



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
**PERFIL HORMONAL, MARCADORES IMUNOLÓGICOS E ATIVIDADE DA
DOENÇA EM MULHERES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Fabiane Tiskievicz

Orientador: Prof. Dr. Poli Mara Spritzer

Porto Alegre, janeiro de 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: ENDOCRINOLOGIA

Fabiane Tiskievicz

**PERFIL HORMONAL, MARCADORES IMUNOLÓGICOS E ATIVIDADE DA
DOENÇA EM MULHERES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas: Endocrinologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Poli Mara Spritzer

**Porto Alegre
2008**

Este estudo foi realizado na Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia e no Ambulatório de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com o apoio financeiro das seguintes instituições:

FAPERGS

FIPE/HCPA

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada aos meus pais, João e Suzana, e à minha avó, Araci.

AGRADECIMENTOS

Às pessoas que, por seu valor, me auxiliaram a cumprir mais este percurso:

À prof. Dra Poli Mara Spritzer, minha orientadora, pela competência, dedicação e carinho.

Ao Prof. Ricardo Machado Xavier, pela sua eterna disponibilidade e gentileza, que tanto me auxiliou durante a realização deste trabalho.

À Prof Dra Elaine Sangali, por ter dado início a este projeto e tanto ter contribuído para a sua execução.

Aos amigos Luiz Cezar Vilodre, Gislaine Krolow Casanova e Maria Augusta Maturana, por suas palavras de incentivo e carinho demonstrado durante nosso convívio.

Aos demais amigos do ambulatório de endocrinologia ginecológica, pela camaradagem e bons momentos que passamos juntos.

Aos amigos do Serviço de Reumatologia, pelo auxílio, amizade e carinho. Em especial à Dra Tamara Mucenic, companheira durante toda esta jornada.

À enfermeira Emi Thomé, pelo apoio nos momentos de necessidade.

À toda equipe da Zona 14, com um agradecimento muito especial ao técnico Vilmar, pelo auxílio indispensável durante as coletas de pesquisa.

Às bioquímicas, Dra Carmem Pilla e Eгна Rossato, pela colaboração na realização dos exames.

À Mirian Santa Helena, pela competência e carinho.

Às pacientes, sem as quais esta pesquisa não poderia ser realizada.

Aos meus amigos e familiares, pela compreensão dos momentos juntos dos quais tivemos que abrir mão nestes últimos tempos, pelo apoio e carinho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
ABREVIATURAS E SÍGLAS	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE FIGURAS	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico	15
1.2 Alterações em Hormônios Sexuais nas Pacientes com Lúpus	20
1.2.1. Estrogênio	22
1.2.2 Androgênios	26
1.2.2.1 Testosterona	26
1.2.2.2 Dehidroepiandrosterona (DHEA) e Sulfato de DHEA (DHEA-S)	27
1.2.3. Progesterona	28
1.2.4 GnRH	29
1.2.5 Prolactina	30
1.2.5.1 Estudos em animais	32
1.2.5.2 Estudos em humanos	35
1.3 Alterações Hormonais e anticorpos Antifosfolípídeos	38
2. OBJETIVOS	40
3. PACIENTES E MÉTODOS	40
3.1 Delinamento do Estudo	40

3.2 Fator em Estudo	40
3.3 Desfecho	40
3.4 Pacientes	40
3.4.1 População em estudo	40
3.4.2 Critérios de inclusão	41
3.4.3 Critérios de exclusão	41
3.5 Fluxograma	41
3.6 Avaliação Clínica	42
3.7. Avaliação Laboratorial	43
3.7.1 Coleta de Sangue e Preparo das Amostras	43
3.7.2 Dosagens Laboratoriais	43
3.8 Análise Estatística	45
3.8.1 Cálculo do Tamanho Amostral	45
3.8.2 Análise dos dados	45
3.9 Considerações éticas	46
4. RESULTADOS	47
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. ANEXOS	81
a. Termo de consentimento livre e esclarecido	
b. Questionários/Formulários	

RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença auto-imune de marcada predileção pelo sexo feminino, em uma proporção 9:1, afetando principalmente mulheres no seu período de vida reprodutivo. Este desbalanço na incidência da doença entre os sexos tem levado vários pesquisadores a investigar a relação entre os gêneros e a influência dos hormônios sexuais nesta doença.

O presente trabalho visou obter um perfil do padrão hormonal encontrado em pacientes femininas com LES, tentando correlacionar os níveis hormonais com a atividade da doença e vários marcadores imunológicos. Para isso foi realizado um estudo transversal não controlado.

Foram estudadas 72 pacientes, em idade reprodutiva, com diagnóstico de LES pelos critérios do “American College of Rheumatology”, sem doença autoimune sobreposta, acompanhadas no Serviço de Reumatologia do Hospital de clínicas de Porto Alegre, alocadas durante consulta de rotina.

Foi definido como atividade da doença índices do “Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index” (SLEDAI) maior ou igual a 4. Trinta e duas pacientes apresentavam doença ativa e 40 pacientes se apresentavam sem atividade da doença. O grau de atividade do LES no grupo de pacientes com doença ativa foi considerado baixo a moderado, com mediana de atividade aferida pelo SLEDAI de 7 pontos. A frequência de hiperprolactinemia observada na amostra total foi de 25%, no entanto, não foi observada associação entre os níveis de prolactina e a atividade da doença. Os níveis de androgênios foram menores nas pacientes com doença ativa, em comparação com o

grupo sem atividade do LES, e este resultado sofreu influência do uso de corticoesteróides por estas pacientes. Não houve diferença entre a escala de dano aferida pelo SLE International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology Damage Index (SLICC) e a presença de anticorpos anti-ENA nos dois grupos. Pacientes com presença de anticorpos anti-RNP apresentavam níveis mais altos de prolactina ($p=0,004$) e estradiol ($p=0,039$) do que as pacientes com ausência deste anticorpo. A presença de FAN se correlacionou positivamente com os níveis de prolactina em nosso estudo, como já havia sido demonstrado na literatura.

A presença de anticorpos anticardiolipina associou-se com níveis mais baixos de estradiol ($p=0,015$), assim como de S-DHEA ($p=0,047$), sugerindo um estado hipoestrogênico associado à presença destes anticorpos. Mais estudos devem ser realizados, a partir deste, para averiguar melhor esta associação, tendo em vista ao pior prognóstico acrescido pela síndrome antifosfolípides para as pacientes.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease with strong predilection to females, in a 9:1 ratio, and peak incidence during the reproductive years. This disbalance on incidence between sexes, led many researchers to investigate the relation between gender and sex hormones in this disease.

In this cross-sectional, nocontrolled study the hormonal profile was evaluated in SLE women and correlated with immunological markers and with the SLE activity index (SLEDAI).

Seventy-two women, at reproductive age, attending the Division of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, were enrolled in the study. They were classified as presenting SLE by the American College of Rheumatology criteria and had no overlapping autoimmune disease.

A SLEDAI index greater or equal to four was considered as active SLE. Thirty two patients had active and 40 had inactive SLE. The SLE activity index in the active group was low or moderate, with median SLEDAI equal to seven. Twenty five percent of the patients had hyperprolactinemia, however, no association between prolactin and disease activity was observed. The androgen levels were lower in patients with activity disease, in comparison with the group without activity. This result was dependent on the use of corticosteroids in these patients.

No significant differences in damage scale by SLE International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology Damage Index (SLICC) were observed between the groups. The presence of anti-ENA antibodies were not else related with the

activity of SLE. Patients with anti-RNP antibodies had greater levels of prolactin ($p=0,004$) and estradiol ($p=0,039$). The presence of ANA was positively correlated with prolactin levels, as previously published.

The presence of anticardiolipin antibodies was associated with lower levels of estradiol ($p=0,015$) and S-DHEA ($p=0,047$), suggesting the existence of a hypoestrogenic state related to the presence of these antibodies. Additional studies are needed in order to clarify these findings and their clinical relevance on the prognosis of SLE.

ABREVIATURAS E SÍGLAS

LES = Lúpus Eritematoso Sistêmico
MHC = Complexo maior de histocompatibilidade
HLA = Antígeno leucocitário humano
ENA = *Extractable nuclear antigens*
SNC = Sistema nervoso central
dsDNA = DNA de dupla hélice
RNP = ribonucleoproteína
ECG = Eletrocardiograma
FAN = Fator antinuclear
SLEDAI = *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*
SAF = Síndrome antifosfolípida
aAFL = anticorpo antifosfolípico
aCL = anticardiolipina
LA = Lúpus anticoagulante
antiβ 2-GPI = Antiglicoproteína I
TH2 = *T helper 2*
TH1 = *T helper 1*
AR = artrite reumatóide
ACO = anticoncepcional oral combinado
TH = Terapia hormonal
LH = hormônio luteinizante
DHEA = Dehidroepiandrosterona
DHEA-S = sulfato de dehidroepiandrosterona
SELENA = *Safety of Estrogen in Lupus Erythematosus National Assessment*
RR = risco relativo
DIU = dispositivo intra-uterino
ERs = receptores de estrogênio
RNA_m = RNA mensageiro
IgG = Imunoglobulina G
IgM = Imunoglobulina M
GnRH = Hormônio liberados das gonadotrofinas
NK = *Natural Killer*
KDa = Kilodaltons
PRL = prolactina
NZB/NZW = *New Zealand Black/White*
ECLAM = *European Consensus Lupus Activity Measurement*
IRMA = análise imunoradiométrica
DCE = Depuração da creatinina endógena
EQU = Exame comum de urina
AVC = acidente vascular cerebral
GI = gastrointestinal
TVP = trombose venosa profunda
IA = insuficiência adrenal
GH = hormônio do crescimento
RNM = Ressonância nuclear magnética
HCPA = Hospital de Clínicas de Porto Alegre

LISTA DE TABELAS

. LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Critérios revisados do “American College of Rheumatology” para a classificação do LES 18	
Tabela 2 - Doenças auto-imunes associadas com hiperprolactinemia:(1)	31
Tabela 3 - Descrição amostral do grupo de pacientes com LES participantes do estudo, estratificadas pelo índice de atividade da doença (SLEDAI) em doença ativa ou não ativa.	49
Tabela 4 - Perfil hormonal das pacientes com LES com doença ativa (SLEDAI \geq 4) e sem doença ativa (SLEDAI $<$ 4)	50
Tabela 5 - Concentrações hormonais em mulheres portadoras de LES, nos grupos de usuárias de ACO, não usuárias de ACO durante a fase folicular precoce (FFP) e não usuárias em outro período do ciclo menstrual (OP).	52
Tabela 6 - Regressão logística tendo como variável independente os níveis hormonais e como variável independente a atividade do LES	53
Tabela 7 - Correlação entre as dosagens hormonais e o índice de dano (SLIC), Tempo de doença, e FAN em mulheres portadoras de LES.	53
Tabela 8 - Características clínicas das pacientes com LES, segundo a presença ou não de anticorpos anticardiolipina.	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição dos índices de SLEDAI em pacientes com doença ativa (SLEDAI \geq 4) e sem doença ativa (SLEDAI $<$ 4). 48
- Figura 2** - Níveis de prolactina e estradiol em mulheres com LES, com doença ativa e sem doença ativa. 51
- Figura 3** - Níveis de androgênios testosterona (pg/ml) e S-DHEA (μ g/ml), de acordo com a atividade da doença. 51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico:

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), é uma doença crônica auto-imune, mediada por imunocomplexos, que afeta vários órgãos e sistemas, apresentando períodos de remissão e exacerbações.

Possui maior prevalência entre mulheres jovens, com pico de incidência entre o início da adolescência até o início dos 40 anos. É mais prevalente em mulheres do que em homens (em uma relação 9:1) e é mais comum em certos grupos étnicos, como pessoas de descendência africana ou asiática. A prevalência estimada de LES na população é de 27,7/100mil, chegando a um máximo de 206/100mil em mulheres afro-caribenhas (2).

A exata etiologia do LES ainda é desconhecida e precisa ser elucidada. Sua gênese é provavelmente multifatorial, com uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais (2, 3).

Muitos genes diferentes contribuem para a suscetibilidade à doença. Os genes do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) têm sido os mais estudados por sua relação com o LES em humanos. Estudos revelam que a susceptibilidade para o LES envolve polimorfismos no HLA (antígeno leucocitário humano) classe II, o qual também é associado com a presença de anticorpos anti-ENA (Extractable nuclear antigens). e anti-DNA e HLA classe III (4)

O LES mostra uma agregação familiar forte, com uma frequência aumentada entre parentes de primeiro grau e alta concordância entre gêmeos idênticos. Além disso, pode coexistir com história familiar de outras doenças auto-imunes órgão-específicas, como tireoidites, anemia hemolítica e púrpura trombocitopênica. No entanto, muitos casos são também esporádicos, sem predisposição genética identificável (4).

A doença é muito variável em severidade, indo de casos leves, que podem até passar despercebidos, até casos muito severos, debilitantes e potencialmente letais, acarretando danos funcionais e conseqüências sociais, com grande prejuízo na qualidade de vida dos pacientes (3).

As manifestações clássicas são eritema facial em “asa de borboleta” e artrite, mas esta apresentação não é a mais comum. Sintomas não específicos como fadiga, mal-estar, úlceras orais, poliartralgia, fotossensibilidade, linfadenopatia, dor torácica, cefaléia, parestesias, fenômeno de Raynaud, perda de cabelos, olhos e boca seca podem ser os primeiros apresentados por estas pacientes (2).

O LES afeta também outros órgãos, podendo causar glomerulonefrite, vasculite sistêmica, serosite (pleurite ou pericardite), assim como anemia hemolítica, trombocitopenia e envolvimento do sistema nervoso central (SNC). Cinquenta por cento dos pacientes com LES apresentam lesão permanente em órgão-alvo (3).

Vários tipos de anticorpos são encontrados em pacientes com LES. Os anticorpos anti-ENA incluem o anti-Ro (SS-A), anti-La (SS-B), anti-ribonucleoproteínas (RNP) e anticorpo de Smith (anti-Sm). O anti-Sm e anti-dsDNA são específicos para LES, os demais podem ser encontrados em pacientes com LES, mas não são específicos para esta doença (3, 5).

O anticorpo antinuclear (FAN) se apresenta em virtualmente todos os pacientes com LES (95%), os 5% restantes possuem FAN negativo mas anticorpo anti-Ro (SSA) positivo sendo o diagnóstico de LES improvável na ausência destes anticorpos. Títulos elevados de anti-DNA de dupla hélice (anti dsDNA) se correlacionam com a atividade da doença no LES e costumam estar associados com exacerbações de nefrite em pacientes com esta patologia (5).

A presença de determinado grupo de anticorpos parece ter associação com fenótipos distintos da doença, sendo associados com diferentes cursos clínicos e predição de dano em órgão alvo (6).

O diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico segue, em geral, os critérios de classificação da doença desenvolvidos pelo American College of Rheumatology (7), os quais são detalhados na tabela 1. Pacientes que apresentem quatro ou mais destes critérios são classificados com diagnóstico de LES. Os critérios podem não se apresentar simultaneamente, mas se acumularem ao longo dos anos.

Atualmente, a grande maioria dos estudos envolvendo LES utilizam esses critérios para inclusão dos pacientes (7).

Tabela 1. Critérios revisados do “American College of Rheumatology” para a classificação do LES (7, 8).

<i>Rash</i> malar	Eritema fixo, plano ou elevado, sobre as eminências malares, tendendo a poupar o sulco nasolabial.
<i>Rash</i> Discóide	Placas eritematosas elevadas com escamas ceratóticas aderentes e (folicular plugging). Escaras atróficas podem ocorrer em lesões antigas.
Fotossensibilidade	Rash na pele secundário à reação não usual a luz solar, relatado pelo paciente ou observado pelo médico.
Úlceras orais	Ulceração oral ou nasofaríngea, usualmente indolor, observada pelo médico.
Artrite	Artrite não erosiva, envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor, edema ou derrame articular.
Serosite	a)Pleurite: história convincente de dor pleurítica ou atrito pleural auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural ou b)pericardite: documentada por ECG ou atrito pericárdico ou evidência de derrame pericárdico.
Distúrbios Renais	a)Proteinúria persistente, maior do que 0,5g/ 24h ou maior do que +++ ou b)cilindros celulares: podem ser hemáticos, granulares, tubulares ou mistos.
Distúrbios Neurológicos	a)Convulsões ou b)psicose, não secundárias ao uso de medicações ou desordens metabólicas (como uremia, cetoacidose ou alterações de balanço hidroeletrólítico).
Distúrbios hematológicos	a)Anemia hemolítica, com reticulocitose ou b)leucopenia: menos de 4000/mm ³ em duas ou mais ocasiões ou c)linfopenia: menos de 1500/mm ³ em duas ou mais ocasiões ou trombocitopenia: menos de 100mil /mm ³ em duas ou mais ocasiões.
Distúrbios imunológicos	a)Anti-DNA em títulos anormais ou b) presença de anticorpos anti Sm ou c)sinais positivos de anticorpos antifosfolípídeos baseado em: índices anormais de anticorpos anticardiolipina (IgG ou IgM), ou presença de Lúpus anticoagulante ou Teste falso-positivo para sífilis por no mínimo seis meses e confirmado por testes treponêmicos.
FAN	Títulos anormais de Fator Antinuclear em qualquer período, na ausência e medicações associadas a “LES induzido por medicações”.

Vários métodos também vêm sendo estabelecidos para determinar a atividade da doença nos pacientes com LES, sendo desejável que um índice de atividade validado seja utilizado em estudos observacionais, assim como em ensaios clínicos e na prática clínica diária, tentando tornar as decisões terapêuticas tão objetivas quanto possível.

O instrumento mais utilizado em estudos para aferir o grau de atividade nestas pacientes é o Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), um índice global que inclui 24 critérios clínicos e laboratoriais específicos podendo a atividade da doença variar de 0 a 105 (9, 10).

Valores de SLEDAI maiores do que cinco estão associados à probabilidade de início de terapia em mais de 50% dos casos. Agudização do LES tem sido definida como um acréscimo no SLEDAI maior do que 3 pontos, mudanças de 1 a 3 pontos no índice de SLEDAI indica persistência de atividade e remissão completa é definida como SLEDAI = 0 (8). No entanto, alguns sinais de exacerbação da doença não são contemplados pelo SLEDAI, como grau leve de atividade em alguns órgãos e sistemas como anemia hemolítica e mononeurite multiplex (11).

Inicialmente descrita no contexto do LES, a síndrome antifosfolípídica (SAF) tem sido identificada em um subgrupo de pacientes com fenótipo distinto, e pode complicar várias doenças auto-imunes (2). A presença persistente de anticorpos antifosfolípeos (aAFL), incluindo anticoagulante lúpico, anticorpos anticardiolipina (aCL) e antiglicoproteína 1 (anti β 2-GPI) em pacientes com tromboembolismo arterial ou venoso ou perdas fetais recorrentes caracteriza esta síndrome. SAF primária raramente progride para LES, mas pacientes com LES que apresentam SAF tem maior morbidade e mortalidade (12).

1.2. Alterações hormonais em pacientes com LES:

A maior prevalência de LES no sexo feminino, somada ao fato de haver um aumento na incidência em mulheres após a puberdade, a reversão deste fenômeno após a menopausa e as variações da doença durante o ciclo menstrual e gestação, leva a um maior interesse em observar o papel dos hormônios sexuais nas manifestações desta doença (13, 14).

Não só os hormônios sexuais, mas também fatores genéticos específicos do gênero, como o cromossoma X, podem estar implicados no desenvolvimento do LES (15). Esta tese se baseia na observação de que o cromossoma X inclui genes que são cruciais na determinação dos níveis hormonais e na manutenção da tolerância imunológica (16).

Os níveis hormonais não só diferem entre os sexos feminino e masculino, como sofrem alterações dependentes da idade e do ciclo reprodutivo na mulher, com alguns autores tendo relacionado as manifestações do LES ao uso de anticoncepcional hormonal (17), administração de estrogênio e regimes de indução da ovulação (18).

Manifestações clínicas do LES podem se intensificar durante a gestação. No LES, a resposta imune humoral é um importante fator patogênico, podendo explicar o porque da piora desta doença durante este período da vida reprodutiva. Mudanças observadas na produção de hormônios como cortisol, progesterona, estradiol e prolactina durante a gestação, parecem influenciar no balanço entre citosinas T Hellper 1 e 2 (Th1 e Th2) (19), com ativação da resposta imune humoral e diminuição da imunidade celular (14).

No entanto, estudos mais recentes sobre o uso de terapia com estrogênios exógenos em pacientes com LES mostram resultados conflitantes (20, 21).

Tanto a menarca precoce quanto a tardia têm sido ocasionalmente associadas ao risco de desenvolver LES. Menopausa em idades mais precoces foi observada em mulheres com LES em um estudo, mas uso de terapia hormonal (TH) não foi associado a risco de desenvolver a doença (22).

A análise retrospectiva realizada através de questionários respondidos pelas pacientes sobre a incidência de LES em uma coorte de mulheres (Nurses' Health Study), analisou 164 casos incidentes de LES, encontrando uma associação entre a idade da menarca, a idade da menopausa, o uso de ACO, de TH e a incidência de LES (23).

Outro estudo retrospectivo encontrou uma taxa de mortalidade 4,5 vezes maior em mulheres que desenvolviam LES sob a vigência de taxas hormonais elevadas (até 41 anos), em comparação com o grupo que desenvolvia LES em idade mais avançada. Os parâmetros de atividade lúpica não diferiram nos dois grupos (24).

Têm sido descritas associações de LES e Síndrome de Klinefelter (cariótipo XXY) (25). O metabolismo dos hormônios esteróides (hidroxilação da estrona e oxidação da testosterona) em pacientes com esta síndrome foi semelhante ao de mulheres com LES e o tratamento com testosterona levou a melhora das manifestações clínicas do Lúpus (26).

Várias alterações no padrão hormonal têm sido identificadas nestas pacientes em relação a controles saudáveis, como elevação nos níveis de estradiol, diminuição dos níveis de androgênios e de progesterona (27), com sugestão de que os hormônios

tenham implicações na sua modulação. No entanto, só recentemente o mecanismo do envolvimento dos hormônios no LES vem sendo, aos poucos, elucidado.

O fato de a maioria dos estudos utilizar pequeno número de participantes com um poder epidemiológico menos sólido, as diferentes etnias estudadas, o tempo relativamente longo em que os estudos têm sido descritos, ausência de poder estatístico suficiente para testar as respectivas hipóteses e a variabilidade dos estudos individuais tem gerado controvérsias quanto a uma possível influência das concentrações séricas dos hormônios sexuais nas pacientes com LES. Ciclicidade menstrual, interconversão hormonal e mecanismos de retrocontrole endócrinos podem também ser um fator complicador na interpretação de causa e efeito e aplicação de hormonioterapia (27, 28).

1.2.1 Estrogênios:

Os estrogênios vêm sendo associados ao LES há várias décadas. No entanto, apesar de encontrar aumento nos níveis de estradiol em pacientes com LES em relação aos controles, os valores de estradiol, nestas pacientes, não estão fora dos padrões considerados normais, e as alterações no metabolismo do estrogênio são observadas tanto em mulheres quanto em homens, não exercendo o gênero influência sobre este achado (27).

O estrogênio parece estimular o processo imunológico guiado por CD4⁺ Th2 e células B, enquanto androgênios aumentam a atividade de células CD4⁺ TH1 e CD8. Doenças auto-imunes que são mediadas por linfócitos Th2 são mais prevalentes no sexo

feminino, como a tireoidite de Hashimoto, Doença de Graves, Esclerodermia e Lúpus eritematoso sistêmico (29).

O estudo *Safety of Estrogen in Lúpus Erythematosus National Assessment* (SELENA) teve seus resultados publicados em 2005. Parte do estudo avaliou o uso de TH em mulheres pós menopáusicas com LES e doença quiescente, em um estudo randomizado, duplocego, controlado por placebo. Após 12 meses de tratamento com estrogênios conjugados 0,625mg mais 5mg de medroxiprogesterona ou placebo, verificou-se que exacerbações graves foram raras nos dois grupos. No entanto, exacerbações leves a moderadas foram mais frequentes no grupo usando TH (RR = 1,34, p=0,01) (21). Já o outro braço do estudo, o qual avaliou o uso de anticoncepcional oral combinado (ACO) com etinil estradiol 30 microgramas de levonorgestrel, em comparação com o uso de progestogênio isolado (levonorgestrel) e dispositivo intra-uterino (DIU), mostrou índices de SLEDAI, freqüências de exacerbações e incidências de efeitos adversos similares em todos os grupos testados (20).

Tem sido reportado há mais de 30 anos que o metabolismo do estrogênio apresenta-se alterado em pacientes com LES. Em pacientes de ambos os sexos existe um aumento na 16 α hidroxilização da estrona, considerado estrogênio com ação mitogênica, contribuindo para a manutenção do estado inflamatório no LES por exercer influência na proliferação das células do sistema imune (30). Foi demonstrado também que a excreção renal da 16 α - hidroxiestona era aumentada em relação a um metabólito de ação estrogênica menos potente, a 2-hidroxiestona, nas pacientes com LES. Estes dados são intrigantes e sugerem que as pacientes com LES podem exibir uma resposta exagerada aos estrogênios. No entanto, estes estudos foram feitos com um número pequeno de pacientes e estudos clínicos maiores necessitam ser realizados (31, 32).

Mais recentemente, estudos que examinam os efeitos dos estrogênios na regulação das células B auto-reativas utilizaram camundongos transgênicos que expressam uma cadeia pesada de anti-DNA (R4A), permitindo a análise de uma população definida de células B DNA-reativas. Esta cadeia pode parear-se com numerosas moléculas de cadeia leve gerando anticorpos com afinidade variada ao DNA. O uso de estradiol nestes animais resulta em um aumento do anti-DNA, expansão das células B transgênicas e aumento no número de células B secretoras de anti-DNA. Além disso, imunocomplexos foram detectados nos rins dos ratos tratados com 17β -estradiol, o que sugere que o estrogênio pode sozinho induzir um fenótipo Lupus-Like nestes animais (33).

O tratamento destes ratos com estrogênio produz uma diminuição significativa na porcentagem de células B Th1 provavelmente devido à diminuição da produção de células B imaturas. No entanto, há um aumento significativo na produção de células B Th2. Esta inversão da relação Th1: Th2, induzida pelo tratamento com estrogênio, se acredita ser reflexo da aberração da seleção de células B auto-reativas, dentro do pool de células B maduras. Em suporte a isso foi observado que o tratamento com estrogênio bloqueia a apoptose mediada por receptores de células B, que se sabe ser crítico para a eliminação de células B auto-reativas (34).

Estudos têm demonstrado que alguns dos efeitos dos estrogênios nas células B podem ser bloqueados pelo uso de tamoxifeno, com prevenção da produção de anticorpos anti-DNA induzida por estrogênio e deposição de imunocomplexos nos rins. Isso sugere que drogas que possam modular a resposta estrogênica podem ter potencial terapêutico para o tratamento do LES (35).

Para exercer suas funções, o estrogênio precisa se ligar a receptores intracelulares (ERs), e regular a transcrição gênica. O papel destes receptores na imunomodulação vem se tornando o foco de estudos de imunologistas e endocrinologistas, procurando estratégias terapêuticas que possam se desenvolver baseadas no efeito específico de cada receptor (36).

Existe descrição de que receptores estrogênicos, ER α e ER β , são expressos nas células B de ratos e humanos. A presença de receptores estrogênicos reforça a idéia de que estas células podem responder diretamente a este hormônio. Após a ligação do estrogênio ao seu receptor na membrana celular, células T recrutadas por antígeno demonstram um aumento dos índices de cálcio intracelular. Interessantemente dois polimorfismos no gen ER α encontram associação com LES (37).

Em um estudo comparando pacientes com LES e controles saudáveis a expressão gênica do ER α pelos polimorfonucleares de pacientes com LES foi significativamente aumentada. Já a expressão de ER β foi diminuída nas células destes pacientes comparadas com as dos controles e houve uma correlação inversa entre a expressão de ER β RNAm e o SLEDAI. Houve também uma correlação inversa entre a presença de RNA-m para ER α e ER β e a dose de prednisolona utilizada por estes pacientes (38).

Resultados semelhantes foram encontrados por Li e McMurray(39), em que a administração de agonistas seletivos para ER α , em ratos ooforectomizados, acelerou a mortalidade, promoveu o desenvolvimento de albuminúria aumentou a produção de anticorpos anti-DNA (IgG2a, IgG2b, IgG3) e a concentração de IgG sérica, quando comparada com controles. Já a administração de agonistas seletivos para ER β , suprimiu significativamente a produção da subclasse IgG2b do anti-DNA, mas não alterou as

concentrações das demais subclasses ou do IgG total, prolongou a sobrevida e diminuiu a incidência de albuminúria, sugerindo que a ativação do ER α , tem um papel imunoestimulatório importante na modulação estrogênica do LES, enquanto o ER β parece ter papel imunossupressivo nesta doença (39) Alguns polimorfismos nestes receptores vem sendo associados à idade de diagnóstico do LES e a manifestações sistêmicas.(40)

1.2.2 Androgênios

1.2.2.1 Testosterona

Níveis baixos de androgênios têm sido observados em várias doenças inflamatórias auto-imunes, entre elas o LES, artrite reumatóide (AR) e esclerose sistêmica (15).

Segundo a metanálise publicada por Mc Murray em 2003, estudos em mulheres com LES demonstram uma supressão da testosterona sérica estatisticamente significativa nestes pacientes, em comparação com controles saudáveis (27).

Estas pacientes apresentam oxidação acelerada da testosterona, o que pode resultar em efeitos imunomodulatórios, uma vez que a testosterona suprime a produção de anticorpos anti-DNA (15).

É relatado, em pacientes com LES, um aumento da atividade da aromatase, uma enzima que faz a conversão de androgênios a estrogênios, levando a um aumento da relação estrogênio/ androgênio (30, 41).

A aromatase é uma enzima envolvida na conversão periférica de androgênios (testosterona e androstenediona) a estrogênios (estradiol e estrona). Em pacientes com LES, a atividade da aromatase avaliada na pele e no tecido subcutâneo encontrou-se elevada em relação aos controles. A atividade da aromatase varia inversamente com a atividade da doença, e os pacientes tem uma diminuição dos androgênios e aumento dos níveis séricos de estrogênio, com a atividade da aromatase mostrando correlação direta significativa com os níveis de estrogênio e podendo justificar a redução dos níveis de testosterona nestas pacientes (30).

1.2.2.2 Dehidroepiandrosterona (DHEA) e Sulfato de DHEA (DHEA-S):

A Maioria dos estudos em pacientes com LES mostram que tanto o DHEA quanto o DHEA-S são significativamente diminuídos nestes pacientes em comparação com os controles, assim como a relação androgênio/estrogênio (27).

Um estudo prospectivo realizado para avaliar a depuração renal e a excreção de esteróides em pacientes com LES e artrite reumatóide (AR) mostrou que a excreção de DHEA e androstenediona não se encontra aumentada nestes pacientes, não sendo esta a causa dos níveis reduzidos destes hormônios (42).

Estudos recentes sugerem que a administração de DHEA a pacientes com LES tem potencial terapêutico, demonstrando benefícios em pacientes com doença leve (43).

Em um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, mulheres chinesas com LES ativo (SLEDAI >2) recebendo doses de prednisona entre 0 e 10 mg/dia e doses estáveis das demais drogas utilizadas para o tratamento do LES (azatioprina, cloroquina, etc), foram randomizadas para receber DHEA, 200mg/dia (17 pacientes) ou placebo (15 pacientes), por 24 semanas. A mediana da testosterona diminuiu no grupo controle e aumentou no grupo usando DHEA. Houve redução significativa da produção de interleucina 10 nestas pacientes (uma citocina estimuladora dos linfócitos B) (44).

Outro grupo de pesquisadores utilizou DHEA em de 50 mulheres com LES leve a moderado, as quais foram acompanhadas por um ano. Houve diminuição da atividade da doença medida pelo SLEDAI e diminuição nas doses de prednisona utilizadas no tratamento (45).

1.2.3 Progesterona:

Poucos estudos têm sistematicamente examinado as concentrações de progesterona sérica em pacientes adultos com LES. As concentrações de progesterona parecem ser diminuídas em pacientes com LES (27).

1.2.4 GnRH

O Hormônio Liberador das Gonadotrofinas (GnRH) e os esteróides sexuais são fortemente implicados no desenvolvimento e modulação do sistema imunológico, tendo sido demonstrados sítios de ligação específicos para GnRH e efeito imunoestimulador deste hormônio em células deste sistema em modelos animais e humanos (46).

Genes de GnRH e GnRH- R mRNA têm sido demonstrados em linfócitos periféricos e Linfócitos B. em humanos (47).

Análogos do GnRH, utilizados em mulheres para o tratamento de endometriose, induziram aumento nas células natural Killer (NK) e incremento na atividade mitogênica das células T após um ano de seguimento. Nenhuma das mulheres nestes estudos tinha doença auto-imune (48).

O uso de agonista do GnRH em ratas castradas aumentou os níveis de anti-DNA, IgG, presença de hematúria nestes animais, não ocorrendo o mesmo em ratos machos castrados. Houve também uma diminuição na expressão do RNA mensageiro (RNA-m) para os receptores de GnRH, comparado com placebo, no baço das fêmeas, concomitantemente com aumento da expressão de receptores para IL-2 e de RNAm para $G\alpha_q/11$, uma proteína transdutora de sinal que influencia na ação do GnRH na hipófise. Estes achados sugerem uma influência do gênero nas manifestações da imunidade (49).

1.2.5. Prolactina

A prolactina é um hormônio peptídico lactogênico, secretado pela hipófise anterior, envolvido em vários processos biológicos, sendo, nos últimos anos, o hormônio mais estudado em pacientes lúpicas.

A prolactina também é produzida em tecidos extra-hipofisários, como o miométrio, decídua, linfócitos T e linfócitos B, entre outros (50). A assim chamada prolactina linfocitária, está sob controle de uma corrente promotora alternativa e se acredita ter funções autócrinas e parácrinas, encontrando-se aumentada em pacientes com LES, em comparação com pacientes sem a doença (51, 52).

Os receptores de prolactina são incluídos na superfamília de receptores de citocina e são encontrados em linfócitos, monócitos, células Natural Killer (NK) e células tímicas epiteliais (53, 54).

A prolactina humana circulante é um hormônio heterogêneo do ponto de vista de tamanho molecular, sendo a forma monomérica de 23 kDa predominante tanto em indivíduos normais como em pacientes com hiperprolactinemia sintomática. As outras formas circulantes são os dímeros de 50 kDa (*big-prolactin*) e as formas de alto peso molecular, com 150 a 170 kDa (*big-big prolactin* ou macroprolactina). A estrutura da macroprolactina é, pelo menos na maioria dos casos, relacionada à presença de imunoglobulinas circulantes que se ligam à prolactina com graus de afinidade variável, alterando suas propriedades funcionais (55). Entretanto, a patogênese deste complexo imunoglobulina-prolactina permanece desconhecida. Alguns autores identificaram anticorpos anti-prolactina em pacientes com hiperprolactinemia idiopática, onde a macroprolactina era a forma molecular predominante (56).

A presença de anticorpos anti-PRL também tem sido observada em pacientes com LES. Um trabalho avaliou a presença de hiperprolactinemia devido ao predomínio de macroprolactina em uma mulher com LES antes, durante e após a gestação, observando que a presença de macroprolactina nesta paciente estava associada com a presença de anticorpos anti-prolactina, formando um complexo IgG-PRL (57).

Estudos em pacientes com hiperprolactinemia de várias etiologias sugerem uma taxa aumentada de auto-anticorpos (incluindo antitireoideos, anti-DNA, anticardiolipina e FAN, anti-SSA e anti-SSB) sem evidência clínica de doença auto-imune (58), assim como níveis elevados de prolactina têm sido encontrados em pacientes com doenças auto-imunes, levando a uma hipótese de relação causal e possível alvo terapêutico (59).

A tabela 2 mostra as doenças autoimunes que têm sido associadas com hiperprolactinemia, de acordo com Orbach et al (1)

Tabela 2: Doenças auto-imunes associadas com hiperprolactinemia:(1)

<u>Doenças Sistêmicas</u>	<u>Doenças Órgão-específicas</u>
Lúpus Eritematoso Sistêmico	Diabetes Mellitus tipo I
Artrite Reumatóide	Doença de Graves
Esclerose Sistêmica	Tireoidite de Hashimoto
Síndrome de Sjögren	Doença de Addison
Artrite Reativa	Hipofisite Linfocítica
	Doença Celíaca
	Esclerose Múltipla
	Uveítes
	Rejeição a transplante cardíaco

A taxa esperada de hiperprolactinemia na população em geral é de 3%. As concentrações séricas de prolactina são aumentadas em pacientes com LES em relação aos controles (60), sendo que hiperprolactinemia ocorre em aproximadamente 15-31% destes pacientes, tendo sido sugerido seu uso como um biomarcador nesta doença (61).

Na metanálise publicada por Mc Murray, 21 % dos pacientes com LES tinham hiperprolactinemia, comparando-se com 3% dos controles saudáveis. Esta metanálise indica de forma consistente a presença de alterações hormonais em pacientes com LES, em comparação com controles saudáveis, apesar de não demonstrar relação de causa e efeito entre os achados e as manifestações ou predisposição para a doença (27).

Em várias doenças auto-imunes, como o LES, artrite reumatóide e tireoidite auto-imune, os índices de cortisol são inferiores ao normal. O tônus reduzido dos corticoesteróides tem um efeito permissivo nas doenças auto-imunes. O aumento dos níveis de prolactina pode acelerar a resposta imune em pacientes com baixos índices de cortisol. Corticoesteróides antagonizam o efeito estimulatório da prolactina (54). Além disso, tratamentos com Bromocriptina, um inibidor da secreção de prolactina, mostraram efeitos benéficos em LES induzido por prolactina-em ratos (62), assim como em pacientes com LES com doença leve à moderada (63).

1.2.5.1 Estudos em Animais:

Aparentemente, os hormônios podem iniciar ou acelerar um processo auto-imune, contribuindo para o “viés de gênero” no LES. Estrogênio e prolactina são considerados imunomoduladores, afetando a seleção e maturação das células B auto-reativas, assim como a secreção de anticorpos, enquanto que a progesterona parece agir como imunossupressor (64). O impacto da prolactina e do estrogênio pode ser evidenciado por sua capacidade em permitir que as células B auto-reativas escapem do mecanismo normal de tolerância e se tornem células B secretoras de anticorpos

maduros, que podem causar um LES clinicamente aparente. No entanto, o mecanismo de ação dos dois hormônios é diferente, o estrogênio aumenta a sobrevivência e ativação das células B auto-reativas com fenótipo de zona medular enquanto a prolactina induz a auto-reatividade das células B na zona folicular (15, 62).

Existem várias cepas de camundongos, geneticamente suscetíveis para o desenvolvimento de LES. New Zealand Black (NZB)/B1 têm anticorpos IgG1 para eritrócitos, IgM para DNA de cadeia simples e linfoproliferação leve, a maioria morrendo por anemia hemolítica, com a doença ocorrendo de forma mais precoce nas fêmeas em relação aos machos. Ratos NZB/NZW F1 vêm sendo usados para vários estudos sobre os níveis hormonais e as manifestações do LES. Estes animais têm altos índices de anticorpos anti-dsDNA e morrem prematuramente por glomerulonefrite mediada por imunocomplexos. As fêmeas têm uma progressão acelerada da doença em comparação aos machos. Em um estudo realizado por Walker em 1992, fêmeas desses animais receberam implantes de cápsulas contendo estradiol, 17- β estradiol ou cápsulas vazias, a fim de determinar se a mortalidade precoce nestes animais era devida à toxicidade estrogênica ou ao efeito imunomodulador dos estrogênios. As ratas tratadas com estrogênio tiveram uma sobrevivência menor, títulos de anti-DNA e níveis de prolactina superiores em relação aos controles. No momento da autópsia, 100% dos controles apresentavam-se urêmicos e com glomerulonefrite com média de lesão glomerular de 43 ± 2 . Nas ratas tratadas com etinil estradiol, 50% foram urêmicos e 5% apresentaram glomerulonefrite. No grupo tratado com 17 B-estradiol, os índices foram respectivamente de 28% e 11%. Linfoma contribuiu para a morte de 28 % dos ratos tratados com estrogênios (65).

Em outros estudos ratos com hiperprolactinemia tiveram desenvolvimento acelerado de albuminúria e níveis mais altos de anticorpos anti-DNA, independente dos níveis de estradiol, quando comparados com animais com níveis normais ou baixos de prolactina. Os níveis de IgG não foram significativamente diferentes entre os grupos. A sobrevivência foi menor nos animais com níveis altos de estradiol e prolactina e um pouco maior em animais com um índice elevado de estradiol, mas prolactina baixa. Este estudo sugere que altos índices de prolactina são associados com aceleração da imunidade nestes animais, independente dos níveis de estrogênio e que altos índices de estrogênio não exercem este efeito quando a prolactina é inibida pelo uso de bromocriptina (66).

Ratos transgênicos (R4A- γ 2B/BALB/c) foram tratados com implantes transdérmicos de 17 β - estradiol ou placebo. Metade dos ratos tratados com estradiol recebeu bromocriptina, um agonista da dopamina que age como inibidor da liberação da Prolactina, por quatro semanas após a realização do implante, com supressão dos níveis de prolactina. Os títulos de anticorpos anti-dsDNA aumentaram significativamente nos ratos tratados com estradiol em comparação com os tratados com placebo e os que receberam estradiol mais bromocriptina. Não houve diferença significativa entre os títulos séricos de anti-DNA entre os ratos que receberam placebo e os que receberam estradiol e bromocriptina, demonstrando que a bromocriptina pode abolir a ativação das células B-reativas induzida pelo estradiol, ou que a prolactina é necessária para sua ativação. Depósitos glomerulares de IgG foram encontrados em 12 dos 18 animais tratados com estradiol, em 2 dos 18 tratados com estradiol mais bromocriptina e em nenhum dos que receberam placebo. No entanto mesmo na presença de bromocriptina o estradiol leva a um aumento nas células B de ratos transgênicos (67).

Em outro estudo, o tratamento com prolactina por quatro semanas induziu um fenótipo lúpico e causou uma alteração no desenvolvimento e maturação das células B, com diminuição na população de células B transitórias e um aumento nas células B foliculares maduras e marginais em relação ao placebo, assim como houve um aumento na expressão de gene *bcl-2* nas células B, um gene anti-apoptótico que contribui para diminuir a seleção negativa e apoptose nas células B reativas. Houve também aumento no anti-DNA sérico e nos depósitos glomerulares de imunoglobulinas. Estas alterações não ocorreram na ausência de células CD4⁺ T (62).

No entanto, em um estudo realizado com ratos *knockout* para o gene da prolactina (*PRL*^{-/-}), foi observada deficiência no desenvolvimento mamário e reprodutivo, mas estes animais foram capazes de manter uma resposta imune normal seguida à exposição a antígenos (68). O mesmo grupo demonstrou, em trabalho posterior, que níveis elevados de prolactina antagonizam a apoptose em timócitos expostos a glicocorticóides *in vivo* (69).

1.2.5.2 Estudos em Humanos:

Em um estudo, 60 pacientes com LES, sendo 8 homens, 13 mulheres pós-menopáusicas e 39 pré-menopáusicas foram comparadas com 18 pacientes com outra doença autoimune e 47 indivíduos saudáveis. Os pacientes com LES e com outra doença autoimune apresentaram níveis de prolactina superiores aos controles ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$). Não houve diferença significativa nos índices de prolactina entre esses dois grupos. Em pacientes com LES houve uma correlação positiva entre os índices de

prolactina, os títulos de anti-DNA e IgG e o grau de atividade da doença aferido pelo *European Consensus Lupus Activity Measurement* (ECLAM). Todas as manifestações de doença estudadas, com exceção da leucopenia e trombocitopenia foram mais comuns em pacientes com LES. As flutuações nos níveis de prolactina durante o estudo estiveram de acordo com os níveis de anti-DNA e se correlacionaram com as modificações no grau de atividade da doença pelo ECLAM. Houve diferença nos níveis de prolactina entre pacientes pré e pós menopáusicas (70).

Em outro estudo publicado foram avaliados 78 pacientes com LES, sendo 5 homens, e 20 controles. A atividade da doença foi definida pelo LACC e seu grau de atividade quantificado pelo SLEDAI. Hiperprolactinemia, definida como PRL maior do que 20ng/ml, foi encontrada em 26,9% dos pacientes usando IRMA (análise imunoradiométrica) e 39,7% usando BA (análise biológica usando células Nb2). Os resultados obtidos pelos dois métodos se correlacionaram positivamente em todas as amostras e por ambos os métodos os níveis de prolactina se correlacionaram com o grau de atividade da doença medido pelo SLEDAI, sendo os níveis de prolactina maiores nos pacientes com doença ativa. Em pacientes com hiperprolactinemia foi encontrada uma maior prevalência de Rash malar e doença do SNC. A cloroquina inibe a prolactina *in vitro*. Neste estudo, no entanto, não se observou correlação entre o uso de cloroquina e alteração nos níveis de prolactina, nem o uso de corticóide mostrou interferir no crescimento das células Nb2 (71).

Um artigo muito interessante foi publicado em 2003, correlacionando os efeitos da terapia convencional para o tratamento do LES e níveis de prolactina. Foram estudadas 43 pacientes com diagnóstico de LES pelos critérios do American College of Rheumatology, maiores de 16 anos, sendo excluídas pacientes com insuficiência renal

crônica (IRC), insuficiência hepática, hipotireoidismo, ou que estivessem usando drogas que pudessem afetar os níveis séricos de prolactina. As pacientes tiveram o grau de atividade da doença aferido pelo SLEDAI no início do estudo e foram divididas em dois grupos: dezesseis pacientes com envolvimento cutâneo ou articular e com depuração da creatinina endógena (DCE), exame qualitativo de urina (EQU) e creatinina normais e 27 pacientes com diagnóstico de glomerulonefrite por biópsia renal, mas sem insuficiência renal ($cr < 1,3$ mg/dl e Clearance de cr > 60 ml/min). Foi utilizado um grupo controle com 36 indivíduos saudáveis. A prolactina foi dosada no início do estudo, após o tratamento e após 6 meses de uso de terapia convencional para o tratamento do LES. Neste estudo, 69,7% dos pacientes apresentavam níveis de prolactina entre 20 e 30ng/ml. Este índice de hiperprolactinemia é maior que o demonstrado em estudos anteriores, o que pode ser explicado pelo fato de que neste estudo todos os pacientes apresentam doença ativa. A diferença foi significativa em relação aos controles ($p < 0,0001$) e não houve diferença entre os dois grupos de pacientes lúpicos. Após 6 meses de tratamento, a prolactina normalizou em 58,1 % dos pacientes e os dados dos pacientes com LES mostraram haver uma regressão linear significativa entre prolactina e o SLEDAI (72).

Estudos têm demonstrado que um relevante número de pacientes com hiperprolactinemia apresenta anticorpos anti-prolactina. Em um estudo comparando gestante lúpicos com e sem anticorpo anti-prolactina e pacientes saudáveis, as gestante lúpicos sem o anticorpo apresentaram uma frequência maior de complicações maternas (abortamento, pré-eclampsia e exacerbações) e fetais, quando comparadas com pacientes lúpicos sem este anticorpo (73). Pacientes com anticorpo anti-prolactina parecem apresentar manifestações mais amenas do LES, levando a hipótese que estes

anticorpos podem atenuar a atividade biológica da prolactina, provavelmente pela formação de macroprolactina. No entanto, estudos *in vitro* demonstram que a macroprolactina dos pacientes com LES apresenta-se com atividade biológica (57).

1.3 Alterações Hormonais e Antifosfolipídeos:

Síndrome antifosfolipídeo é definida por oclusão vascular, perda fetal espontânea e/ou trombocitopenia na presença de anticorpos antifosfolipídeos (anticorpos anticardiolipina, anticoagulante lúpico e anti- β 2-glicoproteína I).

Pacientes com esta alteração que não sofrem de LES ou outra doença auto-imune são caracterizados como tendo SAF primária. Nesta entidade, a relação mulher homem é 2:1 a 5:1, menor do que a relação encontrada no LES.

Um estudo comparou em 2005 pela primeira vez as diferenças, no diagnóstico e durante o acompanhamento, entre os gêneros na síndrome primária (74). Sessenta e oito pacientes foram seguidos por 13 anos (30 homens e 38 mulheres). Todos os pacientes foram tratados com anticoagulante oral. Não foi encontrada diferença entre os dois grupos quanto à trombose venosa ou arterial. Acidente vascular cerebral (AVC) foi mais prevalente em mulheres, numa proporção de 13:3 e trombose gastrointestinal (GI) mais prevalente em homens, numa relação de 7:1. Não houve diferença em tromboembolismo pulmonar, retiniano, cardíaco ou renal. Neste estudo, as mulheres eram jovens e pré menopáusicas, não apresentando proteção quanto ao aparecimento de AVC em relação aos homens, provavelmente devido a um estado hipoestrogênico nas pacientes com esta síndrome (74).

Num estudo com 15 gestantes (4 com SAF associada) e controles, os níveis de PRL se correlacionaram com a atividade da doença, medida pelo m-SLAM (um índice de atividade modificado para ser utilizado na gestação). Esta correlação foi perdida entre os 8 e 9 meses e recuperada no puerpério. Foi encontrada uma associação direta entre a presença de LA e os níveis de PRL. Não foram realizadas análises quanto à presença de anticorpos anticardiolipina (75).

Um estudo investigou o papel dos hormônios sexuais na expressão dos anticorpos anticardiolipina (IgG) e outros fosfolípidios em ratos normais (sem LES). Ratos C57BL/6, SLE-prone MRL/lpr e BXSB, foram gonadectomizados e tratados com estrogênio, DHEA ou placebo, através de implantes subcutâneos. O tratamento com estrogênio induziu a presença de níveis detectáveis de anticorpos IgG e IgM específicos para cardiolipina. Orquiectomia e o uso de DHEA não aumenta os níveis de anticardiolipina (76).

Foi avaliada a concentração de 17β -estradiol em 72 mulheres com diagnóstico de artrite reumatóide (AR), as quais tiveram anticorpos anticardiolipina medidos por 3 ocasiões em 6 meses. Nenhuma paciente usou corticóide ou ACO. Os níveis de estradiol foram maiores nas pacientes com AR e positivas para anticorpo anticardiolipina (77).

2. Objetivos

1. Avaliar o perfil hormonal de pacientes femininas com LES, em idade reprodutiva, atendidas no Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).
2. Determinar se os hormônios estudados se associam com o grau de atividade da doença, e com marcadores imunológicos nestas pacientes.

3. Pacientes e métodos:

3.1.Delineamento do estudo:

Estudo transversal, não controlado.

3.2. Fator em estudo:

Avaliação do perfil hormonal de pacientes com LES.

3.3 Desfechos:

Atividade da doença: SLEDAI.

3.4. Pacientes:

3.4.1. População em estudo:

Foram incluídas 72 pacientes do sexo feminino, em idade reprodutiva, com 4 ou mais critérios diagnósticos para LES, segundo o American College of Rheumatology, atendidas em agendas de rotina, no Ambulatório de Reumatologia do HCPA.

3.4.2. Critérios de inclusão:

- Sexo Feminino.
- No mínimo 2 anos após a menarca.
- Idade máxima 45 anos
- Pré-menopáusicas
- No mínimo 4 critérios para o diagnóstico de LES segundo o American College of Rheumatology.

3.4.3. Critérios de Exclusão:

Pacientes com: alterações em provas de função hepática (TGO, TGP ou LDH).

Insuficiência renal (índices de creatinina acima de 1,5) (78, 79)

Alteração de função tireoidiana.

Presença concomitante de outra doença auto-imune.

Usuárias de drogas que alterem os níveis circulantes de prolactina (80).

3.5 Fluxograma:

As pacientes foram convidadas a participar da pesquisa durante consulta ambulatorial de rotina no ambulatório de reumatologia, sendo orientadas sobre o projeto. Àquelas que aderiram à pesquisa, foi solicitada a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido e agendada nova data para coleta de exames de rotina do acompanhamento ambulatorial, mais dosagens hormonais (SDHEA,

testosterona, TSH, T4, prolactina, estradiol) e globulina ligante de hormônios sexuais (SHBG). As amostras foram coletadas pela manhã, após repouso de 20 minutos.

No mesmo dia da coleta, foi realizada entrevista sobre história mórbida progressiva e antecedentes gineco-obstétricos.

Em um prazo máximo de 10 dias, a contar do dia da coleta dos exames, as pacientes retornavam para nova consulta reumatológica e realização do SLEDAI (Systemic Lúpus Erythematosus Disease Activity Index) (8, 81).

Foi feita revisão de prontuário para verificação da presença de anticorpos anti-ENA, diagnóstico de Síndrome antifosfolipídica e história de comprometimento de órgãos alvo.

As pacientes que apresentaram alterações hormonais durante a pesquisa foram encaminhadas através de inter-consulta para o ambulatório de endocrinologia ginecológica do HCPA para posterior investigação e acompanhamento.

3.6 Avaliação Clínica:

A avaliação reumatológica constava de exame físico completo e avaliação dos exames de rotina de acompanhamento dos pacientes com LES, segundo a rotina do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

As pacientes tiveram seu grau de atividade da doença aferido através do SLEDAI, calculado pelo médico reumatologista assistente, durante consulta

ambulatorial de rotina, e foram, para fins de análise, divididas em 2 grupos: grupo com Lúpus ativo (SLEDAI \geq 4) e grupo com Lúpus inativo (SLEDAI $<$ 4).

O índice de dano foi calculado pelo reumatologista através do SLE International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology Damage Index (SLICC) (82).

3.7. Avaliação Laboratorial:

3.7.1. Coleta de Sangue e preparo das amostras:

As coletas foram realizadas na Zona 14 ou na Zona Ambulatorial de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por um coletador experiente, especialmente designado para coletas de pesquisa.

Foi feita coleta de sangue periférico, pela manhã, em jejum, com a paciente sentada, após repouso de 20 minutos.

As amostras eram então encaminhadas para análise no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.7.2 Dosagens laboratoriais:

Todas as dosagens foram realizadas no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Para dosagem dos exames de rotina de acompanhamento reumatológico foram utilizadas técnicas padrão do Laboratório de Patologia Clínica deste hospital: FAN por imunofluorescência indireta (IFI) com células Hep-2, anti-DNA por IFI com *Crithidia luciliae*, anti-ENAs por hemaglutinação, anticardiolipina por ELISA.

As dosagens hormonais foram realizadas através de:

– Estradiol: Determinado por eletroquimioluminescencia (ECLIA). Kit reagente Elecsys Estradiol II.(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Sensibilidade analítica: 5.0 pg/mL.

- T4: determinado por ECLIA. Kit reagente Elecsys T4.(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Sensibilidade analítica: 5,40 nmol/l.

- TSH: Determinado por ECLIA. Kit reagente Elecsys TSH.(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Sensibilidade analítica: 0,005 μ IU/ml.

- Prolactina: Determinado por ECLIA. Kit reagente Elecsys Prolactin II(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Sensibilidade analítica: 0,047ng/ml.

- DHEA-S: Determinado por ECLIA. Kit reagente Elecsys DHEA-S (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Sensibilidade analítica: 0,10 μ g/dl.

- Testosterona: Determinada por radioimunoensaio (RIA).Kit Testosterone RIA DSL-4000 (Diagnóstic Systems Laboratories, Texas USA). Sensibilidade analítica: 0,08ng/ml.

- SHBG: Determinado por ECLIA. Kit Elecsys SHBG (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Sensibilidade analítica: 0,35 nmol/l.

Pacientes com níveis de prolactina acima de 30 ng/ml tiveram a proporção de macroprolactina estimada na amostra.

3.8. Análise estatística:

3.8.1. Cálculo do tamanho amostral

Calculou-se um N de 72 pacientes para obter um poder estatístico de 80% com intervalo de confiança de 95%, considerando-se que o percentual de expostos (pacientes com Hiperprolactinemia e Lúpus em atividade) esteja em torno de 65%, baseado em dados da literatura.

3.8.2: Análise dos dados:

Os dados foram digitados num banco de dados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v.14.0 (Chicago, IL, USA), onde foram analisados.

Foram descritas as variáveis categóricas pela frequência absoluta e frequência relativa percentual e as variáveis quantitativas pela média e desvio padrão quando a sua distribuição foi simétrica, ou pela mediana e intervalo interquartil quando assimétrica.

Foram relacionadas as variáveis categóricas pelo teste de Qui quadrado com correção de Yates. Para comparar variáveis com distribuição simétrica entre categorias de variáveis dicotômicas, foi usado o teste t de Student, e aquelas com distribuição assimétrica pelo Mann-Whitney.

Para comparar variáveis com distribuição assimétrica entre três categorias foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, e para localizar a diferença foi feita uma transformação por postos da variável e posteriormente utilizado o teste de Tukey.

Para ajuste de fatores de confusão foi realizada uma regressão logística para o desfecho dicotômico e uma regressão linear múltipla quando se considerou um desfecho quantitativo (se a sua distribuição foi assimétrica, foi feita uma transformação logarítmica).

Considerou-se significativo um valor de $p \leq 0,05$ (bicaudal).

3.9. Considerações éticas:

Este trabalho foi aprovado, sob número 04-215, pela Comissão de Ética em Pesquisa e Ética em saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

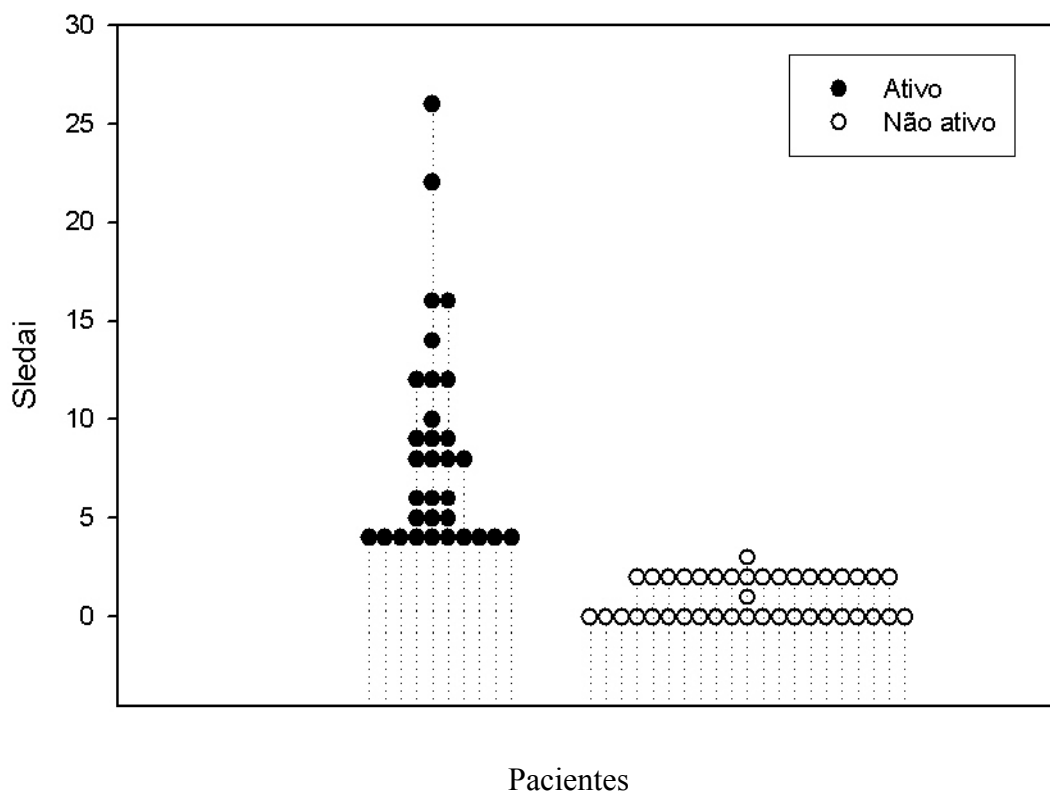
Foi obtido consentimento pós-informação por escrito de todas as pacientes.

4. Resultados

Inicialmente, foram alocadas para o estudo 90 pacientes que preencheram os critérios de inclusão e exclusão. Destas, 18 foram posteriormente excluídas: oito por apresentarem níveis elevados de TSH, uma por hipertireoidismo sintomático no momento da coleta, cinco por uso próximo a data da coleta de medicações que poderiam influenciar nos resultados da prolactinemia (4 acetato de medroxi-progesterona DEPO e 1 antipsicóticos), uma por alteração de função hepática, uma por alteração de função renal, uma por menopausa e uma por abandono do acompanhamento reumatológico. As pacientes foram então estratificadas, segundo o grau de atividade do LES aferido através do SLEDAI em doença ativa e não ativa.

Durante o estudo, 32 pacientes apresentavam doença ativa (SLEDAI \geq 4) e 40 apresentavam doença não ativa. A mediana do SLEDAI no grupo com LES em atividade foi de 7 pontos, com a maioria das pacientes apresentando SLEDAI abaixo de 15 pontos, como demonstrado na figura 1.

Figura1: Distribuição dos índices de SLEDAI em pacientes com doença ativa (SLEDAI \geq 4) e sem doença ativa (SLEDAI $<$ 4):



Portanto, o nosso grupo de pacientes se caracteriza por apresentar baixa atividade da doença, com 21 pacientes (29%) com SLEDAI igual a zero, apenas oito pacientes (em um total de 72) apresentando SLEDAI maior ou igual a 11 e 73,6% da amostra (53 pacientes) apresentando SLEDAI menor ou igual a 5 e diferente de zero (mediana = 2, p25 = 0, p75 = 6).

O perfil clínico e imunológico das pacientes é apresentado na tabela 3

Tabela 3: Descrição amostral do grupo de pacientes com LES participantes do estudo, estratificadas pelo índice de atividade da doença (SLEDAI) em doença ativa ou não ativa.

Variáveis	Ativo	Não ativo	P ($\alpha=0,05$)
	SLEDAI ≥ 4 (n=32)	SLEDAI < 4 (n=40)	
Idade ^a	28,13 ($\pm 7,61$)	33,48 ($\pm 7,58$)	0,004
Tempo de doença ^b	3,5 (1,0-6,75)	8,0 (4-11)	0,001
Idade da menarca ^b	12 (11-13)	13(11,25-14)	0,013
Uso de anticoncepcional ^c	7 (23,3)	9 (23,1)	0,980
Uso de corticóide ^c	26 (81,3)	14 (35,0)	$< 0,001$
Dose de prednisona (mg) ^b	20 (12,5-50)	10 (9,37-37,5)	0,131
FAN ^b	1/1280 (1/320- 1/1280)	1/1280 (1/640- 1/1280)	1,0
QT prévia ^c	14 (46,7)	10 (27,0)	0,098
SLIC ^b	0 (0-0,1)	0 (0,1)	0,579
Anticorpos anticardiolipina ^c	12 (38,7)	5 (12,8)	0,013
Anti-Ro (SSA) ^{c,d}	16 (51,6)	11 (31,4)	0,133
Anti- Sm ^{c,d}	9 (29,0)	11 (31,4)	0,834
RNP ^{c,d}	11 (35,5)	9 (25,7)	0,392
Anti-LA (SSB) ^{c,d}	4 (12,9)	2 (5,7)	0,314
SLC 70 ^{c,d}	2 (6,5)	0 (0)	0,130
Anti-DNA ^c	14 (44)	2 (5)	$< 0,001$
SLEDAI	7(4-11)	0 (0-2)	$< 0,001$

a = média \pm desvio padrão

b = mediana (p25-p75)

c = n (%)

d = anticorpos anti-ENA

FAN = Fator antinuclear

QT= Quimioterapia

SLIC = International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology Damage Index

SLEDAI= Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

RNP= Ribonucleoproteína

As pacientes do grupo com e sem atividade no momento do estudo, diferiram quanto à idade e o tempo de doença. As pacientes com LES em atividade eram mais jovens e tinham há menos tempo o diagnóstico de LES.

A idade da menarca também diferiu entre os dois grupos, com média de 12 anos no grupo com a doença ativa e 13 anos no grupo sem atividade ($p=0,013$).

A frequência de pacientes em uso de anticoncepcional oral não diferiu entre os grupos, sendo 7 usuárias no grupo com atividade e 9 no grupo sem atividade lúpica segundo o SLEDAI ($p=0,961$).

Como esperado, o uso de corticóide foi mais prevalente entre as pacientes com LES em atividade, devido a maior necessidade de medicações para o controle da doença.

Não houve diferença entre os dois grupos quanto à escala de dano, estimada através do SLICC, nem quanto à presença de anticorpos anti-ENA.

A seguir, foram analisadas as concentrações séricas de hormônios nas pacientes com LES, de acordo com o grau de atividade da doença. A tabela 4 apresenta as medianas e percentis 25 e 75 dos mesmos.

Tabela 4. Perfil hormonal das pacientes com LES com doença ativa (SLEDA ≥ 4) e sem doença ativa (SLEDAI < 4).

	Grupo SLEDA ≥ 4 (n=32)	Grupo SLEDAI < 4 (n=40)	p
Prolactina (ng/ml)	16,46 (10,27 – 21,51)	11,34 (8,01 – 16,88)	0,062
Estradiol (pg/ml)	64,69 (20,02 – 146,57)	74,01 (34,20 – 172,72)	0,17
SHBG (nmol/l)	51,4 (31,75-81,2)	56,95 (38,22-76,4)	0,904
Testosterona (ng/ml)	0,19 (0,12 – 0,35)	0,33 (0,20 – 0,49)	0,034
S-DHEA ($\mu\text{g/ml}$)	11,66 (7,87 – 23,35)	48,51 (18,89 – 127,55)	$< 0,001$

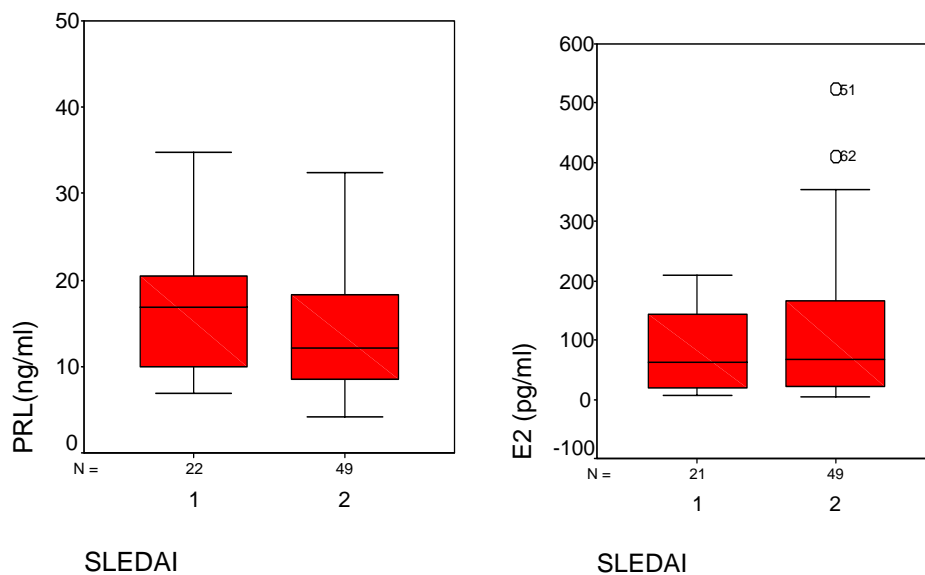
Dados expressos em mediana (p25-p75)
Análise realizada por Mann-Whitney

Das 72 pacientes em estudo, dezoito (25%) apresentavam hiperprolactinemia, sendo onze (34,4%) no grupo em atividade e sete (17,5%) no grupo sem atividade de LES. A mediana de prolactina foi discretamente mais elevada no grupo com doença ativa, mas esta diferença não alcançou significância estatística ($p=0,062$).

Níveis séricos de estradiol e SHBG foram similares nos dois grupos.

Os níveis de prolactina e estradiol nos pacientes com e sem doença ativa são representados graficamente na figura 2:

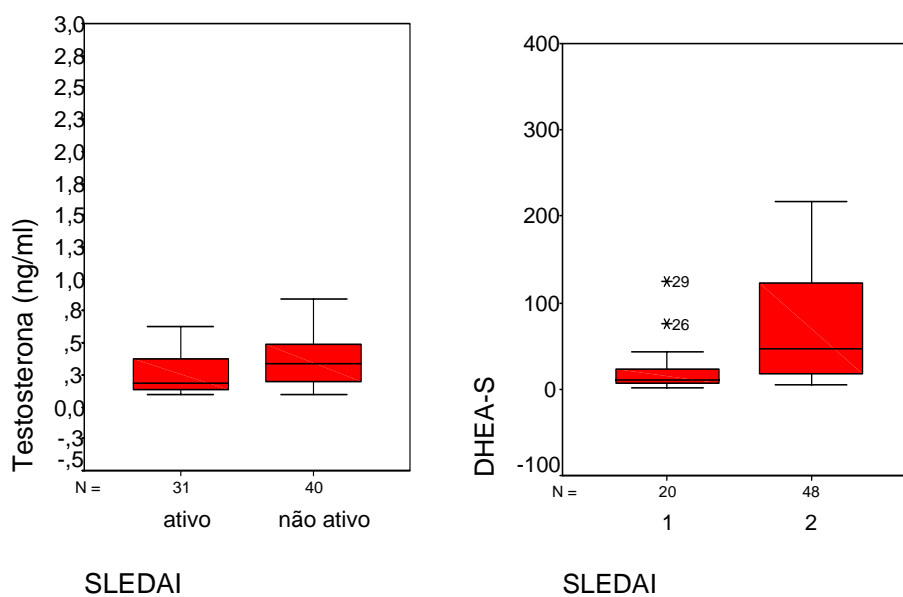
Figura 2: Níveis de prolactina e estradiol em mulheres com LES, com doença ativa e sem doença: ativa:



Os valores de testosterona e S-DHEA foram significativamente mais baixos no grupo com atividade da doença em comparação com o grupo sem atividade ($p=0,034$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Estes dados são representados graficamente na figura 3.

Figura 3. Níveis de androgênios testosterona (pg/ml) e S-DHEA ($\mu\text{g/ml}$), de acordo com o grau de atividade da doença, de acordo com a atividade da doença.



Com base nestes primeiros resultados, buscou-se analisar fatores que pudessem estar interferindo no padrão hormonal observado, em especial, a fase do ciclo menstrual, o uso de anticoncepcionais orais e/ou corticóide.

A tabela 5 apresenta valores de hormônios circulantes em fase folicular precoce ou outro período do ciclo menstrual e em usuárias de anticoncepcional oral. Apenas as concentrações de estradiol diferiram, sendo mais baixas no grupo de usuárias de anticoncepcional oral. Prolactina, testosterona e S-DHEA foram similares entre os grupos.

Tabela 5 Concentrações hormonais em mulheres portadoras de LES, nos grupos de usuárias de ACO, não usuárias de ACO durante a fase folicular precoce (FFP) e não usuárias em outro período do ciclo menstrual (OP):

	Usuárias de ACO (n=16)	Não usuárias – FFP (n= 15)	Não usuárias – OP (n=25)	p
Prolactina	16,49 (10,17 – 21,47)	11,74 (7,74 – 20,18)	13,28(10,54 – 20,92)	0,628
Estradiol	20,07 (14,75 – 62,81)	98,08 (65,44 – 250)	128,92 (61,64–173,65)	<0,001 ^c
Testosterona	0,20 (0,10 - 0,37)	0,35 (0,12 – 0,51)	0,30 (0,19 – 0,51)	0,14
S-DHEA	17,69 (9,08 – 109,9)	23,48 (14,66 – 88,27)	25,87 (10,63 – 88,24)	0,667

OBS: a) 17 pacientes não sabiam informar a data da última menstruação e não puderam ser incluídas na análise.

ANOVA, seguida de Teste de Tukey

Com o objetivo de verificar se o uso de corticóide estava interferindo nos valores de androgênios observados, no grupo com LES em atividade, foi realizada análise de regressão logística (tabela 6). Observa-se que a associação dos androgênios com o SLEDAI perde significância quando ajustada para o uso de corticóide. Além disso, quando analisadas apenas as 37 pacientes que não fazem uso de corticóide, não houve associação entre o SLEDAI e a testosterona e o S-DHEA (p=0,976 e p=0,956, respectivamente).

Tabela 6. Regressão logística tendo como variável independente os níveis hormonais e como variável independente a atividade do LES

	p	OR (IC95%)
Testosterona ^a	0,971	1,009(0,620 – 1,643)
S-DHEA ^a	0,367	0,995 (0,983 – 1,006)
Estradiol ^b	0,033	1,046(0,982 – 1,13)

a)Ajustado para uso de corticóide

b)Ajustado para os níveis de prolactina

Um outro aspecto que foi considerado para análise foram as relações entre o perfil hormonal das pacientes com LES e a presença de anticorpos anti-ENA. Observou-se que pacientes que apresentavam anticorpos anti-RNP tinham níveis mais elevados de prolactina ($p=0,004$) e estradiol ($p=0,039$), no entanto, a presença dos demais anticorpos (Anti-SSA, anti-SSB, Anti-Sm e SLE-70), não apresentou nenhuma associação com o perfil hormonal das pacientes no presente estudo.

A etapa seguinte foi a análise das possíveis relações entre o índice de dano, avaliado pelo SLICC, tempo de doença e presença de FAN e concentrações circulantes dos hormônios estudados. Estes dados de associação são apresentados na tabela 7.

Tabela 7 Correlação entre as dosagens hormonais e o índice de dano (SLIC), Tempo de doença, e FAN em mulheres portadoras de LES.

	SLIC	Tempo de Doença	FAN
	r(p)	r (p)	r(p)
Prolactina	-0,051 (0,68)	-0,125 (0,30)	0,38 (0,046)*
Estradiol	-0,13 (0,27)	0,294(0,013)*	0,087 (0,476)
Testosterona	-0,2 (0,10)	0,236 (0,049)*	-0,126 (0,298)
S-DHEA	-0,6 (0,65)	0,430 (<0,001)*	-0,124 (0,317)

a) Coef de correlação (p). Análise realizada utilizando-se teste de correlação de Spearman

Finalmente, analisou-se a relação entre a presença dos anticorpos anticardiolipina e os níveis hormonais.

Das 17 pacientes com presença de anticorpos anticardiolipina, 12 apresentavam doença ativa (70%) já das 53 pacientes sem o anticorpo, 19 encontrava-se com doença ativa (36%) $p=0,023$. Pacientes com presença de anticorpos anticardiolipina apresentaram níveis mais baixos de estradiol ($p=0,015$) assim como de S-DHEA ($p=0,047$) do que as pacientes com ausência destes anticorpos.(tabela 8)

Tabela. 8 Características clínicas das pacientes com LES, segundo a presença ou não de anticorpos anticardiolipina:

Anticorpos anticardiolipina :	Presente (n=17)	Ausente (n=53)	p
Idade ^a	28,9 ± 6,5	31,47 ± 8,4	0,258
Menarca ^a	12,1 ± 1,6	12,6 ± 1,6	0,397
Aborto espontâneo ^b	0 (0-0)	0 (0-0)	0,923
Gestações ^b	1,0 (0,5-2,0)	1,0 (0-2)	0,636
Prolactina ^b	14,22 (10,54-20,8)	11,9 (8,1-20,4)	0,348
Estradiol ^b	38,4 (13,43-84,63)	88,25 (34,1-170,35)	0,015*
Testosterona ^b	0,19(0,12-0,39)	0,28 (0,18-0,46)	0,139
S-DHEA ^b	11,40(6,8-26,6)	27,82 (14,55-88,06)	0,047*
Anti-DNA ^b	0 (0-1/120)	0 (0-0)	0,026*
Tempo de Doença ^b	4 (0,5-7)	6 (2,3-9,8)	0,117
SLEDAI ^c	4 (2-10,5)	2 (0-4,5)	0,034*

a) teste T de Student

b) Mann-Whitney

c) Qui quadrado

Estas pacientes, quando estratificadas pela presença ou ausência de anticorpos anticardiolipina, não mostraram diferir significativamente quanto à idade, idade da menarca, número de gestações ou abortos espontâneos, apresentando diferença apenas nos níveis hormonais descritos anteriormente e nos níveis de anti-DNA, que eram maiores no grupo com presença de anticorpos anticardiolipina.

5. Discussão:

O LES é uma doença auto-imune com marcada predileção pelo sexo feminino. A relação entre os sexos no LES é de 9 mulheres para cada homem acometido pela doença (2). Devido a esta discrepância entre os sexos, vários grupos vêm estudando as alterações hormonais em pacientes com LES e tentando correlacionar estas alterações com aspectos clínicos e imunológicos do LES e com a atividade da doença (27, 29, 32, 74, 83-85).

No presente estudo, procuramos traçar um perfil hormonal de uma amostra de pacientes femininas com LES e verificar alguma possível associação entre este perfil, marcadores imunológicos e características clínicas apresentadas.

Observou-se, primeiramente, que as pacientes com menor atividade do LES aferida através do SLEDAI, eram pacientes mais velhas e tinham maior tempo de doença do que as pacientes com LES mais ativo. Isto pode dever-se ao fato de as pacientes mais jovens terem o diagnóstico recente, em período de agudização, enquanto as pacientes mais velhas, que apresentam o diagnóstico há mais tempo, já possuem um melhor controle da doença, estando mais estáveis. Outro fator poderia ser um maior nível estrogênico nas pacientes mais jovens, no entanto, a comparação dos níveis estrogênicos não diferiu entre os grupos com e sem atividade lúpica. É possível que esta diferença não tenha sido evidenciada por serem todas pacientes ainda jovens, em idade reprodutiva.

Em modelos experimentais, o papel do estradiol no LES vem sendo evidenciado. Um destes modelos são os ratos NZB/NZW F1 (B/W), que vêm sendo utilizados como

modelo experimental para estudos em LES. Similarmente aos humanos, as fêmeas desta espécie desenvolvem uma doença *Lupus-like* e têm sobrevida menor se comparadas aos machos. Estudos nestes animais foram os primeiros a demonstrar que a modulação hormonal pode alterar o fenótipo no LES, com vários trabalhos demonstrando que o uso de estradiol pode exacerbar a doença (65, 86) e que o uso de anti-estrogênicos como o tamoxifeno pode reduzir a resposta imune nestes animais (87).

Na metanálise publicada por McMurray em 2003(27) é sugerido que os níveis de estradiol possam ser elevados em mulheres lúpicas, mas não em homens. O autor sugere, como explicação possível para este fato, uma resposta à atividade da doença, com um aumento da atividade da aromatase estimulada pela inflamação. Há também sugestão de que a ação inflamatória de citocinas possa estimular a liberação de gonadotrofinas (88).

Por outro lado, evidências sugerem que os linfócitos de pacientes com LES podem ser mais responsivos ao estrogênio. Células mononucleares do sangue periférico tratadas com estrogênio exógeno demonstram um aumento de anticorpos anti-DNA e secreção de IgG em linfócito B de pacientes com LES, o que não ocorreu nas células dos pacientes controles (89). Em trabalho anterior, estes autores mostraram que a testosterona reduz a produção de anti-DNA, indicando que o antagonismo pelos androgênicos pode bloquear a ação do estrogênio na produção de auto-anticorpos (90).

No presente estudo, títulos de anti-DNA, assim como dose de prednisona em uso foram, como era de se esperar, mais altos nas pacientes com doença ativa, sendo esta uma característica da doença e de seu manejo usual. Elevações nos títulos de anti-DNA são classicamente correlacionados com a atividade da doença em pacientes com LES (91), fazendo parte dos critérios de atividade da doença pelo SLEDAI(8). O manejo de

pacientes com LES inclui o uso de drogas imunossupressoras, seja glicocorticóides, como a prednisona, como drogas como micofenolato mofetil, azatioprina, metotrexato, entre outras (3).

Uma característica observada na amostra de pacientes com LES, estudada no presente trabalho, é que o grau de atividade do grupo variou entre sem atividade e apenas baixa a moderada (SLEDAI 1-5 e 6-10, respectivamente) (7).

A maioria dos estudos que comparam os níveis hormonais com atividade do LES mostram grande variabilidade no grau de atividade da doença, apresentando, em alguns estudos, pacientes com doença mais ativa em comparação às pacientes da nossa amostra. Vera-Lastra et al, estudaram pacientes com LES apresentando SLEDAI médio de 16, considerado alta atividade (72), Pacíclio et al encontraram relação com níveis de prolactina e atividade da doença em pacientes com LES com SLEDAI mediano de 8 (atividade moderada) em seus pacientes com hiperprolactinemia (71) No estudo publicado por Garcia et al, a mediana do SLEDAI foi 4,(92). É importante salientar que a variabilidade no grau de atividade do LES, descrita nos estudos publicados e a atividade baixa a moderada, observada no presente trabalho, pode ter influência sobre os resultados observados quanto aos aspectos hormonais.

Quanto aos níveis de androgênios, verificou-se que as pacientes do grupo com atividade apresentaram valores mais baixos em comparação com o grupo sem atividade. Estes achados estão de acordo com dados da literatura, que referem níveis diminuídos de androgênios (testosterona, DHEA e DHEA-S) em pacientes com LES em comparação com controles saudáveis (27). Um dos mecanismos envolvidos para a redução das concentrações de androgênios pode estar relacionado com o uso associado de corticoesteróides, que é freqüente em pacientes com LES ativo. No presente estudo,

quando os dados foram ajustados para uso de corticosteróides perdeu-se a significância para a diferença em androgênios. Assim, é possível hipotetizar que o corticosteróide exógeno possa ter suprimido androgênios adrenais.

Neste sentido, o DHEA costuma estar diminuído em pacientes com doenças crônicas, assim como em grandes queimados e pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Fisiologicamente, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) induz a produção concomitante de glicocorticóides (GC) e DHEA pelo córtex adrenal. Já, em pacientes realizando tratamento com glicocorticóides, o uso deste pode suprimir a secreção adrenal de DHEA, com redução drástica dos níveis de DHEA e DHEA-S pela redução do estímulo basal e induzido pelo ACTH, tendo sido levantada inclusive a hipótese do uso concomitante de DHEA nestes pacientes para contrabalançar os efeitos catabólicos deletérios dos GC, com melhora na qualidade de vida (93, 94).

No que se refere às relações entre prolactina e LES, a prolactina tem sido o hormônio mais exaustivamente estudado nas pacientes com LES, sendo a frequência observada de hiperprolactinemia maior em pacientes com LES (15-31%) do que em mulheres saudáveis (3%), (1, 27). Os resultados apresentados no presente trabalho também mostram uma frequência aumentada de hiperprolactinemia, em relação aos valores descritos para populações saudáveis.

Inúmeros trabalhos demonstram uma correlação positiva entre os níveis séricos de prolactina e o grau de atividade da doença através do SLEDAI (62, 70, 71, 75, 95, 96).

No entanto, os estudos não são unânimes neste achados. Em um estudo publicado por Blanco-Favela em 1999 (28), foram revisados trabalhos sobre a

associação de hiperprolactinemia e atividade do LES. Um estudo demonstrou esta associação, com uma diferença de 49 % entre os níveis de prolactina nos dois grupos, enquanto em outro, os níveis de prolactina não foram associados com o grau de atividade do LES (97).

No presente estudo, não encontramos diferença entre os níveis de prolactina entre pacientes com e sem doença ativa. Alguns aspectos devem ser comentados em relação a este resultado, entre estes a questão do tamanho amostral e seu poder e a frequência e grau de atividade do LES na nossa população em estudo. Com base no estudo de Vera-Lastra et al, no qual 69,7% dos pacientes apresentavam níveis de prolactina entre 20 e 30ng/ml, calculamos que seria necessário incluir 72 pacientes para obter um poder de 80%. No entanto, a frequência de hiperprolactinemia nas nossas pacientes foi cerca da metade da obtida pelo estudo de Vera-Lastra et al (72), ou seja, 34,4% e 17,5% nos grupos com e sem atividade, respectivamente. Esta diferença pode se dever às características das 2 amostras: enquanto o estudo de Vera-Lastra et al incluiu apenas pacientes com LES em atividade, no presente estudo, de desenho transversal, não houve este critério de seleção. Assim, esta menor frequência de hiperprolactinemia reduziu o poder do nosso estudo para detectar esta diferença.

Além disso, deve ser considerado, também, que o grau de atividade do LES na nossa amostra foi baixo a moderado para a maioria das pacientes consideradas com LES em atividade, o que pode ter igualmente influenciado para a ausência de diferença entre os grupos quanto aos níveis circulantes de prolactina.

Um trabalho comparando os tipos de prolactina com o grau de atividade da doença em pacientes com LES, o qual também considerou como ativo índices de SLEDAI > 4 e apresentava também poucas pacientes em atividade (50 pacientes em 259

ou 19,3%), também não observou diferença entre as medianas da prolactina sérica entre os dois grupos. Neste estudo, no entanto, observou-se diferença entre os grupos quanto as medianas de prolactina livre (ou monomérica) (98).

Com referência às concentrações de estradiol e LES, a literatura tem chamado a atenção para evidências que parecem indicar que alguns pacientes com LES respondem de forma diferente ao estímulo hormonal (32). No presente estudo, o estradiol, apesar de apresentar níveis que tendem a ser mais altos nas pacientes sem doença ativa, não atingiu significância estatística. No entanto, quando ajustamos os dados em relação à prolactinemia, através da análise de regressão logística para os níveis de prolactina, observou-se que o estradiol se correlaciona com o grau de atividade medido pelo SLEDAI, o que corrobora a idéia de que estradiol está associado à atividade no LES.

É bem conhecido que o estradiol estimula a produção da prolactina e esta, por ação junto a neurotransmissores que atuam no eixo GnRH-gonadotrofinas, inibe a produção de estradiol (99). Portanto, se a elevação da prolactina fosse a alteração primária, pacientes com níveis elevados de prolactina apresentariam baixos níveis de estradiol. Ao contrário, se a elevação do estradiol fosse a alteração primária, se esperaria elevação dos níveis de prolactina. Em pacientes com LES, é descrita tanto uma elevação dos níveis de prolactina, quanto uma elevação dos níveis de estrogênios (27).

Existem poucos estudos sobre a associação de alterações hormonais e a presença de marcadores imunológicos específicos em pacientes com LES. No nosso estudo, com relação aos anticorpos anti-ENA, encontramos que pacientes com a presença de anticorpos anti-RNP tinham níveis mais altos de prolactina e estradiol. Estes anticorpos são encontrados em pacientes com LES, mas não são anticorpos específicos do LES, sendo mais associados às chamadas doenças mistas do tecido conjuntivo (100, 101). Já

o anti-Sm, anticorpo específico do LES, e o anti-Ro (SSA), mais sensível, não mostraram se correlacionar com alterações nos níveis hormonais no nosso estudo.

A associação entre presença de anticorpos anti-ENA e concentrações hormonais foi avaliada em poucos estudos. Jara, et al, descrevem uma associação positiva entre os níveis de prolactina e o grau de atividade da doença, assim como com a presença de FAN em mulheres com LES, mas nenhuma associação com anticorpos anti-ENA e anticardiolipina (97). Kozáková et al analisaram a presença de anticorpos e os níveis de prolactina em 50 mulheres com LES, das quais 27 apresentavam níveis de prolactina elevados ($>20\mu\text{g/ml}$). Nenhuma associação significativa foi encontrada entre PRL e a maioria dos anticorpos estudados. Níveis de anti-Ro (SSA) foram mais altos em pacientes sem hiperprolactinemia(102). Um estudo publicado por Furukawa et al, demonstrou um aumento, relacionado ao uso de estradiol, da ligação de anti-RNP, anti Ro (SSA) e anti La (SSB) em queratinócitos humanos (103).

Poucos estudos têm avaliado as relações entre presença de anticorpos antifosfolipídeos e alterações hormonais no LES, assim como a influência dos hormônios nesta doença.

Anticorpos antifosfolipídeos foram descritos pela primeira vez há aproximadamente um século, mas apenas há cerca de 15 anos, testes laboratoriais e pesquisas vem demonstrando serem estes na realidade um conjunto heterogêneo de vários anticorpos, sendo o Lúpus anticoagulante e a anticardiolipina os mais estudados (104).

Os anticorpos anticardiolipina são detectados por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e podem ser separados em isotopos IgG, IgM, e IgA, tendo o IgG forte associação com trombose vascular (105).

Estes anticorpos têm sido associados com manifestações de trombose arterial e venosa, perda fetal decorrente de trombocitopenia, na chamada Síndrome antifosfolípídica (SAF). No entanto, podem também ser encontrados no soro de pacientes com LES sem critérios diagnósticos para SAF (106). A presença de anticorpos anticardiolipina no soro de pacientes com LES é associada ao aumento de risco cardiovascular e de nefrite (107). Esta associação também foi observada em estudos de base populacional: os resultados do Framingham Heart study cohort demonstram que altos índices de anticorpo anticardiolipina, independente de outros fatores de risco cardiovasculares, prediz significativamente o risco de AVC em mulheres, mas não em homens (108). Por outro lado, Todorova et al (109) analisaram em estudo caso-controle, o impacto da reposição hormonal em pacientes pós menopáusicas sobre anticorpos anticardiolipina. Anticorpos anticardiolipina IgG não diferiram entre os grupos na avaliação basal e após 3 e 6 meses de tratamento. Já os níveis de anticardiolipina IgM foram significativamente maiores do que os níveis encontrados nos controles em 3 e 6 meses de tratamento (109).

Um dado interessante e original, verificado no nosso estudo foi que entre as pacientes com presença de anticorpos anticardiolipina, os níveis de estradiol eram significativamente inferiores aos das pacientes em que estes anticorpos não foram detectados e o grau de atividade do LES era maior. Embora Jara et al tenham sugerido que pacientes com SAF possam ser hipoestrogênicas (74), até o momento esta associação entre hipoestrogenismo e presença de anticorpos anticardiolipina em pacientes com LES, sem SAF, não tinha ainda sido descrita. Esta observação é potencialmente relevante, tendo em vista que ambos fatores estão associados com doença aterosclerótica. O delineamento do presente trabalho, estudo transversal, não

permite uma análise de causalidade, mas apenas de associação. Em geral, níveis de estrogênio mais elevado estão associados na produção de auto-anticorpos em pacientes com LES, ao contrário do observado aqui, na presença de anticorpos anticardiolipina. Estudos recentes têm sugerido que a produção desses anticorpos está relacionada com a exposição a antígenos expressados em células endoteliais em processo de apoptose, bem como com a exposição a LDL oxidada (110, 111), eventos também associados a situações de hipoestrogenismo (112). Como pacientes com a síndrome antifosfolipídica, isto é, com história de trombozes venosas ou arteriais e/ou perdas fetais de repetição na presença do anticorpo, foram excluídas dessa amostra, não temos como avaliar a patogenicidade dos anticorpos anticardiolipina dessas pacientes. Assim, estudos longitudinais são necessários para avaliar a relevância clínica destes achados, incluindo associação com desenvolvimento futuro da SAF ou com doença aterosclerótica.

.O presente trabalho não tem a intenção de encerrar esta questão, mas acrescentar mais um dado à fascinante pesquisa sobre as diferenças entre os padrões imunológicos entre os sexos.

Estudos sobre alterações hormonais em pacientes com LES são difíceis de ser realizados pois corticoesteróides são amplamente utilizados para o tratamento de crises e melhor controle da doença, não podendo, na maioria dos casos, ser suspensos ou substituídos por outras drogas para melhor avaliação hormonal, sem correremos o risco de interferir negativamente no prognóstico das pacientes.

Também não é possível suspender anticoncepção hormonal nestas pacientes, sem que seja substituída por outro método de grande eficácia, tendo em vista os riscos de uma gravidez não planejada em uso de medicações muitas vezes teratogênicas e os riscos gestacionais inerentes ao LES para a mãe e para o feto.

No entanto, justamente pelo prognóstico ruim desta patologia e pelo fato dela afetar principalmente mulheres em período de vida reprodutivo e produtivo, não se deve deixar de investigar qualquer possibilidade que possa contribuir para o entendimento e manejo da doença, com intuito de auxiliar estas mulheres a obterem a chance de viver suas vidas o mais normalmente possível, mantendo-se em seus trabalhos, tendo filhos e vida social ativa.

6. Conclusões:

Com base nos resultados encontrados podemos concluir que:

1. As pacientes com LES em atividade, no momento em que foram incluídas no trabalho, diferiram das pacientes sem atividade do LES, por serem mais jovens e apresentarem há menos tempo o diagnóstico da doença.
2. O índice de hiperprolactinemia observado nas pacientes com LES foi superior ao esperado para pacientes saudáveis da mesma faixa etária, podendo ser este hormônio, tanto uma influência sobre a imunidade destas pacientes, quanto um marcador de atividade da doença.
3. Não houve associação estatisticamente significativa entre os níveis de prolactina e o grau de atividade da doença. Isto pode ter ocorrido por influência do baixo grau de atividade do LES na amostra estudada e/ou da diferença pequena observada no número de pacientes com hiperprolactinemia entre os grupos LES com e sem atividade, o que reduziu o poder do estudo para detectar esta associação.
4. Concentrações circulantes de androgênios foram inferiores no grupo de pacientes com LES em atividade em relação ao grupo sem atividade. Este resultado foi dependente do uso de corticosteróide.
5. Os níveis de prolactina apresentaram uma correlação positiva com os títulos de FAN na amostra de pacientes com LES

6. Pacientes com presença de anticorpos anticardiolipina apresentaram níveis de estradiol e S-DHEA mais baixos do que as pacientes sem a presença destes anticorpos.

7. Referências Bibliográficas:

1. Orbach H, Shoenfeld Y. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 2007;6:537-542.
2. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2007;369(9561):587-96.
3. Petri M. Systemic lupus erythematosus: 2006 update. *J Clin Rheumatol* 2006;12(1):37-40.
4. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Pathol* 2003;56:481-490.
5. Kurien BT, Scofield RH. Autoantibody Determination in the Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. *Scand J. Immunol* 2006;64(3):227-35.
6. To CH, Petri M. Is Antibody Clustering Predictive of Clinical Subsets and Damage in Systemic Lupus Erythematosus? *Arthritis Rheum* 2005;52(12):4003-10.
7. Smith EL, Shmerling RH. The American College of Rheumatology criteria for the classification of systemic lupus erythematosus: strengths, weaknesses, and opportunities for improvement. *Lupus* 1999;8(8):586-95.
8. Griffiths B, Mosca M, Gordon C. Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices. *Best Prat Res Clin rheumatol* 2005;19(5):685-708.
9. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caro D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for Lupus patients. The committee on prognosis Studies in LES. *Arthritis Rheum.* 1992;35(6):360-340.

10. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 2002;29(2):288-91.
11. Petri M, Buyon J, Kim M. Classification and definition of major flares in SLE clinical trials. *Lupus* 1999;8(8):685-91.
12. Lim W CM. Antiphospholipid antibodies: a critical review of the literature. *Current Opinion in Hematology* 2007 2007;14:494-499.
13. Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex- Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. *Clin Microb Reviews* 2000;14(3):476-488.
14. Whitacre CC, Blankenhorn E. Sex Differences in Autoimmune disease: Focus on Multiple Sclerosis. *Science Magazine* 1999;283:1277.
15. Zandaman-Goddard G, Peeva E, Shoenfeld Y. Gender and Autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 2007;6:366-372.
16. Hernández-Molina G, Svyryd Y, Sánchez-Guerrero J, Mutchinick OM. The role of the X chromosome in immunity and autoimmunity. *Autoimmune Rev* 2007;6:218-22.
17. Buyon JP. Oral contraceptives im Women with systemic lupus erythematosus. *Ann Med Interne* 1996;147:259-64.
18. Ben-Chetrit A, Ben-Chetrit E. Systemic lupus erythematosus induced by ovulation inducion treatment. *Arthritis Rheum.* 1994;37:1614-17.
19. Tiskievicz F, Mallmann ES, Xavier RM, Brenol JCT. Prolactina e Macroprolactina no Lupus Eritematoso Sistêmico. *Rev Bras Reumatol* 2005;45(3):191-194.

20. Petri M, Kim MY, Kalunian KC, Grossman J, Hahn BH, Sammaritano LR, et al. Combined oral contraceptives in women with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2005;353(24):2550-8.
21. Buyon JP, Petri MA, Kim MY, Kalunian KC, Grossman J, Hahn BH, et al. The effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2005;142(12 Pt 1):953-62.
22. Cooper GS, Dooley MA, Treadwel EL, St. Clair EV, Gilkeson GS. Hormonal and reproductive risk factors for development of Systemic lupus Erythematosus: results of population-based case-control study. *Arthritis Rheum* 2002;46:1830-9.
23. Costembader HK, Feskanich D, Stampfer MJ, Karlson EW. Reproductive and Menopausal Factors an Risk of Systemic Lupus Erythematosus in Women. *Arthritis Rheum* 2007;56(4):1251-1262.
24. Rood J, Van Der Velde E, Tem Cate R, Breedveld F, Huizin T. Femele sex Hormones at the onset of Systemic Lupus Erythematosus Affect Survival. *British Journal of Rheumatology* 1998;37:108-10.
25. Sasaki N, Yamauchi K, Sato R, Masuda T, Sawai T, Inoue H. Klinefelter's syndrome associated with systemic lupus erythematosus and autoimmune hepatitis. *Mod Rheumatol* (2006) 16:305–308 2006.
26. Lahita RG, Bradlow HL. Klinefelter's syndrome: hormone metabolism in hypogonadal males with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987;14(Suppl 13):154-7.
27. McMurray R, May W. Sex hormones and Systemic Lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003;48(8):2100-2110.

28. Blanco-Favela F, Quintal-Alvarez G, Leanos-Miranda A. Association Between Prolactin and Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. Influence of statistical Power. *Journal of Rheumatology* 1999;26:55-59.
29. Seli E, Arici A. Sex Steroids and Immune system. *Immunol Allergy Clin North Am* 2002;22:407-433.
30. Cutolo M, Capellino S, Sulli A, Seriollo B, Secchi ME, Villaggio B, et al. Estrogens and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1089:538-47.
31. Cohen-Solal J, Jeganathan V, Grimaldi C, Peeva E, Diamond B. Sex hormones and SLE: influencing the fate of autoreactive B cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;305:67-88.
32. Grimaldi CM. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18:456-461.
33. Bynoe MS, Grimaldi CM, Diamond B. Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction on naive B cells. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:2703-08.
34. Grimaldi CM, Cleary J, Dagtas AS. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest* 2002;109:1625-33.
35. Peeva E, Venkatesh J, Diamond B. Tamoxifen blocks estrogen-induced B cell maturation but not survival. *J Immunol* 2005;175:1415-1423.
36. Li J, McMurray RW. Effects of estrogen receptor subtype-selective agonists on immune functions in ovariectomized mice. *Int Immunopharmacol* 2006;6(9):1413-23.
37. Johansson M, Arlestig L, Moller B, Smedby T, Rantapaa-Dahlqvist S. Oestrogen receptor {alpha} gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005;64(11):1611-7.

38. Inui A, Ogasawara H, Naito T, Sekigawa I, Takasaki Y, Hayashida Y, et al. Estrogen receptor expression by peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2007;26:1675-1678.
39. Li J, McMURRAY RW. Effects of estrogen receptor subtype-selective agonists on autoimmune disease in lupus-prone NZB/NZW F1 mouse model. *Clinical Immunology* 2007;123:219-226.
40. Costembader HK FD, Stampfer MJ, Karlson EW. Reproductive and Menopausal Factors an Risk of Systemic Lupus Erythematosus in Women. *Arthritis Rheum* 2007;56(4):1251-1262.
41. Cutolo M. Estrogen metabolites: increasing evidence for their role in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatology* 2004;31:419-421.
42. Straub RH, Weidler C, Demmel B, Herrmann M, Kees F, Schmidt M, et al. Renal clearance and daily excretion of cortisol and adrenal androgens in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004(63):961-68.
43. Petri M, Mease PJ, Merrill J T, Lahita RG, Iannini MJ, Yocun D. Effects of Prasterone on disease activity and symptoms in women with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004;50:2858-68.
44. Chang DM, Chu SJ, Chen HC, Kuo SY, Lai JH. Dehydroepiandrosterone suppresses interleukin 10 synthesis in women with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1623-26.
45. Van Vollenhoven RF, Morabito LM, Engleman EG, McGuire JL. Treatment of systemic lupus erythematosus with dehydroepiandrosterone: 50 patients treated up to 12 months. *J Rheumatol* 1998;25(2):285-289.

46. Tanverdi F, Silveira LFG, Bouloux PMG. The hypothalamic - pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *Journal of Endocrinology* 2003;176:293-3004.
47. Chem HF, Jeung EB, Stephenson M, Leung PC. Human Peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH receptor, and interleukin-2 receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999;84:743-750.
48. Hsu CC, Lin YS, Wang ST, Huang KE. Immunomodulation in women With endometriosis receiving GnRH agonist. *Obstetrics and Gynecology* 1997;89:993-998.
49. Jacobson JD, Ansari MA, Kinealy M, Muthukrishnan V. Gender-Specific Exacerbation of Murine Lupus by Gonadotropin-Releasing Hormone: Potential Role of Gαq/11. *Endocrinology* 1999;140(8):3429- 3437.
50. Bem-Jonathan N, Mershon J, Allen D, Steinmetz R. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr ver* 1996;17:139-69.
51. Stevens A, Ray DW, Worthington J, Davis JR. Polymorphisms of the human prolactin gene- implications for production of lymphocyte prolactin and systemic lupus erythematosus. *LUPUS* 2001;10:676-83.
52. Larrea F, Martínez-Castillo A, Cabrera V, Alcocer-Varela J, Queipo G, Cariño C, et al. A Bioactive 60-Kilodalton Prolactin Species Is Preferentially Secreted in Cultures of Mitogen-Stimulated and Nonstimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells from Subjects with Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Endocr Metab* 1997;82(11):3664-69.

53. Yu-Lee LY. Prolactin Modulation of Immune and Inflammatory Responses. *Recent Prog Horm Research* 2000;57:435-455.
54. Chikanza IC. Prolactin and Neuroimmunomodulation: In vitro and in vivo Observations. *Ann New York Acad Sci* 1999;876:119-130.
55. Sadideen H, Swaminathan R. Macroprolactin: what is it and what is its importance? . *Int J Clin Pract* 2006;60(4):457-61.
56. Hattori N. Macroprolactinemia: a new cause of hyperprolactinemia. *J Pharmacol Sci* 2003;92:171.
57. Leños-Miranda A, Pascoe-lira D, Chavez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Antiprolactin Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus: Frequency and Correlation with Prolactinemia and Disease Activity. *Journal of Rheumatology* 2001;28(7):1546-1553.
58. Krause I, Blumenfeld Z, Malchinsky M, Cohen S, Blank M, Eldor A. Anti-endothelial cell antibodies in the sera of hyperprolactinemic women. . *Lupus* 1998;7:377-82.
59. Chuang E, Molitch ME. Prolactin and autoimmune disease in humans. *Acta Biomed* 2007;78(suppl 1):255-261.
60. Dostál C, Moszkorzová L, Musilová L, Lacinová Z, Marek J, Zvárová J. Serum prolactin stress values in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2003;62:487-88.
61. Orbach H, Zandman-Goddard G, H. A, Barak V, Szekanecz Z, Szucs G, et al. Novel Biomarkers in Autoimmune Diseases Prolactin, Ferritin, Vitamin D, and TPA Levels in Autoimmune Diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007;1109:385-400.

62. Peeva E, Michael D, Cleary J, Rice J, Chen X, Diamond B. Prolactin Modulate the naive B Repertoire. *J. Clin. Invest* 2003;111(2):275-283.
63. Walker SE. Bromocriptine treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001;10:762-68.
64. McMurray RW. Sex Hormones in the Patogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Front in Biosc* 2001;6:193-206.
65. Walker SE, McMurray RW, Miller D. Premature death with bladder outlet obstruction and hyperprolactinemia in New Zeland Blac X New Zeland White mice treated whit ethinyl estradiol and 17 beta-estradiol. *Arthritts Rheum* 1992;35:1387-1392.
66. Elborn KB, Keisler D, Mc Murray RW. Differential Effects of estrogen and prolactin on autoimmune disease in the NZB/NZW F1 mouse model of Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* 1998;7:420-27.
67. Peeva E, Grimald C, Spatz L, Diamond B. Bromocriptin restores Tolerance in estrogen-treated mice. *J. Clin. Invest* 2000;106(11):1373-79.
68. Foster MP, Jensen ER, Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Horseman ND, Dorshkind K. Humoral and cell-mediated immunity in mice with genetic deficiencies of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-1, and thyroid hormone. *Clin Immunol.* 2000;96:140-49.
69. Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ, Horseman ND, Buckley AR. Prolactin Suppresses Glucocorticoid-Induced Thymocyte Apoptosis in Vivo. *Endocrinology* 2003;144(5):2102-2110.
70. Jacob AM, Rhode W, Ventz M, Riemekasten G, Burmester G-R, F. H. Enhanced Serum Prolactin (PRL) Levels in Paatients Whit Systemic Lupus

Erythematosus: PRL Levels are Related to the Disease Activity. *Lupus* 2001;10:544-561.

71. Pacilio M, Migliarese S, Meli R, Ambrosone L, Brunella B, Di Carlo R.

Elevated Bioactive Prolactin Levels in Systemic Lupus Erythematosus - Association with Disease activity. *Journal of Rheumatology* 2001;28(10):2216-2221.

72. Vera-Lastra O MC, Jara LJ, Cisneros M, Medina G, Ariza R, Espinosa LR.

Correlation of prolactin Serum Concentration With Clinical Activity and Remission in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. Effect of conventional Treatment.

Journal of Rheumatology 2003;30(10):2140-46.

73. Leños-Miranda A, Cárdenas-Mondragón G, Ulloa-Aguirre A, Isordia-Salas I,

Parra A, Ramirez-Peredo J. Anti-prolactin autoantibodies in pregnant women with

Systemic lupus erythematosus: maternal and fetal outcome. *LUPUS* 2007;16:342-49.

74. Jara LJ MG, Vera-Lastra O, Barile L. The impact of gender on clinical

manifestations of primary antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2005;14:607-612.

75. Jara LJ, Pacheco-Reyes H, Medina G, Angeles U, Cruz-Cruz P, Saavedra MA.

Prolactin Levels Are Associated with Lupus Activity, Lupus Anticoagulant, and Poor Outcome in Pregnancy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007;1108:218-226.

76. Verthelyi D AS. Characterization of Estrogen-Induced Autoantibodies to

Cardiolipin in Non-Autoimmune Mice. *Journal of Autoimmunity* 1997;10:115-125.

77. Serio B, Accardo S, Garnerio A, Fasciolo D, Cutolo M. Association between

anticardiolipin Antibody Positivity and Increased 17-beta-estradiol levels in

premenopausal women with Rheumatoid Arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1999;876:159-63.

78. Hou HS, Grossmann S, Molitch ME. Hyperprolactinemia in Patients With Renal Insufficiency and Chronic Renal Failure Requiring Hemodialysis or Chronic Ambulatory peritoneal Dialysis. *Am J Kidney Disease* 1985;4(4):245-248.
79. Cowden EA, Ratcliffe WA, Ratcliffe JG, Dobbie JW, Kennedy AC. Hyperprolactinemia in Renal Disease. *Clin Endocrinol*. 1978;9:241-248.
80. Molitch M. Medication-induced Hyperprolactinemia. *Mayo Clin Proc* 2005;80(8):1050-1057.
81. Bombardier C GD, Urowitz MB, Caro D, Chang, CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for Lupus patients. The committee on prognosis Studies in LES. *Arthritis Rheum*. 1992;35(6):360-340.
82. Gladman DD UM, Goldsmith CH. The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index in patients with systemic lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:809-13.
83. Li J, May W, McMurray RW. Pituitary hormones and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2005;52(12):3701-12.
84. Lindsay S, Ackerman MD. Sex Hormones and the Genesis of Autoimmunity. *Arch dermatol* 2006;142:371-76.
85. McMurray RW. Sex Hormones in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Front in Biosc* 2001;6:193-206.
86. Cohen-Solal JF, Jeganathan V, Grimaldi CM, Peeva E, Diamond B. Sex hormones and SLE: influencing the fate of autoreactive B cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;305:67-88.
87. Stoeber ZM, Zinger H, Mozes E. Beneficial effects of the anti-oestrogen tamoxifen on systemic lupus erythematosus of (NZBxNZW)F1 female mice are

associated with specific reduction of IgG3 autoantibodies. *Ann Rheum Dis* 2003;62:341-346.

88. Spangelo B, Judd A, Isakson P, and MacLeod R. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* 1989;125:575-77.

89. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42(2):328-37.

90. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1703-11.

91. Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. Biomarkers in Systemic Lupus Erythematosus II. Markers of Disease Activity. *Arthritis Rheum* 2004;50(7):2048-2065.

92. Garcia M, Colombiani-Vidal ME, Zylbersztein CC, Testi A, Marco J, Arturi A, et al. Analysis of molecular heterogeneity of prolactin in human systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004;13:575-583.

93. Nordmak G, Bengtsson C, Larsson A, Karlsson A, Sturfelt G, Rönnblom L. Effects of dehydroepiandrosterone supplement on health-related quality of life in glucocorticoid treated female patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2005;38(7):531-40.

94. Robinzon B, Cutolo M. Should dehydroepiandrosterone replacement therapy be provided with glucocorticoids? *Rheumatology* 1999;38:488-495.

95. Leños-Miranda A, Cárdenas-Mondragón G. Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity. *Rheumatology* 2005;45:97-101.
96. Vera-Lastra O, Mendez C, Jara LJ, Cisneros M, Medina G, Ariza R, et al. Correlation of prolactin Serum Concentration With Clinical Activity and Remission in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. Effect of conventional Treatment. *Journal of Rheumatology* 2003;30(10):2140-46.
97. Jara LJ, Gómez-Sanches C, Silveira LH, Martínez-Osuna P, Vasey FB, Espinoza LR. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. *Am J Med Sci* 1992;303:222-6.
98. Leños-Miranda A, Cárdenas-Mondragón G. Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity. *Rheumatology* 2006;45:97-101.
99. Speroff L, M.A. F. Neuroendocrinology. In: *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005.
100. Mosca M, Tani C, Neri C, Baldini C, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD). *Autoimmune Rev* 2006;6(1):1-4.
101. Keith MP, Moratz C, Tsokos GC. Anti-RNP immunity: Implications for tissue injury and the pathogenesis of connective tissue disease. *Autoimmune Rev* 2007;6:232-236.
102. Kozáková D, Rovensk'y J, Cebecauer L, Bořák V, Jahnová E, Vigařs M. Prolactin levels and autoantibodies in female patients with systemic lupus erythematosus. *Z Rheumatol* 2000;59(suppl 2: II):80-84.

103. Furukawa f IS, Norris DA. Stimulation of anti-RNP antibody binding tu cultured Keratinicytes by estradiol. Arch dermatol 1991;283:258-261.
104. McIntyrea JA, Wagenknechta DR, Faulka WP. Antiphospholipid antibodies: discovery, definitions, detection and disease. Prog Lipid Res 2003;42.
105. Lim W, Crowther MA. Antiphospholipid antibiodies: a critical review of the literature. Current Opinion in Hematology 2007 2007;14:494-499.
106. Sahin M, Duzgun N, Tunc SE, Tutkak H. Antibodies to β 2-glycoprotein-I: Relation of anticardiolipin antibodies with clinical and laboratory parameters in patients with systemic lupus erythematosus. Clin Biochem 2007;40:526-530.
107. Loizou S, Samarkos M, Norsworthy JK, Cazabon MJ, M.J. W, Davies KA. Significance of anticardiolipin and anti-B2-glycoprotein I antibodies in lupus nephritis. Rheumatology 2000;39:962-968.
108. Janardhan V WP, Kase CS, Massaro JM et al Anticardiolipin antibodies and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham cohort and offspring study. Stroke 2004;35:736-741.
109. Todorova M, Kamenov Z, Baleva M, Christov V, Nicolov K. Anticardiolipin antibodies during hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women. Maturitas 2004;48:393-397.
110. Tuominen A, Miller YI, Hansen LF, Kesäniemi YA, Witztum JL, Hörkkö S. A natural antibody to oxidized cardiolipin binds to oxidized low-density lipoprotein, apoptotic cells, and atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26(9):2096-12.

111. Damoiseaux J, Jeyasekharan AD, Theunissen R, Tervaert JW. Cross-reactivity of IgM and IgG anticardiolipin antibodies with oxidized-low density lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:163-9.
112. Florian M, Magder S. Estrogen decreases TNF-alpha and oxidized LDL induced apoptosis in endothelial cells. *Steroids*. 2008 Jan;73(1):47-58. Epub 2007
Steroids 2008;73(1):47-58.

ANEXOS

a. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa:

Associação entre os níveis de Prolactina e Macroprolactina com o grau de atividade da doença em mulheres com Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Pesquisador responsável:

Dra. Fabiane Tiskievicz

Contato: Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Quintas-feiras: Pela manhã: Zona 16 :Fone: 21018246

Pela tarde Zona 15.: Fone: 21018271

Informações sobre a pesquisa:

Nossa pesquisa tem como objetivo medir os níveis de prolactina e macroprolactina, verificando a presença de alterações nestes hormônios e sua relação com os períodos em que há melhora ou piora dos sintomas do Lúpus.

Com isso, tentamos compreender melhor como os hormônios sexuais influenciam esta doença, a qual ocorre nove vezes mais em mulheres em comparação com homens, afim de no futuro, poder oferecer algum benefício para as pacientes portadoras de Lúpus.

Sua participação na pesquisa não é obrigatória, sendo de sua livre escolha, sem nenhum prejuízo em caso de recusa .

Caso concorde em participar da pesquisa, durante a coleta dos exames de rotina para o acompanhamento do Lúpus, serão coletados 5ml adicionais de sangue para realização de dosagens hormonais. A senhora será convidada a responder a um questionário sobre patologias anteriores e histórico ginecológico e obstétrico, a ser realizado no dia da sua consulta.

As pacientes que apresentarem alterações hormonais serão encaminhadas através de interconsulta para o Ambulatório de Endocrinologia Ginecológica do Serviço de Endocrinologia, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Estas pacientes terão continuidade da investigação e acompanhamento endocrinológico.

Haverá total privacidade e proteção dos dados pessoais apresentados e somente pessoas autorizadas e pertencentes diretamente à pesquisa terão conhecimento dos dados coletados.

Consentimento:

Eu, _____, portadora da carteira de identificação n.º _____, aceito participar da pesquisa acima referida e declaro terem sido esclarecidas todas as minhas dúvidas sobre esta.

Paciente _____

— Pesquisador: _____

— Porto Alegre, de de .

b. Questionários/Formulários

1. Protocolo: Hiperprolactinemia e LES. ()

Responsável: Fabiane Tiskievicz (f:96537473/ 33313488)

Data: ___/___/___ Prontuário _____

Nome: _____

Idade: _____

Endereço: _____ Fone: _____

1. Antecedentes Gineco/Obstétricos:

Gestações: (___) Sim (___) Não

Idade da Menarca: _____ DUM _____

MAC: (___) Não usa

(___) Não hormonal

(___) Hormonal Qual? _____

Ciclos menstruais: (___) Regulares

(___) Amenorréia

(___) Irregulares = Descrever

2. Tratamento específico para LES: () Sim () Não

Medicação	Sim	Não	Tempo de uso
Corticóide			
Azatioprina			
Cloroquina			

3. Outras medicações em uso atualmente:

4. Como foi feito o diagnóstico?

5. Diagnóstico prévio de HPRL? () Sim

() Não

6. Tratamento Usado: (___) Bromocriptina

(___) Cabergolina

(___) outro _____

7. SLEDAI (escore): _____

Exames:

Data					
PRL(basal)					
PRL (T1)					
Estradiol					
T4					
TSH					
Testosterona					
DHEA-S					
FAN					
Anti-DNA					
TGO/TGP					
C3					
C4					
VSG					
Leucócitos					
Linfócitos					
Plaquetas					
Uréia					
Creatinina					
Equ					

2. Tabela SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)

Peso	Pontuação	Descrição	Definição
8		Convulsões	Início recente. Excluir causa orgânica ou metabólica.
8		Psicose	Distúrbio na percepção da realidade com alteração das atividades normais. Inclui alucinações, incoerência, perda marcada de associações, conteúdo empobrecido da fala, pensamento ilógico, bizarro, desorganizado. Catatonia. Exclui uremia e causas medicamentosas.
8		Síndrome Orgânica Cerebral	Função mental alterada, com diminuição na orientação, memória ou outra função intelectual, com rápido início e fatores clínicos flutuantes. Inclui enuveamento da consciência, com diminuição da capacidade de foco e incapacidade de manter a atenção, mais pelo menos dois dos seguintes: distúrbio de percepção, incoerência, insônia ou sonolência diurna, aumento ou diminuição da capacidade psicomotora. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou medicamentosas.
8		Distúrbios visuais	Corpos alodinosos, hemorragia retiniana, exudato ou hemorragias na coróide, neurite óptica. Exclui HAS, infecção, medicações
8		Desordem de nervos cranianos	Envolvimento de início recente
8		cefaléia lúpica	Cefaléia severa, persistente; pode ser enxaquecosa, porém não deve responder a analgesia com narcóticos
8		AVC	Início recente. Exclui arteriosclerose
8		vasculites	Ulceração, gangrena, nódulos dolorosos nos dedos, infarto periungueal, splinter hemorrhages, biópsia ou angiograma provando vasculite.
4		artrite	Mais de duas articulações com dor e sinais de inflamação
4		miosite	Dor e fraqueza em musculatura proximal, associada a aumento da creatinina fosfoquinase/aldolase ou alterações na eletroneuromiografia ou biópsia mostrando miosite.
4		Cilindros urinários	Heme-granular ou hemáticos.
4		hematúria	> 5 células por campo de maior aumento. Exclui cálculo,

		infecção ou outras causas.
4	proteinúria	> 0,5 gm/24h. Início recente ou aumento de .
4	piúria	> 5 leucócitos por campo de grande aumento. Exclui infecções.
2	Surgimento de Rash	Início recente ou recorrência de rash tipo inflamatório
2	alopecia	Início recente ou anormal de perda de cabelo localizada ou difusa
2	Úlceras mucosas	Início recente ou recorrências de úlceras nasais ou orais.
2	pleurise	Dor torácica pleurítica com atrito ou derrame pleural.
2	pericardite	Dor pericárdica, com pelo menos um dos seguintes: atrito, derrame ou confirmação por ECG ou Ecografia cardíaca.
2	Diminuição de complemento	Diminuição de CH50, C3 ou C4, abaixo dos limites normais para o padrão do laboratório.
2	Aumento da ligação do DNA	Aumento de 25% ou acima do limite normal para o padrão do laboratório.
1	febre	> 38°C. Exclui causa infecciosa.
1	trombocitopenia	< 100.000 plaquetas / mm ³
1	leucopenia	< 3.000 leucócitos / mm ³ . Exclui causas medicamentosas.
