

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

**AVALIAÇÃO DO VOLUME PLAQUETÁRIO MÉDIO EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

LISANDRA TORRES HARTMANN

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DO VOLUME PLAQUETÁRIO MÉDIO EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

LISANDRA TORRES HARTMANN

Orientador: Prof. Dr. Odirlei André Monticielo

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2016

BANCA EXAMINADORA

Ana Paula Alegretti

Charles Lubianca Kohen

Claiton Viegas Brenol

Rafael Mendonça da Silva Chakr

Dedico ao meu filho, meu marido, minha mãe e ao meu pai que sempre me apoiaram em minha vida e também no período realização da dissertação de mestrado.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Odirlei André Monticielo, pelo apoio e presença constante me orientando no desenvolvimento deste estudo.

À farmacêutica Ana Paula Alegretti pelo estímulo a realizar o mestrado desde o início.

À farmacêutica Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado pelo apoio e amizade a mim confiados durante o desenvolvimento do mestrado.

À Luciana Scotti, farmacêutica, chefe da Unidade de Bioquímica Clínica pelo apoio, confiança e estímulo dados, desde o início de seu trabalho na chefia da Bioquímica Clínica.

Ao colega de trabalho e supervisor da Unidade de Bioquímica Clínica Carlos Alberto pelo apoio durante a realização do trabalho do mestrado e das disciplinas.

Ao chefe de Serviço de patologia Clínica Prof. Galton de Campos Albuquerque pelo apoio.

As colegas da coleta Karine de Oliveira Vargas Pacheco da Silva e Juliana Beatriz de Lima por me avizarem da chegada dos pacientes na zona 14 para coleta do termo de consentimento.

Aos meus colegas de trabalho da Unidade de Bioquímica Clínica pelo apoio e compreensão durante as minhas saídas da Unidade para comparecer às aulas do mestrado.

À Gabriela Ratkiewicz Taffarel secretária do serviço de Reumatologia pelo apoio durante a realização do meu mestrado.

À Vera, secretária do Programa de Pós-graduação, pelo apoio durante a minha trajetória no mestrado.

A meu marido Antonio Jaques Rodrigues da Silva pelo apoio, amor e compreensão dedicados a mim durante a nossa vida juntos.

Ao meu filho Antonio Pietro Hartmann da Silva pela alegria que trouxe a minha vida desde seu nascimento.

A minha mãe Anete Mari Torres por me apoiar em todos os momentos importantes da minha vida. Ao meu pai Adroaldo Hartmann por me ensinar a valorizar o estudo.

A minha sogra Lacy Rodrigues da Silva e sogro Antonio Ely da Silva e cunhada Eliane da Silva Schrank pelo incentivo constante na realização e conclusão do mestrado.

RESUMO

Introdução: O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória autoimune crônica de etiologia ainda pouco conhecida, e de natureza pleomórfica, que intercala períodos de atividade e remissão. O desenvolvimento da autoimunidade no LES está associado à perda da tolerância imunológica e do controle imunorregulatório, tendo seus achados clínicos e laboratoriais variados. A atividade do LES pode ser medida pelo SLEDAI (*systemic lupus erythematosus disease activity index*) que é uma ferramenta complexa e que exige treinamento e conhecimento para sua aplicação. O volume plaquetário médio (VPM) é um marcador de ativação de plaquetas associado à inflamação, o que o torna um potencial candidato para a avaliação de atividade de doença no LES.

Objetivos: Avaliar o VPM em pacientes com LES e comparar com indivíduos hígidos. Estudar a correlação entre o VPM e o índice de atividade de doença (SLEDAI) nos pacientes com LES. Analisar a correlação entre o VPM e a velocidade de sedimentação globular (VSG), a proteína C reativa (PCR), e os componentes do complemento C3 e C4.

Métodos: Estudo transversal no qual foram incluídos 81 pacientes com LES segundo critérios de classificação diagnóstica do *American College of Rheumatology* (ACR), e 58 controles hígidos. Os pacientes foram selecionados consecutivamente por conveniência, de acordo com exames laboratoriais e SLEDAI devidamente calculados. As coletas foram realizadas entre outubro de 2015 e julho de 2016. LES ativo foi definido como SLEDAI>0 no momento da coleta. O VPM foi analisado no equipamento de automação *Sysmex XE 5000*.

Resultados: O VPM estava reduzido nos pacientes com LES em atividade, quando comparado ao grupo de pacientes com LES inativo ($10,0 \pm 0,7 \text{ fL}$ vs. $10,7 \pm 1,0 \text{ fL}$, $p=0,005$). Existe uma fraca correlação inversa entre o valor do SLEDAI e o VPM ($r=-0,29$, $p=0,009$). Houve uma diferença significativa no VPM entre o grupo dos controles e os pacientes com LES ativo

($10,9 \pm 1,0$ fL vs. $10,0 \pm 0,7$ fL, $p < 0,001$). Em contrapartida, o VPM foi semelhante entre o grupo controle e o grupo de pacientes com LES inativo ($10,9 \pm 1,0$ fL vs. $10,7 \pm 1,0$ fL, $p = 0,40$). Não foi encontrada correlação entre o VPM e o VSG, PCR, C3 e C4.

Conclusão: O VPM está diminuído nos pacientes com LES ativo e correlaciona-se inversamente com o SLEDAI. Apesar da diferença entre os valores encontrados no VPM, entre os pacientes com LES ativo e inativo, os resultados podem não ser relevantes clinicamente. Estudos longitudinais prospectivos são necessários para melhor caracterizar a flutuação do MPV em diferentes estados de atividade da doença para definir mais claramente o papel do MPV no LES.

Palavras chave: volume plaquetário médio (VPM), lúpus eritematoso sistêmico (LES), *systemic lupus erythematosus disease activity* (SLEDAI), autoimunidade, atividade de doença.

ABSTRACT

Background Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an inflammatory autoimmune chronic disease etiology still unknown, and pleomorphic nature, which intersperses periods of activity and remission. The development of autoimmunity in SLE is related to loss of immunological tolerance and immunoregulatory control and clinical symptoms can be varied. The SLE activity can be measured by SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity) which is a complex tool and it requires time and knowledge for your application. The MPV (mean platelet volume) is a marker of platelet activation and has been shown to be associated with inflammation, which makes it a potential candidate for use in the assessment of disease activity in SLE. In this study, we evaluated the MPV (Mean platelet volume) in healthy individuals and compared with SLE patients and correlate with SLEDAI VPM.

Objectives: -To evaluate the MPV in SLE patients and compared with healthy individuals; to study the correlation between MPV and the SLEDAI patients with SLE and assess a possible correlation between MPV with erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), complement 3 (C3), and complement 4 (C4).

Methods: This is a cross-sectional study in which 81 patients with SLE according to the American College of Rheumatology (ACR) diagnostic classification criteria and 58 healthy controls were included. Patients were selected for convenience, according to laboratory tests and SLEDAI duly calculated. The collections were carried out between October 2015 and July 2016. Active LES was defined as SLEDAI>0 at the time of collection. The VPM was analyzed in the Sysmex XE 5000 automation equipment.

Results: In this study in patients with active SLE, the MPV is reduced when compared to the group of patients with inactive SLE [10.0 ± 0.7 fL vs. 10.7 ± 1.0 fL, $p=0.005$]. There is a weak inverse correlation between the SLEDAI value and the MPV ($r=-0.29$, $p=0.009$). There was a significant difference between the control group and the patients with active SLE (10.9 ± 1.0 fL

vs. $10.0 \pm 0.7 \text{ fL}$, $p < 0.001$). In contrast, the MPV was similar between the control group and the group of patients with inactive SLE ($10.9 \pm 1.0 \text{ fL}$ vs $10.7 \pm 1.0 \text{ fL}$, $p = 0.40$). There was no correlation between MVP and CRP, ESR, C3 and C4.

Conclusion: MPV is decreased in patients with active SLE and inversely correlated with SLEDAI. Despite the difference between MVP values, between active and inactive SLE patients, the results may not be clinically relevant. Prospective longitudinal studies are needed to better characterize the fluctuation of MPV in different states of disease activity to more clearly define the role of MPV in SLE.

Key Words: Mean platelet volume (MVP), systemic lupus erythematosus (SLE), and systemic lupus erythematosus disease activity (SLEDAI), autoimmunity, disease activity.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1- Histograma de distribuição das plaquetas.....	28
Figura 2- Representativa do marco inicial teórico.....	34
Tabela 1- Representativa da estratégia de busca das referências bibliográficas.....	19
Tabela 2- Intervalos de referência para os parâmetros plaquetários.....	30

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura1- <i>The correlation between MPV and SLEDAI</i>	53
Figura2- <i>The sensitivity versus the specificity for different cutoff levels of MPV, ESR, CRP, C3 an C4</i>	56

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela1- <i>Demographic, clinical, and laboratorial features of SLE patients</i>	54
Tabela2- <i>Laboratory and epidemiological profile of patients and healthy controls</i>	55
Tabela3- <i>Description of treatment in patients with inactive and active lupus</i>	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AR - artrite reumatóide

ACR - *American College of Rheumatology* (Colégio Americano de Reumatologia)

DAS 28 - *disease activity score 28*

DNA - ácido desoxirribonucleico

EA- espondilite anquilosante

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

FMF - febre familiar do mediterrâneo

GC - glicocorticóide

HAS - hipertensão arterial sistêmica

HBV - *Hepatitis B virus* (vírus da hepatite B)

HCV - *Hepatitis C virus* (vírus da hepatite C)

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HIV - *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

IL - interleucinas

LES - lúpus eritematoso sistêmico

LESJ - lúpus eritematoso sistêmico juvenil

MVP - mean platelet volume (volume plaquetário médio)

OA- osteoartrite

PCR - proteína C reativa

PF4 – fator plaquetário 4

PTI - púrpura trombocitopênica idiopática

SLEDAI - *systemic lupus erythematosus disease activity index*

SLICC/ACR - *systemic lupus international collaborating clinics/ American College of Rheumatology*

TNF- α - *tumor necrosis factor alpha* (fator de necrose tumoral alfa)

VPM - volume plaquetário médio

VS- versus

VSG - velocidade de sedimentação globular

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	11
LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO.....	11
LISTA DE TABELAS DO ARTIGO.....	11
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	18
2.2 Lúpus eritematoso sistêmico (LES).....	19
2.2.1 Conceito do LES.....	19
2.2.2 Epidemiologia do LES.....	20
2.2.3 Etiologia e patogênese do LES.....	21
2.2.4 Manifestações Clínicas do LES.....	22
2.2.5 Atividade de doença no LES.....	24
2.3 VPM (volume plaquetário médio).....	26
2.3.1 Conceito do VPM.....	26
2.3.2 Plaquetas.....	26
2.3.3 Metodologias disponíveis para dosagem de plaquetas.....	27
2.3.4 Interferentes pré-analíticos no VPM.....	29
2.3.5 Valores de referência para VPM.....	29
2.3.6 Vpm e outras doenças inflamatórias.....	30
2.3.7 Avaliação do VPM em pacientes com LES.....	32
3 MARCO TEÓRICO.....	34
4 JUSTIFICATIVA.....	35
5 OBJETIVOS.....	36
5.1 Objetivos gerais.....	36
5.2 Objetivos específicos.....	36
6 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	37
7 ARTIGO CIENTÍFICO.....	46
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	61
10 ANEXOS.....	62
10.1 Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	62

10.2 Anexo II- SLEDAI (<i>systemic lupus erythematosus disease activity</i>).....	66
10.3 Anexo III- Critérios de classificação do LES.....	68
10.4 Anexo IV- Declaração STROBE.	71

1. INTRODUÇÃO

O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune, de natureza pleomórfica quanto à patogênese e ao surgimento das manifestações clínicas, e costuma evoluir com períodos de atividade e remissão (1). O desenvolvimento da autoimunidade no LES está relacionado à perda da tolerância imunológica e do controle imunorregulatório (1).

A atividade do LES pode ser medida por índices de atividade, como SLEDAI (*systemic lupus erythematosus disease activity index*), que é uma ferramenta composta por 24 variáveis clínicas e laboratoriais que são avaliadas em um determinado momento durante a evolução da doença (2). Ainda não existe um exame laboratorial fidedigno e confiável que possa de maneira independente quantificar esta atividade de doença. O VPM (volume plaquetário médio) tem sido estudado e considerado um marcador de ativação de plaquetas e está associado com inflamação (3,4), o que o torna um potencial candidato para avaliar o estado inflamatório em algumas doenças autoimunes, dentre elas, o LES.

O VPM é um dos índices plaquetários, um parâmetro fornecido por analisadores hematológicos, obtido sem custo adicional no exame de hemograma (5). Os contadores automáticos apresentam-se cada vez mais evoluídos, permitindo a análise de novos parâmetros hematológicos, com elevado potencial de interesse clínico (5,6). O VPM representa uma variável biológica que determina a atividade plaquetária cujo potencial clínico ainda está sendo estudado (5,6).

Alguns estudos tem avaliado o uso do VPM em várias doenças inflamatórias, como indicador de atividade de doença, inclusive em lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) (3,4,7-11). Yavuz S *et. al.* demonstraram que o VPM se mostrou estatisticamente mais elevado nos pacientes que nos controles e significativamente mais elevado na fase ativa do

que na fase inativa da doença, apresentando resultados indicativos de existência de correlação entre o VPM e a atividade de doença (3).

Recentemente, o VPM foi estudado retrospectivamente, em pacientes adultos com LES, apresentando valores reduzidos nos pacientes com a doença em atividade (12). Desta maneira, é importante que se investigue o comportamento do VPM em pacientes adultos com LES, estudando sua utilidade como indicador de atividade de doença e sua correlação com ferramentas já utilizadas, tais como SLEDAI.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar o VPM em pacientes com LES e doadores hígidos do banco de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Além disto, avaliar a correlação entre VPM e o índice de atividade de doença medido pelo SLEDAI nos pacientes com LES.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados ao VPM em pacientes com LES. Também consideramos na revisão da literatura a pesquisa de fatores que demonstrassem a correlação entre a atividade de doença, medida pelo SLEDAI, e o VPM no LES. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: Scielo, Pubmed e banco de teses da CAPES, no período de 1982 a 2016. Foram realizadas buscas através dos termos *MVP (mean platelet volume), systemic lupus erythematosus, MVP autoimmune disease, SLE etiology, platelet systemic lupus erythematosus, markers of SLE activity*, conforme tabela 1.

PALAVRAS-CHAVE

1 - *MPV*

2 - *Platelet*

3 - *Systemic lupus erythematosus;*

4 - *SLE etiology;*

5- *Autoimmune disease;*

6 - *Platelet systemic lupus erythematosus;*

7 - *Markers of SLE activity*

Tabela1. Estratégia de busca de referências bibliográficas

Palavras Chave	PubMed	Scielo	Capes
1	1970	67	34000
2	205202	974	882000
3	51776	682	250000
4	19837	10	25500
5	381887	906	694000
6	1009	2	28600
7	479	9	19700

Fonte: Elaborado pela Autora 2016.

Este é o resultado da busca da combinação das palavras-chave. Dentre estes estudos foram lidos os resumos e selecionados os artigos de acordo com a maior relevância, excluindo os artigos repetidos, totalizando aproximadamente 200 artigos, destes foram selecionados 72 artigos (referências).

2.2 LES

2.2.1 Conceito de LES

O LES é uma doença de caráter inflamatório crônico, de etiologia autoimune ainda pouco conhecida, com envolvimento de diferentes órgãos e sistemas sendo caracterizada pela presença de inúmeros autoanticorpos e amplo espectro de manifestações clínicas (1). Podem ser encontradas manifestações inespecíficas como febre, fadiga, anorexia, perda de peso, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, alopecia e artralgias, assim como serosite (pleura, pericárdio e peritônio), vasculite, miosite, nefrite, envolvimento neuropsiquiátrico, diversos tipos de lesões cutâneas (eritema malar, lúpus cutâneo subagudo, lúpus discóide), anemia,

leucopenia, linfopenia e trombocitopenia (1). O diagnóstico é convencionalmente realizado através de achados clínicos e laboratoriais, conforme critérios de classificação diagnóstica propostos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) em 1982 e revisados em 1997 (13-15), descritos no anexo III.

2.2.2 Epidemiologia

A incidência estimada do LES em diferentes locais do mundo varia em torno de 1,8 a 20 casos por 100000 indivíduos por ano. A prevalência pode variar de 7 a 160 casos para cada 100000 pessoas (16-19). A mortalidade associada ao LES é 1,5 a 5 vezes maior do que na população em geral (16). O LES é mais comum em mulheres numa razão de aproximadamente 9 mulheres para 1 homem, nas crianças, esta proporção cai para 3:1; em adultos jovens chega a 15:1 e nos indivíduos com maior idade tende novamente a ser menor, aproximadamente 8:1, fato este atribuído a influências hormonais, 90% dos casos ocorrem em mulheres na idade fértil, com idade média de aproximadamente trinta anos (20-21). Em estudo epidemiológico incluindo os Estados Unidos, Ásia, Europa, Martinica e Austrália demonstrou-se uma variação na incidência de 1 a 32 casos, para cada 100000 pessoas/ano (22). Neste estudo, a prevalência foi maior nos países europeus se comparada aos Estados Unidos. Espanha, Itália e França foram os países Europeus onde foi maior a prevalência da doença (22). Estudo no nordeste do Brasil estimou uma incidência de LES de aproximadamente 8,7 casos para cada 100000 pessoas por ano. Sendo no caso das mulheres uma estimativa de 14 casos para cada 100000 pessoas por ano e nos homens de 2,2 casos para cada 100000 pessoas ano (23). A maior incidência ocorreu entre as mulheres com idade entre 35 e 39 anos (23). Estudo realizado em Cascavel, no Paraná, relata que a incidência observada nesta região é semelhante à observada em estudos internacionais, estimada em 4,8 casos/100.000 habitantes/ano, sendo todos pacientes pertencentes ao sexo feminino (24).

2.2.3 Etiologia e patogênese do LES

O LES é uma doença inflamatória crônica de natureza autoimune com etiologia ainda pouco conhecida (1). Sua fisiopatogenia envolve fatores genéticos, imunológicos, hormonais e ambientais e as manifestações clínicas e laboratoriais são pleomórficas (13-15). O desenvolvimento da autoimunidade no LES está relacionado à perda da tolerância imunológica e do controle imunorregulatório, e também à ativação do sistema complemento e ao desenvolvimento de anticorpos contra antígenos próprios (1). O desenvolvimento característico de anticorpos contra o DNA e outros antígenos nucleares e de membrana sugerem o envolvimento de vários mecanismos (16). Além disso, existe a influência genética determinada pela participação de um conjunto de alterações em diferentes genes e de fatores ambientais, principalmente radiação UV-B e algumas infecções virais, que também podem estar associados ao desencadeamento da doença (25, 26).

A influência hormonal na patogênese no LES é determinada principalmente pela presença do estrogênio que, na medida em que atua de diversas maneiras estimulando o sistema imune, poderia contribuir para o desequilíbrio dos mecanismos imunorregulatórios, característico da doença (21). Isto explicaria em parte o predomínio do LES em mulheres (21). Entretanto, fatores genéticos, mais recentemente descritos, ligados ao cromossomo X e que atuam diretamente na fisiopatogenia do LES, ajudam a entender melhor esta estreita relação desta doença com a população feminina (27-29).

A autoimunidade é um fenômeno fisiológico, onde há reação entre anticorpos e autoantígenos em indivíduos sadios (16). As doenças autoimunes se manifestam quando este equilíbrio fisiológico é rompido e as interações imunológicas determinam o surgimento de lesões teciduais e disfunção em diferentes órgãos e sistemas (16). Além disso, existe a influência genética e de fatores ambientais que podem estar associados à doença (30).

O fenômeno da autoimunidade tem sido atribuído à perda da autotolerância (26). Devido à inadequado controle central ou periférico, ou ainda, o silenciamento de linfócitos

autorreativos, levando ao desenvolvimento de múltiplos autoanticorpos específicos (26). Apoptose desregulada, seguida da remoção inadequada de células apoptóticas e restos nucleares, também podem contribuir para a autoimunidade, devido à exposição prolongada do sistema imune aos componentes nucleares e de membranas celulares (25-26).

2.2.4 Manifestações Clínicas do LES

No momento do diagnóstico, a febre, geralmente moderada e com resposta rápida ao glicocorticoide (GC), é encontrada na maioria dos pacientes. Sendo a fadiga uma das principais queixas apresentadas pelos pacientes com LES em atividade. Outros sintomas como mialgias, perda de peso e linfadenopatia reacional periférica podem ser frequentemente encontradas nos pacientes com LES (31). Depois dos sintomas constitucionais, a manifestação mais encontrada é o envolvimento articular, sendo detectado em até 95% dos pacientes. Além disso, pode ocorrer também necrose asséptica de múltiplas articulações, principalmente da cabeça do fêmur, particularmente em pacientes em uso de GC em doses elevadas durante períodos longos (32). O uso crônico de GC e deficiência de vitamina D associada à baixa exposição solar, geralmente está associado com a perda de massa óssea com aumento do risco de osteoporose e fraturas (33-34). As lesões de pele são comuns podendo ser variadas. A clássica lesão em asa de borboleta, que aparece em menos de 50% dos casos, é identificada por eritema malar e no dorso do nariz, preservando o sulco nasolabial. A maioria dos pacientes apresenta fotossensibilidade depois da exposição à radiação solar ou artificial (lâmpadas fluorescentes). Sendo caracterizada por eritema nas áreas expostas, ocorrendo em 60 a 80% dos casos. Outros sinais comuns são as úlceras orais e nasais, na maioria das vezes indolores. No lúpus discoide, as lesões manifestam-se como placas eritematosas cobertas por uma escama aderente, normalmente no couro cabeludo, pescoço, orelhas, e face. Primeiramente tais lesões são hiperpigmentadas evoluindo para uma

área central atrófica, com ausência de pêlos. Já no lúpus cutâneo subagudo, as lesões se localizam em áreas fotoexpostas, sendo simétricas, superficiais, não cicatriciais. No princípio, essas lesões iniciam como pequenas pápulas eritematosas, progredindo para lesões anulares policíclicas ou pápulo escamosas. Nesta forma de apresentação, pode-se encontrar a presença do anticorpo anti-Ro/SSA. O fenômeno de Raynaud está presente em cerca de 16 a 40% dos pacientes e geralmente sua presença está associada com estresse emocional ou frio (31). A agudização do LES pode ser percebida pela alopecia, que é um achado frequente, geralmente difusa ou frontal. A manifestação cardíaca mais comum do LES é a pericardite que pode ser clínica ou subclínica, ocorrendo em até 55% dos pacientes (35). O ecocardiograma pode apresentar derrame pericárdico que na maioria das vezes é pequeno sendo detectável apenas neste exame. O derrame pericárdico raramente evoluindo para tamponamento cardíaco ou pericardite constrictiva. A miocardite está frequentemente associada à pericardite, ocorrendo em cerca de 25% dos casos. Também pode ser detectado pelo ecocardiograma, o acometimento valvar ecocardiograma, sendo o espessamento valvar a alteração mais encontrada. A endocardite de Libman-Sacks caracterizada por lesões verrucosas, principalmente localizadas nas valvas aórtica e mitral, é descrita em até 43% dos pacientes (36). Na maioria das vezes apresenta um curso clínico silencioso, podendo raramente, evoluir com eventos tromboembólicos e endocardite infecciosa. Também podem ser evidenciados episódios tromboembólicos associados à presença de anticorpos antifosfolípidos e ao uso crônico de GC ou de contraceptivos orais (37). Outra manifestação muito importante encontrada nos pacientes com LES é a doença arterial coronariana que está relacionada com processo acelerado de aterogênese sendo responsável por morbidade e mortalidade precoces (38). Cerca de metade dos casos dos pacientes podem apresentar envolvimento pulmonar ou pleural. Sendo mais comum a pleurite com derrame de pequeno a moderado volume, na maioria das vezes sendo bilateral. Também podemos encontrar hipertensão pulmonar e pneumonite lúpica, porém mais raramente. Hipertensão pulmonar pode ser encontrada em 12 a 23% dos casos apresentando intensidade leve a moderada.

Pneumonite aguda cursa com febre, tosse, hemoptise, pleurisia e dispnéia, podendo ser observada em até 10% dos pacientes (39). Síndrome do pulmão encolhido e hemorragia alveolar aguda, também podem estar presentes, porém menos frequentemente (40,41). As manifestações clínicas de doença renal ocorrem em cerca de 40-60% dos pacientes, sendo a hematúria e a proteinúria persistentes os sinais encontrados com maior frequência. Pacientes com LES também podem apresentar sintomas neuropsiquiátricos. Estes sintomas são caracterizados por eventos primários (danos imunomediados no sistema nervoso central) e secundários (repercussão da doença em outros órgãos ou complicações terapêuticas). O quadro clínico do lupus neuropsiquiátrico é diverso, sendo constituído por quadros depressivos, psicose, convulsões, síndrome cerebral orgânica, déficits funcionais, acidentes vasculares encefálicos, neuropatias cranianas, neuropatias periféricas, mielite transversa, convulsões, entre outros (42). Psicose e convulsão podem ser as primeiras manifestações apresentadas de forma isolada na doença. A psicose orgânica aparece com relativa frequência devendo ser diferenciada da psicose associada ao uso de GC.

2.2.5 Atividade de doença no LES

O LES é uma doença que ao longo da sua evolução ocorre alternância de períodos de atividade e remissão, sendo fundamental para o clínico, durante o acompanhamento do paciente, verificar em que fase o mesmo se encontra. A atividade da doença pode ser avaliada usando a combinação de anamnese, exame físico e exames laboratoriais como hemograma, velocidade de sedimentação globular (VSG), proteína C reativa (PCR), exame do sedimento urinário, anticorpo anti-dsDNA nativo e dosagem de complemento (C3 e C4). Existem vários índices com sensibilidade semelhantes (43) para avaliar a atividade da doença, tais como: SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) (44), SLAM (*Systemic Lupus Activity Measure*) (45) e BILAG (*British Isles Lupus Assessment Group*) (46). A detecção de lesão irreversível ou sequela decorrente da doença pode ser medida por meio do

SLICC/ACR DAMAGE INDEX (SLICC/ACR: *Systemic Lupus International Colaborating Clinics/ American College of Rheumatology*) (47).

O SLEDAI tem sido amplamente utilizado para avaliação de atividade de doença em vários centros, com bons resultados quanto à validade e à reprodutibilidade no Brasil (26). O SLEDAI foi criado por especialistas para quantificar de forma global a atividade da doença. Esta ferramenta inclui, em sua avaliação, parâmetros clínicos e laboratoriais, levando-se em conta o órgão acometido. Realiza-se uma pontuação de acordo com o acometimento do órgão envolvido. Ao todo, são englobados nove órgãos/sistemas: sistema nervoso central, sistema vascular, rins, sistema musculoesquelético, pele, serosas, sistema imunológico, sistema hematológico e quadro clínico constitucional. A pontuação máxima teórica é de 105 pontos, mas na prática, poucos pacientes têm pontuação superior a 45. A atividade da doença pode então ser relacionada com a pontuação atingida, sendo: SLEDAI=0 (sem atividade); SLEDAI entre 1-5 (leve atividade); SLEDAI entre 6-10 (moderada atividade); SLEDAI entre 11-19 (alta atividade) e SLEDAI superior a 20 (muito alta atividade). Uma pontuação de SLEDAI igual ou superior a cinco ou com um incremento na pontuação em três pontos, associa-se com início ou mudança na terapia, em mais do que 50% dos casos (2).

Existem vários candidatos a biomarcador no LES porém com utilidade ainda limitada. Um biomarcador para o LES deve possibilitar a realização do diagnóstico precoce, ou prever recidivas. Deve ser preciso, sensível e específico, permitindo o monitoramento da atividade de doença e predizendo indivíduos suscetíveis a desenvolver o LES, (marcadores genéticos) (48).

Um biomarcador pode ser definido como evento genético, biológico ou molecular cujas variações se correlacionem com a patogênese da doença e ou suas manifestações clínicas; e que possa ser avaliado qualitativa ou quantitativamente em laboratórios (8). Alguns critérios são necessários para que o laboratório possa utilizar o suposto marcador como biomarcador de doença, incluindo a relevância biológica ou patofisiológica, ser de fácil e prática utilização na rotina e responder com acurácia e sensibilidade às variações na

atividade da doença (8). Não há marcador que avalie sozinho, bem como quantifique a suscetibilidade e atividade da doença no LES (8). O VPM pode vir a servir como marcador de atividade de doença e acompanhamento do tratamento (3).

2.3 VPM

2.3.1 Conceito do VPM

O VPM é um índice que mede o volume das plaquetas (tamanho), medido pelos equipamentos de hematologia quando realizado o exame de plaquetas. O VPM é obtido pela divisão do plaquetócrito (denominado hematócrito plaquetário ou relação do volume plaquetário, ponderado para a frequência de plaquetas) pelo número de plaquetas, conforme fórmula a seguir (5,6):

$$\text{VPM (fL)} = \text{plaquetócrito} / \text{contagem plaquetária}$$

2.3.2 Plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados provenientes dos megacariócitos da medula óssea (5,49). Normalmente medem de 1,5 a 3,5 μm (50) sendo consideradas macroplaquetas quando apresentarem tamanho entre 4 a 7 μm de diâmetro e gigantes quando forem maiores que 7 μm (5,51).

A avaliação do tamanho das plaquetas pode ser realizada através da microscopia, porém é muito subjetiva, pois a análise morfológica é duvidosa para percepção do tamanho da plaqueta (5, 52). Já o VPM por ser um índice liberado pelos analisadores hematológicos apresenta maior acurácia quando comparado à avaliação plaquetária em lâmina (5). O VPM deverá ser avaliado sempre juntamente com a contagem global de plaquetas, pois existe uma

relação inversa entre a ploidia do megariócito e o VPM. Desta forma, uma relação inversa entre o VPM e a produção de plaquetas será provavelmente encontrada (5, 53,54).

O principal agente do controle na regulação da produção plaquetária é a trombopoietina (5,55-57). Sua ação é provavelmente modulada por citocinas, fatores humorais estimuladores como IL (interleucinas) 3, 6, 11, bem como por estimuladores de colônia de granulócitos e macrófagos, e também pela eritropoietina (5,58). Em contrapartida, existem proteínas específicas, dentre elas β - trombomodulina e o fator plaquetário 4 (PF4), liberados dos alfa grânulos, que atuam como fatores humorais inibidores. (5, 57).

2.3.3 Metodologias disponíveis para dosagem de plaquetas

Atualmente, as metodologias disponíveis para a contagem de plaquetas são óptica, imunológica e impedância (5,59-61). No método óptico, o citograma das plaquetas é medido por dois diferentes ângulos de dispersão de luz, o ângulo baixo é convertido em volume celular e o ângulo alto, é utilizado para medição do índice de refração (densidade) (5,60). A avaliação imunológica das plaquetas é realizada por citometria de fluxo, pela utilização de marcadores imunológicos de superfície (anticorpos), que se ligam a proteínas específicas nas plaquetas (50). Na impedância a contagem é baseada na análise dimensional, onde as plaquetas são medidas por seu tamanho. Esta metodologia é fundamentada na medição de alterações na corrente elétrica durante a passagem de partículas, no caso células sanguíneas (suspensas numa solução salina, isotônica, boa condutora), através de um pequeno orifício entre dois eletrodos. As células não são condutoras de corrente elétrica, durante a sua passagem pela abertura (orifício) ocorre uma diferença de potencial entre os dois eletrodos. A alteração na corrente gera um pulso elétrico proporcional ao volume da célula que lhe deu origem. A quantidade de pulsos gerados determina o número de células. O tamanho/amplitude do pulso representa o volume/tamanho da célula. Um analisador específico analisa e classifica os pulsos pelo tamanho. A soma dos impulsos de todas as

células no volume específico é avaliada com recurso de um histograma. O somatório dos pulsos fornece o valor de hematócrito e no caso das PLT, o valor do plaquetócrito (62).

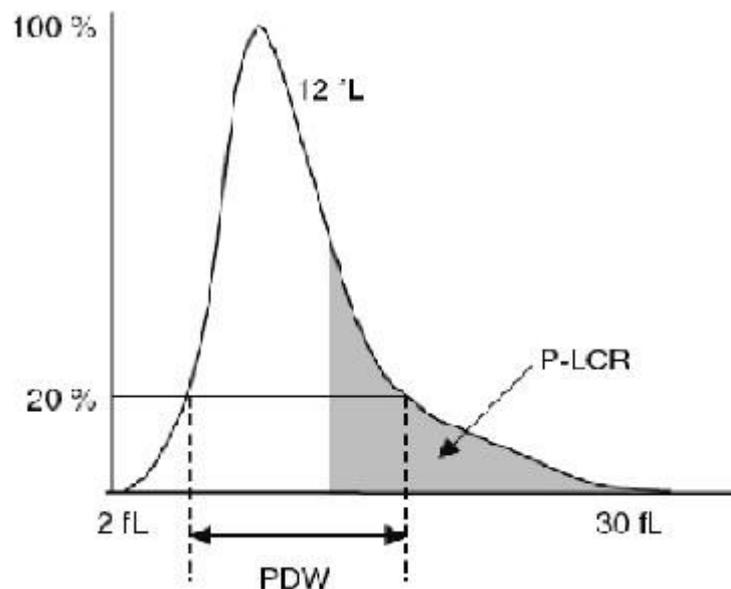


Figura 1. Histograma de distribuição das plaquetas para a determinação do parâmetro P-LCR pelos analisadores hematológicos Sysmex. P-LCR (%): porcentagem de macroplaquetas; PDW: distribuição do volume da população de plaquetas; LD: região de baixa distribuição; UD: região de alta distribuição.

Fonte: Ref. Leader A, *et al.*(6).

2.3.4 Interferentes pré-analíticos no VPM

O VPM, medido juntamente com as plaquetas, no hemograma, é um sensível indicador de desordens plaquetárias *in vivo*. *In vitro*, sofre influência de interferentes pré-analíticos. Embora o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) seja o anticoagulante usado na rotina dos laboratórios, para contagem de células, ele pode induzir a modificações na forma e na ultraestrutura das plaquetas. Plaquetas coletadas com esse anticoagulante podem sofrer alterações com o tempo e a temperatura, e devem ser processadas no equipamento em até duas horas após a coleta, para evitar que as mesmas fiquem esféricas (63,64). Em contrapartida, o anticoagulante citrato de sódio pode deixar as plaquetas discóides (5, 65). A interferência do anticoagulante deve ser controlada através da padronização do tempo entre a

venipunctura e a análise da amostra, já que estudos anteriores demonstraram que o aumento do tamanho do VPM é inferior a 0,5 fL, quando a análise é realizada em até duas horas após a coleta do sangue (5,66).

2.3.5 Valores de referência para o VPM

Segundo estudos anteriores (5,50), o ideal é que seja padronizado em cada laboratório, de acordo com sua rotina, e população estudada, os valores de referência para o VPM. Neste estudo referenciamos intervalo dos valores de referência para os parâmetros plaquetários de estudo anterior, pertencente ao projeto Elsa Brasil, que utilizou o equipamento Sysmex, o mesmo utilizado para dosar o VPM neste estudo, na tabela a seguir:

Tabela 2. Intervalo dos valores de referência para os parâmetros plaquetários.

Parâmetro Plaquetário	Mediana	Intervalo de Referência	
		Percentil 2,5	Percentil 97,5
VPM (fL)	10,3	8,9	12,2
<i>PDW</i>	12,0	9,4	16,0
P-LCR (%)	27,0	15,8	41,6

VPM: Volume plaquetário médio, *PDW* (*platelet distribution with*) distribuição da população plaquetária, P-LCR: percentual de macroplaquetas (50).

2.3.6 VPM e doenças inflamatórias

Estudos recentes tem sugerido a utilização do VPM como marcador de atividade inflamatória em diversas doenças (3, 4, 5,7). Doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, diabetes, doenças infecciosas como hepatite B crônica e C, doença de Crohn (67), doenças difusas do tecido conjuntivo como artrite reumatóide, espondilite anquilosante e febre

familiar do mediterrâneo são exemplos de doenças onde o VPM vem sendo estudado, merecendo destaque, por sua significativa utilidade clínica. Se avaliarmos tais doenças o que podemos encontrar semelhante entre as mesmas é a presença do processo inflamatório (3-5,7-12).

Em estudo caso-controle retrospectivo, os autores, avaliaram pacientes com vírus da hepatite B (HBV) para verificar se o VPM poderia auxiliar na determinação da severidade da fibrose ou inflamação no fígado de pacientes crônicos. Valores mais elevados de VPM foram encontrados entre os pacientes com índices maiores de fibrose no fígado quando comparados a pacientes com índices menores [9,4 (6,8-13,1) fL vs. 8,7 (6,5-15,7) fL, $p=0,001$], sugerindo essa variação no VPM estar relacionada à presença de plaquetas novas na circulação sanguínea, sendo estas maiores do que as plaquetas velhas (9). Shen *et al* 2009, ao estudar pacientes com a doença de Crohn encontraram valores de VPM mais baixos em pacientes masculinos quando comparados a controles saudáveis (67).

Artrite reumatoide (AR) é uma doença sabidamente associada à inflamação crônica (4, 7, 10, 11,17). Segundo Yazici S. *et al.* pacientes com AR apresentam valores elevados de proteína C reativa (PCR), velocidade de sedimentação globular (VSG) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (10). O processo inflamatório está associado à ativação das plaquetas, e o VPM está relacionado com a reatividade das plaquetas. Além disso, Yazici S. *et al.* demonstraram uma fraca correlação positiva entre o VPM e DAS 28 (*disease activity score* 28) ($r=0,27$, $p=0,007$) em pacientes com AR(10).

Kisack B. *et al.* encontraram resultados discrepantes dos anteriores ao estudar o VPM como marcador inflamatório em AR e espondilite anquilosante (EA). O VPM foi significativamente mais baixo em ambos os grupos de pacientes com EA e AR com doença ativa quando comparado aos controles (AR vs. osteoartrite (OA) $p<0,001$, EA vs. controles saudáveis $p<0,001$). Após o tratamento os valores do VPM significativamente aumentaram em EA e AR ($p<0,001$). Foi demonstrada uma correlação negativa entre os valores do VPM e

atividade de doença. Entretanto, este estudo apresentou várias limitações: foi um estudo retrospectivo, com uma amostra pequena e os autores não descreveram qual foi nem a duração do tratamento utilizado (7).

Outro autor demonstrou que a terapêutica anti-TNF α , em pacientes com AR, resultou num aumento significativo ($p=0,01$) do VPM ao longo do estudo ($7,7\pm 0,9$ fL; $7,8\pm 1,1$ fL e $8,4\pm 1,1$ fL no início do estudo, 2 semanas e 12 semanas, respectivamente). Os resultados deste estudo sugerem o uso do MPV em condições associadas com inflamação de alto grau, particularmente a AR, para o monitoramento do tratamento anti-inflamatório (68).

A febre familiar do mediterrâneo (FMF) é uma doença genética autossômica recessiva caracterizada por episódios recorrentes curtos de inflamação em diversos sítios do organismo, incluindo febre, peritonite, pleurite, sinovite e, raramente, pericardite. A complicação mais severa da FMF é a amiloidose que é semelhante ao que é visto em outras doenças inflamatórias crônicas, tais como AR. Sakalli H. *et. al.* estudaram o comportamento do VPM em crianças e adultos com FMF durante os períodos de agudização da doença para verificar se o VPM refletiria o surgimento da microalbuminúria/proteinúria no desenvolvimento da amiloidose ou não. Foram encontrados resultados significativamente mais elevados nos pacientes do que nos grupos de controles saudáveis. Quando comparados os pacientes pediátricos com os respectivos controles ($7,2\pm 1,0$ fL vs. $6,6\pm 0,4$ fL) e os pacientes adultos e seus respectivos controles ($8,5\pm 1,3$ fL vs. $7,1\pm 0,4$ fL) (69).

2.3.7 Avaliação do VPM em pacientes com LES

O primeiro estudo publicado na literatura que avaliou VPM em pacientes lúpicos envolveu uma população de pacientes com LES juvenil (LESJ), que sabidamente tem pior prognóstico do que o LES em adultos (3). Yavuz S. *et. al* avaliaram o VPM em crianças com LESJ, encontrando resultados de VPM aumentados nos pacientes com LES ativo quando

comparados aos inativos ($9,4 \pm 2,7$ fL vs. $7,5 \pm 0,9$ fL, $p=0,001$), da mesma maneira, quando comparado o grupo dos pacientes ativos com os controles ($9,4 \pm 2,7$ fL vs. $6,9 \pm 0,5$ fL, $p=0,001$). O VPM foi positivamente correlacionado ao SLEDAI ($r=0,55$, $p=0,01$)(3).

Em contrapartida, população de adultos com LES, apresentou valores diminuídos do VPM no LES em atividade se comparados aos pacientes em remissão ($7,2 \pm 1,4$ fL vs. $8,2 \pm 1,5$ fL, $p=0,005$)(12). Pacientes com LES ativo onde o principal sinal clínico era artrite também apresentaram valores de VPM significativamente diminuídos quando comparados aos inativos ($7,7 \pm 0,9$ fL vs. $8,6 \pm 1,1$ fL), da mesma maneira ao comparar pacientes com LES ativo com os controles saudáveis, os autores encontraram valores mais baixos nos pacientes do que nos controles ($7,7 \pm 0,9$ fL vs. $8,6 \pm 1,1$ fL, respectivamente) (70).

Diante das controvérsias nos estudos anteriores, é interessante ressaltar que o VPM representa a variação do tamanho das plaquetas, cuja participação ativa no processo inflamatório vem sendo cada vez mais reconhecida (71,72). Devido ao seu elevado número e sua habilidade em liberar vários mediadores inflamatórios, e por estarem idealmente posicionadas, apresentam a capacidade de desempenhar papel de sentinela e fornecer sinais precoces às células imunes (71). Habets *et al.* afirmaram em estudo anterior que durante as doenças autoimunes, as plaquetas são cronicamente expostas a estímulo intensos, o que resultaria em elevada ativação plaquetária (71).

Estudos recentes vêm demonstrando as variações do VPM em diversas doenças (3,4,6,7,9-12,57,66,68-70). Na verdade, provavelmente o VPM seja o reflexo do papel desempenhado pelas plaquetas em cada delas. Desta forma, de acordo com a intensidade do processo inflamatório característico à doença estudada, o VPM pode aumentar ou diminuir de valor, sugerindo a possibilidade de correlacionarmos esta variação com a ativação da doença, nos casos onde ocorre flutuação de atividade ao longo do tempo em doenças crônicas. Isto é característico das doenças autoimunes como AR, EA, LESJ e LES (68). Não foram encontrados relatos na literatura que expliquem a correlação da fisiopatologia do VPM no

LES. No presente estudo será validado o VPM e a sua variação em indivíduos hígidos e pacientes adultos com LES, em diferentes fases da doença, buscando verificar o desempenho do VPM como possível marcador de atividade de doença para o LES.

3. MARCO TEÓRICO

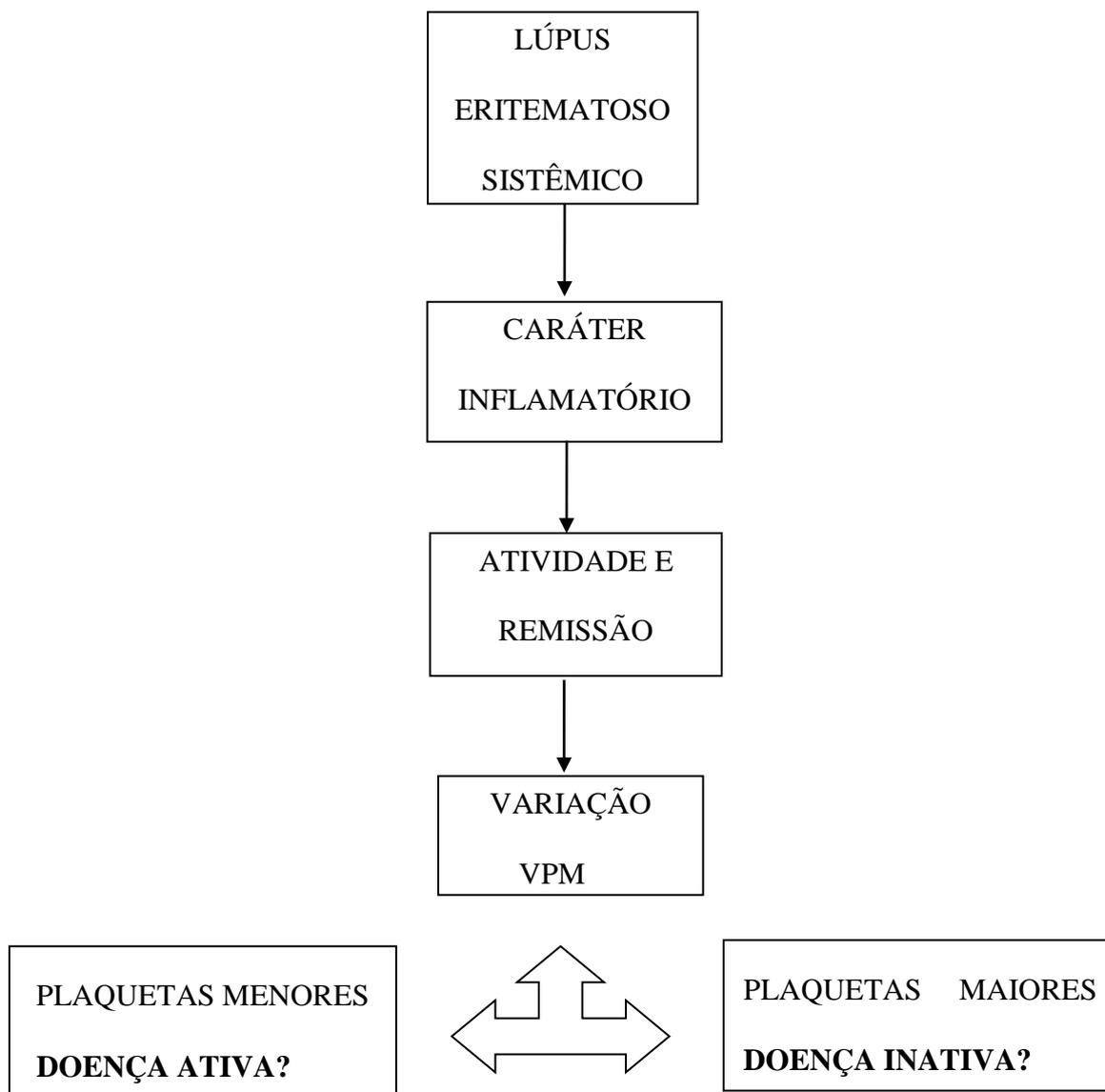


Figura 2. Esquema marco teórico.

Fonte adaptado pela autora.

4. JUSTIFICATIVA

A escassez de marcadores laboratoriais para avaliar a atividade de doença em pacientes com LES e o baixo custo do exame de plaquetas torna o VPM uma interessante ferramenta a ser utilizada. Ajudar o médico na avaliação precoce de uma possível reativação de doença em paciente com LES poderá permitir a otimização do manejo clínico, o que reflete diretamente nos custos despendidos na assistência, possibilitando melhorar o tratamento e, conseqüentemente, os defechos e a qualidade de vida destes pacientes.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o VPM em indivíduos hígidos e comparar com pacientes com lúpus eritematoso sistêmico apresentado doença ativa e inativa, medida pelo SLEDAI.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a correlação entre o VPM e o índice de atividade de doença (SLEDAI) nos pacientes com LES;
- Analisar a correlação entre o VPM e a velocidade de sedimentação globular (VSG), a proteína C reativa (PCR) e os componentes do complemento C3 e C4.

6. REFERÊNCIAS

1. Manson JJ, Isenberg DA. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Neth J Med.* 2003 Nov; 61(11): 343-6.
2. Mosca, M. and S. Bombardieri, Assessing remission in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*, 2006. 24(6 Suppl 43): p. S-99-104.
3. Yavuz S, Ece A. Mean platelet volume as an indicator of disease activity in juvenile SLE. *Clin Rheumatol.* 2014 May; 33(5):637-41.
4. Gasparyan AY, Ayvazyan L, Mikhailidis DP, Kitis GD. Mean platelet volume: a link between thrombosis and inflammation? *Curr Pharm Des.* 2011; 17(1):47-58.
5. Farias M. G.; Bó S. D. The clinical and laboratory importance of mean platelet volume. *J Bras Patol Med Lab* 2010 Aug; 46(4) 275-281.
6. Leader A, Pereg D, Lishner M. Are the platelet volume indices of clinical use? A multidisciplinary review. *Ann Med.* 2012 Dec; 44 (8):805-16.
7. Kisacik B, Tufan A, Kalyoncu U, Karadag O, Akdogan A, Ozturk MA, Kiraz S, Ertenli I, Calguneri M. Mean platelet volume (MPV) as an inflammatory marker in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 2008 May; 75(3):291-4.
8. Liu CC, Ahearn JM. The search for lupus biomarkers. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2009 Aug; 23(4):507-23. doi: 0.1016/j.berh.2009.01.008.
9. Ceylan B, Fincanci M, Yardimci C, Eren G, Tozalgan U, Muderrisoglu C, Pasaoglu E. Can mean platelet volume determine the severity of liver fibrosis or inflammation in patients with chronic hepatitis B? *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2013, Vol 25 n° 5.
10. Yazici S, Yazici M, Erer B, Erer B, Calik Y, Ozhan H, Ataoglu S. The platelet indices in patients with rheumatoid arthritis: mean platelet volume reflects disease activity. *Platelets.* 2010; 21(2): 122-5.

11. IşıkM¹, Şahi H², Hüseyin E² . New platelet indices as inflammatory parameters for patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Rheumatol*. 2014 Dec; 1(4):144-146.
12. Delgado-Garcia G, et al. O volume plaquetário está reduzido em adultos com lupus ativo. *Rev Bras Reumatol*. 2016.
13. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997 Sep; 40(9): 1725.
14. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982 Nov; 25(11):1271-7.
15. Edworthy SM, Zatarain E, McShane DJ, Blpch DA. Analysis of the 1982 ARA lupus criteria data set by recursive partitioning methodology: new insights into the relative merit of individual criteria. *J Rheumatolo*. 1988 Oct; 15 (10):1493-8.
16. Vargas K S, Romano M A. Lúpus Eritematoso Sistêmico: Aspectos Epidemiológicos e Diagnóstico. *Revista Salus-Guarapuava (PR)* 2009 Jan/ Jun3 (1).
17. Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, et al. Estimates of prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders an the United States. *Arthritis Rheum*. 1998. May; 41(5):778-99.
18. D´Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erytematosus. *Lancet*. 2007 Feb 17; 369(9561):587-96.
19. Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, Clarke AE, WARD MM. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pensylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthrites Rheum*. 2007 Jun; 56(6):2092-4.
20. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Parks CG, Gilkeson GS. Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1988 Oct; 41(10):1714-24.

21. Lahita RG. The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 1999 Sep; 11(5): 352-6.
22. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus.* 2006; 15(5):308-18.
23. Vilar MJ, Sato EL. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus.* 2002; 11(8): 528-32.
24. Nakashima C.A.K. et al. Incidência e aspectos clínico-laboratoriais do Lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. *Rev. Bras. Reumatol.* vol.51 no.3 São Paulo May/June 2011.
25. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T, Ferrario F, Fogo AB, Ginzler EM, Hebert L, Hill G, Hill P, Jennette JC, Kong NC, Lesavre P, Lockshin M, Looi LM, Makino H, Moura LA, Nagata M. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Feb; 15 (2):241-50. Erratum in: *J Am Soc Nephrol.* 2004 Mar; 15(3): 835-6.
26. Freire EAM, Souto LM, Ciconelli. Medidas de avaliação em lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol* 2011; 51(1):70-80.
27. McMurray RW, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2003 Aug;48(8):2100-10.
28. Scofield RH, Bruner GR, Namjou B, Kimberly RP, Ramsey-Goldman R, Petri M, et al. Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome. *Arthritis Rheum.* 2008 Aug; 58(8):2511-7.
29. Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2009 Jul;10(5):373-9.

30. Maidhof W, Hilar O. Lupus an overview of the disease and management options. *P T*. 2012 Apr.37 (4):240-9.
31. Cervera, R., et al., Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)*, 2003. 82(5): p. 299-308.
32. Cronin, M.E., Musculoskeletal manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am*, 1988. 14(1): p. 99-116.
33. Lee, C., et al., Self-reported fractures and associated factors in women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 2007. 34(10): p. 2018-23.
34. Ruiz-Irastorza, G., et al., Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology (Oxford)*, 2008. 47(6): p. 920-3.
35. Moder, K.G., T.D. Miller, and H.D. Tazelaar, Cardiac involvement in systemic lupus erythematosus. *Mayo Clin Proc*, 1999. 74(3): p. 275-84.
36. Roldan, C.A., B.K. Shively, and M.H. Crawford, An echocardiographic study of valvular heart disease associated with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 1996. 335(19): p. 1424-30.
37. Khamashta, M.A., Management of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Lupus*, 1996. 5(5): p. 463-6.
38. Mucenic, T., et al., Glu298Asp eNOS polymorphism is not associated with SLE. *Lupus*, 2009. 18(5): p. 448-51.
39. Orens, J.B., F.J. Martinez, and J.P. Lynch, 3rd, Pleuropulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am*, 1994. 20(1): p. 159-93.
40. Karim, M.Y., et al., Presentation and prognosis of the shrinking lung syndrome in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*, 2002. 31(5): p. 289-98.

41. Badsha, H., et al., Pulmonary hemorrhage in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*, 2004. 33(6): p. 414-21.
42. Schenatto, C.B., et al., Raised serum S100B protein levels in neuropsychiatric lupus. *Ann Rheum Dis*, 2006. 65(6): p. 829-31.
43. Griffiths, B., M. Mosca, and C. Gordon, Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2005. 19(5): p. 685-708.
44. Bombardier, C., et al., Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum*, 1992. 35(6): p. 630-40.
45. Liang, M.H., et al., Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1989. 32(9): p. 1107-18.
46. Symmons, D.P., et al., Development and assessment of a computerized index of clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. Members of the British Isles Lupus Assessment Group (BILAG). *Q J Med*, 1988. 69(259): p. 927-37.
47. Gladman, D., et al., The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1996. 39(3): p. 363-9.
48. Liu CC, Kao AH, Manzi S, Ahearn JM. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2013 Aug;5(4):210-33.
49. Briggs, C. et al. New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter: the XE200T|M. *Clin Lab Med*, v.22, p. 345-50, 2000.
50. Maluf, C.B. Intervalos de Referência dos parâmetros de volume plaquetários: Estudo longitudinal de saúde do adulto- Minas Gerais (Elsa- MG).2011.94f. Dissertação (Mestrado Patologia) Faculdade de Medicina. Universidade Federal de MG- Belo Horizonte. 2011.

51. College of American Pathologists. Surveys & Anatomic Pathology Education Programs. Hematology, Clinical microscopy and body fluids glossary. 2005. p. 11.
52. Bessman, J. D. Automated blood counts and differentials: a practical guide. Johns Hopkins University Press, 1986. p. 57-83.
53. Butkiewicz, A. M. et al. Platelet count, mean platelet volume and thrombocytopoietic indices in healthy women and men. *Thromb Res*, v. 118, n.2, p. 199-204, 2006.
54. Yngen, M. Platelet hyperactivity in diabetes mellitus. *Business briefing: European Cardiology*, p. 1-6, 2005.
55. Drachman, J. G. Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP. *Blood*, v.103, n.2, p 390-8, 2004.
56. Harker. L. A. et al. Effects of megakaryocyte growth and development factor on platelet production, platelet life span, and platelet function in healthy human volunteers. *Blood*, v. 95, p. 2514-22, 2000.
57. Kapsoriatakis, A. N. et al. Mean platelet volume: a useful marker of inflammatory bowel disease activity. *Am J Gastroenterol*, v. 96, p. 776-81, 2001.
58. Italiano JR, J. E.; Shivdasani, R. A. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Tromb Haemost*, v. 1, p. 1174-82, 2003.
59. Briggs, C. et al. Continuing developments with the automated platelet count. *Int Jnl Lab Hem*, v. 29, p.77-91, 2007.
60. Felle, P. et al. Platelets in the paediatric population: the influence of age and the limitations of automation. *Clin Lab Haem*, v. 27, p. 250-7, 2005.
61. Segal, H. C. et al. Accuracy of platelet counting haematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion. *Br J Haematol*, v. 128, p. 520-5, 2005.

62. Braga, D.S.G.P.A.. Contagem globular automática: parâmetros avaliados, significado clínico e causas de erro. 2014. 59f. Dissertação (Mestrado Análises Clínicas). Faculdade de farmácia- Universidade do Porto- Porto-2014.
63. Brummitt. D. R.; H. F. The determination of a reference range for new platelet parameters produced by the bayer ADVIATM 120 full blood analyser. *Clin Lab Haem*, v. 22, p 103-7, 2000.
64. Nishiova, T. et al. Flow cytometric analyses of platelet activation under calcium ion-chelating conditions. *Clin Lab Haem*, v.24, p.115-9, 2002.
65. Macei, M. et al. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the Advia 120 hematology system. *Clin Chem*, v.48, n.6, p. 891-9, 2002.
66. Endler, G. et al. Mean platelet volume is an independent risk factor for myocardial infarction but not for coronary artery disease. *Br J Haematol*, v.117, p 399-404, 2002.
67. Shen J, Ran ZH, Zhang Y, Cai Q, Yin HM, Zhou XT, Xiao SD. Biomarkers of altered coagulation and fibrinolysis as measures of disease activity in active inflammatory bowel disease: a gender-stratified, cohort analysis. *Thromb Res*. 2009 Feb; 123(4):604-11.
68. Gasparyan AY¹, Sandoo A, Stavropoulos-Kalinoglou A, Kitis GD. Mean platelet volume in patients with rheumatoid arthritis: the effect of anti-TNF- α therapy. *Rheumatol Int*. 2010 Jun;30(8):1125-9.
69. Sakallı H, Kal O. Mean platelet volume as a potential predictor of proteinuria and amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int*. 2012 Nov; 32(11):3559-63.
70. Safak S, Uslu AU, Serdal K, Turker T, Soner S, Lutfi A. Association between mean platelet volume levels and inflammation in SLE patients presented with arthritis. *Afr Health Sci*. 2014 Dec; 14(4):919-24.
71. Habets KL¹, Huizinga TW, Toes RE. Platelets and autoimmunity. *Eur J Clin Invest*. 2013 Jul;43(7):746-57.

72. Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 2011;11:264-74.

7. ARTIGO ORIGINAL

Assessment of mean platelet volume in patients with systemic lupus erythematosus

¹Lisandra Torres Hartmann, ¹Ana Paula Alegretti, ¹Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado, ²Eduardo Ferreira Martins, ²Rafael Mendonça da Silva Chakr, ²Andrese Aline Gasparin, ²Odirlei Andre Monticielo.

¹Department of Clinical Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

²Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Correspondence address:

Lisandra Torres Hartmann

Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Largo Eduardo Zaccaro Faraco, 2º Andar Laboratório de Patologia Clínica, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil- Zip Code: 90035-903.

Telephone/ Fax number: +555133598316

ABSTRACT

Background: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multisystem inflammatory autoimmune chronic disease, that evolves with periods of remission and exacerbation activity, whose intensity can be measured by the SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity index). Although all studies aimed at disease research, there are few reliable biomarkers available to assess activity of lupus. The mean platelet volume (MPV) is a platelet activation biomarker that has been associated with inflammation in different diseases. It has been recently described a correlation between MPV and the activity of SLE.

Objectives: To evaluate the MPV in patients with SLE and compare it with healthy individuals. To study the correlation between MPV and SLE disease activity index (SLEDAI) in SLE patients. To analyze possible correlation between MPV and erythrocyte sedimentation rate (ESR), and C-reactive protein (CRP), and complement components C3 and C4.

Methods: This is a cross-sectional study in which 81 patients with SLE according to the American College of Rheumatology (ACR) diagnostic classification criteria and 58 healthy controls were included. Patients were selected consecutively between October 2015 and July 2016. Clinical and laboratory data were collected during patient's consultation and SLEDAI and SLICC damage index were calculated. Active disease was defined as SLEDAI>0. The MPV was analyzed in Sysmex XE 5000 automation equipment.

Results: Patients with active SLE had a decreased MPV when compared to the group of patients with inactive disease (10.0 ± 0.7 fL vs. 10.7 ± 1.0 fL, $p=0.005$, respectively). Our study found a weak negative correlation between the SLEDAI and the MPV ($r=-0.29$, $p=0.009$). There was a statistically significant difference between the control group and the patients with active SLE (10.9 ± 1.0 fL vs. 10.0 ± 0.7 fL, $p<0.001$, respectively). However, the MPV was similar between the control group and the group of patients with inactive SLE (10.9 ± 1.0 vs. 10.7 ± 1.0 fL, $p=0.4$). There was no correlation between MVP and CRP, ESR, C3 and C4. Also, no correlation between SLEDAI and CRP, ESR, C3 and C4 was found.

Conclusions: MPV is decreased in patients with active SLE and inversely correlated with SLEDAI.

Key Words: Mean platelet volume (VPM), systemic lupus erythematosus (SLE), *systemic lupus erythematosus disease activity index*(SLEDAI), autoimmunity, biomarker.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune inflammatory disease, with a pleomorphic nature regarding the pathogenesis and onset of clinical manifestations. The development of autoimmunity in SLE is related to the loss of immunological tolerance and immunoregulatory control (1).

SLE is a disease which evolves with periods of activity and remission. It is essential for the clinician, during the patient's follow-up, to verify in which phase the same is found (1). The SLE activity can be measured by SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity index), which is a complex tool composed of 24 clinical and laboratory variables, and it requires training and knowledge for its application (2). SLEDAI is a tool that is studied at a given time during disease progression. There is still no reliable laboratory test that can independently quantify this disease activity (3-4).

The mean platelet volume (MVP) is a parameter detected by hematological analyzers during routine blood count. The MPV has been studied in several diseases such as diabetes, vascular diseases, ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. This index has been shown to be associated with the inflammatory process, and it is also an important marker of platelet activation and function (3-10). There is a study about juvenile systemic lupus erythematosus (JSLE) that showed a positive correlation between SLEDAI and MVP, suggesting a possible role of this biomarker on lupus activity identification (3). Other authors recently published about SLE and MPV and they found discrepant results. Seventy two patients were selected and the MPV was decreased in patients with active disease. The researchers stated that there is a relationship between platelet size and its activity. They also suggested that autoimmune

reactions may contribute to the process of platelet activation in SLE (7). However, there are still doubts regarding the possibility of using MPV as a disease activity biomarker in adult patients with SLE.

Our study aimed to evaluate MPV in adult patients with SLE, and to compare MVP values among SLE patients and healthy individuals. Moreover, we studied the correlation between MPV and disease activity index (SLEDAI) in SLE patients and analyzed a possible correlation among MPV and erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), and complement components C3 and C4.

Materials and methods

Patients and study design

This is a cross-sectional study with the inclusion of 139 participants. The study population consisted of 81 SLE patients who were followed up at the outpatient clinic of the Rheumatology Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The diagnosis of the disease was established based on the presence of at least four of the 11 criteria of diagnostic classification criteria proposed by the American College of Rheumatology (ACR) in 1982 and revised in 1997 (11). Patients with overlap of other diffuse connective tissue diseases (except Sjogren's syndrome and antiphospholipid antibody syndrome) and non-SLE-related hematological diseases such as thalassemia, myeloproliferative disorders, myelofibrosis, Bernard-Soulier syndrome, and anomaly of May-hegglin were excluded. Patients with previous or current history of neoplasm, diabetes, uncontrolled systemic arterial hypertension, heart disease, hyperthyroidism, splenectomy, acute and chronic infections (hepatitis B, hepatitis C, human immunodeficiency virus infection, tuberculosis and syphilis) were also excluded, as well as patients who underwent blood transfusions three months prior to screening. Healthy individuals were selected among volunteers from the HCPA blood bank, matched by sex, age, and ethnicity. The research project was approved by the ethics

committee of the HCPA and all participants were included only after reading, understanding and signing the informed consent form (ICF) in accordance with the Helsinki Declaration.

Clinical and laboratory variables

At the time of the consultation, disease activity index was calculated through SLEDAI and disease chronicity index through SLICC damage index, respectively. Data were also collected regarding the treatment used at the time of the consultation and detection of possible exclusion criteria. The patient's chart was reviewed to confirm the diagnostic classification criteria. Blood collection should have been performed within 10 days prior to the consultation, when the patient was invited to participate in the study and signed the ICF.

Analytical methods used

Blood counts and platelets were measured on the Sysmex XE 5000 automation equipment. The hemogram was performed within two hours between collection and processing in the automation equipment. The platelets were analyzed by impedance methodology, and the MPV index was calculated by the equipment when the platelet test was performed. MPV is obtained by dividing the platelet count (called platelet hematocrit or platelet volume ratio, weighted for platelet frequency) by the number of platelets.

The results of the laboratory tests for SLE patients comprising SLEDAI (C3, C4, Anti-dsDNA, blood counts, platelets and urinary sediment) were extracted from patients' charts and requested at their last routine visit, without affecting the study costs. The C3 and C4 and CRP (C-reactive protein) exams were measured by immunoturbidimetry in the SIEMENS-ADVIA1800 automation equipment. Anti-dsDNA was performed by immunofluorescence, anticardiolipin antibodies, performed by the Liaison automation equipment. VSG was performed on the Alere Roller 20 equipment. Urinary sediment was performed on the IQ200-IRIS automation equipment. The lupus anticoagulant was analyzed in the BCS-Siemens automation equipment using reagent LA1 and LA2 (both produced with

Russel viper venom at different concentrations) with LA1 screening and LA2 being confirmatory.

Statistical analysis

Data analysis was performed in SPSS 16.1 software. The comparison of the two groups (patients and controls) was determined by Student's t-test. The results were presented as means and standard deviations. The correlation between the variables was calculated by Pearson's and Spearman's coefficients. ROC curve was performed to determine the value of the VPM Cutoff as a disease activity biomarker. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value, likelihood ratio and confidence interval and the p-value were also calculated.

Results

This study consisted of 81 patients with SLE and 58 healthy controls. The patients were 96.4% female, 72.3% Euro-descendants, mean age 42.7 ± 12.3 years and mean disease duration of 12.8 ± 7.8 years. Forty-four (54.3%) patients had active disease at the time of evaluation. The comparison of clinical and laboratory characteristics of patients with inactive and active disease is described in Tables 1 and 2. The group of healthy controls consisted of 89.7% of women, 89.7% Euro-descendants with a mean age of 36.4 ± 11.9 years. Except for age, total leukocytes count and hemoglobin, SLE and control groups were similar.

The treatment used by patients at the time of consultations was described in table 3. Both groups, active and inactive, did not present statistically significant differences with the different medications used.

The MPV showed a negative correlation with the SLEDAI, which was, although weak, statistically significant ($r=-0.29$, $p=0.009$) (Figure 1). VPM results did not show statistically significant correlation with the parameters of CPR, ESR and C3 and C4 complements ($p=0.562$, $p=0.796$, $p=0.427$, $p=0.977$, respectively). SLEDAI also did not

present a statistically significant correlation with CRP, ESR, C3 and C4 ($p=0.856$, $p=0.640$, $p=0.300$, $p=0.415$, respectively).

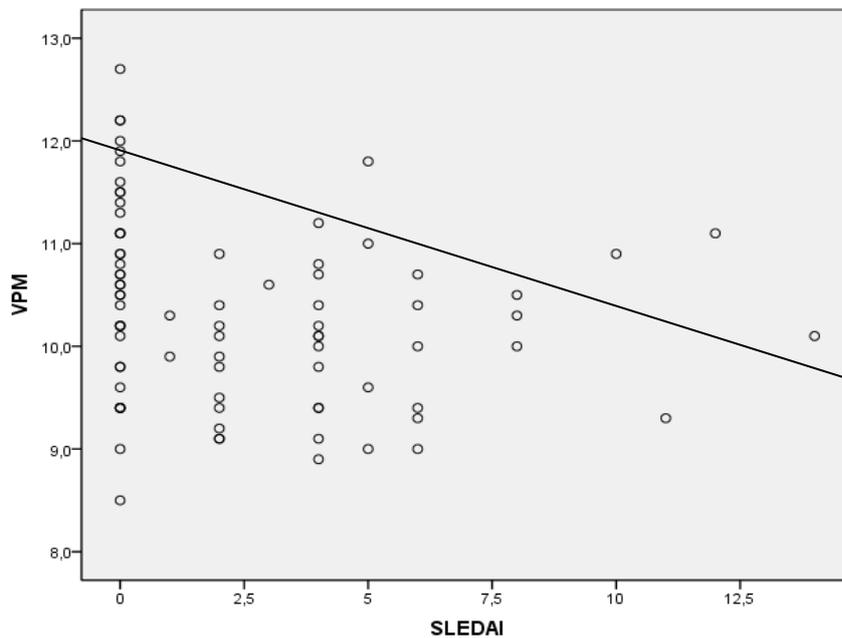


Figure1. The correlation between MPV and SLEDAI

Table1. Demographic, clinical, and laboratorial features of SLE patients

Patient's features	Whole (n=81)	SLEDAI=0 (n=37)	SLEDAI>0 (n=44)	p value*
Age (years±SD)	42.7±12.3	43.6±12.3	41.8±12.3	0.519
Disease duration (years±SD)	12.8±7.8	13.6 ±8,3	12.1±7.3	0.425
Malar rash (%)	50.7	42.4	57.5	0.243
Discoid rash (%)	8.2	12.1	5.0	0.400
Photosensitivity (%)	68.5	63.6	72.5	0.456
Oral ulcers (%)	41.1	27.3	52.5	0.034
Arthritis (%)	72.6	69.7	75.0	0.793
Serositis (%)	15.3	12.1	17.9	0.533
Nephritis (%)	47.9	42.4	52.5	0.482
Neurologic disorders (%)	13.7	18.2	10.0	0.496
Hematologic disorders (%)	71.2	63.6	77.5	0.207
Hemolytic anemia (%)	30.1	21.2	37.5	0.200
Leukopenia/ Lymphopenia (%)	21.5	10.8	31.0	0.053
Thrombocytopenia (%)	2.5	-	4.5	0.498
Immunologic disorders (%)	65.7	59.4	71.1	0.325
Anti-dsDNA (%)	12.8	2.8	21.4	0.017
Anti-Sm (%)	18.4	10.5	26.3	0.405
Anticardiolipin (%)	17.1	18.8	15.8	0.761
Lupus anticoagulant (%)	5.4	8.6	2.6	0.339
False positive VDRL (%)	1.5	0.0	2.6	1.000
ANA (%)	98.6	100.0	97.6	1.000
Anti-Ro/SSA (%)	33.8	21.2	44.7	0.046
Anti-La/SSB (%)	12.7	3.0	21.1	0.033
Anti-RNP (%)	26.4	18.2	33.3	0.185
Sjögren's syndrome (%)	1.5	0.0	2.9	1.000
Antiphospholipid syndrome (%)	2.9	3.0	2.7	1.000
SLEDAI ^a	2 (0-4)	0(0-0)	4 (2-6)	<0.001
SLICC damage index ^a	0 (0-1)	0(0-1)	0.5(0-2)	0.304
MPV (fL±SD)	10.3±0.9	10.7±1.0	10.0±0.7	0.001
ESR (mm/h±SD)	29.3±17.7	29.0±18.9	29.5±16.8	0.896
CRP (mg/dL) ^a	2.8(1.4-5.3)	2.9(1.3-5.3)	2.6(1.5-5.2)	0.949
C3 (mg/dL±SD)	105.3±27.1	110.1±21.0	101.3±30.9	0.135
C4 (mg/dL±SD)	19.6±10.0	20.9±8.8	18.6±10.1	0.294

Abbreviations: ANA, antinuclear antibody; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; SD, standard deviation; SLEDAI, systemic lupus erythematosus disease activity index; SLICC, systemic lupus international collaborating clinics; MPV, mean platelet volume; VDRL, venereal disease research laboratory test.

* Chi square test for qualitative variables and Mann-Whitney for asymmetric quantitative variables or Student's *t* test for symmetric quantitative variables.

^aMedian (interquartile range).

Table2. Laboratory and epidemiological profile of patients and healthy controls*

Parameter	Controls (n=58)	Patients (n=81)	
		SLEDAI=0 (n=37)	SLEDAI>0 (n=44)
Euro-derived ethnicity (%)	89.7	62.2 ^a	79.5
Female (%)	89.7	97.3	95.5
Age (mean±SD)	36.4±11.9	43.6±12.3 ^a	41.8±12.3
WBC (10 ³ /mm ³)	7.47±1.9	6.55±2.4 ^b	5.95±3.1 ^{ab}
Hgb (g/dl)	14.1±0.9	12.7±1.0 ^a	12.1±1.4 ^a
Plt (10 ³ /mm ³)	274.6±57.8	244.0±49.5	270.4±105.7
MVP (fL±SD)	10.9±1.0 ^a	10.7±1.0 ^b	10.0±0.7 ^{a, b}

Abbreviations: ANA, antinuclear antibody; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; SD, standard deviation; SLEDAI, systemic lupus erythematosus disease activity index; SLICC, systemic lupus international collaborating clinics; MPV, mean platelet volume; VDRL, venereal disease research laboratory test.

* Chi square test for qualitative variables and Anova for quantitative variables, and Tukey test.

^a p-value<0.05 between patients and controls.

^b p-value<0.05 between active and inactive patients.

Table3. Description of treatment in patients with inactive and active lupus

Medications	SLEDAI=0	SLEDAI>0	p value*
	(n=37)	(n=44)	
Corticosteroids (%)	32.4	47.8	0.183
Immunosuppressive dose (%)	37.8	23.9	0.229
Antimalarial (%)	86.5	73.9	0.182
Azathioprine (%)	40.5	45.7	0.663
Cyclophosphamide (%)	5.4	13.0	0.289
Micophenolate (%)	11.1	11.4	1.000
Methotrexate (%)	8.1	4.3	0.652
Anti-hypertensive drugs (%)	45.9	63.0	0.128
Statins (%)	18.8	24.3	0.771

Abbreviations: ANA, antinuclear antibody; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; SD, standard deviation; SLEDAI, systemic lupus erythematosus disease activity index; SLICC, systemic lupus international collaborating clinics; MPV, mean platelet volume; VDRL, venereal disease research laboratory test.

* Chi square test for qualitative

There was no statistically significant difference in the ROC curves for MPV, ESR, C3 and C4. The curves MPV and CRP presented statistically significant differences ($p=0.03$). Areas under the curve and coefficient intervals are represented at the figure 2. The analysis of the roc curve for the MPV showed an area under the curve (AUC) of 0.71 (IC95% 0.59; 0.830). Sensitivity, specificity, of MPV, ESR, CRP, C3 and C4 are represented at the table 4.

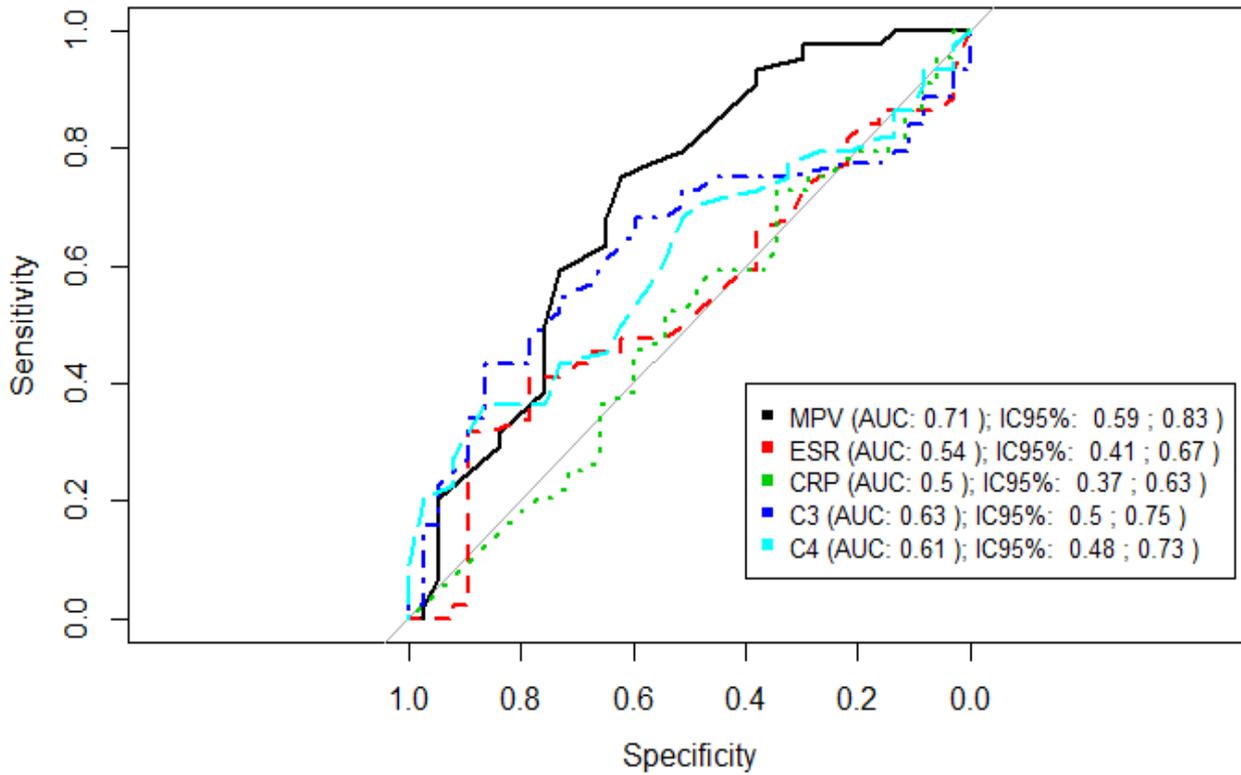


Fig.2 Sensitivity versus specificity for different cutoff levels of MPV, ESR, CRP, C3 and C4.

Table 4. Sensitivity Specificity PPV PNV

	MPV	CRP	ESR	C3	C4
Sensitivity	61%	41%	41%	23%	54%
Specificity	24%	63%	78%	81%	35%
PPV	49%	58%	69%	59%	50%
PNV	35%	46%	53%	47%	40%
Cutoff level	9.85fL	3.65mg/dL	35.5mm/Hg	122.5mg/dL	15.5mg/dL

Abbreviations: PPV, positive predictive value; PNV, negative predictive value.

Discussion

Our study found significantly lower values of MPV in patients with active SLE when compared to patients in remission or when compared to healthy controls, contradicting results previously described in the study with individuals with juvenile SLE (3). We demonstrated a negative correlation of MPV with SLEDAI, which, although weak, was statistically significant. Perhaps this discrepancy occurs due to the inherent characteristics of the treatment or study population (3). SLE is a chronic autoimmune disease that intersperses periods of activity and remission, and the juvenile SLE presents a worse prognosis than SLE in adults, requiring a more aggressive immunosuppressive therapy (3). Another aspect that should be considered is that the study with JSLE was conducted on a small sample of patients, having evaluated only 20 children (3). However, according to our findings, a study of 72 adult patients with SLE found MPV to be inversely correlated with disease activity (7), as well as another study with adults with lupus in which the main clinical symptom was arthritis that showed lower MPV values in patients with active disease when compared to those with disease in remission and controls (5). In case of rheumatoid arthritis, there is a study that also demonstrated diminished results of MPV in the active disease. In this study, after the patients' treatment, the values of the MPV increased (12). Similar results were obtained in a study with adult patients with active ankylosing spondylitis, where MPV was analyzed before and after treatment, and the MPV values showed a significant increase after the treatment (8). Our study also showed decreased MPV results in active patients when compared to healthy controls, this result was consistent with the study performed in patients with inflammatory bowel disease; however, in our study, the results of the patients in remission were similar to the results of the MPV in the controls. And in the study performed with inflammatory bowel disease the results of the MPV in patients in remission were also decreased when compared to control group (13). When the children with acute rheumatic fever were evaluated, MPV increased after treatment (14). However, other previous studies

have shown a probable relationship between high values of MPV and active inflammatory disease (4, 15).

There are discrepancies in the results found for MPV in several diseases. However, a previously published article suggests that an increase in MPV in diseases such as acute myocardial infarction and cerebrovascular diseases is expected, as well as its reduction in rheumatic diseases such as rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and ulcerative colitis in disease activation (4).

MPV has been considered a possible marker of platelet activation and inflammatory process (5). The pathophysiology of SLE involves the presence of inflammatory cytokines and deregulation of the complement system, which interferes with the activation of platelets (7). A probable mechanism that may explain the relationship between reduced MPV and disease activity is the consumption of large platelets at sites of inflammation (4, 7).

Although our MPV results did not show statistically significant correlation with the parameters of CRP, ESR and C3 and C4 complement components, we found a negative correlation between MPV and SLEDAI. Although the correlation was weak, it confirms that the diminished results of MPV in patients with active SLE are linked to the disease activity. It is well known that CRP and ESR are not good biomarkers of disease activity in SLE. However, as C3 and C4 complement components are 1 part of the 24 items evaluated in SLEDAI, it would be expected to have some correlation with the variation in disease activity, a fact that was not observed in the present study. A plausible explanation would be a bias selection of patients with low complement intake as one of the scoring items in SLEDAI.

The MPV is an easily measurable parameter, and has shown high sensitivity (86%) in a previous study so it may be considered a potential candidate for activity biomarker in SLE (7). Although the MPV presented pre-analytical interferences related to the time of collection, sample storage and the anticoagulant used (9), these variables were controlled in our study. In addition, we evaluated the treatment used in the patients of the active and inactive groups, and there was no statistically significant difference between them. Our results were similar to

the recently performed study with patients with active and inactive SLE at similar sampling (7).

Total leukocyte count and hemoglobin were reduced in active SLE (table 2). No difference was found between active and inactive SLE regarding the medications used by the patients (table 3). These results are consistent with those from the literature. However, this study has limitations such as cross-sectional study.

We conclude that MPV is reduced in patients with active SLE and presents an inverse correlation with SLEDAI. Despite the difference between MVP values and between active and inactive SLE patients, the results may not be clinically relevant. Prospective longitudinal studies are needed to better characterize the fluctuation of MPV in different stages of disease activity to more clearly define the role of MPV in SLE.

Interest conflicts

The authors stated that there were no conflicts of interest.

References

- 1.MansonJJ, IsenbergDA.The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Neth J Med.* 2003 Nov; 61(11): 343-6.
- 2.Mosca, M. and S. Bombardieri, Assessing remission in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*, 2006. 24(6 Suppl 43): p. S-99-104.
- 3.Yavuz S, Ece A. Mean platelet volume as an indicator of disease activity in juvenile SLE. *Clin Rheumatol.* 2014 May; 33(5):637-41.
- 4.Gasparyan AY, Ayvazyan L, Mikhailidis DP, Kitas GD. Mean platelet volume: a link between thrombosis and inflammation? *Curr Pharm Des.* 2011; 17(1):47.
- 5.Safak S, Uslu AU, Serdal K, Turker T, Soner S, Lutfi A. Association between mean platelet volume levels and inflammation in SLE patients presented with arthritis.

6. Işık M¹, Şahi H², Hüseyin E². New platelet indices as inflammatory parameters for patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Rheumatol*. 2014 Dec; 1(4):144-146.
7. Delgado-Garcia G, et al. O volume plaquetário está reduzido em adultos com lúpus ativo. *Rev Bras Reumatol*. 2016.
8. Kisacik B, Tufan A, Kalyoncu U, Karadag O, Akdogan A, Ozturk MA, Kiraz S, Ertenli I, Calguneri M. Mean platelet volume (MPV) as an inflammatory marker in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2008 May; 75(3):291-4.
9. Farias M. G.; Bó S. D. The clinical and laboratory importance of mean platelet volume. *J Bras Patol Med Lab* 2010 Aug; 46(4) 275-281.
10. Yazici S, Yazici M, Erer B, Erer B, Calik Y, Ozhan H, Ataoglu S. The platelet indices in patients with rheumatoid arthritis: mean platelet volume reflects disease activity. *Platelets*. 2010; 21(2): 122-5.
11. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982 Nov; 25(11):1271-7.
12. Kim DA, Kim TY. Controversies over the interpretation of changes of mean platelet volume in rheumatoid arthritis. *Platelets*. 2011; 22 (1): 79-80.
13. Öztürk ZA, Dag MS, Kuyumcu ME, Cam H, Yesil Y, Yilmaz N, Aydinli M, Kadayifci A, Kepekci Y. Could platelet indices be new biomarkers for inflammatory bowel diseases? *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013 Feb; 17(3):334-41
14. Sert A, Aypar E, Odabas D. Mean Platelet volume in acute rheumatic fever. *Platelets*. 2013; 24(5):378-82.
15. Leader A, Pereg D, Lishner M. Are platelet volume indices of clinical use? A multidisciplinary review. *Ann Med*. 2012 Dec; 44(8): 805-16.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho detectou um VPM significativamente diminuído em pacientes com LES ativo, quando comparado com pacientes com LES inativo e controles saudáveis, contudo numericamente semelhante. Há uma correlação inversa fraca entre o VPM e o SLEDAI nos pacientes com LES. O VPM demonstrou ser um potencial candidato a biomarcador para o LES, faz-se necessário agora o desenvolvimento de estudos prospectivos longitudinais para avaliar esse possível biomarcador e verificar seu desempenho ao longo da evolução do LES.

Publicamos um resumo com dados preliminares deste estudo no Congresso EULAR de 2016:

Hartmann LT, Alegretti AP, A.B.M.P. Machado A B M P, Matins E.F., Chakr R.M.D.S., Gasparin A.A., O.A. Monticielo. Assessment of Mean Platelet Volume as A Marker of Disease Activity in SLE Patients. *Ann Rheum Dis* 2016;**75**:1067 doi:10.1136/annrheumdis-2016-eular.5600

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Realizar o seguimento destes 83 pacientes com LES ao longo dos próximos 6 e 12 meses para avaliar se o VPM pode predizer ou não maior ou menor risco de reativação de doença neste período.

10. ANEXOS

Anexo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (casos)

Convidamos o Sr (a) a participar da pesquisa **Avaliação do volume plaquetário médio (VPM) em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico**, sob a responsabilidade do pesquisador Pr. Dr. Odirlei Andre Monticelo, cujo objetivo é avaliar a utilidade do VPM, medido habitualmente no exame de plaquetas, como marcador de atividade de doença para o lúpus eritematoso sistêmico.

Sua participação será voluntária e se dará por meio da sua permissão para que os pesquisadores busquem informações sobre sua doença no seu prontuário do hospital. Além disso, será coletado sangue para a realização do exame anticorpos anti-plaquetas necessário para a realização do estudo. Serão realizados os mesmos exames que você já realiza habitualmente, apenas será necessário coletar uma amostra um pouco maior do que o habitual. Normalmente não existem riscos envolvidos na coleta de sangue. Pode apenas ocorrer um pequeno desconforto da picada e a formação de uma mancha roxa no local da coleta, que irá desaparecer sozinha.

Os testes que serão realizados nesse estudo serão feitos com a mesma amostra de sangue dos seus exames de rotina, solicitados pelo seu médico. Será realizada uma nova coleta para realização de hemograma e plaquetas após 6 meses no mesmo dia que você vier para uma consulta de rotina.

Após a coleta de seus exames você será identificado por um número não sendo revelada em nenhum momento sua identidade. Os pesquisadores se comprometem em manter

a confidencialidade dos dados de identificação pessoal dos participantes e os resultados serão divulgados de maneira agrupada sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

Não serão esperados benefícios diretos aos pacientes envolvidos no estudo. No entanto, o conhecimento adquirido poderá proporcionar uma alternativa de marcador para lúpus eritematoso sistêmico de baixo custo, que poderá otimizar a assistência dos pacientes portadores de lúpus. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação no estudo e o participante não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Se depois de consentir em sua participação o Sr(a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independentemente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. Para qualquer outra informação, o Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Pr. Dr. Odirlei Monticielo no endereço (Ramiro Barcelos 2350, Bom Fim, Hospital de Clínicas de Porto Alegre), pelo telefone 51- 33598340, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), 2º andar do HCPA, sala 2227, pelo telefone 3359-7640.

Pelo presente Termo de Consentimento, fui informado sobre a pesquisa porque gostaria da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Nome e assinatura do paciente:

Nome e assinatura do pesquisador:

Local e Data

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (controles)

Convidamos o Sr(a) a participar da pesquisa **Avaliação do volume plaquetário médio (VPM) em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico**, sob a responsabilidade do pesquisador Pr. Dr. Odirlei Andre Monticielo, cujo objetivo é avaliar a utilidade do VPM, medido habitualmente no exame de plaquetas, como marcador de atividade de doença para o lúpus eritematoso sistêmico.

Estamos convidando você a participar da pesquisa como grupo controle, ou seja, você não tem a doença lúpus que está sendo estudada. Para a realização do estudo é necessário comparar o grupo de pacientes, que apresentam a doença lúpus, com o grupo que não apresenta a doença.

Sua participação será voluntária e se dará pela permissão da utilização de sua amostra de sangue para a realização de exames de sangue na mesma. Na sua amostra de sangue será realizado o exame hemograma e plaquetas. Será utilizada a sobra do material biológico que você já coleta habitualmente no banco de sangue. Normalmente não existem riscos envolvidos na coleta de sangue. Pode ocorrer apenas um leve desconforto da picada e a formação de uma mancha roxa no local da coleta, que irá desaparecer sozinha.

Após a coleta de seus exames você será identificado por um número não sendo revelada em nenhum momento sua identidade. Os pesquisadores se comprometem em manter a confidencialidade dos dados de identificação pessoal dos participantes e os resultados serão divulgados de maneira agrupada sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

Não serão esperados benefícios diretos aos participantes envolvidos no estudo. No entanto, o conhecimento adquirido poderá proporcionar uma alternativa de marcador para

lúpus eritematoso sistêmico de baixo custo, que poderá otimizar a assistência dos pacientes portadores de lúpus. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação no estudo e o participante não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Se depois de consentir em sua participação o Sr(a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independentemente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. Para qualquer outra informação, o Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Pr. Dr. Odirlei Monticielo no endereço (Ramiro Barcelos 2350, Bom Fim, Hospital de Clínicas de Porto Alegre), pelo telefone 51- 33598340, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), 2º andar do HCPA, sala 2227, pelo telefone 3359-7640.

Pelo presente Termo de Consentimento, fui informado sobre a pesquisa e porque gostaria da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Nome e assinatura do paciente:

Nome e assinatura do pesquisador:

Local e Data

Anexo II

SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*)

ESCORE	ITEM
8	Convulsão
8	Psicose
8	Síndrome cerebral orgânica
8	Visual
8	Nervos cranianos
8	Cefaléia lúpica
8	AVC
8	Vasculite
4	Artrite
4	Miosite
4	Cilindros
4	Hematúria
4	Proteinúria
4	Piúria
2	Rash malar novo

2	Alopecia
2	Membranas mucosas
2	Pleurite
2	Pericardite
2	Baixos complementos
2	Anti- DNA
1	Febre
1	Trombocitopenia
1	Leucopenia
	TOTAL

Observações: O resultado dos exames laboratoriais deve ter sido obtido +/-10 dias da avaliação clínica do paciente. As definições de atividade da doença são classificadas da seguinte forma: LES inativo: 0; Atividade leve: 1-5; Atividade moderada: 6-10; Atividade alta: 11-19 e Atividade muito alta: ≥ 20 .

Anexo III

CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

1. Eritema malar: eritema fixo, plano ou elevado, nas eminências malares, tendendo a poupar a região nasolabial.

2. Eritema Discóide: placas eritematosas elevadas, ocorrendo cicatrização atrófica nas lesões antigas.

3. Fotossensibilidade: eritema cutâneo resultante de reação incomum ao sol, por história do paciente ou observação do médico.

4. Úlcera oral: ulceração oral ou nasofaríngea, geralmente não dolorosa, observada pelo médico.

5. Artrite: artrite não erosiva envolvendo 2 ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor à palpação, edema ou derrame.

6. Serosite:

(a) pleurite – história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural.

ou

(b) pericardite – documentada por ECG, atrito ou evidência de derrame pericárdico.

7. Alteração renal:

(a) proteinúria persistente >0,5 g por dia ou >3+ se não quantificada.

ou

(b) cilindros celulares: podem ser hemáticos, granulares, tubulares ou mistos.

8. Alteração neurológica:

(a) convulsão – na ausência de drogas implicadas ou alterações metabólicas conhecidas (ex.: uremia, cetoacidose ou distúrbios hidroeletrólíticos).

ou

(b) psicose - na ausência de drogas implicadas ou alterações metabólicas conhecidas (ex.: uremia, cetoacidose ou distúrbios hidroeletrólíticos).

9. Alteração hematológica:

(a) anemia hemolítica com reticulocitose.

ou

(b) leucopenia – $<4000/\text{mm}^3$ total em 2 ou mais ocasiões.

ou

(c) linfopenia – $<1500/\text{mm}^3$ em 2 ou mais ocasiões.

ou

(d) trombocitopenia – $<100\ 000/\text{mm}^3$ na ausência de drogas causadoras.

10. Alteração imunológica:

(a) anti-dsDNA – anticorpo ao DNA nativo em títulos anormais.

ou

(b) Anti-Sm – presença do anticorpo ao antígeno nuclear Sm.

ou

(c) Achados positivos de anticorpos antifosfolípeos baseados em: (1) concentração sérica anormal de anticardiolipina IgG ou IgM; (2) teste positivo para anticoagulante lúpico usando teste-padrão ou (3) VDRL falso positivo por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-Abs.

11. Anticorpo antinuclear (FAN): título anormal do FAN por imunofluorescência ou método equivalente em qualquer momento, na ausência de drogas sabidamente associadas ao lúpus induzido por drogas.

Para fins de classificação de doença, o (a) paciente deve apresentar pelo menos 4 dos 11 critérios.

ANEXO IV

STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
<hr/> Introduction		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
<hr/> Methods		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and

controls

Cross-sectional study—Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants

(b) *Cohort study*—For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed

Case-control study—For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case

Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias
Study size	10	Explain how the study size was arrived at
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions
		(c) Explain how missing data were addressed

(d) *Cohort study*—If applicable, explain how loss to follow-up was addressed

Case-control study—If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed

Cross-sectional study—If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy

(e) Describe any sensitivity analyses

Results

Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed
		(b) Give reasons for non-participation at each stage
		(c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest
		(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time
		<i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or

summary measures of exposure

Cross-sectional study—Report numbers of outcome events or summary measures

Main results 16 (a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included

(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized

(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period

Other analyses 17 Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses

Discussion

Key results 18 Summarise key results with reference to study objectives

Limitations 19 Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias

Interpretation 20 Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence

Generalisability 21 Discuss the generalisability (external validity) of the study results

Other information

Funding 22 Give the source of funding and the role of the funders for the present

study and, if applicable, for the original study on which the present article is based

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.