 – 965 ng/dl), T3 (70 – 204 ng/dl), T4 (4.3 - 12.5 µg/dl), T4 livre (0.4 - 1.6 ng/dL), TSH (0.5 – 6 µU/ml), LES – lúpus eritematoso sistêmico.

Tabela 2 – Análise dos espermatozoides em pacientes com LES de acordo com os níveis séricos reduzidos (Grupo 1) ou normais (Grupo 2) de inibina B.

Variáveis	Valor de referência	Grupo 1 (n=8)	Grupo 2 (n=26)	p
Exame macroscópico				
Abstinência sexual, dias	≥ 2	3 (3-5)	4 (2-75)	0,169
Volume do sêmen, ml	≥ 2	1,75 (1-4)	2,37 (0,6-5)	0,426
pH do sêmen	≥ 7,2	7,5 (7,0-8,0)	7,5 (7,0-8,0)	0,611
Concentração e contagem				
Concentração de espermatozoides, X10 ⁶ /ml	≥ 20	2 (1-84)	56,5 (0-892)	0,024
Oligozoospermia, n (%)		6 (75)	7 (26,9)	0,033
Contagem total de espermatozoides, X 10 ⁶	≥ 40	6 (1,4-221)	133 (0-1024)	0,023
Níveis diminuídos, n (%)		7 (87,5)	7 (26,9)	0,004
Motilidade				
Contagem total de espermatozoides móveis, X 10 ⁶	≥ 10	3 (0,7-112)	69,5 (0-577)	0,025
Níveis reduzidos, n (%)		5 (62,5)	6 (23)	0,079
Motilidade dos espermatozoides, % *	≥ 50	57,2 (15-65)	60,2 (0-78,5)	0,465
Astenozoospermia, n (%)		3 (37,5)	9 (34,6)	1,0
Motilidade progressiva rápida (grau "a"), %		0 (0-7,5)	1,5 (0-32)	0,07
Motilidade progressiva lenta (grau "b"), %		25 (8-42,5)	30 (0-51)	0,73
Motilidade não progressiva (grau "c") %		20,5 (8-41)	22,5 (0-57,5)	0,839
Sem motilidade (grau "d"), %		46,2 (34,5-84)	33,2 (0-89,5)	0,035
Morfologia dos espermatozoides				
Formas normais por Kruger, %	≥ 14	1,2 (0-5,5)	2,5 (0-27)	0,595
Teratozoospermia, n (%)		6 (75)	18 (69)	1,0
Formas normais pela OMS, %	≥ 15	7,2 (1-21,5)	13,2 (0-31)	0,309
Teratozoospermia, n (%)		6 (75)	14 (53,8)	0,422

Valores expressos em média, n – número de pacientes, LES – lúpus eritematoso sistêmico, OMS – Organização Mundial de Saúde

*Valores de referência para motilidade de espermatozoides - 50% ou mais móveis (graus "a" + "b") ou 25% ou mais com grau "a" (critério da OMS) ²⁴.

Tabela 3 - Avaliação do volume testicular (por Prader e ultrasonografia) e varicocele em pacientes com LES de acordo com níveis séricos reduzidos (Grupo 1) ou normais (Grupo 2) de inibina B.

Variáveis	Grupo 1 (n=8)	Grupo 2 (n=26)	p
Volume testicular por Prader, ml			
Direito	15 (10-20)	15 (10-25)	0,475
Diminuído (<12), n (%)	1 (12,5)	1 (3,9)	0,420
Esquerdo	15 (10-20)	15 (10-25)	0,344
Diminuído (<12), n (%)	2 (25)	2 (7,7)	0,299
Volume testicular por US, ml			
Direito	10,7 (3,8-20)	11,8 (4,8-21,8)	0,310
Diminuído (<7), n (%)	3 (37,5)	3 (11,5)	0,126
Esquerdo	9,8 (3,8-22)	10,5 (3,28-22)	0,556
Diminuído (<7), n (%)	2 (25)	5 (19,2)	0,147
Varicocele			
Clínica (graus I ou II), n (%)	3 (37,5)	5 (19,2)	0,355
US, n (%)	5 (62,5)	8 (30,7)	0,211

Valores expressos em média, LES – lúpus eritematosos sistêmico, US – ultrasonografia testicular.

Tabela 4 – Achados clínicos e laboratoriais, escores de atividade e dano cumulativo em pacientes com LES de acordo com os níveis séricos reduzidos (Grupo 1) ou normais (Grupo 2) de inibina B.

Variáveis	Grupo 1 (n=8)	Grupo 2 (n=26)	p
SLEDAI	0 (0-12)	0 (0-16)	0,982
SLEDAI ≥ 4, n (%)	4 (50)	6 (22)	0,194
SLEDAI ≥ 8, n (%)	1 (12,5)	3 (11,5)	1,0
SLICC/ACR-DI	0,5 (0-3)	0 (0-2)	0,258
SLICC/ACR-DI ≥ 1, n (%)	3 (37,5)	1 (30,7)	1,0
Manifestações clínicas			
Cutânea, n (%)	6 (75)	22 (84,6)	0,609
Articular, n (%)	7 (87,5)	25 (96,2)	0,421
Renal, n (%)	6 (75)	18 (69)	1,0
Neuropsiquiátrica, n (%)	2 (25)	7 (26,9)	1,0
Alteração hematológica, n (%)	8 (100)	24 (92,3)	1,0
Cardiopulmonar, n (%)	5 (62,5)	11 (42,3)	0,429
Alteração laboratorial			
Anti-DNA dupla-hélice, n (%)	1 (12,5)	4 (15,3)	1,0

Valores expressos em média, LES – lúpus eritematoso sistêmico, SLEDAI - *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*, SLICC/ACR-DI - *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR Damage Index*.

Tabela 5 – Tratamento medicamentoso em pacientes com LES de acordo com os níveis séricos reduzidos (Grupo 1) ou normais (Grupo 2) de inibina B.

Variáveis	Grupo 1 (n=8)	Grupo 2 (n=26)	p
CICIV			
Uso atual, n (%)	0	0	-
Uso após 1ª ejaculação, n (%)	5 (62,5)	8 (30,8)	0,211
Dose cumulativa, g	26,5 (12-39)	14,1 (11-31,5)	0,057
Número de pulsoterapias, n	20 (12-31)	12 (6-19)	0,064
Duração do tratamento, anos	2,6 (1-4)	1,7 (0,6-3)	0,161
Azatioprina			
Uso atual, n (%)	2 (25)	8 (30,8)	1,0
Uso após 1ª ejaculação, n (%)	4 (50)	18 (69,2)	0,410
Dose atual, mg	225 (150-300)	150 (125-250)	0,199
Dose cumulativa, g	95,45 (30-138,3)	73,6 (3,5-150,5)	0,370
Prednisona			
Uso atual, n (%)	3 (37,5)	16 (61,5)	0,417
Dose atual, mg	20 (10-20)	15 (2,5-60)	0,571
Dose cumulativa, g	23,8 (4,5-50)	26 (3,3-76)	0,887
Difosfato de cloroquina			
Uso atual, n (%)	5 (62,5)	20 (76,9)	0,648
Uso após 1ª ejaculação, n (%)	7 (88,8)	25 (96)	0,421
Dose atual, mg	250	250 (200-250)	0,742
Dose cumulativa, g	494 (64-966)	260 (22,5-1478)	0,327
Metotrexate			
Uso atual, n (%)	0	2 (7,7)	1,0
Uso após 1ª ejaculação, n (%)	1 (12,5)	8 (30,8)	0,403
Dose cumulativa, g	0,84	1,75 (0,08-5,6)	0,245
Micofenolato mofetil			
Uso atual, n (%)	0	4 (15,4)	0,551
Uso após 1ª ejaculação, n (%)	1 (12,5)	5 (19,2)	1,0
Dose atual, mg	0	2500 (2000-3000)	-
Dose cumulativa, g	92	1,098 (180-2,447)	0,143

Valores expressos em média, g – gramas, CICIV – pulsoterapia com ciclofosfamida intravenosa, mg – milligramas, n – número de pacientes, LES – lúpus eritematoso sistêmico.

8.

REFERÊNCIAS



1. Pistiner M, Wallace DJ, Nessim S, Metzger AL, Klinenberg JR. Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Semin Arthritis Rheum* 1991; 21:55-64.
2. McMurray RW, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2100-10.
3. Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNeilly AS, et al. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3341-5.
4. Groome NP, Evans LW. Does measurement of inhibin have a clinical role? *Ann Clin Biochem* 2000; 37:419-31.
5. Bordallo MA, Guimarães MM, Pessoa CH, Carriço MK, Dimetz T, Gazolla HM, et al. Decreased serum inhibin B/FSH ratio as a marker of Sertoli cell function in male survivors after chemotherapy in childhood and adolescence. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004; 17:879-87.
6. O'Connor AE, De Kretser DM. Inhibins in normal male physiology. *Semin Reprod Med* 2004; 22:177-85
7. Adamopoulos D, Kapolla N, Nicopoulou S, Pappa A, Koukkou E, Gregoriou A. Assessment of Sertoli cell functional reserve and its relationship to sperm parameters. *Int J Androl* 2003; 26:215-25.
8. Jensen TK, Andersson AM, Hjollund NH, Scheike T, Kolstad H, Giwercman A, et al. Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A study of 349 Danish men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:4059-63.
9. Hayes FJ, Pitteloud N, DeCruz S, Crowley WF Jr, Boepple PA. Importance of inhibin B in the regulation of FSH secretion in the human male. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5541-6.
10. Pierik FH, Vreeburg JT, Stijnen T, De Jong FH, Weber RF. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3110-4.

11. von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG, et al. Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2496-501.
12. Kumanov P, Nandipati K, Tomova A, Agarwal A. Inhibin B is a better marker of spermatogenesis than other hormones in the evaluation of male factor infertility. *Fertil Steril* 2006; 86:332-8.
13. 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.
14. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725.
15. Tanner JM. Growth at adolescence. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1962.
16. Prader A. Testicular size: assessment and clinical importance. *Triangle* 1966; 7:240-3.
17. Colli AS, Berquió ES, Marques RM. Crescimento e desenvolvimento pubertário em crianças e adolescentes brasileiros. In: Colli AS, Berquió ES, Marques RM, editors. Volume testicular. São Paulo: Brasileira de Ciências Ltda; 1984: 1-34.
18. Bong GW, Koo HP. The adolescent varicocele: to treat or not treat. *Urol Clin N Am* 2004; 31:509-15.
19. Atkinson GO, Patrick LE, Ball TI. The normal and abnormal scrotum in children: evaluation with color Doppler sonography. *Am J Roentgenol* 1992; 158:613-7.
20. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AM. World Health Organization (WHO) for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile men. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2000:1-86.
21. World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. New York: Cambridge University Press; 1999:1-128.
22. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49:112-7.

23. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Karon D, Chang CH and The Committee on Prognosis Studies in SLE. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35:630-40.
24. 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.
25. Folomeev M, Alekberova Z. Impotence in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1990; 17:117-8.
26. Atreya BH, Rafferty JH, Sehgal GS, Lahita RG. Adenohypophyseal and sex hormones in pediatric rheumatic diseases. *J Rheumatol* 1993; 20:725-30.
27. Vilarinho ST, Costallat LT. Evaluation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in males with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1998; 25:1097-103.
28. Mok CC, Lau CS. Profile of sex hormones in male patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000; 9:252-7.
29. Silva CA, Hallak J, Pasqualotto FF, Barba MF, Saito MI, Kiss MHB. Gonadal function in adolescents and young men with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002; 29:2000-5.
30. Klaij IA, van Pelt AM, Timmerman MA, Blok LJ, de Rooij DG, de Jong FH. Expression of inhibin subunit mRNAs and inhibin levels in the testes of rats with stage-synchronized spermatogenesis. *J Endocrinol* 1994; 141:131-41.
31. Griffin JE, Wilson JD. Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: Larsen PD, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: Saunders; 2003:709-69.
32. Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Rago R, Paoli D, Dondero F. Antisperm antibody detection: 2. Clinical, biological, and statistical correlation between methods. *Am J Reprod Immunol*. 1997; 38:224-30.
33. Reichlin M, Gilbert G, Haas GG Jr. Association of anti-sperm antibodies with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1985; 28:76.
34. Lähteenmäki PM, Toppari J, Ruokonen A, Laitinen P, Salmi TT. Low serum inhibin B concentrations in male survivors of childhood malignancy. *Eur J Cancer* 1999; 35:612-9.

35. Cicognani A, Cacciari E, Pasini A, Burnelli R, De lasio R, Pirazzoli P, et al. Low serum inhibin B levels as a marker of testicular damage after treatment for a childhood malignancy. *Eur J Pediatr* 2000; 159:103-7.
36. Petersen PM, Andersson AM, Rørth M, Daugaard G, Skakkebaek NE. Undetectable inhibin B serum levels in men after testicular irradiation. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:213-5.
37. Silva CA, Brunner HI. Gonadal functioning and preservation of reproductive fitness with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2007; 16:593-9.