

OLÍVIO BRITO MALHEIRO

**INDICADORES DE RESERVA OVARIANA EM MULHERES
COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Belo Horizonte
2011

OLÍVIO BRITO MALHEIRO

**INDICADORES DE RESERVA OVARIANA EM MULHERES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina: Saúde da Mulher

Área de concentração: Reprodução Humana e Patologia Ginecológica e Mamária

Orientador: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

Co-orientadora: Profa. Dra. Gilda Aparecida Ferreira

Belo Horizonte
2011

Malheiro, Olívio Brito.
M249i Indicadores de reserva ovariana em mulheres com Lúpus Eritematoso Sistêmico [manuscrito]. / Olívio Brito Malheiros. - - Belo Horizonte: 2011. 79f.: il.
Orientador: Fernando Marcos dos Reis.
Co-Orientador: Gilda Aparecida Ferreira.
Área de concentração: Reprodução Humana e Patologia Ginecológica e Mamária.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Lúpus Eritematoso Sistêmico. 2. Hormônio Antimülleriano. 3. Hormônio Foliculoestimulante. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Reis, Fernando Marcos dos. II. Ferreira, Gilda Aparecida. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM : QH 471



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **OLÍVIO BRITO MALHEIRO**, nº de registro 2009658544. No dia **vinte e nove de agosto de dois mil e onze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“AVALIAÇÃO DOS INDICADORES DE RESERVA OVARIANA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO”**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração Patologia Ginecológica e Reprodução. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Fernando Marcos dos Reis, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Fernando Marcos dos Reis/ Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTO</u>
Profa. Gilda Aparecida Ferreira/ Coorientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTO</u>
Profa. Cristina Costa Duarte Lana	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTO</u>
Profa. Márcia Mendonça Carneiro	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTO</u>

Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de agosto de 2011.

Prof. Fernando Marcos dos Reis/ Orientador [Assinatura]

Profa. Gilda Aparecida Ferreira/ Coorientadora Gilda A. Ferreira

Profa. Cristina Costa Duarte Lana Cristina Costa Duarte Lana

Profa. Márcia Mendonça Carneiro Márcia Mendonça Carneiro

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral/Coordenador [Assinatura]

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador **Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher
Faculdade de Medicina - UFMG

CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores Fernando Marcos dos Reis, Gilda Aparecida Ferreira, Cristina Costa Duarte Lana e Márcia Mendonça Carneiro, aprovou a defesa da dissertação intitulada **“AVALIAÇÃO DOS INDICADORES DE RESERVA OVARIANA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO”** apresentada pelo mestrando **OLÍVIO BRITO MALHEIRO**, para obtenção do título de mestre em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Patologia Ginecológica e Reprodução, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 29 de agosto de 2011.

Prof. Fernando Marcos dos Reis
Orientador

Profa. Gilda Aparecida Ferreira
Coorientadora

Profa. Cristina Costa Duarte Lana

Profa. Márcia Mendonça Carneiro



REITOR

Professor Clélio Campolina Diniz

VICE-REITORA

Professora Rocksane de Carvalho Norton

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professor Ricardo Santiago Gomez

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Professor Renato de Lima dos Santos

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Professor Francisco José Penna

VICE-DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Professor Tarcizo Afonso Nunes

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professor Manoel Otávio da Costa Rocha

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professora Teresa Cristina de Abreu Ferrari

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

Professor Cezar Alencar de Lima Rezende

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

Professor Antônio Carlos Vieira Cabral

SUBCOORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

Professora Alamanda Kfoury Pereira

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER:

PATOLOGIA GINECOLÓGICA

Professor Antônio Carlos Vieira Cabral

Professora Alamanda Kfoury Perreira

Professor Selmo Geber

Professor Victor Hugo de Melo

Gabriel Costa Osanan – Representante Discente

*A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a
realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Nomear pessoas neste momento é muito difícil, mas não posso deixar de mencionar e tornar conhecido de todos a minha gratidão e o reconhecimento àqueles que tornaram este trabalho possível.

A toda minha família, pelo suporte necessário nos momentos de dificuldade.

Às pacientes do serviço de Reumatologia do Ambulatório Bias Fortes, que na intimidade de sua doença, me permitiram realizar a coleta de sangue para análise e ultrassonografias transvaginais.

Ao professor Fernando Marcos dos Reis, por ter me aceitado como orientando e pelo brilhantismo como orientador e formador de grupos de pesquisa.

À professora Gilda, por sua paciência na elucidação de dúvidas e confiança na viabilidade deste projeto.

A toda equipe do laboratório Prof. Aroldo Camargos de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFMG, pelos ensinamentos e ajuda no projeto. Sinto muita satisfação em conviver com um grupo tão qualificado e solícito.

À Dra Carolina Passos Resende, pela imensa disponibilidade em realizar os exames de ultrassonografia e esclarecer minhas dúvidas no cotidiano do serviço de reprodução humana da UFMG.

A toda equipe de Reumatologia do Ambulatório Bias Fortes, principalmente os professores Marco Antônio Parreira de Carvalho e Cristina Costa Duarte Lanna por permitirem que este estudo fosse realizado no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

Aos meus colegas dos Hospitais Alberto Cavalcanti, Felício Rocho e Life Center, que dividiram comigo as responsabilidades cotidianas, proporcionando assim tempo para que pudesse cursar as disciplinas do curso e me dedicar ao projeto.

À Neusa e Vânia, secretárias do 2º andar do ambulatório Bias Fortes pelo carinho e atenção, assim como a Juliana no laboratório de Reprodução Humana.

À Carla, pelo amor, companheirismo e paciência durante o projeto.

"Eu ouço e esqueço. Eu vejo e lembro. Eu faço e entendo".

Confúcio, 551-478 aC

RESUMO

Introdução: O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença multissistêmica, que compromete principalmente mulheres em idade reprodutiva, e pode promover disfunção ovariana precoce relacionada a fatores relacionados à doença ou ao seu próprio tratamento. A avaliação de indicadores de reserva ovariana pode determinar se há diferenças entre estas pacientes e a população geral, previamente ao estabelecimento do climatério. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar se há diferenças nos marcadores tradicionais de reserva ovariana em pacientes com LES comparados a um grupo controle, e avaliar sua relação com características clínicas e terapêuticas de pacientes com LES. **Pacientes e métodos:** Este foi um estudo transversal controlado, incluindo 27 mulheres com LES e 27 controles. Todas as participantes tinham entre 18 e 40 anos, eram eumenorréicas e não haviam usado terapia hormonal ou contraceptivos hormonais nos últimos 6 meses. Os dados clínicos foram avaliados no acompanhamento regular da doença, e as pacientes foram selecionadas para coletar amostras de sangue para dosagem de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio anti-mulleriano (AMH), e submetidas a ultrassonografia transvaginal para contagem de folículos antrais (AFC). Todos os procedimentos foram feitos na fase folicular inicial do ciclo menstrual. **Resultados:** A média de idade e do tempo de duração da doença do grupo LES foi 32 (SD±3.8) anos e 102,7 (SD±66,7) meses, respectivamente. Não encontramos diferença entre o grupo LES e o grupo controle na análise de AFC [mediana (intervalo interquartil) 7 (5-13) versus 11 (7-12), $p = 0,076$] FSH, [6,44 (4,19-7,69) mUI / ml versus 7,5 (6,03-8,09) mUI / ml, $p = 0,135$] e valores de AMH [1,23 (0,24-4,63) ng / ml versus 1,52 (1,33-1,88) ng / ml, $p = 0,684$]. Entretanto, os valores de AMH no grupo LES foram mais heterogêneos em relação ao grupo controle. A presença de nefrite e a dose cumulativa de ciclofosfamida foram fatores relacionados individualmente com menor reserva ovariana, por associação com valores mais baixos de AFC e AMH. Na regressão logística multivariada, o grupo controle mostrou maior probabilidade de apresentar os maiores valores de AMH que o grupo LES (OR 5,2, 95% CI 1,286-20,405, $p = 0,021$) e na análise isolada do grupo de LES, AMH estava associado com menores doses máximas de corticosteróides no seguimento (OR 0,95, 95% CI 0,894-1,000, $p = 0,50$). AFC associou-se com baixos escores de SLICC / ACR-DI (OR: 0,14, 95% CI 0,025-0,841, $p = 0,031$). **Conclusão:** Pacientes com LES eumenorréicas apresentaram marcadores tradicionais de reserva ovariana semelhantes aos de controles. No entanto, o AMH teve uma maior variação de valores no grupo LES, necessitando de avaliação de outros marcadores para esclarecer a sua melhor aplicação clínica. A função ovariana mostrou-se comprometida, em pacientes com nefrite, com maior dose acumulada de ciclofosfamida, e naquelas com valores de escores de dano sistêmico mais altos.

Palavras-chave: lúpus eritematoso sistêmico, hormônio anti-mulleriano, hormônio folículo estimulante, contagem de folículos antrais, reserva ovariana.

ABSTRACT

Background: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multisystem disease, which affects mostly women at your reproductive age, and can promote premature ovarian dysfunction related to factors associated to rheumatic disease or its treatment. The assessment of indicators of ovarian reserve can determine if there are differences between these patients and the general population, prior to the establishment of the climacteric. **Objective:** The aim of this study was to evaluate if there are differences in ovarian reserve markers in systemic lupus erythematosus (SLE) patients compared to controls, and explore the relationship of such markers with clinical and treatment features of SLE patients. **Methods:** This was a controlled cross-sectional study including 27 women with SLE and 27 controls. All participants were between 18 and 40 years, were eumenorrheic and did not use hormone therapy or hormone contraceptives in the past 6 months. Clinical data were assessed at a regular follow up visit, serum concentrations of follicle stimulating hormone (FSH) and anti-mullerian hormone (AMH), and through transvaginal ultrasound antral follicle count were assessed at early follicular phase of a subsequent menstrual cycle. **Results:** We found no difference between SLE group and control group at analysis of AFC [median (interquartile interval) 7 (5 – 13) vs. 11 (7 – 12), $p=0.076$], FSH [6.44 (4.19 – 7.69) vs. 7.5 (6.03 – 8.09) mIU/ml, $p=0.135$] and AMH levels [1.23 (0.24 – 4.63) ng/ml vs. 1.52 (1.33 – 1.88) ng/ml, $p=0.684$]. However, AMH values in SLE group were more heterogeneous compared to control group. The presence of nephritis and the cumulative dose of cyclophosphamide were factors individually related to reduced ovarian reserve, by association with lower values of AFC and AMH. At multivariate logistic regression, control group was more likely to have higher AMH values than the SLE (OR 5.2, 95% CI 1.286 - 20.405, $p=0.021$) and in the SLE group, AMH was associated with lower maximum corticosteroid doses in the follow-up (OR 0.95, 95%CI 0.894-1.000, $p=0.50$). AFC was associated with lower scores of SLICC/ACR-DI (OR: 0.14, 95% CI 0.025-0.841, $p=0.031$). **Conclusion:** SLE patients who were eumenorrheic had average values of ovarian reserve markers similar to controls. However, AMH had a larger variation in that group, needing evaluation of other markers to clarify the best clinical application for it. Ovarian function is more compromised in patients with nephritis, higher cumulated dose of cyclophosphamide and with higher disease damage scores.

Key words: systemic lupus erythematosus, antimullerian hormone, follicle stimulating hormone, antral follicle count, ovarian reserve.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AFC	<i>Antral follicle count</i>
AFL	Anticorpo antifosfolípide
AMH	<i>Anti-mullerian hormone</i>
COEP/UFMG	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
EUA	Estados Unidos da América
FIG	Figura
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FOP	Falência ovariana prematura
FSH	<i>Follicle stimulating hormone</i>
GnRH	Hormônio regulador de gonadotrofinas
HC/UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
ICSI	<i>Intracytoplasmic sperm injection</i>
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LESJ	Lúpus eritematoso sistêmico juvenil
SLICC	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease activity index</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SAAF	Síndrome do anticorpo antifosfolípide
TAB	Tabela
TRA	Terapia de reprodução assistida
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1. Avaliação da reserva ovariana em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico	17
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo principal	23
3.2. Objetivos secundários	23
4. APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS	25
4.1. Manuscrito	26
5. COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO I: CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO ACR 1982, REVISADOS EM 1997	66
ANEXO II: QUESTIONÁRIO PARA CÁLCULO DO SCORE DE DANO ORGÂNICO (SLICC/ACR-DI)	68
ANEXO III: QUESTIONÁRIO PARA CÁLCULO DO SCORE DE ATIVIDADE	70
ANEXO IV: INSTRUMENTO PARA COLETA DOS DADOS	73
ANEXO V: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	77
ANEXO VI: CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (COEP/UFMG)	79

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma síndrome inflamatória crônica auto-imune, com um amplo espectro de manifestações teciduais e orgânicas, clinicamente expressa por períodos de exacerbações e remissões, com curso e prognóstico variáveis. A prevalência global oscila de 20-70/100.000 habitantes,¹ com incidência anual variando de 1-10/100.000 dependendo da região estudada.²⁻⁶ A doença incide em 80%-90% dos casos em mulheres entre 15 e 35 anos, portanto, na idade reprodutiva.⁷

As pacientes do sexo feminino com LES apresentam maior frequência de alterações da função ovariana comparadas à população geral.⁷⁻⁹ As manifestações variam de aumento do fluxo menstrual, geralmente associado à plaquetopenia, à amenorréia temporária e falência ovariana prematura (FOP).^{7,10,11} Sabe-se também que, em média, as pacientes com LES apresentam a menopausa mais precocemente, e maior prevalência de falência ovariana prematura, em relação à população geral.¹²⁻¹⁴

Os principais fatores de risco associados à disfunção ovariana em pacientes com LES são: atividade da doença de base,^{8,9,15-16} alto grau de dano orgânico,¹⁵ anticorpos anti-corpo lúteo,^{17,18} e medicações para tratamento do LES.^{7,11,18,19}

Nas mulheres em geral, a função ovariana pode ser estimada através de características do ciclo menstrual, além de exames complementares hormonais e ultrassonográficos ovarianos.^{20,21} Porém, todos estes métodos demonstraram-se insuficientes na predição precoce da idade da menopausa ou na seleção de pacientes com maior rendimento em terapia de reprodução assistida (TRA). O hormônio anti-mulleriano (AMH) parece ser um marcador promissor para avaliação

da reserva ovariana. Contudo, individualmente, não obteve sucesso nesta predição.

20,21

O objetivo deste estudo foi avaliar, de forma transversal, os indicadores de reserva ovariana em pacientes com LES comparadas a um grupo controle de mesma idade média. Estes indicadores foram correlacionados com os critérios diagnósticos de LES, com uso prévio e dose acumulada de Ciclofosfamida e valores do escore de atividade de doença (SLEDAI) e do escore de dano (SLICC).

A hipótese a testar foi que os indicadores de reserva ovariana nas pacientes com LES se equivalem aos encontrados em um grupo controle da mesma idade média.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Avaliação da reserva ovariana em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico é uma patologia auto-imune que incide preferencialmente em mulheres na idade reprodutiva. Dados da literatura médica demonstram que as pacientes com LES apresentam, em geral, a fertilidade preservada.¹² Porém, em situações específicas como amenorréia relacionada a surtos de atividade inflamatória,¹⁵ hipogonadismo relacionado à insuficiência renal²² ou falência ovariana secundária ao uso de ciclofosfamida,^{12,23-25} estas pacientes têm comprometida a sua função ovariana.

Os distúrbios do ciclo menstrual são mais frequentes nas pacientes com LES comparadas à população geral.²⁶ A frequência de alterações do ciclo menstrual é variável, podendo comprometer até 55% das pacientes estudadas em populações com histórico de uso prévio de alquilantes, com predomínio de oligomenorréia ou amenorréia.²⁷ O uso da ciclofosfamida como tratamento do LES parece ser o principal determinante para as variações do ciclo menstrual. A toxicidade ovariana da ciclofosfamida parece estar relacionada com a dose acumulada da medicação, com a forma de administração e com a idade do uso da medicação.^{28,29} A dose total acumulada de ciclofosfamida e o tempo maior de duração do tratamento podem determinar a ocorrência de amenorréia, transitória ou permanente.³⁰ A formulação oral de ciclofosfamida de uso diário pode causar amenorréia em um ano, podendo levar a falência ovariana em até 70% das usuárias.²⁴ O uso da ciclofosfamida venosa em pulsos mensais parece ser menos lesivo para os ovários que o tratamento com a formulação oral, uma vez que as frequências de amenorréia e falência ovariana prematura relacionada a este tratamento são de 45%²⁴ e 11-27%,²⁸

respectivamente. A ocorrência de FOP é mais comum em pacientes com idade maior que 31 anos e naquelas na pré-menopausa,²⁴ e menos frequente em pacientes menores de 26 anos.³⁰ Estratégias como o uso de anticoncepcionais orais, hormônio liberador de gonadotrofina sintético ou criopreservação de ovários ou oócitos na vigência do uso de ciclofosfamida parecem ser benéficas para preservação da função ovariana.³¹⁻³⁴ Outros medicamentos, como os anti-inflamatórios não hormonais e as altas dosagens de corticosteróides podem alterar a regularidade menstrual, porém de forma reversível.^{8,15,35} Em crianças e adolescentes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) o uso de doses elevadas de corticosteróides associou-se a retardo na idade da menarca.³⁶ Tal efeito não foi comprovado com uso de ciclofosfamida.²⁹ Não há dados que associam outros imunossupressores como azatioprina, ciclosporina, micofenolato mofetil, antimaláricos, ou medicação imunobiológica a alterações em marcadores da reserva ovariana.²⁴

Outros fatores que comprovadamente correlacionam-se com aumento da frequência de alterações do ciclo menstrual em pacientes com LES são: o grau de atividade inflamatória da doença,^{8,9} aferido através do escore SLEDAI, e o grau de dano sistêmico relacionado a doença inflamatória,¹⁵ aferido pelo escore SLICC/ACR. Silva *et al*¹⁵ em 2007 avaliaram em uma coorte multicêntrica (n=298) os fatores de risco para amenorréia em 35 pacientes com LESJ. As pacientes com histórico de amenorréia eram mais jovens (15,04 +/- 2,5 versus 17,8 +/- 3,1 anos; P = 0,001), e tinham menor média de tempo entre menarca e idade atual (3,4 +/- 2,9 versus 6,7 +/- 5,4 anos; P = 0,001) comparadas àquelas sem histórico de alterações menstruais. Maiores valores do SLEDAI e SLICC/ACR foram identificados através de análise multivariada como fatores de risco independentes para amenorréia, mas

o uso prévio de ciclofosfamida não. Posteriormente, o perfil de gonadotrofinas em 32 pacientes com amenorréia foi analisado, e comprovou-se que aquelas com valores reduzidos (n=25) usavam maiores doses vigentes de prednisona e apresentavam maiores escores SLEDAI e SLICC.³⁷

Outra condição frequentemente associada às pacientes com LES que pode comprometer sua função reprodutiva é a presença de anticorpos antifosfolípides (AFL). A prevalência destes anticorpos em mulheres com LES varia de 10% a 80% conforme a população estudada.³⁸⁻⁴⁰ Em 20% a 30% das pacientes com LES, a presença destes anticorpos, associada a condições clínicas caracterizadas por fenômenos tromboembólicos e morbidade gestacional, caracteriza a síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAAF).⁴¹ Apesar de comprometer a fertilidade das pacientes lúpicas, promovendo insuficiência vascular da placenta e outros órgãos necessários para gestação através de fenômenos tromboembólicos, não há referências na literatura sobre a influência destes anticorpos na redução da reserva ovariana nas pacientes com LES. A presença de alterações menstruais, geralmente metrorragia, relaciona-se principalmente com a plaquetopenia, associada à presença dos AFL ou pelo próprio LES, ou mesmo relacionada com uso de medicamentos para prevenção de tromboembolismo, como anticoagulantes e ácido acetilsalicílico (AAS).

O número pequeno de publicações não permitiu a literatura média avaliar o papel dos marcadores de reserva ovariana em pacientes com LES. O FSH foi avaliado em pacientes com LES com diversos propósitos, como na avaliação da função ovariana ou hipofisária,^{9,36,42} avaliação de medicamentos protetores da função ovariana em pacientes usuárias de alquilantes⁴³ ou mesmo em pacientes com LES submetidas a reprodução assistida.⁴⁴ Porém, isoladamente, ele não se

mostrou um bom marcador de reserva ovariana, como já observado na população geral. Não há referências na literatura médica de estudos que avaliaram a contagem de folículos antrais para avaliação de reserva ovariana em pacientes com lúpus.

O Hormônio anti-mulleriano (AMH) é uma glicoproteína dimérica, que pertence à superfamília de fatores β de transformação do crescimento (TGF- β) que estão envolvidos no controle do crescimento e diferenciação tecidual. No sexo masculino, o AMH é sintetizado nas células de Sertoli logo após a diferenciação testicular e é responsável pela regressão ipsilateral dos ductos de Müller, e, nas mulheres, o AMH não se expressa antes do nascimento, garantindo a diferenciação feminina normal. Após a puberdade, o AMH é detectado nas células da granulosa de folículos primordiais e atinge pico de concentração em folículos antrais. O AMH produzido pelos folículos ovarianos em crescimento é um fator inibitório parácrino, prevenindo o recrutamento excessivo dos folículos primordiais restantes e permitindo, então, o surgimento de apenas um folículo dominante. O nível sérico do AMH reflete o número de folículos em crescimento, o que pode ser correlacionado com a idade ovariana e, conseqüentemente, com o prognóstico da fertilidade.

Em 2009, Browne *et al* traçaram, retrospectivamente, o perfil de AMH em seis pacientes com LES, com manifestações graves e refratárias ao uso de ciclofosfamida (14 ciclos de ciclofosfamida em média), submetidas a transplante de medula óssea.⁴⁵ Em duas pacientes com ciclos menstruais espontâneos pós transplante, enquanto os valores de FSH eram normais, os valores de AMH estavam reduzidos em todas as dosagens, realizadas nos meses 0, 4 e 9 pós transplante. Lawrenz *et al*, 2011, avaliaram pacientes com LES na pré-menopausa (n=33), com manifestações leves da doença e sem uso prévio de ciclofosfamida, comparadas com controles sadias, pareadas por idade, e demonstraram que aquelas apresentam

valores de AMH menores.⁴⁶ Ambos os grupos avaliados apresentavam entre seus integrantes pacientes gestantes e usuárias de contracepção hormonal. A comparação entre paridade e número de abortamentos entre os grupos não apresentou diferenças. Entre as pacientes com LES, os valores de AMH não se correlacionaram com a duração da doença ou com o grau de atividade da doença (SLEDAI).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar indicadores de reserva ovariana em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, comparadas a um grupo controle da mesma idade.

3.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Relacionar os indicadores de reserva ovariana e os critérios diagnósticos de Lúpus Eritematoso Sistêmico.
- Relacionar os indicadores de reserva ovariana com uso prévio e dose acumulada de Ciclofosfamida.
- Relacionar os indicadores de reserva ovariana com os valores do escore de atividade de doença (SLEDAI) e do escore de dano orgânico (SLICC/ACR-DI).

APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

4. APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

Os resultados e a discussão desse trabalho estão apresentados sob a forma de artigo científico a ser encaminhado para publicação, seguindo recomendações do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher:

Ovarian reserve markers in reproductive age women with systemic lupus erythematosus

Olivio B. Malheiro^{1,2}, Carolina P. Rezende¹, Gilda A. Ferreira², Fernando M. Reis¹

Departments of ¹Obstetrics and Gynecology and ²Locomotor System Medicine, Federal University of Minas Gerais, and National Institute of Hormones and Women's Health, Belo Horizonte, Brazil.

Running Title: Ovarian reserve and lupus

Address for Correspondence:

Fernando M. Reis, MD, PhD

Division of Human Reproduction, Department of Obstetrics and Gynecology

Federal University of Minas Gerais

Av. Alfredo Balena 110 – 9o andar

30130-100 Belo Horizonte, Brazil

Tel. +55 31 3409 9485 Fax +55 31 3409 9299

e-mail: reis@medicina.ufmg.br

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate if there are differences in ovarian reserve markers in systemic lupus erythematosus (SLE) patients compared to controls, and explore the relationship of such markers with clinical and treatment features of SLE patients.

Methods: This was a controlled cross-sectional study including 27 women with SLE and 27 controls. All participants were between 18 and 40 years, were eumenorrheic and did not use hormone therapy or hormone contraceptives in the past 6 months. Clinical data were assessed at a regular follow up visit, serum concentrations of follicle stimulating hormone (FSH) and anti-mullerian hormone (AMH), and antral follicle count through transvaginal ultrasound were assessed at early follicular phase of a subsequent menstrual cycle.

Results: Mean age of SLE patients was 30.9 years (SD±4.8) and had 102.7 months (SD±66.7) of disease duration. There was no difference between SLE group and control group at analysis of AFC [median (interquartile interval) 7 (5 – 13) vs. 11 (7 – 12), $p=0.076$], FSH [6.44 (4.19 – 7.69) vs. 7.5 (6.03 – 8.09) mIU/ml, $p=0.135$] and AMH levels [1.23 (0.24 – 4.63) ng/ml vs. 1.52 (1.33 – 1.88) ng/ml, $p=0.684$]. However, AMH values in SLE group were more heterogeneous compared to control group. The presence of nephritis and the cumulative dose of cyclophosphamide were factors individually related to reduced ovarian reserve, by association with lower values of AFC and AMH. At multivariate logistic regression, patients of control group were more likely to have higher AMH values than the SLE (OR 5.2, 95% CI 1.286 - 20.405, $p=0.021$) and in the SLE group, AMH was associated with lower maximum corticosteroid doses in the follow-up (OR 0.95, 95%CI 0.894-1.000, $p=0.50$). AFC

was associated with lower scores of SLICC/ACR-DI (OR: 0.14, 95% CI 0.025-0.841, $p=0.031$).

Conclusion: SLE patients who were eumenorrheic had average values of ovarian reserve markers similar to controls. However, AMH had a larger variation in that group, needing evaluation of other markers to clarify the best clinical application for it. Ovarian function is more compromised in patients with nephritis, higher cumulated dose of cyclophosphamide and with higher disease damage scores.

Key words: systemic lupus erythematosus, antimullerian hormone, follicle stimulating hormone, antral follicle count, ovarian reserve.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory chronic syndrome of unknown etiology with a large spectrum of manifestation, which clinically presents periods of activity and remission. The evolution and prognosis are variable. The overall prevalence ranges from 20-70/100,000 inhabitants, with an annual incidence ranging from 1-10/100,000 depending on the region studied (1) SLE affect in 80%-90% of cases women aged between 15 and 35 years, therefore, at reproductive age.(2)

Women diagnosed with SLE have a higher frequency of abnormal ovarian function compared to the general population (2-4). Manifestations range from a simple increased menstrual flow, with thrombocytopenia usually associated, to states of temporary amenorrhea and premature ovarian failure (POF).(2, 5, 6) On average, patients with SLE have earlier menopause and higher prevalence of premature ovarian failure than general population women.(7-9)

The main risk factors related to ovarian dysfunction in patients with SLE are disease activity,(3, 4, 10, 11) high scores of organic damage,(10) anti corpus luteum antibody,(12, 13) and drugs for SLE treatment.(2, 6, 13, 14)

In general population, ovarian function can be estimated by menstrual cycle characteristics, serum markers and transvaginal ultrasound ovarian parameters, as ovarian size, ovarian blood flow and antral follicles count (AFC) .(15) However, all these methods proved insufficient in predicting age of menopause or identifying patients with best outcomes in assisted reproductive technology (ART). Anti mullerian hormone (AMH) seems to be a promising marker for assessment of ovarian reserve, although it should be combined with others markers to achieve an acceptable predictive power.(15, 16)

Despite cumulative evidence that SLE may affect ovarian reserve, it remains unknown whether these women have altered diagnostic markers or ovarian function while they are still eumenorrheic. If so, they could be counselled to consider measures of fertility preservation. Thus, the aim of this study was to evaluate, in cross-sectional view, the indicators of ovarian reserve in patients with SLE compared to a control group of the same age. These markers were also correlated with the diagnostic criteria for SLE, with previous use and cumulative dose of cyclophosphamide and values of score of disease activity (SLEDAI) and damage score (SLICC/ACR-DI).

Patients and Methods

Patients

This is a cross-sectional study performed at the baseline of a single arm cohort study designed to evaluate potential predictors of primary ovarian insufficiency in women with SLE. The study protocol was approved by the Ethics Committee on Research of Federal University of Minas Gerais, and written informed consent was obtained from all participants.

The inclusion criteria were post-menarche patients, with current age ≥ 18 and < 40 years, who had menstrual cycles, and SLE diagnosis according with the American College of Rheumatology (ACR) criteria.⁽¹⁷⁾ The exclusion criteria were absence of menarche, surgical amenorrhea, salpingectomy or salpingoplastia, past history of pelvic radiotherapy and/or chemotherapy for cancer, abnormal TSH values, cognitive impairment, impossibility to undergo transvaginal ultrasound, and refusal to participate.

The following data were recorded for all SLE patients: age, school instruction, marital status, age of SLE diagnosis, disease duration, SLE diagnostic criteria (ACR) (17), treatment characteristics (corticosteroid current and maximal dose used, hydroxychloroquine or chloroquine diphosphate current and follow up use, azathioprine current and follow up use, cyclophosphamide current and follow up use, cyclophosphamide cumulated dose, age when cyclophosphamide use started). SLE disease activity index (SLEDAI) (18) and Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR – Damage Index (SLICC/ACR-DI) (19), both measured in the last regular visit, were used to assess SLE disease activity and cumulative damage. Antiphospholipid syndrome, kidney failure, cancer and hypothyroidism were considered as comorbidity. Patients who had hypothyroidism and abnormal thyroid stimulating hormone, were oriented to adjust thyroxin daily dose, and then were allowed to participate in the study.

For the present cross-sectional study, we selected an age matched group of healthy women to serve as a control group. These women (n=27) were attending the reproductive medicine unit of our university hospital due to exclusive male factor infertility (n=23) or tubal obstruction (n=4), without any evidence of ovarian dysfunction. All controls were under forty years old, eumenorrheic (menses during 21 to 35 days in the last 6 months), were not using any hormonal medications, had normal levels of serum FSH and had transvaginal ultrasound without abnormalities. Patients with irregular menses, polycystic ovary syndrome or unknown causes of infertility were excluded from this group.

Patients and controls were asked to contact the investigators at the first day of menstruation in order to set up an appointment for transvaginal ultrasound and

blood sampling, as the assessment of ovarian reserve markers should be performed in the early follicular phase of menstrual cycle (days 2-5).

After pre-selecting 185 SLE patients with ages between 18 and 40 years, 127 patients met exclusion criteria, as shown in Figure 1. Fifty-eight patients were included and agreed to sign the informed consent, and 27 contacted the researchers to inform the beginning of menstruation. They were submitted to blood sampling and transvaginal ultrasound at early follicular phase.

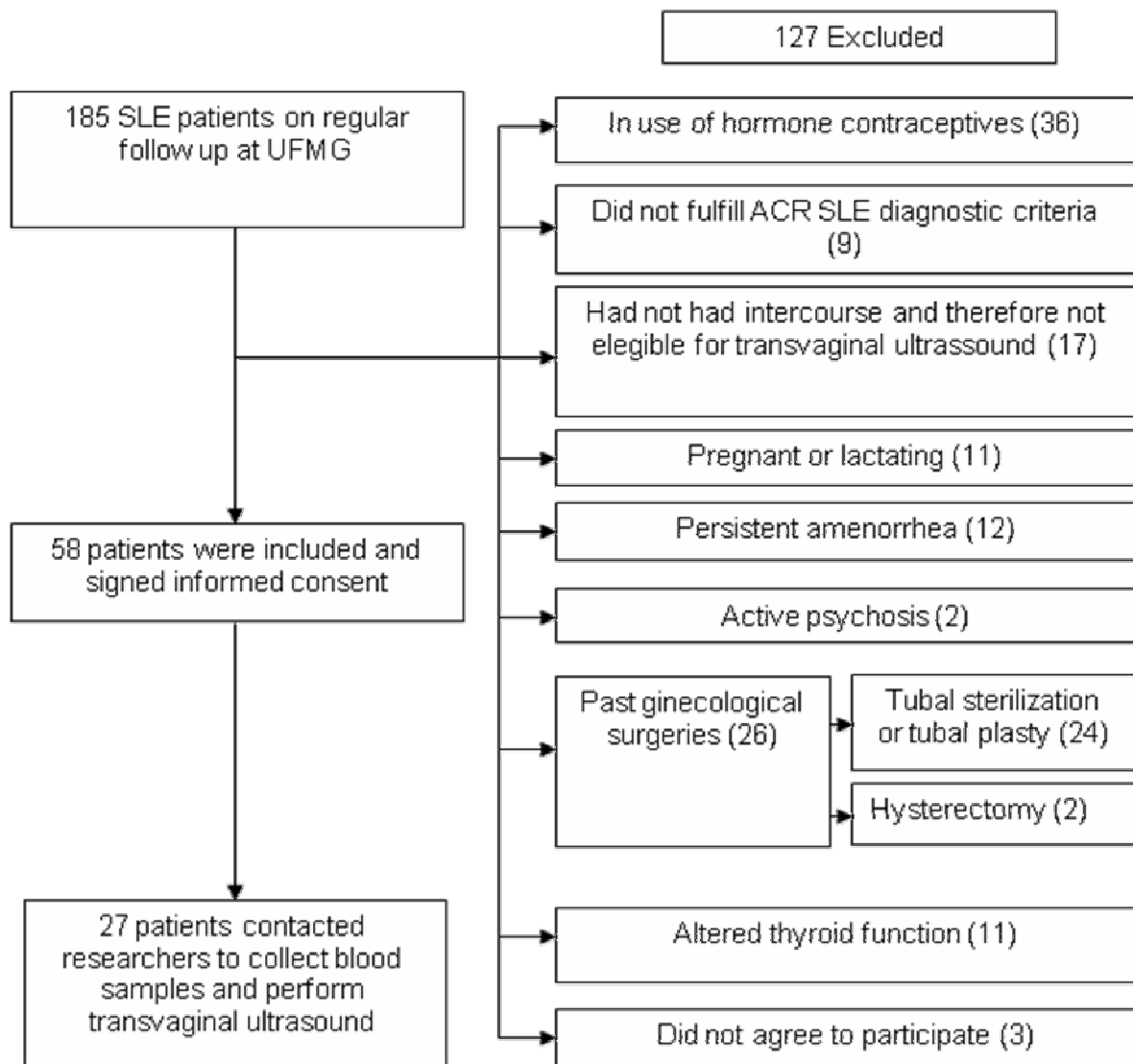


Figure 1: Flowchart of SLE patients entering the study.

The demographic and clinical features of the SLE groups are summarized in Table 1. The mean age of SLE group was 30.9 years and the mean of disease duration was 102.7 months. Seventeen (63%) SLE patients had nephritis during the follow up, and four (14%) also had antiphospholipid syndrome (APS). The median disease activity index measured by SLEDAI (18) was 2 (range 0-16) and the median intensity of damage measured by SLICC/ACR –DI (19) was 0 (range 0-8). Treatment with corticosteroid was necessary in 22 (81.5 %) patients with a mean dose of 5 mg (range 1.3 – 50). Twenty (74.1%) SLE patients used cyclophosphamide during follow up, and four (14.8%) were in current use at the time of blood test and ultrasound. The mean of age when treatment with cyclophosphamide started was 22.6 (range 11-34, SD±6.6) years. Median cumulated dose of cyclophosphamide was 9.6 (range 1 - 49) grams.

Table 1: Demographic, clinical and therapeutic characteristics of the 27 SLE patients included in the study

Characteristic	Results
Mean age (yr.)	30.9 (SD±4.8)
Mean age of onset	22.2 (SD±6.1)
Mean Disease duration (mo.)	102.7 (SD±66.7)
Skin color	
White	8 (29.6%)
Non white	19 (70.4%)
Education	
Elementary	11 (40.7%)
High School	13 (48.1%)

College	3 (11.1%)
Marital status	
Married	11 (40.7%)
Other	16 (59.3%)
Smoking	
Past	1 (3.7%)
Current	1 (3.7%)
Never	25 (92.6%)
Hypothyroidism	1 (3.7%)
Chronic Kidney disease	2 (7.4%)
SLE /ACR Clinical manifestations	
Mucocutaneous characteristics ^a	19 (70.4%)
Non erosive arthritis	16 (59.3%)
Neuropsychiatric disorders ^b	1 (3.7%)
Hematologic abnormality	22 (81.5%)
Leukopenia/Lymphopenia	21 (77.8%)
Hemolytic anemia	3 (11.1%)
Trombocytopenia	5 (18.5%)
Serositis (pleurisy or pericarditis)	6 (22.2%)
Nephritis ^c	17 (63%)
Positive ANA	26 (96.3%)
Antibody to Sm	5 (18.5%)
Antibody to DNA	12 (44.4%)
False positive VDRL	1 (3.7%)
Positive aPL	16 (59.3%)

Corticosteroid therapy (current)	22 (81.5%)
Mean daily dose of corticosteroid (mg)	5 (1.3 – 50)
Azatioprina therapy (follow-up)	16 (49.2%)
Antimalarial therapy (follow-up)	27 (100%)
Cyclophosphamide therapy (follow-up)	20 (74.1%)
Cyclophosphamide therapy (current)	4 (14.8%)
Mean age of start cyclophosphamide (yr.)	22.6(SD±6.6)
Median cumulate dose of cyclophosphamide (g)	9.6 (1 – 49)
SLEDAI (Median) ^d	2 (0-14)
SLICC/ACR – DI (Median) ^e	0 (0-8)
APS	4 (14%)
Menses irregularity	4 (14%)
BMI (Mean) ^f	23 (SD±3.4)

Values are presented as mean (\pm SD), n (%), or median (minimum – maximum).

^aMucocutaneous characteristics: Malar erythema, Discoid lupus, photosensitivity, mucosal ulcers. ^bNeuropsychiatric disorders: Psychosis, seizures, cranial neuropathy and transverse myelitis. ^cNephritis: Proteinúria > 0,5g/24hs or 3+ routine urine test, cylindruria or compatible renal biopsy. ^dSLEDAI (18): Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index. ^eSLICC (19) (Systemic Lupus International Collaborating Clinics). ^fBMI: Body mass index.

Blood sampling for hormone measurements

Blood samples were collected, using sterile equipment, in two vials of serum gel, each one of 5 milliliters. The material was centrifuged for 5 minutes at 3000 revolutions per minute, and then separated from the serum component of cell serum

by manual pipetting with disposable material. The serum was then stored at - 80 degrees Celsius, until the completion of hormone assays.

Transvaginal ultrasound

Patients and controls underwent transvaginal ultrasound at the same day of blood collection, during the early follicular phase of menstrual cycle. Ultrasound was performed by a single examiner (C.P.R.), using a Aloka equipment with a 3 – 7.5 mHz endocavitary transducer. Antral follicle counting included all follicles with a mean diameter of 2-10 mm calculated from two dimensions. (20)

Hormone assays

AMH was measured using an enzymatically amplified two-site immunoassay (kit A73819 AMH Gen II ELISA purchased from Beckman Coulter®, Diagnostic Systems Laboratories, Brea, CA, USA). The results were expressed in nanograms per milliliter (ng/ml). The lowest amount of AMH in the sample that can be detected with 95% probability is 0.08 ng/ml, and estimated minimum dose achieved at 20% total imprecision is 0.16 ng/ml. The coefficient variation of AMH Gen II assay in the concentration range of our samples was 5.7%. FSH was measured by immunoassay using kits ECi/ECiQ from Vitros®, and was expressed by international microunits per milliliter (mIU/ml).

Statistical analysis

We calculated that sample size of at least 23 patients was required per group to achieve a statistical power of 90% with 95% confidence, to detect differences larger than one standard deviation in serum FSH or AMH, as well as in quantitative clinical data, such as duration and frequency of menstrual cycles.

Continuous variables were tested for normal distribution using skewness and kurtosis parameters. Data with normal distribution were expressed as mean and standard deviation, while those with non-normal distribution, were presented as median and percentiles 25 and 75. Between group, differences were tested by unpaired Student's t test or Mann–Whitney U test, for normal and non-normal data distribution, respectively. The correlations between ovarian reserve markers and continuous variables were evaluated by Pearson's or Spearman's coefficient.

Multivariate analysis was performed by logistic regression to test associations between ovarian reserve markers dichotomized as above versus below the control group median and demographic, reproductive and clinical characteristics of patients. We included in the multivariate analysis model all the variables with $p < 0.2$ in the univariate analysis.

All statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS®, IBM®, USA) for Windows v/17.0, with two-sided p values less than 0.05 considered to indicate statistical significance.

Results

The reproductive characteristics of SLE and control groups are shown in Table 2. Mean age of menarche of SLE patients and control group were 13.15 years (SD±1.7) and 12.4 years (SD±1.5), respectively. Median cycle length was 28 (28 – 30) days in both groups, and the mean length of menstrual flow was 4.4 (SD±1.1) days in SLE patients and 4.9 (SD±1.3) days in the control group. There were no significant differences between groups.

The median FSH concentration was 6.44 (4.19 – 7.69) mUI/ml in SLE patients and 7.5 (6.03 – 8.09) mUI/ml in the control group, (p=0.135, FIG.2A). AMH levels were 1.23 (0.24 – 4.63) ng/ml in the SLE group and 1.52 (1.33 – 1.88) ng/ml in the control group, (p=0.684, FIG.2B). The median AFC by ultrasound was 7 (5 – 13) follicles in SLE the group and 11 (7 – 12) follicles in control groups, (p=0.076, FIG.2C).

Table 2. Reproductive characteristics of controls and SLE patients

	SLE (n=27)	Controls (n=27)	P ^a
Age (years)	30.9(SD±4.8)	32.1(SD±3.8)	0.316
Age at menarche (years)	13.2(SD±1.7)	12.4(SD±1.5)	0.076
Menses length (days)	28 (28-30)	28 (28-30)	0.646
Menstrual flow length (days)	4.4(SD±1.1)	4.9(SD±1.3)	0.184
Endometrial thickness (mm)	4 (3-4)	4	0.478

Values are presented as mean (±SD) or median (IQR). ^aUsed T student , Mann-Whitney U as appropriated.

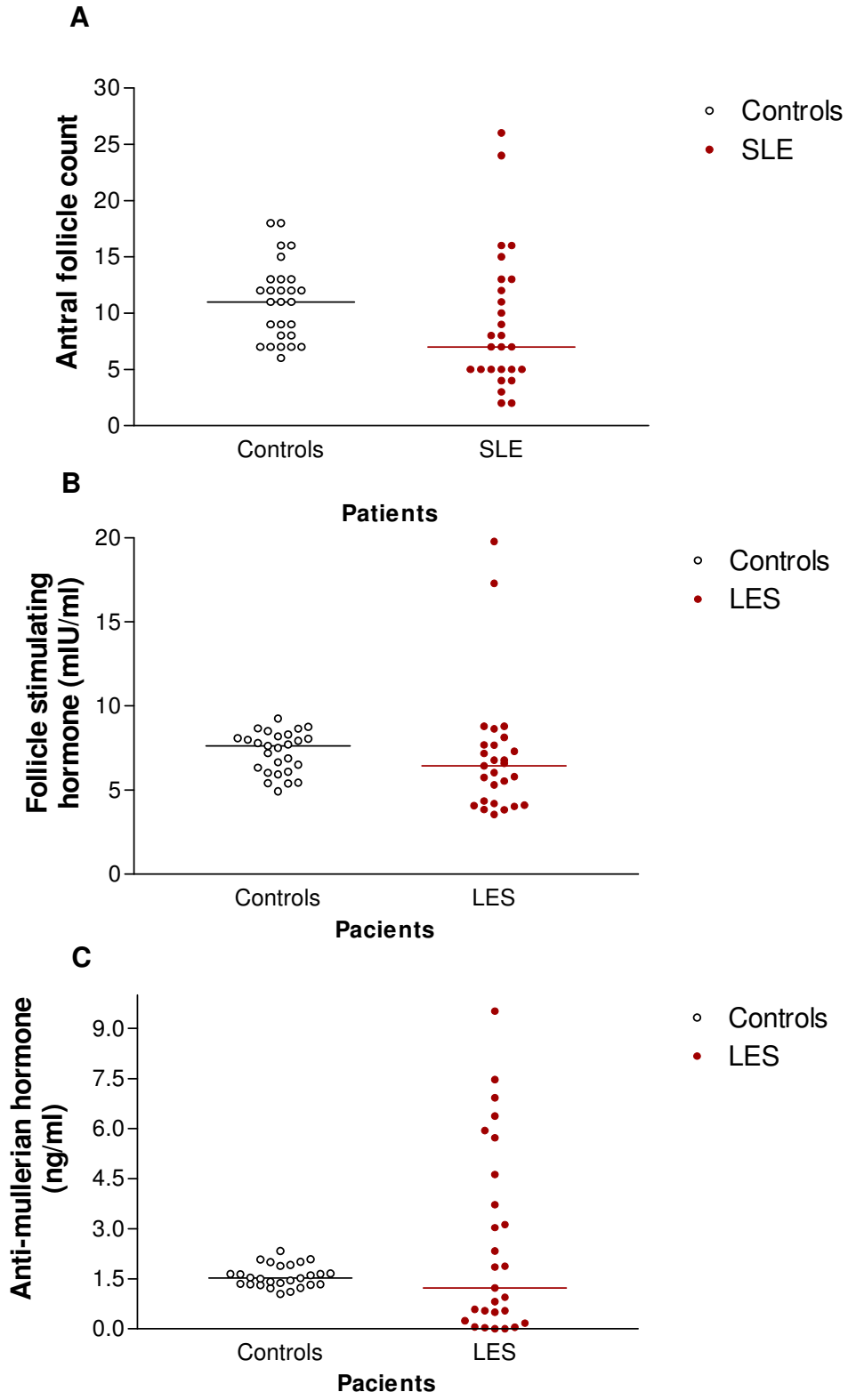
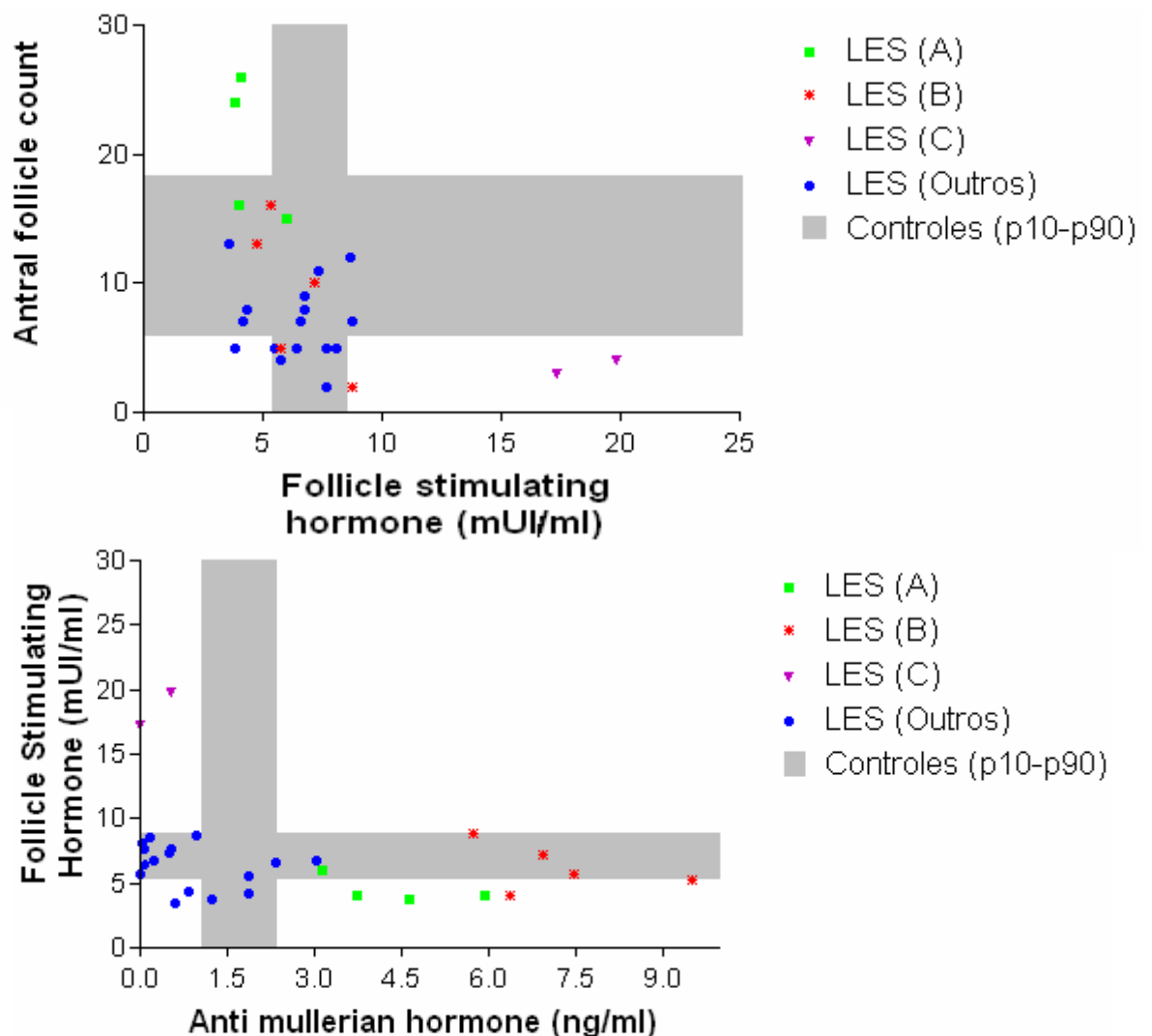


Figure 2. Scatters showing comparison of ovarian reserve markers between SLE patients and controls: AFC (A), FSH (B), and AMH (C). The horizontal bars indicate the medians.

The distribution of SLE patients is illustrated in correlation plots between ovarian reserve markers in Figures 4A, 4B, and 4C. Different clusters were identified in SLE patients: cluster A is formed by patients with high AFC and AMH levels, resembling some characteristics of polycystic ovary syndrome; cluster B has high AMH levels despite normal AFC; and cluster C includes SLE patients with low ovarian reserve, indicated by elevated FSH levels.



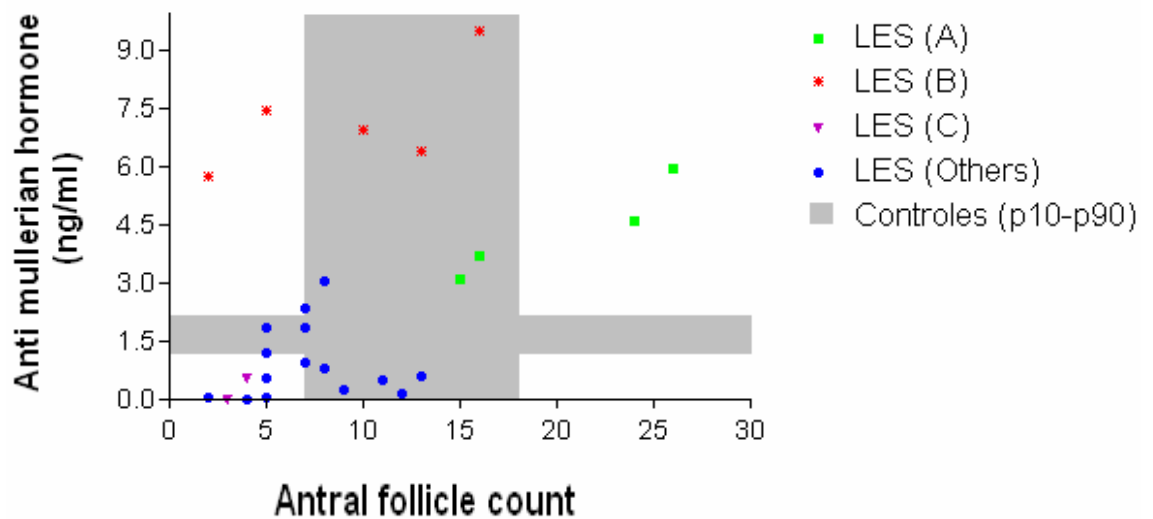


Figure 3. Scatter plots describing correlations between ovarian markers in SLE patients: AFC vs FSH (A), FSH vs AMH (B), and AMH vs AFC (C). The grey areas represent the ranges between 10th and 90th percentile in the control group. Different clusters of SLE patients are represented by different symbols.

All statistically significant data obtained by the univariate analysis are shown in table 3. There was significant correlation between cyclophosphamide cumulate dose and both AMH and AFC (Figure 4A and 4B). Disease length was correlated with FSH and AFC (Figure 4C and 4D). Nephritis was associated with lower AFC (5 vs 13; $p=0,013$) and lower AMH values (0.54 vs 3.42; $p=0,046$) as shown in Figure 5.

In the multivariate logistic regression, AMH independently was associated with group control (OR 5.1; CI95% 1.286 – 20.405) and higher AFC (OR 1.21; CI95% 1.023 – 1.444). Antral follicle count was independently with levels of AMH (OR 1.52;

CI95% 1.055 – 2.109) and endometrial thickness (OR 2.05; CI95% 1.044 – 4.019) as shown in Table 4. In the SLE group, antral follicle count was independently associated to low SLICC/ACR-DI (OR 1.613; CI95% 0.025 – 0.841). (Table 5)

Table 3. Statistically significant correlation coefficients by univariate analysis between ovarian reserve markers and clinical features in 27 SLE cases.

Ovarian Reserve marker	Correlated Variables	Coefficient ^a	P
FSH	Disease length	0.42	0.028
	Cyclophosphamide age of start	- 0.60	0.007
AFC	Disease length	- 0.41	0.034
	Cyclophosphamide cumulated dose	- 0.44	0.021
	Nephritis (follow up)	- 0.49	0.013
AMH	Nephritis (follow up)	- 0.39	0.046
	Cyclophosphamide cumulated dose	- 0.38	0.049
	Corticosteroid maximum dose	- 0.52	0.005

^aUsed Spearman rank-order or Mann Whitney as appropriated. AMH - Anti mullerian hormone, FSH - Follicle Stimulating hormone, AFC - Antral follicles count.

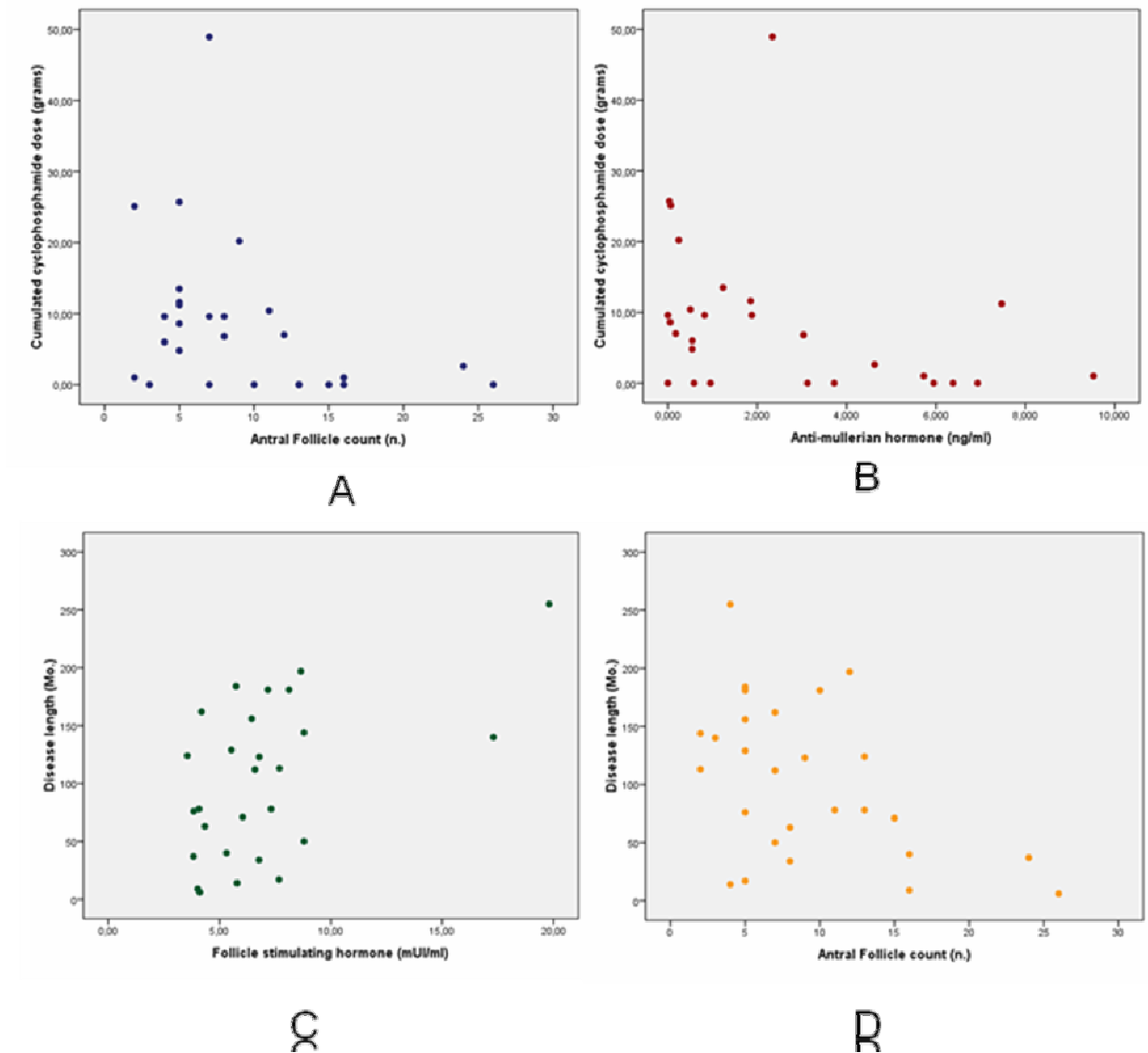


Figure 4. Scatter showing correlations between ovarian reserve markers and clinical features in SLE patients. AFC vs cyclophosphamide cumulated dose (Figure 4A), AMH vs cyclophosphamide cumulated dose (Figure 4B), FSH vs Disease length (Figure 4C), and AFC vs disease length (Figure 4D).

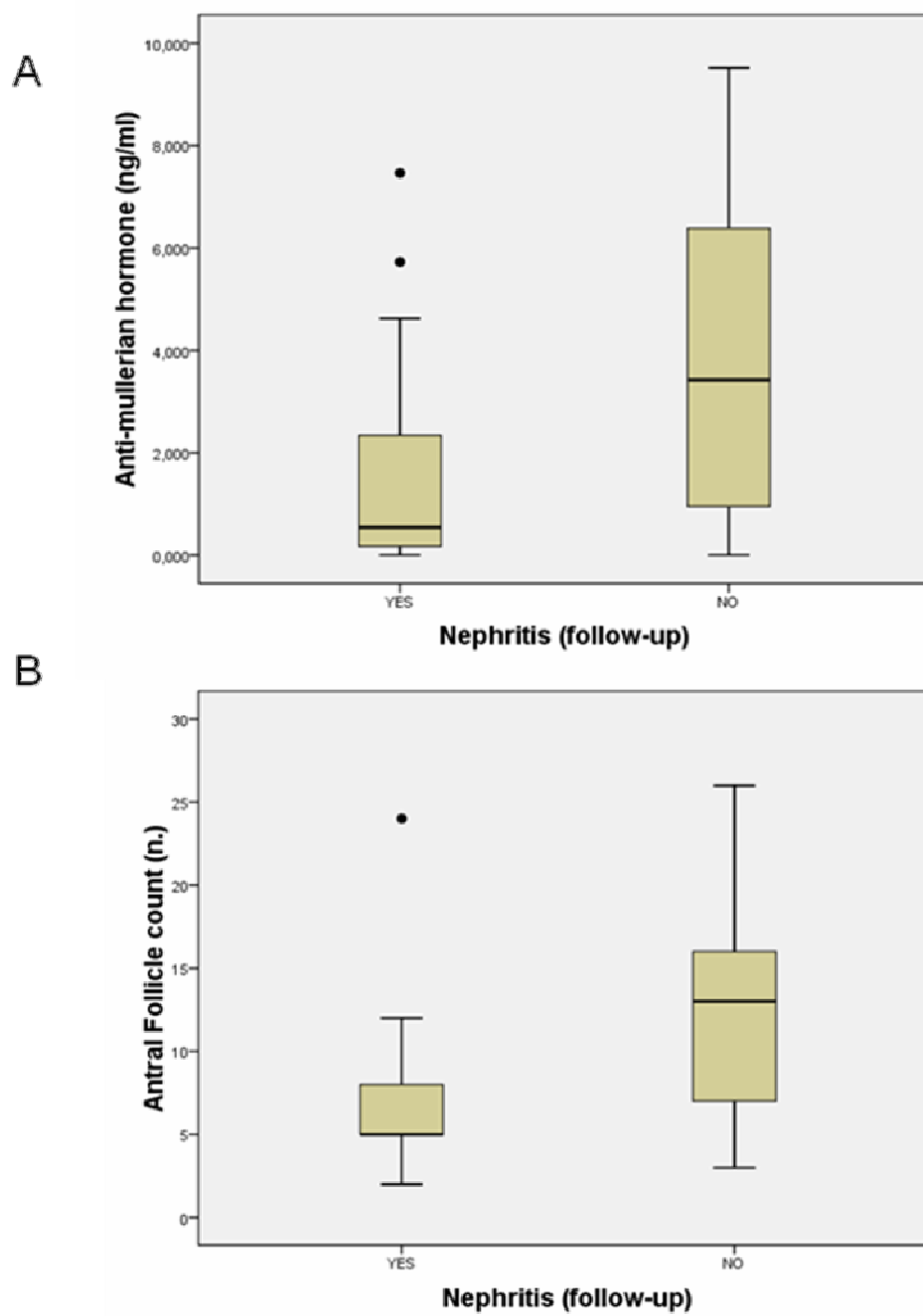


Figure 5. Boxplots describing distribution of AMH (A) and AFC (B) in SLE patients according to the presence or absence of nephritis.

Table 4. Logistic regression analysis to evaluate ovarian reserve and reproductive characteristics in 54 patients

<i>Dependent variable</i>	<i>Covariate</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI</i>	<i>P</i>
AMH > 1.51 ng/ml	Control group	5.12	1.286 - 20.405	0.021
	FSH	1.00	0.756 – 1.311	NS
	AFC	1.21	1.023 - 1.444	0.026
	Endometrial thickness	0.45	0.178 – 1.150	NS
AFC > 9	Control group	3.59	0.915 – 14.101	NS
	AMH	1.52	1.055 - 2.109	0.025
	FSH	0.91	0.671 – 1.232	NS
	Endometrial thickness	2.05	1.044 - 4.019	0.037
FSH > 6.77 mIU/ml	Control group	2.10	0.625 – 7.058	NS
	AMH	0.81	0.557 – 1.182	NS
	AFC	0.93	0.557 – 1.182	NS
	Endometrial thickness	0.91	0.488 – 1.694	NS

CI - Confidence interval, OR – odds ratio, AMH - Anti mullerian hormone, FSH - Follicle Stimulating hormone, AFC - Antral follicles count. R square (Nagelkerk): 0.350 for AMH and 0.210 for AFC analysis

Table. 5 Logistic regression analysis to evaluate ovarian reserve and clinical features and reproductive characteristics in 27 SLE cases

<i>Dependent variable</i>	<i>Covariate</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI</i>	<i>P</i>
AFC > 1.23 ng/ml	Major prednisone dose	0.95	0.868 – 1.051	NS
	– follow up			
	Disease length	0.99	0.969 – 1.009	NS
	Start age of	1.01	0.863 – 1.193	NS
	cyclophosphamide			
	Cumulated	0.93	0.797 – 1.090	NS
	cyclophosphamide dose			
AMH > 7	Nephritis	0.92	0.015 – 57.488	NS
	SLICC/ACR-DI	0.14	0.025 – 0.841	0.031
	Major prednisone dose	0.95	0.894 – 1.000	0.050
	– follow up			
	Disease length	0.98	0.959 – 1.012	NS
	Start age of	1.12	0.896 – 1.408	NS
	cyclophosphamide			
	Cumulated	1.09	0.971 – 1.229	NS
	cyclophosphamide dose			
	Nephritis	0.03	0.000 – 11.859	NS

	SLICC/ACR-DI	2.00	0.605 – 6.638	NS
FSH > 6.44 mIU/ml	Major prednisone dose – follow up	1.03	0.961 – 1.121	NS
	Disease length	1.00	0.991 – 1.025	NS
	Start age of cyclophosphamide	0.86	0.711 – 1.047	NS
	Cumulated cyclophosphamide dose	1.03	0.916 – 1.151	NS
	Nephritis	17.59	0.200 – 1547.158	NS
	SLICC/ACR-DI	1.18	0.564 – 2.486	NS

CI - Confidence interval, OR – odds ratio, AMH - Anti mullerian hormone, FSH - Follicle Stimulating hormone, AFC - Antral follicles count, SLICC – Systemic Lupus International Collaborating Clinics-American College of Rheumatology/Damage Index. R square (Nagelkerk): 0.210 for AMH and 0.457 for AFC analysis.

Discussion

In recent years, concurrent with increased survival of SLE patients, also raised the interest of this population for quality of life. Concerns about the best age for pregnancy and its viability, as well as doubts about the expected age of menopause and how to reduce the negative effects of climacteric are part of SLE women's thoughts. These questions are justified by some reports in the medical literature of fewer offspring, and lower average age of menopause in SLE patients compared to the general population. (7, 21)

In this study we found no difference between the results of three major serum and ultrasonographic ovarian reserve markers in women with SLE compared with women without the disease. However, in a broader analysis of the sample, the SLE patients had about five times more odds to have low AMH values than the control group. The groups had similar menarche ages and there were no differences between groups in the length of menstrual cycle or duration of menstrual flow in the follicular phase. Taken together, these findings suggest that eumenorrheic women with SLE may already have low AMH levels as an early sign of diminished ovarian reserve, but only the completion of their follow-up will allow us to verify whether the women with lower AMH levels are those who eventually will have the earliest manifestations of ovarian insufficiency.

The two previous studies that specifically evaluated AMH as a marker of ovarian reserve in patients with SLE found reduced values of this hormone in the SLE group.(22, 23) In the present study, we noticed a large variation between the values found in the AMH group of patients with SLE compared the distribution in the control group. This heterogeneity sample of patients with SLE is more evident in values above the median. Some subgroups were identified through the joint

evaluation of markers of ovarian reserve, such as patients with high levels of AMH and AFC, resembling women with polycystic ovary syndrome, (24) and women with clearly reduced ovarian reserve, showing high FSH levels and low values of AMH and AFC. Five patients had high AMH values associated with the presence of normal or slightly reduced AFC ("SLE B" group). We were unable to identify any relationship between this isolated AMH increase and clinical characteristics or disease activity scores and systemic damage. Thus, it remains unclear why some SLE women have such high serum AMH concentrations without a correspondent increase in AFC.

One patient with the group "SLE B" profile had existing chronic renal failure in dialysis, pre-renal transplantation, but without clinical or laboratory evidence of uremia, low SLEDAI (2 points) and SLICC / ACR-DI (2 points) scores, and had regular menstrual cycles. A well known complication of chronic renal failure is hypogonadism, caused by hyperprolactinemia secondary to uremia, which interferes with the regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, leading to reduced ovarian function.(25, 26) However, we found no reference in the literature about renal failure and increased amounts of AMH.

A positive association between AMH and AFC was observed in the group of 54 patients, as well as in the isolated analysis of the SLE group, representing the close relationship between these markers of ovarian reserve.(27, 28) AFC also showed a positive association with endometrial thickness, which is surrogate marker of ovarian estrogen release at the follicular phase, reinforcing the functional significance of the morphological assessment of growing ovarian follicles.

We found a negative association between AFC and the score for organ damage (SLICC / ACR-DI) in SLE patients. However, we could not associate the disease activity index score (SLEDAI) with any of the studied markers of ovarian

reserve, maybe, showing that the ovarian reserve is more influenced by the sequelae of chronic inflammation than only by the intensity of the flares. The patients in the study sample had low levels of SLICC (median = 0) and SLEDAI (median = 2) characterizing a population with the disease well controlled with low systemic damage, which may have determined a limitation to the analysis.

The use of higher doses of corticosteroids during follow up was associated with lower levels of AMH in SLE patients. This relationship seems to reflect primarily the inflammatory activity history of the rheumatic disease, rather than a direct effect of exogenous steroids on the physiology of AMH. We found no differences related to the current dose of prednisone in the study, nor published reports on the relationship between AMH and hypercortisolism.

The presence of nephritis and the cumulative dose of cyclophosphamide were factors individually related to reduced ovarian reserve, by correlations with lower values of AFC and AMH. Nevertheless, they were not confirmed as independent determinants of ovarian markers. The SLE patients had a mean age of 31 years, which is compatible with the group most susceptible to the ovarian effects of alkylating drugs. However, only four patients (14.8%) were in current treatment with cyclophosphamide at the time of the study, and the average age of starting medication was 22 years. Another factor that has not been quantified, but may be considered was the past use of contraceptives playing the role of a protective factor for ovarian function. The SLE patients followed at the rheumatology unit are geared to undertake contraception during the induction treatment of nephritis with intravenous cyclophosphamide pulses to avoid birth defects secondary to medication. The anovulation secondary to hormonal contraceptive use is possibly a protective factor against ovarian failure.(29)

We conclude that eumenorrheic patients with SLE often have the same values of AFC and FSH found in control patients. For better evaluation of AMH in these patients, we believe it is necessary a serial measurement or even joint evaluation with other markers like inhibin B, to define early the groups that really have potential lost of ovarian function.

The reduction of ovarian reserve in some patients with SLE is closely related to conditions that demonstrate greater inflammatory intensity of the disease or longer exposure, such as the presence of nephritis in the course of the disease or use of higher doses of cyclophosphamide in the treatment, and higher scores of organic damage.

Acknowledgements

We thank professors Cristina Duarte Lanna and Márcia Mendonça Carneiro for helpful comments and suggestions. Research supported by CNPq and FAPEMIG, Brazil.

References

1. Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2010;39:257-68.
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.

3. 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.
4. Shabanova SS, Ananieva LP, Alekberova ZS, Guzov, II. Ovarian function and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:436-41.
5. Medeiros MM, Silveira VA, Menezes AP, Carvalho RC. Risk factors for ovarian failure in patients with systemic lupus erythematosus. *Braz J Med Biol Res* 2001;34:1561-8.
6. Schaller J. Lupus in childhood. *Clin Rheum Dis* 1982;8:219-28.
7. Ekblom-Kullberg S, Kautiainen H, Alha P, Helve T, Leirisalo-Repo M, Julkunen H. Reproductive health in women with systemic lupus erythematosus compared to population controls. *Scand J Rheumatol* 2009;38:375-80.
8. Gonzalez LA, Pons-Estel GJ, Zhang JS, McGwin G, Jr., Roseman J, Reveille JD *et al.* Effect of age, menopause and cyclophosphamide use on damage accrual in systemic lupus erythematosus patients from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LXIII). *Lupus* 2009;18:184-6.
9. Minami Y, Sasaki T, Komatsu S, Nishikori M, Fukao A, Yoshinaga K *et al.* Female systemic lupus erythematosus in Miyagi Prefecture, Japan: a case-control study of dietary and reproductive factors. *Tohoku J Exp Med* 1993;169:245-52.
10. Silva CA, 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.

11. Moncayo-Naveda H, Moncayo R, Benz R, Wolf A, Lauritzen C. Organ-specific antibodies against ovary in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:1227-9.
12. 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.
13. McDermott EM, Powell RJ. Incidence of ovarian failure in systemic lupus erythematosus after treatment with pulse cyclophosphamide. *Ann Rheum Dis* 1996;55:224-9.
14. Park MC, Park YB, Jung SY, Chung IH, Choi KH, Lee SK. Risk of ovarian failure and pregnancy outcome in patients with lupus nephritis treated with intravenous cyclophosphamide pulse therapy. *Lupus* 2004;13:569-74.
15. 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.
16. Domingues TS, Rocha AM, Serafini PC. Tests for ovarian reserve: reliability and utility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010;22:271-6.
17. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
18. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.
19. 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.
20. Rosen MP, Johnstone E, Addauan-Andersen C, Cedars MI. A lower antral follicle count is associated with infertility. *Fertil Steril* 2011;95:1950-4, 4 e1.
 21. Costenbader KH, Feskanich D, Stampfer MJ, Karlson EW. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum* 2007;56:1251-62.
 22. Browne H, Armstrong A, Decherney A, Babb R, Illei G, Segars J *et al.* Assessment of ovarian function with anti-Mullerian hormone in systemic lupus erythematosus patients undergoing hematopoietic stem cell transplant. *Fertil Steril* 2009;91:1529-32.
 23. Lawrenz B, Henes JC, 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-Muellerian hormone. *Lupus* 2011.
 24. Lujan ME, Chizen DR, Pierson RA. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: pitfalls and controversies. *J Obstet Gynaecol Can* 2008;30:671-9.
 25. Handelsman DJ, Dong Q. Hypothalamo-pituitary gonadal axis in chronic renal failure. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1993;22:145-61.
 26. Saha MT, Saha HH, Niskanen LK, Salmela KT, Pasternack AI. Time course of serum prolactin and sex hormones following successful renal transplantation. *Nephron* 2002;92:735-7.
 27. La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, Macklon NS. Anti-Mullerian hormone (AMH): what do we still need to know? *Hum Reprod* 2009;24:2264-75.

28. Yang YS, Hur MH, Kim SY, Young K. Correlation between sonographic and endocrine markers of ovarian aging as predictors for late menopausal transition. *Menopause* 2011;18:138-45.
29. Behringer K, Breuer K, Reineke T, May M, Nogova L, Klimm B *et al.* Secondary amenorrhea after Hodgkin's lymphoma is influenced by age at treatment, stage of disease, chemotherapy regimen, and the use of oral contraceptives during therapy: a report from the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2005;23:7555-64.

COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

5. COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

As medidas dos marcadores de reserva ovariana tradicionais em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico foram semelhantes àsquelas encontradas em pacientes controles. Mais importante, o grupo de pacientes com LES apresenta um perfil heterogêneo de distribuição dos valores de hormônio anti-mulleriano. A melhor avaliação destes achados através de dosagens seriadas deste hormônio ou sua avaliação conjunta com outros marcadores ovarianos, como a inibina B, pode determinar o papel destes marcadores para melhor seleção precoce de pacientes com LES sob risco de falência ovariana prematura. Com esta informação, a tomada de medidas profiláticas se torna mais efetiva e menos onerosa.

A redução da reserva ovariana em algumas pacientes do grupo LES está intimamente relacionada com condições que demonstram maior intensidade do processo inflamatório, como a presença de nefrite no decorrer da doença ou uso de maiores doses de ciclofosfamida no tratamento, além de maiores escores de dano orgânico.

Concluimos então que:

- Os marcadores de reserva ovariana em pacientes com LES e indivíduos do grupo controle foram semelhantes.
- Os marcadores de reserva ovariana em pacientes com LES relacionaram-se com o critério diagnóstico nefrite. A presença deste critério correlacionou-se com redução da reserva ovariana.
- Os marcadores de reserva ovariana em pacientes com LES correlacionaram-se com a dose acumulada de ciclofosfamida. A reserva ovariana mostrou-se menor em pacientes com maiores dose acumuladas de ciclofosfamida.

- A reserva ovariana está reduzida em pacientes com LES com maiores escores de dano orgânico SLICC/ACR-DI. Não encontramos associação individual ou independente entre valores do SLEDAI e os marcadores de reserva ovariana estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Pons-Estel GL, Alarcón GS, Scofield L, *et al.* Understanding the epidemiology and progression of the systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2010; 39: 257 – 68.
- 2- Stahl-Hallengren C, Jonsen A, Nived O, Sturfelt G. Incidence studies of systemic lupus erythematosus in Southern Sweden: increasing age, decreasing frequency of renal manifestations and good prognosis. *J Rheumatol* 2000; 27: 685-91.
- 3- Pereira Vilar MJ, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus* 2002;11, 528-32
- 4- McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA Jr, Ramsey-Goldman R, LaPorte RE, Kwoh CK. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1260–70.
- 5- Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Nottingham, UK, 1989-1990. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 110-15.
- 6- Nossent JC. Systemic lupus erythematosus on the Caribbean island of Curaçao: an epidemiological investigation. *Ann Rheum Dis* 1992; 51:1197 – 201.
- 7- Medeiros PB, Febrônio MV, Bonfá ET. Menstrual and hormonal alterations in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009 Jan; 18(1): 38-43.
- 8- 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.
- 9- Shabanova S, Ananieva LP, Alekberova ZS. Ovarian function and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2008; 26(3):436-41.
- 10- Medeiros MM, Silveira VA, Menezes AP, Carvalho RC. Risk factors for ovarian failure in patients with systemic lupus erythematosus. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 1561 - 68.
- 11- Schaller J. Lupus in childhood. *Clin Rheum Dis* 1982; 8:219 - 28.

- 12- Elkblom-Kullberg S, Kautiainen H, Alha P. Reproductive health in women with systemic lupus erythematosus compared to population controls. *Scand J Rheumatol* 2009; 38 (5):375-80.
- 13- González LA, Pons-Estel GJ, Zhang JS. Effect of age, menopause and cyclophosphamide use on damage accrual in systemic lupus erythematosus patients from LUMINA, a multicentric US cohort (LUMINA LXIII). *Lupus* 2009; 18(2): 184-6.
- 14- Lim GS, Petri M & Goldman D (1993). Menstruation and systemic lupus erythematosus: a case-control study. *Arthritis and Rheumatism*, 36 (Suppl 5): R23
- 15- Silva CA, Hilário MO, Febrônio MV. Risk factors for amenorrhea in juvenile systemic lupus erythematosus (JSLE): a Brazilian multicentre cohort study. *Lupus* 2007; 16(7):531-6.
- 16- Moncayo-Naveda H, Moncayo R, Benz R, Wolf A & Lauritzen CH. Organspecific antibodies against ovary in patients with systemic lupus erythematosus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1989; 160: 1227 - 29.
- 17- Pasoto SG, Viana VST, Mendonça BB, Yoshinari NH & Bonfa E. Anti-corpora luteum antibody: a novel serological marker for ovarian dysfunction in systemic lupus erythematosus? *Journal of Rheumatology* 1999; 26: 1087 - 93.
- 18- Mc Dermott EM, Powell RJ. Incidence of ovarian failure in systemic lupus erythematosus after treatment with pulse cyclophosphamide. *Annals of the Rheumatic Disease* 1996; 55: 224 – 29.
- 19- Park MC, Park YB, Jung SY, Chung IH, Choi KH, Lee SK. Risk of ovarian failure and pregnancy outcome in patients with lupus nephritis treated with intravenous cyclophosphamide pulse therapy. *Lupus* 2004; 13: 569 - 74.
- 20- Broekmans FL, Kwee J, Hendricks DJ. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*. 2006;12 (6):685-718.
- 21- Domingues TS, Rocha AM, Serafini PC. Tests for ovarian reserve: reliability and utility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010; 22(4):271-6.
- 22- Kong NC. Pregnancy of a lupus patient: a challenge to the nephrologist. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 268–72.

- 23- Katsifis GE, Tzioufas AG. Ovarian failure in systemic lupus erythematosus patients treated with pulsed intravenous cyclophosphamide. *Lupus* 2004; 13, 673-78.
- 24- Janssen NM, Genta MS. The effects of immunosuppressive and anti-inflammatory medications on fertility, pregnancy, and lactation. *Arch Intern Med* 2000; 160, 610-19.
- 25- Huong LT, Wechsler B and Piette JC. Induction d'ovulation et lupus. *Ann Med Interne* 2003; 145, 45–50.
- 26- Fatnoon NN, Azarisman SM, Zainal D. Prevalence and risk factors for menstrual disorders among systemic lupus erythematosus patients. *Singapore Med J.* 2008 May; 49(5):413-8.
- 27- Wang CL, Wang F, Bosco JJ. Ovarian failure in oral cyclophosphamide treatment for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1995; 4(1): 11-4.
- 28- Gayed M, Gordon C. Pregnancy and rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46: 1634–40.
- 29- Boumpas DT, Austin HA III, 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.
- 30- Appenzeller S, Blatyta PF, Costallat LT. Ovarian failure in SLE patients using pulse of cyclophosphamide: comparison of different regimes. *Rheumatol Int.* 2008; 28(6):567-71.
- 31- Blumenfeld Z. GnRH-agonists in fertility preservation. *Curr Opin endocrinol Diabetes Obes* 2008; 15(6): 523-8.
- 32- Manger K, Windt L, Kalden JR. Prevention of gonadal toxicity and preservation of gonadal function and fertility in young women with systemic lupus erythematosus treated by cyclophosphamide: the PREGO-study. *Autoimmun Rev* 2006; 5(4):269-72.
- 33- Somers EC, Marder W, Christman GM, Ognenovski V, McCune WJ. Use of a gonadotropin-releasing hormone analog for protection against premature ovarian failure during cyclophosphamide therapy in women with severe lupus. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2761–7.

- 34- A. Raptopoulou, P. Sidiropoulos and D.T. Boumpas, Ovarian failure and strategies for fertility preservation in patients with systemic lupus erythematosus, *Lupus* 2004; 13, pp. 887 – 90.
- 35- Mendonca LL, Khamashta MA, Nelson-Piercy C, Hunt BJ, Hughes GR. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as a possible cause for reversible infertility. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39: 880–2.
- 36- Silva CA, Leal MM, Leone C, Simone VP, Takiuti AD, Saito MI, Kiss MH. Gonadal function in adolescents and Young women with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2002;11(7):419-25.
- 37- Silva CA, Deen ME, Febrônio MV. Hormone profile in juvenile systemic lupus erythematosus with previous or current amenorrhea. *Rheumatol Int* 2011 Aug; 31(8):1037-43.
- 38- Love PE and Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 1990;112: 682-98.
- 39- Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Automimmun* 2000; 15: 145-51.
- 40- Danowski A, Kickler TS, Petri M. Anti-beta2-glycoprotein I: prevalence, clinical correlations, and importance of persistent positivity in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2006; 33:1775-9.
- 41- Swadźba J, Iwaniec T, Szczeklik A, Musiał J. Revised classification criteria for antiphospholipid syndrome and the thrombotic risk in patients with autoimmune diseases. *J Thromb Haemost* 2007; 5:1883-9.
- 42- Lavallo C, González-Bárcena D, Graef A, Fraga A. Gonadotropins pituitary secretion in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1984 April-Jun; 2 (2): 163-5.
- 43- Blumenfeld Z, Shapiro D, Shteiberg M, Avivi I, Nahir M. Preservation of fertility and ovarian function and minimizing gonadotoxicity in young women with systemic lupus erythematosus treated by chemotherapy. *Lupus* 2000; 9 (6): 401-5.
- 44- Trakakis E, Loghis C, Laggas D, Simeonides G. Successful pregnancies with assisted reproduction supported with prednisolone, acetylsalicylic acid and

high progesterone doses in a lupus patient. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2007; 34 (4): 212 – 4.

- 45-** Browne H, Armstrong A, Decherney A, Babb R, Illei G, Segars J, Pavletic S. Assessment of ovarian function with anti-Müllerian hormone in systemic lupus erythematosus patients undergoing hematopoietic stem cell transplant. *Fertil Steril*. 2009 Apr; 91(4):1529-32.
- 46-** Lawrenz B., Henes JC, et al. Impact of systemic lupus erythematosus on ovarian reserve in premenopausal women – evaluation using anti-mullerian hormone. *Lupus* 2011 July; 0, 1-5.

ANEXOS

ANEXO I

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO ACR 1982, REVISADOS EM 1997

Critério*	Definição
1. Eritema Malar	Eritema fixo, plano ou elevado, sobre as eminências malares e que tende a respeitar as pregas nasolabiais.
2. Lesão Discóide	Placas eritematosas sobrelevadas, com descamação queratótica e obstrução folicular; cicatrização atrófica pode ocorrer em lesões antigas.
3. Fotossensibilidade	Exantema cutâneo, resultado de reação anormal da pele à luz solar, relatado por paciente ou observado por médico.
4. Ulceração mucosa	Ulceração oral ou nasofaríngea, geralmente indolor, observada por médico.
5. Artrite não erosiva	Artrite envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor à palpação, edema ou derrame articulares.
6. Serosite	a) Pleurite: história convincente de dor pleurítica ou atrito pleural auscultado por médico ou evidência de derrame pleural. OU b) Pericardite: documentada por ECG, presença de atrito pericárdico ou evidência de derrame pericárdico.
7. Nefrite	a) Proteinúria persistente >0,5 g/dia ou >3+ OU b) Cilindros celulares: granulosos, hemáticos ou mistos
8. Alteração hematológica	a) Anemia hemolítica: com reticulocitose OU b) Leucopenia: <4.000/mm ³ em duas ou mais ocasiões OU c) Plaquetopenia: <100.000/mm ³ em duas ou mais ocasiões
9. Alteração neurológica	a) Convulsões: na ausência de uma causa, como drogas ou patologias metabólicas OU b) Psicose: na ausência de uma causa, como drogas ou distúrbios metabólicos

10. Marcadores imunológicos

a) Anticorpo Anti-DNA nativo em títulos anormais OU

b) Anticorpo anti-Sm positivo OU

c) Anticorpos antifosfolípides baseados em: nível sérico anormal de anticardiolipina, frações IgM ou IgG, ou teste positivo para anticoagulante lúpico, utilizando método padrão, ou prova sorológica falsamente positiva para sífilis por pelo menos 6 meses e confirmada pela reação com antígeno treponêmico hemaglutinação passiva, utilizando hemácias recobertas com antígenos treponêmicos.

11. Anticorpo antinuclear

Título anormal de anticorpo antinúcleo por imunofluorescência ou por teste equivalente, em qualquer fase e na ausência de drogas que causam síndrome de “lúpus induzido por droga”

***A identificar pacientes com LES para estudos clínicos, deve-se ter um mínimo de 4 dos 11 critérios acima , de forma seriada ou simultânea, durante qualquer intervalo da observação.**

ANEXO II

QUESTIONÁRIO PARA CÁLCULO DO ESCORE DE DANO ORGÂNICO (SLICC)

ITEM	ESCORE
1. Alteração Ocular – qualquer olho, avaliação clínica	
a) Catarata	1
b) Lesão Retiniana ou atrofia ótica	1
2. Alteração Neuropsiquiátrica	
a) Alteração cognitiva (p.ex. déficit de memória, dificuldade de cálculo, baixa concentração, dificuldade de falar ou escrever) ou psicose	1
b) Convulsão necessitando de terapia por mais de 6 meses	1
c) Acidente vascular cerebral em qualquer momento (escore 2 se > 1 evento)	1 (2)
d) Neuropatia periférica ou craniana	1
e) Mielite transversa	1
3. Alteração Renal	
a) Ritmo de filtração glomerular estimado ou medido < 50%	1
b) Proteinúria $\geq 3,5$ gramas/24h	1
c) Insuficiência renal terminal	3
4. Alteração Pulmonar	
a) Hipertensão pulmonar (aumento de ventrículo direito ou hiperfonese 2° bulha)	1
b) Fibrose pulmonar (ao exame físico ou radiográfico)	1
c) Pulmão retraído (ao exame radiográfico)	1
d) fibrose pulmonar (ao exame radiográfico)	1
e) Infarto pulmonar (ao exame radiográfico)	1
5. Alteração Cardiovascular	
a) Angina OU bypass coronariano	1
b) Infarto do miocárdio (escore 2 se > 1 evento)	1 (2)
c) Miocardiopatia (disfunção ventricular)	1
d) doença valvular (sopro diastólico ou sistólico >3/6)	1
e) Pericardite por 6 meses OU pericardiectomia	1
6. Doença Vascular Periférica	
a) Claudicação por 6 meses	1

- | | |
|--|-------|
| b) Perda tecidual pequena (polpa digital) | 1 |
| c) Perda tecidual significativa (ex. perda digital ou membro) (escore 2 se >1 sítio) | 1 (2) |
| d) Trombose venosa com edema, ulceração ou estase venosa | 1 |

7. Alteração Gastrointestinal

- | | |
|---|-------|
| a) Infarto ou ressecção intestinal abaixo do duodeno, baço, fígado ou vesícula biliar, por qualquer causa (escore 2 se > 1 sítio) | 1 (2) |
| b) Insuficiência mesentérica | 1 |
| c) Peritonite crônica | 1 |
| d) Estenose ou cirurgia do trato gastrointestinal superior em qualquer momento | 1 |

8. Lesão Musculoesquelética

- | | |
|---|-------|
| a) Atrofia ou fraqueza muscular | 1 |
| b) Artrite erosiva ou deformante (inclusive deformidades redutíveis, excluindo necrose avascular) | 1 |
| c) Osteoporose com fratura ou colapso vertebral (excluindo necrose avascular) | 1 |
| d) Necrose avascular (escore 2 se mais de 1 sítio) | 1 (2) |
| e) Osteomielite | 1 |

9. Lesão de pele

- | | |
|---|---|
| a) Alopecia crônica cicatricial | 1 |
| b) Cicatriz extensa em outro local além de couro cabeludo e polpa digital | 1 |
| c) Ulceração (excluindo trombose) por > 6 meses | 1 |

10. Falência Gonadal Prematura (antes dos 40 anos de idade) 1

11. Diabetes Melito (independente do tratamento) 1

12. Malignidade (excluindo displasia) (escore 2 se mais de 1 sítio) 1 (2)

* Conforme definição do SLICC (Systemic Lúpus International Collaborating Clinics), dano é definido como presença de alterações irreversíveis não relacionadas à inflamação ativa, ocorrendo a partir do início do LES, aaliada por abordagem clínica e presente por, pelo menos, 6 meses. Episódios repetidos devem ocorrer após no mínimo 6 meses para escore 2. A mesma lesão não pode ser considerada 2 vezes.

ANEXO III

ÍNDICE DE AFERIÇÃO DA ATIVIDADE DO LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (SLEDAI)

PONTOS	MANIFESTAÇÃO	DEFINIÇÃO
8	Convulsão	Início recente. Excluindo causas metabólicas, infecciosas ou medicamentos
8	Psicose	Habilidade funcional alterada devido a perturbações graves na percepção da realidade. Incluem alucinações, incoerência, associações frouxas, conteúdo do pensamento pobre, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico. Excluindo uremia ou causas medicamentosas.
8	Síndrome orgânica cerebral	Alteração da função mental com perda da orientação, memória ou inteligência, com início súbito e flutuante. Inclui redução da consciência com perda da atenção além de pelo menos 2 dos seguintes: distúrbio da percepção, discurso incoerente, insônia ou sonolência diurna, aumento ou redução da atividade psicomotora. Excluindo causas metabólicas, infecciosas ou medicamentosas.
8	Distúrbio visual	Alterações retinianas 2° ao LES. Incluindo Corpos citóides, hemorragia retinianas, exsudato seroso ou hemorrágico na coróide, ou neurite óptica. Excluindo hipertensão, infecção ou causas medicamentosas.
8	Alteração de par craniano	Início recente de neuropatia motora ou sensitiva envolvendo pares cranianos.
8	Cefaléia lúpica	Cefaléia intensa persistente: tipo enxaqueca, mas não responsiva a analgesia intensa com narcóticos.
8	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos dolorosos nos quirodáctilos, infartos periungueais, hemorragias em lascas, ou comprovação de vasculite por biópsia ou arteriografia.
8	Acidente vascular cerebral	Acidente(s) vascular cerebral recente. Excluindo aterosclerose.
4	Miosite	Dor ou fraqueza muscular proximal, associada a elevação da creatinofosfoquinase/aldolase ou alterações eletroneuromiográficas ou biópsias evidenciando miosite.
4	Artrite	Mais de 2 articulações dolorosas e sinais de

		inflamação (p.ex. edema, eritema, calor local).
4	Cilindros urinários	Cilindros granulares, hemáticos ou mistos.
4	Hematúria	> 5 eritrócitos/menor campo. Excluindo nefrolitíase, infecções ou outras causas.
4	Proteinúria	> 0.5 grama/24 horas. Início ou aumento recente de proteinúria maior que > 0.5 grama/24 horas.
4	Piúria	> 5 leucócitos/menor campo. Excluindo infecções.
2	Rash cutâneo	Início recente ou recorrência de rash cutâneo inflamatório.
2	Alopécia	Início ou recorrência de perda capilar anormal, difusa ou irregular.
2	Úlcera mucosa	Início ou recorrência de ulcerações orais ou nasais.
2	Pleurite	Dor pleurítica com atrito, derrame ou espessamento pleural.
2	Pericardite	Dor pericárdica com pelo menos um dos seguintes: Atrito pericárdico, derrame pericárdico, ou alteração do ECG.
2	Complemento consumido	Redução do CH50, C3 ou C4 abaixo do limite inferior da normalidade para o teste laboratorial.
2	Aumento do anti-DNA	> 25% ligação por imunoensaio ou maior que a variação normal para o teste laboratorial.
1	Febre	> 38°C. Excluindo causas infecciosas.
1	Trombocitopenia	<100.000 plaquetas/mm ³ .
1	Leucopenia	< 3.000 leucócitos/mm ³ . Excluindo efeito medicamentoso.

_____ ESCORE TOTAL (soma dos valores próximos as descrições de manifestações)

Surto de atividade leve a moderado	Surto de atividade severo
Aumento do SLEDAI para > 3	Mudança do SLEDAI >12
Início ou piora de lesões discóides, fotossensibilidade, lúpus profundo, vasculite cutânea, lupus bolhoso, pleurite, artrite, úlceras nasofaríngeas, pericardite, febre (LES)	Início ou intensificação de manifestações neurológicas, vasculite, nefrite, miosite, Plaquetas < 60.000, Hb<7% ou redução da HB >3%, necessidade de aumento dobra a dose regular de prednisona ou dose diária de prednisona >0.5 mg/kg/dia.
Aumento na dose de prednisona, mas não maior que >0.5mg/kg/dia	Prednisona >0.5mg/kg/dia
Acréscimo de antiinflamatório não hormonal ou antimalárico	Início de citotóxico, azatioprina, metotrexate, hospitalização (LES)

Status da doença reumática

Escore atividade de doença (SLEDAI): 39) Preenchimento do protocolo |__|__|DATA |__|__|__|__|__|

40) Coleta de sangue |__|__|DATA |__|__|__|__|__|

41) Na época da menopausa |__|__|DATA |__|__|__|__|__|

Escore de dano orgânico (SLICC/ACR-DI):

42) Na data da coleta de sangue |__|__|

DATA |__|__|__|__|__|

Síndrome Anticorpo antifosfolípide

SAAF 43) |__| 1.Sim |__| 2.Não

TROMBOSE VASCULAR: Trombose Venosa |__| 1.Sim |__| 2..Não |__| 3. Não sabe DATA |__|__|__|__|__|

Trombose Arterial |__| 1.Sim |__| 2..Não |__| 3. Não sabe DATA |__|__|__|__|__|

Trombose de pequenos vasos |__| 1.Sim |__| 2..Não |__| 3. Não sabe DATA |__|__|__|__|__|

MORBIDADE GESTACIONAL: Morte fetal (>= 10 semana) |__| 1.Sim |__| 2..Não DATA |__|__|__|__|__|

Prematuridade (< 34 semanas) |__| 1.Sim |__| 2..Não DATA |__|__|__|__|__|

Abortamentos (3 ou + com < 10 semanas) |__| 1.Sim |__| 2..Não DATA |__|__|__|__|__|

SOROLOGIA:

Anticardiolipina IgM 1° dosagem |__|__| DATA |__|__|__|__|__|

2° dosagem |__|__| DATA |__|__|__|__|__|

Anticardiolipina IgG 1° dosagem |__|__| DATA |__|__|__|__|__|

2° dosagem |__|__| DATA |__|__|__|__|__|

Anticoagulante lúpico TCK 1° dosagem |__| | DATA |__| |__| |__| |__| |__| |

2° dosagem |__| | DATA |__| |__| |__| |__| |__| |

TVVRd 1° dosagem |__| | DATA |__| |__| |__| |__| |__| |

2° dosagem |__| | DATA |__| |__| |__| |__| |__| |

Hexagonal 1° dosagem |__| | DATA |__| |__| |__| |__| |__| |

2° dosagem |__| | DATA |__| |__| |__| |__| |__| |

Histórico ginecológico

42) Presença de menarca |__| 1.Sim |__| 2.Não 45) Idade da menarca (anos) |__| |

45) Fluxo menstrual regular |__| 1.Sim |__| 2.Não 47) Duração do ciclo regular (dias) |__| |

48) Duração do fluxo menstrual (dias) |__| | 49) Fluxo menstrual irregular |__| 1.Sim |__| 2.Não

50) Se irregular, qual é o FSH (mUI/ml) |__| |__| |__| | 51) Gestações prévias |__| 1.Sim |__| 2.Não

52) Número de filhos vivos |__| | 53) Abortamentos prévios |__| 1.Sim |__| 2.Não

54) Quantos abortamentos |__| | 55) Perdas fetais |__| 1.Sim |__| 2.Não

56) Idade gestacional da perda fetal (Semanas) |__| | 57) Valores de FSH atual (mUI/ml) |__| |

58) Valores de FSH no momento da coleta do soro (mUI/ml) |__| |

59) História de Amenorréia |__| 1.Sim |__| Não 60) Menopausa |__| 1.Sim |__| 2.Não

61) Idade da menopausa (meses) |__| | 62) Uso atual de estrógeno (ACO) |__| 1.Sim |__| 2.Não

63) Uso atual de análogos do GnRH |__| 1.Sim |__| 2.Não

64) Uso de terapia de reposição hormonal |__| 1.Sim |__| 2.Não

65) História prévia de cirurgias ginecológicas ou pélvicas: |__| 1.Sim |__| 2.Não

66) Se cirurgia ginecológica. Qual? |__| 1.Histerectomia |__| 2.Salpingotripsia |__| 3. Ooforectomia unilateral
|__| 4.Ooforectomia bilatera |__| 5.Cirurgia conservadora do ovário unilateral |__| 6.Cirurgia conservadora do
ovário bilateral

Valores de FSH e AMH

Valores de AMH (ng/ml): |__| |__| |__| | 1° mês

Valores de FSH (mUI/ml): |__| |__| |__| | 1° mês

Resultado do US pélvico

US pélvico : Data do exame |__| |__| |__| |__| | Dia do ciclo, no qual foi feito o US |__| |

N° folículos ovário Direito |__| |__| |__| | N° de folículos ovário Esquerdo |__| |__| |__| |

Espessura endometrial (mm) |__| |__| |__| |

ANEXO V INSTRUMENTO PARA COLETA DOS DADOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

*Avaliação dos fatores preditivos de falência ovariana prematura em pacientes com Lúpus
Eritematoso Sistêmico*

Prezada Senhora,

Gostaria de convidá-la a participar de um estudo científico que irá avaliar a função ovariana das pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico com o objetivo de identificar as pacientes com maior risco de apresentar falência prematura da função ovariana.

I- INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

O objetivo desse estudo é avaliar quais são as pacientes lúpicas que têm maior risco de ter perda da função ovariana pelo lúpus e quais são as características destas pacientes relacionadas com a perda da função ovariana. O estudo terá 2 fases. Na 1º fase o pesquisador fará uma revisão do prontuário médico da paciente preenchendo dados gerais sobre o histórico da doença. Na 2º parte serão coletadas amostras de sangue das pacientes para realização de exames e serão realizados exames de ultra-som a cada 6 meses para investigação da função ovariana. O acompanhamento da paciente com a equipe de reumatologia não sofrerá qualquer interferência pelo fato da paciente estar participando do estudo.

II- SIGILO DOS DADOS

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a estas informações que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

III- BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Este estudo trará informações importantes que poderão ter aplicação direta na terapêutica. O melhor conhecimento dos fatores que interferem na função ovariana das pacientes com Lúpus permitirá selecionar melhor aquelas que encontram-se sob maior risco assim com ajudará a saber quando a falência ovariana estiver prestes a ocorrer. Isto poderá proporcionar a seleção de pacientes que se beneficiariam do uso de protetores ovarianos.

IV- RISCOS

O estudo não acrescenta nenhum risco às pacientes, uma vez que não exerce nenhuma influência ou modificação do tratamento. As únicas intervenções realizadas serão a coleta de amostras sanguíneas, além das que já habitualmente são coletadas e a realização de ultrassonografia pélvica.

V- RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

Não está prevista qualquer forma de remuneração para as voluntárias. Todas as despesas específicas relacionadas com o estudo são de responsabilidade do Laboratório de Reprodução Humana da Universidade Federal de Minas Gerais. O estudo não acarretará nenhuma despesa extra às voluntárias, sendo que as coletas sanguíneas e a realização da ultrassonografia pélvica serão programadas para dias em que a paciente já teria a necessidade de se locomover até o ambulatório de Reumatologia para consulta médica regular

VI- DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar justificar-se. A aceitação ou não da participação neste estudo não influenciará no seu tratamento. Não será realizado qualquer tipo de manipulação, experimento ou intervenção direta com o paciente, exceto a coleta de amostras de sangue periférico (10ml por coleta, volume equivalente a 2 colheres de sopa) e realização de ultrassonografia pélvica.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu,, voluntariamente concordo que seja coletada amostra sanguínea para dosagem de hormônio anti-mulleriano e inibina B e com a realização de ultrassonografia pélvica, para fins de pesquisa científica no Laboratório de Reprodução Humana da Universidade Federal de Minas Gerais. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo à minha saúde ou ao tratamento.

Belo Horizonte, __/__/__

Assinatura do voluntário: _____

Nº identidade: _____

Contatos:

- Pesquisador Responsável: Olívio Brito Malheiro: 9138-8106/97978106
- Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – Sala 2005 – CEP: 31270-910 – BH – MG – Telefax: (031) 34094592 – email: coep@prpq.ufmg.br
- AMBULATÓRIO DE REUMATOLOGIA DO HC/UFMG: 34099532

ANEXO VI
CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (COEP/UFMG)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 567/08

Interessado(a): Profa. Gilda Aparecida Ferreira
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 03 de dezembro de 2008, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação dos fatores preditivos de falência ovariana prematura em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG