

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Faculdade de farmácia**

**Programa de pós-graduação em análises clínicas e toxicológicas**

Lícia Maria Silva Paes

**LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATOIDE:  
avaliação dos perfis hematológico e hemostático avaliado pelo  
teste de geração de trombina**

Belo Horizonte

2023

Lícia Maria Silva Paes

**LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATOIDE:  
avaliação dos perfis hematológico e hemostático avaliado pelo  
teste de geração de trombina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho.

Coorientadoras: Profa. Dra. Iêda de Fátima Oliveira Silva e Dra. Rita Carolina Figueiredo Duarte.

Belo Horizonte

2023

Paes, Ucia Maria Silva.  
P126I Lupus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide (recurso eletrônico) : avaliação dos perfis hematológico e hemostático avaliados pelo teste de geração de trombina / Ucia Maria Silva Paes. - 2023. 1 recurso eletrônico (102 f. : il.) : pdf

Orientadora: Mariadas Graças Carvalho.  
Coorientadoras: Ieda de Fátima Oliveira Silva e Rita Carolina Figueiredo Duarte.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Lupus eritematoso sistêmico - Teses. 2. Artrite reumatoide - Teses. 3. Doenças autoimunes - Teses. 4. Trombina - Teses. 5. Testes de coagulação sanguínea - Teses. 6. Trombofilia - Teses. I. Carvalho, Maria das Graças. II. Silva, Ieda de Fátima Oliveira. III. Duarte, Rita Carolina Figueiredo. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD:616.978



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Lupus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide: avaliação dos perfis hematológico e hemostático por meio do teste de geração de trombina**

### LÍCIA MARIA SILVA PAES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 24 de maio de 2023, pela banca constituída pelos membros:

*Maria das Graças Carvalho*  
Prof.ª Maria das Graças Carvalho - Orientadora  
UFMG

*Ieda de Fatima Oliveira Silva*  
Prof.ª Ieda de Fatima Oliveira Silva  
UFMG

*Rita C.F. Duarte*  
Prof.ª Rita Carolina Figueiredo Duarte  
Bioclin

*Cristiane Alves da Silva Menezes*  
Prof.ª Cristiane Alves da Silva Menezes  
UFMG

*Marcus Vinícius Ferreira Silva*  
Prof. Marcus Vinícius Ferreira Silva  
Funed

Belo Horizonte, 24 de maio de 2023.

## **Colaboradores**

Mestre Luan Carlos Vieira Alves

Prof. Dr. Vicente de Paulo C.P. de Toledo

## **Instituições Participantes**

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

## **Apoio Financeiro**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ter me dado discernimento para chegar até aqui.

Agradeço à minha mãe, Imar Silva Santos Paes, pelo amor, carinho, paciência e apoio em todos os momentos da minha jornada acadêmica e que me fez crescer e acreditar que todos os dias eu posso ser uma pessoa melhor e mais segura dos seus objetivos.

Agradeço à professora Dra. Maria das Graças Carvalho, pela paciência e atenção desde a orientação da Iniciação Científica até o presente trabalho, o que me permitiu agregar uma infinidade de conhecimentos e crescer não só na carreira acadêmica, mas na vida pessoal e profissional.

Agradeço à Dra. Rita Carolina Figueiredo Duarte, por ter permitido que eu acompanhasse seu projeto referente à técnica de geração de trombina, durante a Iniciação Científica e por toda a paciência e atenção, como co-orientadora deste presente trabalho, assim como a Profa. Dra. Iêda de Fátima Oliveira Silva.

Agradeço também ao Mestre Luan Carlos Vieira Alves, juntamente com o professor Dr. Vicente Paulo C.P. de Toledo, que gentilmente cederam as amostras para que eu pudesse prosseguir com a realização dos experimentos.

Agradeço aos meus amigos que sempre estiveram me apoiando durante essa jornada acadêmica.

## RESUMO

**Introdução:** O lúpus eritematoso sistêmico (LES) se caracteriza por ser uma doença auto imune, de caráter inflamatório e de causa ainda desconhecida, decorrente da produção de anticorpos direcionados contra antígenos nucleares e citoplasmáticos, afetando diferentes órgãos com numerosas manifestações clínicas. Outra doença autoimune de relevância é a artrite reumatoide (AR) que se caracteriza por ser uma doença crônica, inflamatória e que afeta as articulações, causando uma dor articular crônica e intensa. Ambas as doenças podem apresentar alterações hematológicas e hemostáticas e ocorrem predominantemente no sexo feminino. Uma análise da literatura sobre tais alterações como componente do quadro fisiopatológico das doenças autoimunes LES e AR revela inconsistência e, portanto, estudos adicionais são necessários. **Objetivo:** Nesse contexto, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar o impacto do LES e da AR sobre os perfis hematológico e hemostático e comparar os resultados entre si e com aqueles obtidos de um grupo de mulheres híginas (controles). **Metodologia:** Após consentimento livre e esclarecido, um total de 40 mulheres participaram do estudo, compreendendo 21 com LES e 10 com AR, além de 6 mulheres híginas. As alterações hematológicas foram investigadas por meio do hemograma, cujos parâmetros foram utilizados para calcular vários índices relacionados à inflamação como a razão de neutrófilos/linfócitos (NLR), plaquetas/linfócitos (PLR), índice de resposta à inflamação sistêmica (SIRI), índice agregado de inflamação sistêmica (AIS), e índice de inflamação imunológica sistêmica (SII). Quanto às alterações hemostáticas, essas foram investigadas por meio do Teste de Geração de Trombina (método de CAT). **Resultados:** Os parâmetros do hemograma e índices derivados não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados, porém o índice de inflamação dRN/L sugere um processo inflamatório maior nas pacientes com LES comparadas àquelas com AR. Uma análise conjunta dos parâmetros do TGT indicou maior ativação do mecanismo hemostático em pacientes com LES, em comparação à AR, com base nos valores de ETP (*Endogen Thrombin Potential*), para ambas as concentrações de Fator Tissular ( $p=0,005$  para *Low Tissue Factor* e  $p=0,001$  para *High Tissue Factor*).

**Conclusão:** Tais resultados podem apresentar perspectiva clínica dado que uma tendência à hipercoagulabilidade em mulheres com LES em atividade foi observada por meio do TGT no presente estudo.

Palavras-chave: lúpus eritematoso sistêmico; artrite reumatoide; doenças autoimunes; hemograma; teste de geração de trombina; hipercoagulabilidade.

## ABSTRACT

**Introduction:** Systemic lupus erythematosus (SLE) is characterized by being an autoimmune disease, of inflammatory nature and of unknown cause, resulting from the production of antibodies directed against nuclear and cytoplasmic antigens, affecting different organs with numerous clinical manifestations. Another relevant autoimmune disease is rheumatoid arthritis (RA), which is characterized as a chronic, inflammatory disease that affects the joints, causing chronic and intense joint pain. Both diseases can present hematological and hemostatic alterations and occur predominantly in females. An analysis of the literature on such alterations as a component of the pathophysiological picture of autoimmune diseases SLE and RA reveals inconsistency and, therefore, additional studies are needed. **Objective:** In this context, the general objective of the present study was to evaluate the impact of SLE and RA on the hematological and hemostatic profiles and compare the results among themselves and with those obtained from a group of healthy women (controls). **Methodology:** After free and informed consent, a total of 40 women participated in the study, including 21 with SLE and 10 with RA, in addition to 6 healthy women. Hematological alterations were investigated using whole blood counts, whose parameters were used to calculate various indices related to inflammation, such as the neutrophil/lymphocyte ratio (NLR), platelet/lymphocyte ratio (PLR), systemic inflammation response index (SIRI), aggregate systemic inflammation index (AISI), and systemic immune inflammation index (SII). As for hemostatic alterations, these were investigated using the Thrombin Generation Test (CAT method). **Results:** The hemogram parameters and derived indices did not show significant difference between the studied groups, however the dRN/L inflammation index suggests a greater inflammatory process in patients with SLE compared to those with RA. A joint analysis of TGT parameters indicated more hemostatic changes in SLE compared to RA based on ETP (Endogen Thrombin Potential) values, for both Tissue Factor concentrations ( $p=0.005$  for Low Tissue Factor and  $p=0.001$  for High Tissue Factor). **Conclusion:** These results may have a clinical perspective given that a tendency towards hypercoagulability in women with active SLE was observed using the TGT in the present study.

Keywords: systemic lupus Erythematosus; rheumatoid arthritis; autoimmune diseases; whole blood count; thrombin generation test; hypercoagulability

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1 – Processo de hemostasia.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 2 – Cascata de coagulação.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 3 – Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 4- Parâmetros do Trombograma expressando a geração de trombina em nM em função do tempo em minutos.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 1 - Características demográfica, clínica e laboratorial de LES, AR e Controle.....</b>	<b>62</b>
<b>Tabela 2 - Parâmetros do hemograma e índices derivados de LES, AR e Controle.....</b>	<b>63</b>
<b>Tabela 3 - Parâmetros do Teste de Geração de Trombina (TGT), com baixa concentração de fator tissular (<i>Low TF</i>) dos grupos LES, AR e Controle.....</b>	<b>65</b>
<b>Tabela 4 - Parâmetros do Teste de Geração de Trombina (TGT), com alta concentração de fator tissular (<i>High TF</i>) dos grupos LES, AR e Controle.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabela 5 - Parâmetros do Teste de Geração de Trombina (TGT), com baixa concentração de fator tissular (<i>Low TF</i>) do grupo LES de acordo com o índice SLEDAI-2K (<math>\leq 4</math> e <math>&gt;4</math>).....</b>	<b>67</b>
<b>Tabela 6 - Parâmetros do Teste de Geração de Trombina (TGT), com alta concentração de fator tissular (<i>High TF</i>) do grupo LES de acordo com o índice SLEDAI (<math>\leq 4</math> e <math>&gt;4</math>).....</b>	<b>68</b>
<b>Tabela 7 - Índices inflamatórios derivados do hemograma do grupo LES de acordo com o índice SLEDAI (<math>\leq 4</math> e <math>&gt;4</math>).....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ACR	<i>American College Rheumatology</i>
AISI	<i>Aggregate Index of Systemic Inflammation</i>
AHAI	Anemia hemolítica autoimune
ANA	Anticorpos antinucleares
Anti-dsDNA	Anti DNA fita dupla
AR	Artrite reumatoide
AT	Antitrombina
BILAG	<i>British Isles Lupus Assessment Group</i>
CAT	<i>Calibrated Authomated Thrombogram</i>
DCA	Anemia por doença crônica
D-Di	Dímero D
dNLR	<i>Derived NLR</i>
DMARD	Medicamentos antirreumáticos modificadores da doença
ECLAM	<i>European Consensus Lupus Activity Measurement</i>
ETP	<i>Endogen Thrombin Potential</i>
FAFAR -UFMG	Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais
FII	Fator II
FIXa	Fator IX ativado
FT	Fator tecidual
FVa	Fator V ativado
FVII	Fator VII

FVIIa	Fator VII ativado
FVIII	Fator VIII
FX	Fator X
FXa	Fator X ativado
FXIa	Fator XI ativado
FXII	Fator XII
FXIIa	Fator XII ativado
FXIIIa	Fator XIII ativado
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago
GT	Geração de trombina
HC-UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-21	Interleucina 21
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
INF	Interferon
INF $\alpha$	Interferon alfa
INF $\beta$	Interferon beta
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LMR	Linfócitos/Monócitos
NLR	Neutrófilos/Linfócitos
ODA	Outras doenças autoimunes

PC	Proteína C
PCa	Proteína C ativada
PCR	Proteína C reativa
PCRus	Proteína C reativa ultra sensível
PDC's	Células dendríticas plasmocitóides
PIC	Complexo inibidor da plasmina
PLR	Plaquetas/Linfócitos
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
PS	Proteína S
SII	<i>Systemic Immune-inflammation Index</i>
SIRI	<i>Systemic Inflammation Response Index</i>
SLAM	<i>Systemic lupus activity measure</i>
SLEDAI	<i>Systemic lupus erythematosus disease activity index</i>
SLICC	<i>Systemic lupus international collaborating clinics</i>
SNC	Sistema nervoso central
TAT	Trombina antitrombina
TEV	Tromboembolismo venoso
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
TGT	Teste de geração de trombina
TM	Trombomodulina
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Tempo de protrombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada

UV	Ultra violeta
VHS	Velocidade de hemossedimentação
®	Marca registrada
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
<b>2.1 Doenças autoimunes: Lupus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatoide (AR)</b> .....	19
<b>2.1.1 <i>Lupus eritematoso sistêmico</i></b> .....	19
2.1.1.1 Etiologia.....	20
2.1.1.2 Sinais e sintomas.....	22
2.1.1.3 Critérios de classificação .....	23
2.1.1.4 Diagnóstico e tratamento .....	24
<b>2.1.2 <i>Artrite reumatoide</i></b> .....	25
2.1.2.1 Etiologia .....	26
2.1.2.2 Sinais e sintomas .....	27
2.1.2.3 Diagnóstico e tratamento .....	28
<b>2.2 Aspectos inflamatórios relacionados ao Lúpus eritematoso sistêmico e Artrite reumatoide: citocinas e Proteína C Reativa</b> .....	30
<b>2.3 Manifestações hematológicas e marcadores laboratoriais no Lúpus eritematoso sistêmico e Artrite reumatoide</b> .....	32
<b>2.4 Hemostasia</b> .....	36
<b>2.5 Cascata de coagulação</b> .....	37
<b>2.5.1 <i>Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares</i></b> .....	40
2.5.1.1 Fase de iniciação .....	40
2.5.1.2 Fase de amplificação .....	41
2.5.1.3 Fase de propagação .....	41
2.5.1.4 Finalização .....	41
<b>2.6 Teste de geração de trombina</b> .....	43
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	46
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	48
<b>4.1 Objetivo geral</b> .....	48

4.2 Objetivos específicos .....	48
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
5.1 Casuística e aspectos éticos .....	49
5.2 Critérios de inclusão e exclusão para LES.....	50
5.3 Critérios de inclusão e exclusão para AR.....	50
5.4 Critérios de inclusão e exclusão para controles.....	51
5.5 Amostras biológicas .....	51
5.6 Métodos .....	52
5.6.1 Hemograma e índices derivados .....	52
5.6.2 Teste de Geração de Trombina: princípio e procedimento .....	52
<b>6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>54</b>
<b>7 RESULTADOS (ARTIGO).....</b>	<b>54</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>75</b>
<b>9 CONCLUSÕES .....</b>	<b>76</b>
<b>10 AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças autoimunes reumáticas, tais como lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatóide (AR) são caracterizadas por envolvimento de múltiplos órgãos e pela produção de autoanticorpos patogênicos, além de alterações hematológicas nas células sanguíneas e anormalidades hemostáticas (KLEIN & MOLAD, 2021).

O lúpus eritematoso sistêmico (LES), se caracteriza por ser uma doença auto imune e de causa ainda desconhecida, ou seja, anticorpos direcionados contra antígenos nucleares e citoplasmáticos são produzidos, afetando diferentes órgãos com numerosas manifestações clínicas. Dentro desse contexto, as formas mais leves do LES, podem afetar principalmente as articulações e a pele, enquanto as formas mais graves afetam diretamente órgãos internos, podendo ser fatal para o paciente (FORTUNA e BRENNAN, 2013; MATHIAN *et al.* 2015; ALVES *et al.* 2019).

O LES se caracteriza como uma doença em que o curso é não linear e como é de natureza heterogênea, pode variar de paciente para paciente, o que leva a um desafio tanto para o diagnóstico, quanto para o tratamento. Alguns fatores de risco podem contribuir para a suscetibilidade à doença, ou até mesmo para a ativação do sistema imunológico tendo como causa a inflamação. Alguns fatores ambientais como radiação UV, estresse, medicamentos e infecção podem contribuir para o início da doença. A predisposição ao LES também pode ser influenciada por fatores genéticos e, ainda pode estar relacionada a fatores hormonais, o que explica a predisposição feminina para a doença (GOTTSCHALK *et al.* 2015; CUNHA e SEIBERT, 2016).

Outra doença autoimune de relevância é a artrite reumatoide (AR). A AR atinge cerca de 0,5% a 1% da população mundial adulta e ocorre em praticamente todos os grupos étnicos. No entanto, é uma doença que atinge mais os indivíduos do sexo feminino de 2 a 3 vezes, em relação ao sexo masculino, principalmente aqueles entre a quarta e sexta década de vida. Outro fator que contribui para o acometimento da doença, é o fator genético. A predisposição genética para a AR contribui em cerca de 50% para um maior risco da doença. Além disso, a liberação de citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias, resulta na destruição e incapacidade das articulações (MOTA *et al.* 2011; ALUNNO *et al.* 2017; ANGIOLILLI *et al.* 2017).

Conforme revisado por Klein & Molad, 2020, as doenças de caráter autoimune são frequentemente associadas a manifestações hematológicas que, muitas vezes, podem servir como um sinal de apresentação, como citopenias que acometem pacientes com LES, trombocitopenia na síndrome antifosfolípide, além da síndrome de Felty ser uma causa de neutropenia em pacientes com AR.

Uma análise recente da literatura sobre as alterações hemostáticas como componente do quadro fisiopatológico das doenças autoimunes LES e AR revela inconsistência e, portanto, estudos adicionais são necessários. Além disso, torna-se relevante a confirmação para a nossa população de achados prévios na literatura, considerando suas características étnicas e outras bem distintas daquelas próprias dos indivíduos objeto de estudos internacionais.

Nesse contexto, um melhor entendimento sobre o perfil hemostático de pacientes com doenças autoimunes relativamente frequentes, tais como LES e AR poderá contribuir, ao nosso ver, para ampliar o conhecimento atual sobre essas duas graves enfermidades, além de abrir novas perspectivas em seu manejo clínico.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Doenças autoimunes: Lúpus eritematoso sistêmico (LES) e Artrite reumatoide (AR)**

#### **2.1.1 Lúpus Eritematoso sistêmico**

O LES é uma doença que foi identificada na Idade Média e, em 1872, Moric Kaposi reconheceu pela primeira vez a natureza sistêmica da doença. Caracteriza-se por ser autoimune em que há inflamação microvascular multissistêmica, com a geração de autoanticorpos, afetando o sistema imunológico e reduzindo a capacidade do corpo de prevenir e combater infecções (COJOCARU *et al.* 2011; ARINGER e JOHNSON, 2020).

Por algum tempo, o lúpus foi considerado uma doença rara. Porém, nos últimos anos tornou-se comum em alguns grupos populacionais, resultado do avanço dos testes imunológicos que permitiram o diagnóstico de inúmeros casos atípicos ou benignos

que não poderiam ter sido identificados de outra maneira (O'NEILL e CERVERA, 2010).

Trata-se de uma doença universal, encontrada em todas as etnias e nas mais diversas regiões geográficas, com prevalência estimada na América do Norte de 241 casos por 100.000 habitantes e incidência de 23,2 casos por 100.000 habitantes/ano (REES et al., 2017). No Brasil estima-se uma prevalência de 98 casos por 100.000 habitantes e incidência de 4,8 a 8,7 casos por 100.000 habitantes/ano (VILAR & SATO, 2002; SENNA et al., 2004).

O LES pode ocorrer no início da infância ou em pacientes jovens com manifestações clínicas que podem incluir febre, linfadenopatia, anemia hemolítica e até mesmo trombocitopenia. Nesse caso, o curso da doença geralmente é mais grave do que em pacientes menos jovens. Já o LES de início tardio, ocorre após os 50 anos e a presença de comorbidades que acompanham o envelhecimento pode confundir o diagnóstico, em relação à presença de doença renal crônica, diabetes mellitus tipo 2 e comprometimento cognitivo, por exemplo (THONG e OLSEN, 2017).

Mesmo o LES ocorrendo na infância, ou tendo o início tardio, a doença é mais comum em mulheres e afeta principalmente entre a puberdade e a menopausa. A relação entre mulheres/homens é de 3/1 em crianças, mas entre a puberdade e a menopausa essa relação é ainda maior, cerca de 9/1. Acredita-se que o fato da predominância feminina ser menos pronunciada na infância e início tardio, sugere o papel do estrogênio no desenvolvimento do LES (O'NEILL e CERVERA, 2010; KAUL *et al.* 2016).

#### 2.1.1.1 Etiologia

Apesar dos avanços, a etiologia do LES é ainda desconhecida, mas alguns fatores de risco têm contribuído para a suscetibilidade à doença ou ativar o sistema imunológico, causando inflamação. O lúpus possui polimorfismos genéticos que por si só, são insuficientes para o seu desenvolvimento. Influências ambientais, hormonais e até mesmo sexuais estão envolvidos na patologia do LES (JAMES e ROBERTSON, 2012; CUNHA e SEIBERT, 2016)

Durante exposições ambientais em indivíduos geneticamente predispostos, podem ocorrer modificações nos genes de risco do LES resultando em manifestações da

doença. Tais processos epigenéticos se referem a modificações hereditárias que regulam a expressão gênica e alteram as funções celulares, mas sem alterações na sequência genômica (DENG e TSAO, 2015).

Em relação aos fatores genéticos, a taxa de concordância para LES em gêmeos monozigóticos é de 25% - 58% , reforçando ainda mais as modificações epigenéticas desreguladas na etiologia do LES. Modificações estas, que incluem metilação do DNA; modificação das histonas e RNA não codificante, que podem afetar a função e expressão dos genes que participam dos processos patogênicos do LES (DENG e TSAO, 2015; KAUL *et al.* 2016).

Acredita-se também que exposições ocupacionais e ambientais estão implicadas na patogênese do LES, o que poderia explicar uma ocorrência da doença maior que a esperada em certas comunidades. Porém, a patogênese do LES ainda é um verdadeiro desafio, uma vez que a natureza multifatorial do LES leva a entender que nem todas as pessoas expostas necessariamente irão desenvolver a doença, e que a mesma pode se desenvolver em pessoas que não estão expostas (O'NEILL e CERVERA, 2010).

Agentes biológicos, físicos e químicos podem desencadear o LES. Dentre os agentes biológicos, algumas infecções (Epsten -Barr, por exemplo) podem desregular a resposta ( JAMES & ROBERTSON, 2012; FORTUNA & BRENNAN, 2013). A radiação ultravioleta, um agente físico, pode contribuir para o aumentar o risco de desenvolvimento do LES (BARBHAIYA & COSTENBADER, 2014; KAUL *et al.*, 2016), já que pode causar fotossensibilidade e lesões cutâneas, além de danos ao DNA, estimulação de linfócitos B e T, e produção de autoanticorpos e citocinas. Já os agentes químicos envolvem compostos de exposição ocupacional, como sílica, solventes industriais, pesticidas e metais pesados. De acordo com Parks et al., 2017, o cigarro, poluição do ar e medicamentos/drogas (por exemplo hidralazina e procainamida), favorecem o desenvolvimento do LES.

A fim de exemplificar a relação da exposição ocupacional com o desenvolvimento do LES, a exposição à sílica tem sido associada não somente ao desenvolvimento do LES, como também de outras doenças autoimunes (fibrose pulmonar, esclerodermia, vasculite e artrite reumatoide). Um estudo realizado na Carolina do Norte com 265 pacientes com LES e 355 controles, concluiu que a exposição à sílica em níveis médio

e alto foi observada na maioria dos pacientes com LES, o que reforça a exposição à sílica no desenvolvimento de casos de LES (O'NEILL e CERVERA, 2010).

#### 2.1.1.2 Sinais e sintomas

Os sinais e sintomas relacionados ao lúpus são numerosos e altamente variáveis, com alternância entre períodos de atividade e remissão da doença. Desse modo, manifestações cutâneas ocorrem em 75% dos pacientes com LES e geralmente é o primeiro sinal. O sistema músculo esquelético também está envolvido em cerca de 90% dos pacientes com LES e, assim, podem ocorrer mialgia e artralgia, além de artrite que pode acometer pequenas e grandes articulações. Manifestações nos rins, pele e ossos podem ocorrer também, que são facilmente identificáveis, enquanto sintomas neurológicos que são mais sutis, podem não ser reconhecidos. (IGHE *et al.* 2015; KUHN *et al.* 2015).

O sistema musculoesquelético no LES é bastante afetado e as consequências ocorrem em decorrência da doença ativa, ou podem ser secundárias ao tratamento e/ou doença crônica. As manifestações incluem artralgias e artrite, necrose vascular, além de fraturas por fragilidade óssea. Os pacientes ao procurarem atendimento médico, queixam de dores nas articulações da mão e punho, que geralmente são as mais afetadas (COJOCARU *et al.* 2011; LEVY e KAMPHUIS, 2012).

O rim e os pulmões também são afetados em pacientes com lúpus. A doença glomerular geralmente se desenvolve nos primeiros anos após o início do LES e costuma ser assintomática. A nefrite aguda pode se manifestar com hipertensão e hematúria. As manifestações pulmonares em pacientes com lúpus, podem ser na forma aguda ou indolente, podendo comprometer o sistema vascular pulmonar, incluindo hemorragia alveolar difusa, doença tromboembólica e hipertensão pulmonar (COJOCARU *et al.* 2011).

As manifestações cutâneas em pacientes com LES, também são pronunciadas e podem ser classificadas em três tipos, de acordo com sua aparência e duração. O exantema malar trata-se de uma lesão aguda e é marcada por eritema e elevação, distribuída na forma de “borboleta”, localizada nos sulcos nasolabiais. A forma subaguda, ou seja, o lúpus eritematoso subagudo, se caracteriza por apresentar uma

lesão que se inicia como pápulas eritematosas e pode evoluir para lesões papuloescamosas, semelhantes à psoríase. Por fim, o lúpus cutâneo crônico, se apresenta como lesões discoides (pápulas eritematosas), que evoluem para lesões espessas e hiperqueratóticas. Vale ressaltar que, no couro cabeludo, essas lesões levam à alopecia permanente (LAM e PETRI, 2005). Ainda é válido ressaltar que crianças e adolescentes com LES, podem desenvolver erupções cutâneas de qualquer morfologia, localização e distribuição, na maioria das vezes apresentando um desafio no diagnóstico para o médico (LEVY e KAMPHUIS, 2012).

### 2.1.1.3 Critérios de classificação

O *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) classifica o LES em uma doença com base em critérios clínicos e imunológicos (nível de anticorpos antinucleares – ANA - acima da referência laboratorial, anticorpos anti-DNA de fita dupla). Existem também sistemas de pontuação que são utilizados para a determinação da atividade do LES, tais como *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI), *Systemic Lupus Activity Measure* (SLAM), *British Isles Lupus Assessment Group* (BILAG) e *European Consensus Lupus Activity Measurement* (ECLAM), os quais incluem parâmetros laboratoriais e permitem uma avaliação padronizada da doença, para que possam ser tomadas as decisões em relação à terapêutica. Uma estratégia aplicada para a monitoração do LES, consiste na combinação de exames físicos com exames laboratoriais de hematologia, bioquímica e análise de anticorpos anti-DNA fita dupla (KUHN *et al.* 2015; THONG e OLSEN, 2017).

O SLEDAI possui 24 características atribuídas ao lúpus e tem sido utilizado como uma medida global da atividade do LES. Cada característica recebe uma pontuação, sendo 105 a pontuação máxima. Este índice constitui uma ferramenta que mostrou ser sensível a mudanças na atividade da doença ao longo do tempo. Em 2002, o SLEDAI foi revisado e passou a ser denominado “*SLEDAI – 2K*”, sendo útil como um preditor de mortalidade e para descrever a atividade da doença em vários níveis (LAM e PETRI, 2005; TOUMA *et al.* 2010).

O SLAM registra 10 aspectos da doença, em um total de 31 características. A cada aspecto é atribuído um peso numérico, avaliado por graus de atividade e a soma total

indica a atividade geral da doença, ou seja, quanto maior o número, mais ativa é a doença (TOUMA *et al.* 2010).

Outro sistema de pontuação utilizado é o BILAG. Tal sistema é mais abrangente que o SLEDAI, com um total de 86 itens, sendo que cada item é medido qualitativamente através da observação clínica, ou quantitativamente através da medição de valores laboratoriais hematológicos e renais (TOUMA *et al.* 2010).

Por fim, o ECLAM teve seu desenvolvimento em 1992 valendo-se da análise de sintomas e parâmetros laboratoriais, apresentados por uma coorte europeia envolvendo 704 pacientes com LES. O índice possui 15 variáveis ponderadas com base em seus respectivos coeficientes de regressão (TOUMA *et al.* 2010).

#### 2.1.1.4 Diagnóstico e tratamento

Uma anamnese rigorosa e muitas análises laboratoriais devem ser realizadas, já que os testes sorológicos convencionais atualmente utilizados, como anticorpos antinucleares (ANA) ou fator antinúcleo (FAN), anticorpos anti-DNA de fita dupla (anti-dsDNA) e níveis de complemento têm sensibilidade e/ou especificidade limitadas. Tais exames incluem hemograma com contagem de plaqueta, contagem de reticulócitos, velocidade de hemossedimentação (VHS), perfil metabólico completo, teste de *Coombs* direto, transaminases hepáticas, fosfatase alcalina, urina rotina, proteinúria de 24hs, ureia e creatinina séricas, eletrólitos, albumina sérica, dosagem de bilirrubina, complemento (CH50, C3 e C4), proteína C reativa e avaliação de autoanticorpos (FAN, anti-DNA, anti-Sm, anti-cardiolipina, anticoagulante lúpico, anti-La/SSB, anti-Ro/SSA e anti-RNP) por imunofluorescência indireta ( MAIDHOF & HILAS, 2012; KUHN *et al.*, 2015).

Algumas características tais como achados clínicos em articulações, rins, sistema nervoso central (SNC) e parâmetros sorológicos como ANA, além do histórico dos órgãos afetados, constituem a base para o diagnóstico da doença. Atualmente, os critérios de diagnóstico para o LES exigem que o paciente apresente alguns sintomas como erupções cutâneas, inflamação das articulações, distúrbios renais, alterações hematológicas e distúrbios imunológicos (GOTTSCHALK *et al.* 2015; KUHN *et al.* 2015; THONG e OLSEN, 2017; CANIZARES *et al.* 2018; ALVES *et al.* 2019).

O tratamento para o LES deve ser específico para cada paciente, dependendo do sistema ou órgão acometido. Por esse motivo, os pacientes com LES devem obter orientações a respeito da doença e sua evolução. Os pacientes que apresentam artrite, artralguas e serosite, são tratados com anti-inflamatórios não esteroides (AINE's). Para pacientes com manifestações mais graves são prescritos os antimaláricos, como a hidroxicloroquina (diminui a atividade da doença, reduz o risco de trombose e melhora o quadro articular) e os glicocorticoides, como a prednisona. Os fármacos imunossupressores, como ciclofosfamida, metotrexato e azatioprina são utilizados em pacientes com quadro grave, principalmente aqueles que apresentam complicações renais, atuando por meio da inibição da replicação de células efectoras do sistema imune (COSTA e COIMBRA, 2014).

Mesmo com a melhora no prognóstico dos pacientes com LES decorrente da introdução de potentes terapias imunossupressoras, além de um melhor manejo médico em relação às manifestações agudas da doença, o paciente com diagnóstico do LES ainda apresenta um período de vida consideravelmente reduzido. Tal fato também pode ser associado à susceptibilidade que esses pacientes têm a infecções, uma vez que a maioria dos medicamentos utilizados no tratamento de lupus são imunossupressores, o que confere um maior risco de infecções por organismos típicos e atípicos (PUTTERMAN *et al.* 2012).

### **2.1.2 Artrite reumatoide**

A AR se caracteriza por ser uma doença crônica, inflamatória e que afeta as articulações, mais precisamente inflamação da membrana sinovial levando ao edema e sensibilidade articular, podendo levar à incapacidade grave e/ou mortalidade prematura. Sabe-se que na AR há uma hiper reatividade imunológica causada por células T, principalmente CD4 que têm importância na fisiopatologia dessa doença, além da elevação de células B patogênicas, macrófagos, citocinas inflamatórias, quimiocinas e autoanticorpos (NIU e CHEN, 2014; MOTA *et al.* 2015; SMOLEN *et al.* 2016; ALUNNO *et al.* 2017; JANG *et al.*, 2022). Conforme revisado por Jang *et al.* (2022), nos estados Unidos da América a prevalência de AR é em torno de 0,5–1,0% e, em geral, as mulheres são 2 a 3 vezes mais propensas a desenvolver AR do que os homens.

Por algum tempo, a AR foi considerada uma doença de caráter benigno, mas este conceito vem mudando. Estudos apontam que, devido aos seus efeitos deletérios sobre a mobilidade física e capacidade funcional, além da persistência do processo inflamatório, os pacientes com AR tem uma diminuição na expectativa de vida, comparando com a população em geral (GOELDNER *et al.* 2011; JANG *et al.*, 2022).

A AR é uma doença que apresenta prevalência em cerca de 1% na população brasileira e predominância no sexo feminino, com tendência a surgir após a quarta década de vida e pico de incidência na quinta década. Ainda, o risco estimado de familiares de pacientes com AR desenvolverem a doença, é de 4% para irmãos, 4,7% para pais e filhos e 1,9% para familiares de segundo grau. Em contrapartida, familiares de primeiro grau de pacientes que apresentam a doença na forma erosiva, podem ter mais de 15% de chance de desenvolver a doença (BRENOL *et al.* 2007; GOELDNER *et al.* 2011).

É importante ressaltar que a evolução da AR não tratada gera consequências como deformidades nas áreas atingidas, afetando a qualidade de vida do paciente. Por essa razão, ansiedade e depressão são queixas frequentes entre os pacientes. Desse modo, o tratamento dos pacientes deve envolver medicação, educação dos mesmos e seus familiares, além de um suporte psicossocial (FALEIRO *et al.* 2011).

#### 2.1.2.1 Etiologia

A causa exata da AR ainda não foi elucidada, mas sabe-se que fatores de risco genéticos e ambientais (tabagismo, exposição à sílica e doença periodontal) contribuem para a AR (JANG *et al.*, 2022). Estudos apontam que citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL) IL -1, IL-6, IL-17 e os mediadores produzidos através de vias a jusante nas articulações artríticas, constituem o meio que conduz a destruição da cartilagem óssea (ALUNNO *et al.* 2017; JANG *et al.*, 2022).

Para desencadear a AR, o mecanismo acima ocorre da seguinte forma: a IL-6 em combinação com a IL-23, IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  são responsáveis pela diferenciação das células T naive em Th17. Tal diferenciação resulta na produção de IL-17, que por sua vez promove a sinovite. Após a apresentação de auto antígenos pelo Th17 para as células B, inicia-se a resposta humoral, ocorrendo dano progressivo da membrana sinovial, o que favorece o influxo de mais linfócitos para o local da lesão e a liberação

de enzimas provenientes de células lisadas, que degradam a membrana sinovial e as cartilagens (COSTA *et al.* 2019).

O Fator Reumatoide (FR) é utilizado com frequência para diferenciar AR de outras artrites crônica, em que sua sensibilidade é aproximadamente 80% e sua especificidade é cerca de 70%. Um estímulo antigênico pode levar ao aparecimento de IgG anormal na sinóvia, resultando na produção de FR e no posterior desenvolvimento da doença reumática. Dessa maneira, o FR não dá início ao processo inflamatório na AR, mas atua na amplificação do processo (GOELDNER *et al.* 2011).

Como o principal alvo da doença é a sinóvia, caracterizada como uma camada de células que envolvem as articulações e bainha de alguns tendões, o acometimento da membrana sinovial pode levar à destruição osteoarticular. O comprometimento articular decorre de uma intensa inflamação da membrana sinovial, a qual determina a invasão da cartilagem e erosão do osso subcondral por um processo de infiltração e destruição local, denominado *pannus reumatoide* (FALEIRO *et al.* 2011).

#### 2.1.2.2 Sinais e sintomas

Os pacientes com AR inicialmente apresentam uma dor articular crônica e intensa. A dor geralmente ocorre nas pequenas articulações de mãos, pulsos e pés e pode acometer também, mas com menos frequência cotovelos, ombros, joelhos, pescoço e/ou quadris. A intensidade e caráter da dor depende de uma combinação da ativação direta dos nociceptores periféricos e modulação da sensibilidade dos neurônios ao longo da via nociceptiva central e periférica. Outra característica das manifestações clínicas da AR é que podem ser divididas em articulares e extra articulares e como é uma doença sistêmica, alguns sintomas gerais como febre, astenia, fadiga, mialgia, podem preceder ou acompanhar o início das manifestações articulares (MOTA *et al.* 2011; ZHANG e LEE, 2019).

A doença afeta as articulações sinoviais periféricas como metacarpo e metatarso falangianas, tornozelos e punhos. Porém, pode ocorrer comprometimento de joelhos, ombro, cotovelo e quadris. Além dos sintomas articulares, podem ocorrer manifestações extra articulares como a síndrome de Sjögren, nódulos reumatoides que resultam da vasculite de pequenos vasos, além de necrose com proliferação de fibroblastos. Vale ressaltar que o nódulo reumatoide é a manifestação extra articular

mais frequente, principalmente em pacientes com FR positivo, associado ao estágio mais agressivo da doença e acomete tendões, olecrano, dorso das mãos e dos pés (FALEIRO *et al.* 2011; GOELDNER *et al.* 2011).

Os resultados de AR não controlada resultam em dor e deformidades articulares resultantes do processo inflamatório crônico, o que pode levar a uma incapacidade funcional. Ainda, existe o aumento da mortalidade, já que pacientes com AR tem expectativa de vida inferior comparado a população em geral, principalmente em relação a alterações cardiovasculares (FALEIRO *et al.* 2011).

O risco de morte por doença cardiovascular em pacientes com AR é duas vezes maior comparado a controles da mesma faixa etária. Sabe-se que a AR é um fator de risco para aumento da espessura das camadas íntima e média das artérias carótidas comuns e femorais, o que correlaciona com a gravidade e cronicidade da doença reumatológica. O desenvolvimento de doença cardiovascular em pacientes com AR, leva a um aumento no risco desses pacientes desenvolverem infarto do miocárdio silencioso. Tal fato pode estar relacionado à baixa mobilidade devido ao acometimento das articulações, o que não permite que o paciente faça esforço que desencadeie a angina (BRENOL *et al.* 2007).

### 2.1.2.3 Diagnóstico e tratamento

Atualmente, estratégias em relação à AR tem se voltado para o encaminhamento do diagnóstico e início precoce de uma terapia que seja eficaz, com o objetivo de remissão ou baixa atividade da doença. Quando se fala em diagnóstico clínico de AR, o mesmo é baseado em critérios como sintomas físicos, radiografias das articulações e testes sorológicos. Ainda, existem etapas em que a lacuna entre o reconhecimento dos sintomas, diagnóstico e tratamento dependem do paciente: no início dos sintomas como atenção primária, encaminhamento para avaliação por um reumatologista e o início da terapia com medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (DMARD). Vale ressaltar que, nenhum teste isolado, seja laboratorial, de imagem ou histopatológico confirma o diagnóstico de AR (NIU e CHEN, 2014; MOTA *et al.* 2015; SMOLEN *et al.* 2016).

Conforme revisado por Radu & Bungau (2021), o diagnóstico de AR deve ser feito com base nos critérios American College of Rheumatology (ACR) e da European League Against Rheumatism (EULAR), publicados em 2010, que avaliam um conjunto

de variáveis, como fatores de risco, número e tipo de articulações envolvidas e a duração dos sintomas. O sistema de classificação expõe condições a que uma determinada pontuação corresponde e deve ser reexaminada ao longo do tempo. Tais condições e respectivas pontuações são apresentadas abaixo:

2–10 juntas grandes correspondendo a 1;

1–3 juntas pequenas (grandes juntas) correspondendo a 2; 4–

10 juntas pequenas (grandes juntas) correspondendo a 3;

>10 articulações ( $\geq 1$  pequena articulação + quaisquer outras) correspondendo a 5;

Fator reumatoide negativo e anticorpos anticitrulina negativo correspondendo a 0;

Fator reumatoide fracamente positivo e/ou anticorpos anticitrulina  $\leq 3$  x o limite superior do normal correspondendo a 2;

Fator reumatoide positivo alto e/ou anticorpos anticitrulina  $>3$  x o limite superior do normal correspondendo a 3;

Velocidade de hemossedimentação (VHS) anormal e/ou proteína C-reativa (PCR) anormal correspondendo a 1;

PCR normal e VHS normal correspondendo a 0;

Paciente relatou dor, inchaço e sensibilidade  $\geq 6$  semanas correspondendo a 1

Pacientes com pontuação  $\geq 6$  são classificados como portadores de AR.

Outros critérios para diagnóstico, também são propostos pelo ACR, tais como: a) rigidez matinal: rigidez articular com duração de pelo menos 1 hora; b) artrite de três ou mais áreas; c) artrite de articulações das mãos; d) artrite simétrica; e) nódulos reumatoides; f) fator reumatoide sérico; g) alterações radiográficas: erosões ou descalcificações localizadas em radiografias de mãos e punhos. Quatro dos sete critérios são necessários para classificar um paciente com AR (LAURINDO *et al.* 2004).

O tratamento é um processo dinâmico e deve ser reavaliado com frequência. O objetivo é minimizar os sinais e sintomas da doença, além de intervir no mecanismo fisiopatológico, para que possa alcançar a remissão do quadro ou a menor atividade inflamatória. Fisioterapia e terapia ocupacional são essenciais para que o paciente

continue exercendo suas atividades diárias. No âmbito farmacológico são utilizados medicamentos que atuam no controle da dor e inflamação, como analgésicos, AINE'S e os corticosteroides. Vale ressaltar que os AINE'S constituem a terapia de primeira escolha para tratamento de pacientes com AR (LAURINDO *et al.* 2004; FALEIRO *et al.* 2011).

## **2.2 Aspectos inflamatórios relacionados ao Lúpus eritematoso sistêmico e Artrite reumatoide: citocinas e Proteína C Reativa**

Quando há ocorrência de inflamação, deve-se pensar nos aspectos envolvidos em tal evento. As citocinas, por exemplo, se caracterizam como pequenas proteínas secretadas e liberadas pelas células como mediadoras dos processos inflamatórios. Além de atuarem como mediadoras da diferenciação celular, inflamação e regulação da resposta imunológica, as citocinas podem ter atividades redundantes, ou seja, funções semelhantes podem ser estimuladas por diferentes citocinas, além de serem produzidas em cascata, já que uma citocina estimula suas células alvo a produzirem citocinas adicionais. Outro elemento envolvido diretamente na inflamação é a Proteína C Reativa (PCR). A PCR é um biomarcador inflamatório sintetizado no fígado em fase de reação aguda, em resposta à regulação da interleucina 6 (IL-6). Dessa forma, a PCR aumenta de forma rápida em resposta à infecção, inflamação ou lesão tecidual (ZHANG e AN, 2007; ALUNNO *et al.* 2017; WANG *et al.* 2019; GERARDINO *et al.* 2019).

Em relação à PCR no LES, muitos pacientes que apresentam a doença demonstram níveis normais ou reduzidos de PCR. Porém, Gerardino *et al.* 2019, relataram uma associação entre níveis séricos altos de PCR e risco de desenvolver doença cardiovascular em pacientes com LES. Além disso, os níveis séricos de PCR têm sido associados a fatores de risco para hipertensão e aumento de peso corporal. No caso da AR, a PCR pode variar de acordo com a idade e o sexo. Foi observado que o aumento da PCR pode ocorrer antes do início da AR e indica atividade da doença durante o curso da mesma (MOTA *et al.* 2011; NIU e CHEN, 2014; GOTTSHALK *et al.* 2015; GERARDINO *et al.* 2019).

Na patologia do LES, anormalidades das citocinas foram implicadas, como parte do processo fisiopatológico envolvendo o lúpus ou como marcadores secundários que indicam um processo de desregulação imunológica. Prova disso consiste em estudos

que apontam que a desregulação de citocinas se relacionam com a fisiopatologia do LES, uma vez que as citocinas tem papel na diferenciação, maturação e ativação das células imunológicas e perda da tolerância imunogênica (APOSTOLIDIS *et al.* 2011; ALVES *et al.* 2019).

Uma das citocinas de extrema importância na patogênese do LES é o interferon (INF). Esta foi identificada em 1957 e, a partir dessa data, foi descoberto o INF tipo I que engloba o interferon alfa (INF  $\alpha$ ) e o interferon beta (INF  $\beta$ ). A ativação do INF tipo I tem importância no início da doença e manutenção das manifestações clínicas relacionadas ao LES. Estudos indicaram que o tratamento de pacientes com câncer ou doenças infecciosas com INF  $\alpha$ , poderia levar ao desenvolvimento de auto anticorpos antinucleares e LES, sugerindo uma ligação causal entre INF $\alpha$  e lúpus. Ainda, outros estudos mostraram que os níveis de INF  $\alpha$  estavam aumentados no soro e associados ao agravamento da doença em alguns pacientes. Tais fatores podem ser explicados pelo fato de que no LES, a produção de INF  $\alpha$  se dá a partir de células dendríticas plasmocitóides (pDC's), estimuladas por complexos imunológicos interferênticos que promovem a secreção de INF  $\alpha$  através de pDC's (APOSTOLIDIS *et al.* 2011; GOTTSALK *et al.* 2015; MATHIAN *et al.* 2015).

A interleucina 2 (IL-2) também se faz presente no LES e se caracteriza por ser um produto das células T, sendo importante em funções celulares como expansão, contração e homeostase. Em pacientes com lúpus, ocorre uma diminuição da produção de IL-2, a partir de células T, o que contribui para uma redução do número de células T reguladoras e diminuição da morte celular induzida por ativação, que é claramente observada no LES (APOSTOLIDIS *et al.* 2011).

Outra citocina que está presente no LES é a interleucina 8 (IL-8), a qual faz parte da subfamília das quimiocinas CXC. A IL-8 é produzida por células sanguíneas e possui os neutrófilos como alvo específico para sua ação, podendo ocasionar degranulação dos neutrófilos e, conseqüentemente, causar lesão e fibrose intersticial. Nos pacientes com LES e que apresentam um quadro de fibrose pulmonar e nefrite, pode-se dizer que as concentrações de IL-8 estão relacionadas com a atividade da doença (SHAHZAD *et al.* 2010; ALVES *et al.* 2019).

Apesar de todas as contribuições das citocinas para os aspectos inflamatórios do LES, vale ressaltar que existem limitações para a medição das citocinas como estratégia

de monitoramento do LES. Isso porque os níveis podem alterar após a punção sanguínea. Assim, as análises das amostras devem ser realizadas prontamente ou em até 2 horas. Por outro lado, caso as amostras sejam processadas e congeladas para serem analisadas em lotes, podem ocorrer falsos níveis de elevação ou redução de citocinas (ADHYA *et al.* 2011).

Em relação à AR, a liberação de citocinas e outras moléculas pró inflamatórias, resulta na destruição e incapacidade das articulações. Ainda, vários estudos apontam que as citocinas pró inflamatórias incluindo TNF  $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-17, constituem o meio que conduzem à destruição óssea, da cartilagem e alteração às respostas nociceptivas dos neurônios (ALUNNO *et al.* 2017; ZHANG e LEE, 2019). Ao longo do curso da AR, a expressão exacerbada de citocinas como as mencionadas acima, além de IL-8, IL-21 e fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), pode promover a inflamação da membrana sinovial e a reabsorção ósseo-cartilaginosa, por meio da estimulação de osteoclastos (NIU e CHEN, 2014).

### **2.3 Manifestações hematológicas, hemostáticas e marcadores laboratoriais no Lúpus eritematoso sistêmico e Artrite reumatoide**

Na clínica prática, a inflamação sistêmica pode ser indicada diretamente por alteração nas contagens de células de imunidade e inflamação do sangue periférico (células de rotina como neutrófilos, linfócitos e monócitos, além das plaquetas) e proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa. Novos índices de inflamação baseados na integração desses parâmetros inflamatórios convencionais, como a razão de neutrófilos/linfócitos (NLR), plaquetas/ linfócitos (PLR), índice de resposta à inflamação sistêmica (SIRI), índice agregado de inflamação sistêmica (AISII), e índice de inflamação imunológica sistêmica (SII), mostraram valores prognósticos potenciais em vários estudos (PALIOGIANNIS *et al.*, 2018; FOIS *et al.*, 2020; HAMAD *et al.*, 2021). Esses índices combinam os tipos de células acima e refletem a interação complexa entre células imunes e inflamatórias. Como no LES e a AR há envolvimento do sistema imune e inflamação, pode ser interessante investigar a capacidade de tais índices em revelar aspectos clínicos de relevância, como por exemplo, a atividade ou gravidade da doença.

A maioria dos pacientes com LES, desenvolve alguma manifestação hematológica em algum momento no decorrer da doença, sendo a anemia a manifestação hematológica

mais frequente. Esta é definida a partir de níveis de hemoglobina menor que 12 g/dL em mulheres e menor que 13,5 g/dL em homens e com valores do hematócrito cerca de 30% abaixo do valor normal, sendo a anemia classificada de leve a moderada. Além disso, a anemia é uma condição comum entre pacientes com lúpus e é encontrada entre 57 a 78% dos casos. Um estudo realizado por Aleem *et al.* 2014, verificou que as causas mais comuns de anemia em pacientes com LES incluem doença crônica, deficiência de ferro e hemólise autoimune. Em relação à anemia por doença crônica, é o tipo de anemia mais comum em pacientes com LES e sua etiologia parece estar relacionada com a resposta ou atividade inadequada da eritropoetina ou eritropoiese prejudicada. Já a anemia ferropriva em pacientes com lúpus, decorre de uma hemorragia gastrointestinal secundária a medicamentos. No caso da anemia hemolítica autoimune (AHAI), a mesma pode ser considerada como a primeira manifestação do LES e pode aparecer alguns anos antes do diagnóstico de LES (BASHAL, 2013; ALEEM *et al.* 2014; GARCÍA *et al.* 2016; MATOS *et al.* 2016).

A trombocitopenia também está presente em pacientes com LES e tem uma prevalência variando entre 7 e 30%. De acordo com a classificação SLICC, a contagem de plaquetas deve ser menor que 100 000/mm<sup>3</sup> sem nenhuma outra causa que possa ser identificada. A patogenia da trombocitopenia em pacientes com lúpus, pode ser provocada por destruição dessas células quando revestidas de anticorpos, por drogas, infecção e supressão da medula óssea. E ainda, pode estar associada à anemia hemolítica autoimune, sendo conhecida como síndrome de Evans. Alguns estudos sugerem que a trombocitopenia pode ser um fator relacionado à mortalidade de pacientes com LES. Desse modo, tal parâmetro deve ser avaliado pela equipe profissional que acompanha os pacientes portadores de lúpus (BASHAL, 2013; ALEEM *et al.* 2014; FAYYAZ *et al.* 2015; MATOS *et al.* 2016).

A leucopenia é uma alteração típica do LES e pode ser resultado de linfopenia, neutropenia ou uma combinação dessas duas alterações. Ainda, há uma redução de linfócitos T e B e, aumento de células natural *killer* (BASHAL, 2013; FAYYAZ *et al.* 2015). Entre vários critérios clínicos para LES, o *American College of Rheumatology* (ACR) inclui leucopenia (contagem de leucócitos <4.000,00/mm<sup>3</sup>) ou linfopenia (contagem de linfócitos <1.500/mm<sup>3</sup>) ocorrendo, no mínimo, em duas ocasiões (TAN *et al.*, 1982). Todavia, o *Systemic Lupus Collaborating Clinics* (SLICC) também inclui leucopenia (contagem de leucócitos <4.000,00/mm<sup>3</sup>) ou linfopenia (contagem de

linfócitos  $<1.000/\text{mm}^3$ ), no mínimo em uma vez (PETRI et al., 2012). Apesar das duas linhagens granulocítica e linfocítica poderem estar alteradas, a linfopenia é o achado mais comum e parece correlacionar com a atividade da doença (RIVERO et al., 1978; SCHULZE- KOOPS, 2004; LEVINE & ERKAN, 2011). Conforme revisado por Klein & Molad (2021), embora seja debatido se a linfopenia seja causa ou consequência de autoimunidade envolvendo a medula óssea, na presença de trombocitopenia e alteração em outras linhagens, pode-se assumir que a redução do número de linfócitos seja resultado de um processo de autoimunidade. Segundo Fayyaz et al. (2015), este processo de autoimunidade levando à linfopenia ocorre pela presença de anticorpos antilinfócitos, anticorpos linfotóxicos circulantes como IGM reativo ao frio, anti-Ro/SS-A e acelerada apoptose de linfócitos. Ainda de acordo com os autores mencionados anteriormente, a neutropenia também observada no LES pode estar relacionada à supressão da medula óssea por linfócitos T, destruição periférica por anticorpos antineutrófilos e autoanticorpos IgG anti-neutrófilos ativadores de complemento, além de anticorpos anti-Ro/SS-A. Ainda com relação à neutropenia, Meyer et al. (2020) relatou uma prevalência de 21% de neutropenia em pacientes com LES caucasianos significativamente associada com trombocitopenia, linfopenia, baixos níveis de complemento (C3 e C4) e teste de Coombs positivo). Além da atividade da doença, leucopenia em pacientes com lúpus precisa ser devidamente investigada, pois pode ser induzida por drogas, bem como por outras causas como infecção e doenças malignas (KLEIN & MOLAD, 2021). As manifestações hematológicas, na maioria das vezes, podem ser causadas pela fisiopatologia do LES, como também podem ser encontradas em pacientes que apresentam a doença, mas que ainda não tiveram manifestações da doença.

Quanto às manifestações hemostáticas em doenças reumáticas, a inflamação crônica que faz parte de seu processo fisiopatológico, constitui por si só um estado de hipercoagulabilidade (KLEIN & MOLAD, 2021). SLE, AR, síndrome de Sjogren, síndrome de Behçete vasculites, são alguns exemplos de doenças autoimunes, de caráter inflamatório que cursam com risco aumentado de trombose (EMMI et al., 2015). No LES, tais manifestações podem ser decorrentes de precipitação de complexos imunes, que causam distúrbios endoteliais vasculares (direta ou indiretamente), resultando em alguma anormalidade fibrinolítica da coagulação (INOH et al. 1996; FORTUNA e BRENNAN, 2013; ALEEM et al. 2014; FAYYAZ et al. 2015).

Geralmente os pacientes que têm alguma doença autoimune, como é o caso do LES e AR, são propensos a desenvolver aterosclerose e doenças cardiovasculares cerca de 5 vezes mais do que a população em geral. Esse aumento na frequência pode ser em decorrência de aumento no dano endotelial macro vascular (ATEHORTÚA *et al.* 2017). O tromboembolismo venoso (TEV) também é uma das complicações presentes em pacientes com LES. Pode resultar de uma manifestação da síndrome antifosfolípide e presença de alguns fatores de risco como a presença de anticoagulante lúpico, trombofilia hereditária, idade avançada e tabagismo. Todos esses fatores contribuem para o desenvolvimento do TEV em pacientes com LES (ALEEM *et al.* 2014).

Alguns parâmetros laboratoriais como complexo trombina-anti trombina (TAT), D-Di e complexo inibidor da plasmina (PIC), podem ser capazes de detectar alterações próprias na coagulação, ao contrário de parâmetros como tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e produtos de degradação de fibrina (PDF). Nesse sentido, um estudo realizado por Inoh *et al.* 2016, que mediu tais parâmetros laboratoriais em pacientes com LES, constatou que os níveis de TAT e D-Di estavam mais elevados em pacientes com LES do que em pacientes saudáveis. Dessa forma, os autores concluíram que os sistemas da coagulação e da fibrinólise estavam ativados no LES.

Conforme já mencionado acima, os pacientes com AR possuem alto risco de desenvolver aterosclerose e doença cardiovascular. Cerca de 30 a 50% dos pacientes com AR vão à óbito devido ao acometimento do sistema hemostático. Tal fato se deve a diferentes alterações endoteliais incluindo sua ativação persistente, propriedades pró trombóticas e redução da resposta vasodilatadora do endotélio. Além de tais fatores, a disfunção endotelial pode fazer parte da patogênese da AR, uma vez que a inflamação acomete também os vasos de pequeno e grande calibre, podendo causar vasculite reumatoide (ATEHORTÚA *et al.* 2017).

No caso da AR, os marcadores laboratoriais mais utilizados são as provas de atividade inflamatória tais como Fator Reumatoide (FR), PCR e velocidade de hemossedimentação (VHS), sendo essa aferida pelo método de Westergren. Tanto PCR quanto VHS podem variar de acordo com a idade e sexo. O VHS pode sofrer influência de alguns fatores como níveis de hemoglobina, hipoalbuminemia, gravidez dentre outros (INOH *et al.* 1996; MOTA *et al.* 2011).

## 2.4 Hemostasia

Embora as grandes descobertas relacionadas à hemostasia datam do século XX, registros deste processo datam de dois milênios quando o filósofo grego Platão descreveu que o sangue é capaz de formar “fibras” uma vez fora do corpo, conforme revisado por Versteeg *et al.* 2013. Porém, de acordo com estes autores, outra grande descoberta que contribuiu para o entendimento da hemostasia, remonta ao século XIX, quando as plaquetas foram descobertas bem como sua relação com este complexo processo denominado hemostasia.

A hemostasia, a capacidade do sangue fluir livremente dentro dos vasos, envolve fatores pró e anticoagulantes que devem se manter em equilíbrio, garantindo a manutenção do fluxo sanguíneo normal, prevenindo assim, a ocorrência de hemorragia ou trombos (BONAR *et al.* 2017).

Fatores de coagulação, plaquetas, os anticoagulantes naturais e o endotélio vascular, estão envolvidos no processo da coagulação sanguínea. Desse modo, quando ocorre uma ruptura do endotélio vascular, tanto as plaquetas, quanto os fatores de coagulação passam a ser ativados (LORENZI, 2006).

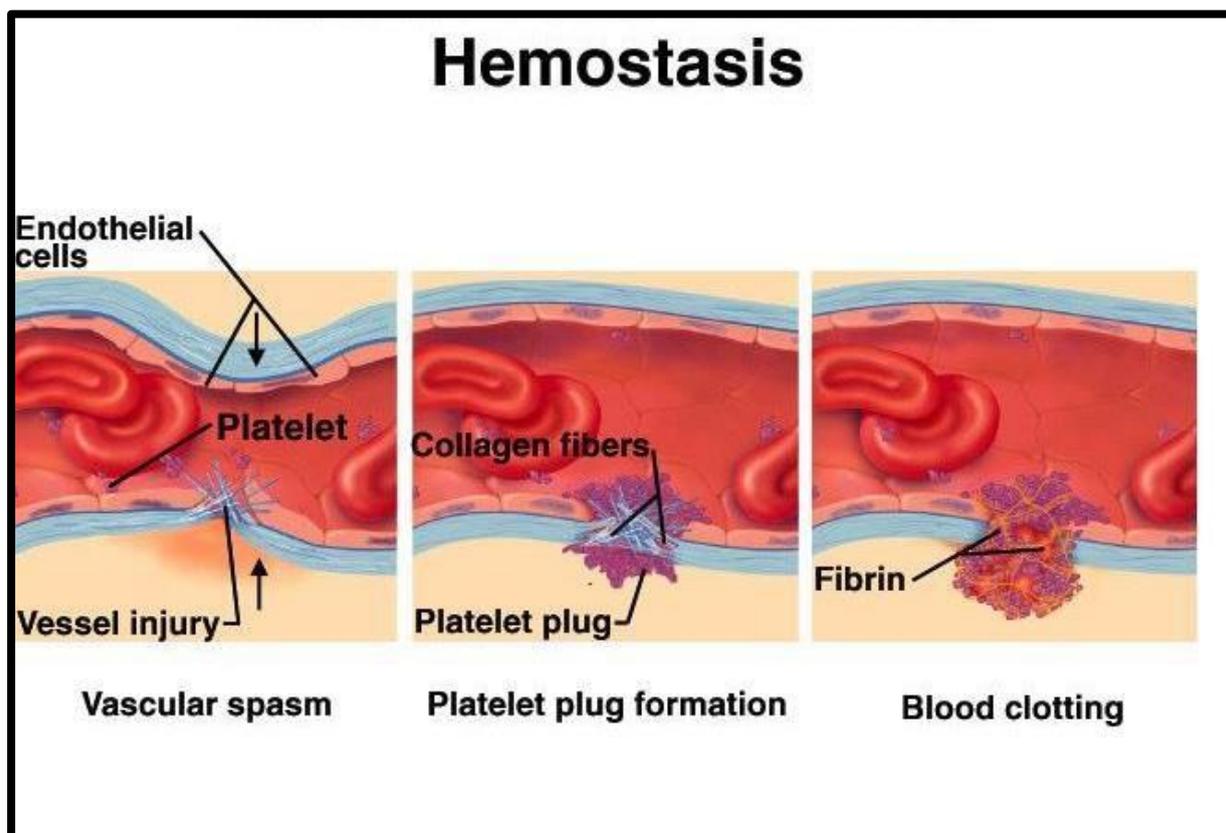
O processo hemostático ocorre em 3 fases, conforme mostrado na **Figura 1**. A primeira delas é chamada “hemostasia primária” e é decorrente da lesão do endotélio vascular. Desse modo, a partir do vaso lesado, ocorre uma vasoconstrição deste (a fim de evitar o extravasamento sanguíneo), seguida da adesão das plaquetas ao endotélio lesado, ativação e agregação destas, com conseqüente formação do tampão plaquetário (LORENZI, 2006; BONAR *et al.* 2017).

A segunda fase ou “hemostasia secundária”, por sua vez, é caracterizada pela formação de um coágulo que tem a função de estancar o extravasamento sanguíneo, a partir da formação de uma rede de fibrina (formada a partir da ativação dos fatores de coagulação sanguínea) entre as plaquetas ali aderidas e consolidando o tampão plaquetário (LORENZI, 2006).

Após a ocorrência das duas etapas descritas acima, ocorre a dissolução da rede de fibrina formada, constituindo a fibrinólise ou “hemostasia terciária”, processo que ocorre por meio de enzimas que são produzidas pelo próprio endotélio. Logo, um exemplo de enzima é a plasmina, proveniente da ativação do plasminogênio, a qual

tem a função de dissolver o coágulo formado no local lesado. Tal fase é caracterizada como a terceira etapa do processo de hemostasia, a qual reestabelece a normalidade do fluxo sanguíneo (LORENZI, 2006).

Resumidamente, a hemostasia capacita o organismo a regenerar os vasos sanguíneos no local da lesão, manter o sangue no estado fluido e ainda remover coágulos após o restabelecimento da integridade vascular (VERSTEEG *et al.* 2013).



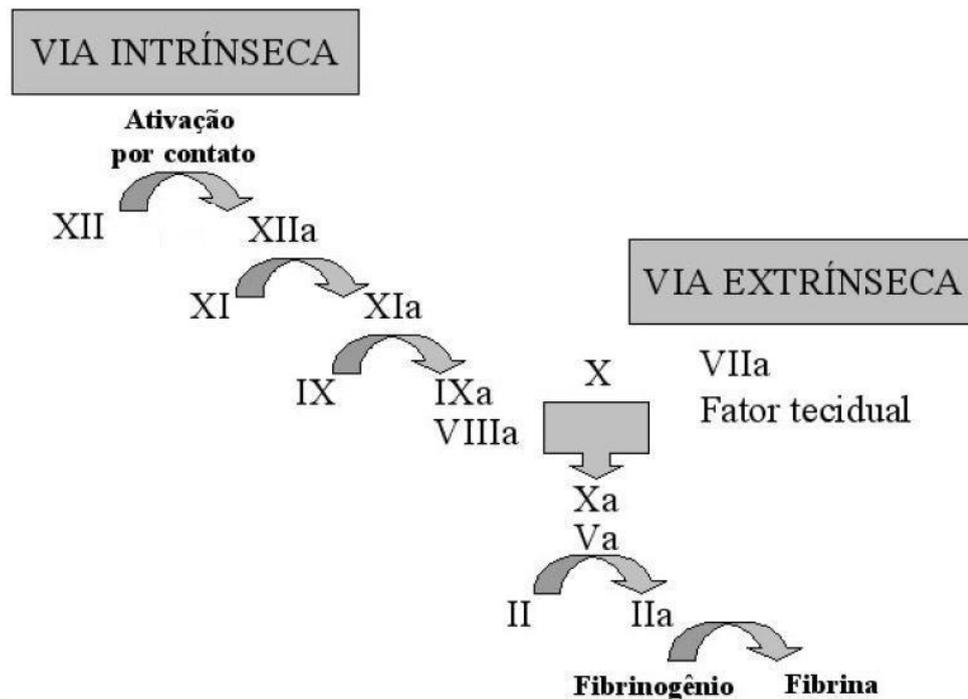
**Figura 1** – Fases da hemostasia: hemostasia primária (adesão, ativação e agregação plaquetária) e secundária (formação do coágulo de fibrina. *Hemostasis*: hemostasia; *endothelial cells*: células endoteliais; *platelet*: plaqueta; *vessel injury*: injúria vascular; *vascular spasm*: contração vascular; *collagen fibers*: fibras colágenas; *platelet plug*: tampão plaquetário; *platelet plug formation*: formação do tampão plaquetário; *fibrin*: fibrina; *blood clotting*: coágulo sanguíneo. Adaptado de: <https://docplayer.com.br/49048332-Hemostasia-e-coagulacao-sanguinea-nea.html>.

## 2.5 Cascata de coagulação

O modelo da cascata de coagulação foi primeiramente proposto por Macfarlane, Davie e Ratnoff (1964) e culmina na formação de trombina que, por sua vez, converte o fibrinogênio em fibrina. Esse modelo foi proposto em 1964 e de acordo com o mesmo, a cascata de coagulação pode ser dividida em duas vias; a intrínseca, com

participação de fatores da coagulação que estão presentes no sangue e a via extrínseca, iniciada pela exposição do fator tissular (tecidual) a partir do tecido lesado. Ambas as vias irão convergir em uma terceira, que é denominada via comum e resulta na formação de trombina e consequente fibrina (DAVIE e RATNOFF, 1964; FRANCO, 2001; LORENZI, 2006; FERREIRA *et al.* 2010).

A partir do momento em que a via extrínseca é ativada (**Figura 2**) reações sequenciais resultam na geração de trombina. De uma forma mais detalhada, a via extrínseca é ativada quando o fator denominado VII (FVII) torna-se ativado (FVIIa) por meio do fator tecidual (FT) e, desse modo, ocorre a formação de um complexo denominado FVIIa + FT, o qual é responsável pela ativação do fator X (FX) (FRANCO, 2001; LORENZI, 2006; FERREIRA *et al.* 2010). Por outro lado, a via intrínseca, se inicia mediante a ativação do fator XII (FXII), que ocorre por meio da ativação por contato entre o sangue e uma superfície negativamente carregada. O FXIIa é responsável pela ativação do fator XI (FXIa) que ativa o fator IX (FIXa). Assim o FIXa se combina com o fator VIIIa (FVIIIa), previamente ativado por traços de trombina, que juntamente com o cálcio e fosfolípidos de carga negativa, forma o complexo tenase e, consequentemente, ativa o FX (FXa). A partir do momento em que a via extrínseca e/ou a via intrínseca ativam o FX, inicia-se a via comum, a qual por sua vez, culmina na formação de trombina e, consequentemente, fibrina, cuja polimerização depende do fator XIII ativado (FXIIIa), conforme mostrado na **Figura 2**. De uma forma mais detalhada, após ativação do FX (FXa), esse combina com o FVa (previamente ativado por traços de trombina), cálcio e fosfolípidos de carga negativa, formando o complexo protrombinase. Esse complexo atua sobre a protrombina transformando-a em trombina (FIIa) e, finalmente, essa converte o fibrinogênio em fibrina (FRANCO, 2001; FERREIRA *et al.* 2010).



**Figura 2** - Cascata de coagulação em que são explicitadas as duas vias (intrínseca e extrínseca), juntamente com os fatores de coagulação. Nota-se que ambas as vias convergem para a via comum. Adaptado de Franco, 2001.

Deve-se atentar que tal modelo apresenta ainda um bom entendimento no que diz respeito aos processos envolvidos na coagulação *in vitro*. Todavia, apresenta limitações. Por exemplo, observa-se que o modelo em questão, não explica o motivo pelo qual a ativação do FX pela via extrínseca não consegue compensar o comprometimento da via intrínseca, quando ocorre uma deficiência de fatores VIII ou IX (HOFFMAN, 2003).

O modelo da cascata de coagulação tradicional deixa evidente que os pacientes que apresentam hemofilia possuem a via extrínseca dentro da normalidade, o que pode ser certificado pelo achado de um tempo de protrombina (TP) normal, ao mesmo tempo em que o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) está prolongado, com chance de extravasamento sanguíneo pelo paciente. Assim, há especulação em torno do motivo pelo qual a via extrínseca não compensa falhas que ocorrem na via intrínseca. Tal fato levantou esse importante questionamento e pesquisas em torno da questão, que culminaram em evidências que as vias extrínseca e intrínseca não agem de forma independente (FERREIRA *et al.* 2010).

Devido às diversas falhas apresentadas pelo modelo tradicional da cascata de coagulação, incluindo as questões que envolvem pacientes que apresentam algum distúrbio hemostático, desenvolveu-se um novo modelo para a hemostasia embasado em superfícies celulares. Este faz a interação entre fatores da coagulação com superfícies celulares específicas, permitindo a explicação de questões levantadas e inexplicadas com base no entendimento apenas do clássico modelo da cascata de coagulação (FERREIRA *et al.* 2010).

### **2.5.1 Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares**

A partir dos avanços nos estudos e pesquisas que ocorreram mais recentemente no que tange à hemostasia, consolidou-se o entendimento de que a coagulação tem início em células que apresentam o FT como componente de sua superfície (FERREIRA *et al.* 2010).

O modelo da coagulação baseado em superfícies celulares, apresentado na **Figura 3**, foi criado para um melhor entendimento de distúrbios da coagulação que não podiam ser explicados pela cascata convencional. Neste modelo, é destacado o papel de superfícies celulares específicas no controle e direcionamento dos processos hemostáticos (HOFFMAN, 2003; FERREIRA *et al.* 2010).

O novo modelo da cascata de coagulação foi apresentado em fases (iniciação, amplificação, propagação e finalização), que serão detalhadas a seguir, com o intuito de esclarecer o processo hemostático *in vivo* (HOFFMAN, 2003; VINE 2009; FERREIRA *et al.* 2010).

#### 2.5.1.1 Fase de iniciação

Para o entendimento do novo modelo da cascata de coagulação, a fase de iniciação é compreendida a partir do momento em que as células que expressam o FT entram em contato com os componentes sanguíneos no local lesionado, desencadeando uma série de eventos. Desse modo, o FT expresso pela célula endotelial, ou em outro tipo celular, se liga ao FVII e este torna-se ativado. A partir daí, há formação de um complexo envolvendo o FVIIa e o FT (FT-FVIIa), o qual irá ativar tanto o FIX quanto o FX. O FX na sua forma ativada (FXa) irá se combinar com um cofator, o Fator V ativado (FVa) e é formado um complexo denominado protrombinase. Tal complexo tem a função de transformar a protrombina, denominada como fator II (FII), em

trombina (FIIa), o que nos leva a entender que a fase em questão, ainda não permite a formação de um coágulo.

#### 2.5.1.2 Fase de amplificação

A partir do momento em que ocorre uma lesão vascular, imediatamente as plaquetas seguem um rumo extra vascular e aderem no local lesionado. Nesse ponto, há produção de pequenas quantidades de trombina, que ativam as plaquetas e alteram sua permeabilidade, permitindo a entrada de cálcio e saída de substâncias quimiotáticas que atraem os fatores de coagulação para sua superfície. Logo, a trombina gerada juntamente com o cálcio, amplifica o processo de coagulação, a partir da ativação dos fatores XI, IX, VIII e V.

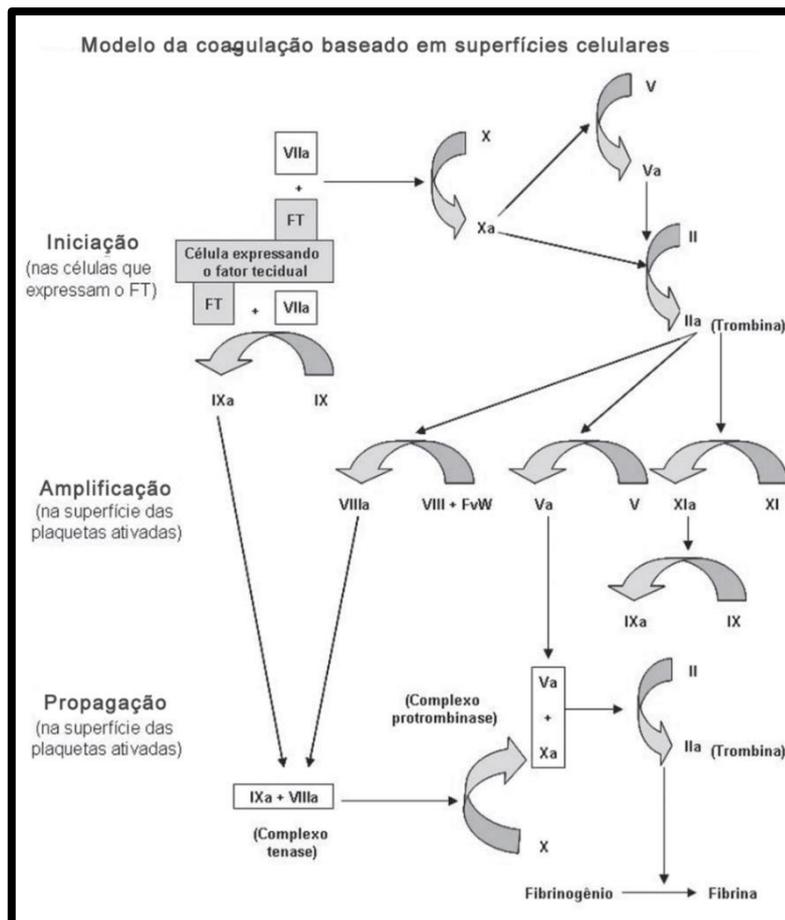
#### 2.5.1.3 Fase de propagação

Durante a fase de propagação, o FIXa irá interagir com o FVIIIa (na superfície das plaquetas ativadas) e resulta na formação do complexo tenase. Tal complexo tem a função de produzir maior quantidade de FXa, uma vez que o mesmo não se move das células que expressam o FT em direção às plaquetas ativadas. Devido à essa explicação, o FXa associa-se ao FVa e, conseqüentemente, é formado o complexo protrombinase, que é responsável pela conversão de protrombina em trombina.

#### 2.5.1.4 Finalização

Uma das características desta fase é limitar o processo de coagulação. Como há formação do coágulo de fibrina, este deve ser controlado para que não ocorra total oclusão do vaso, pela formação de um trombo. Para que esse controle ocorra, quatro anticoagulantes naturais participam do processo. São eles: inibidor da via do fator tecidual (TFPI), proteína C (PC), proteína S (PS) e antitrombina (AT).

Primeiramente o TFPI irá formar um complexo quaternário, caracterizado por FT-FVIIa-FXa-TFPI e, dessa maneira, ocorre uma inativação dos fatores que teoricamente estavam ativados, controlando a coagulação. Em seguida, tem-se a ação de outros dois anticoagulantes naturais, as proteínas C e S, as quais em conjunto, tem a função de inativar os cofatores pró coagulantes FVa e FVIIIa. Além do mais, a antitrombina (AT), outro anticoagulante natural, inibirá o excesso de trombina formada, também contribuindo para limitar o processo de coagulação (FERREIRA *et al.* 2010).



**Figura 3** – Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares, em que ocorrem as seguintes fases: iniciação (nas células que expressam o Fator Tissueal), amplificação (na superfície das plaquetas ativadas), propagação (na superfície das plaquetas ativadas), que culminam na fase de finalização, em que é formado o coágulo de fibrina. Fonte: FERREIRA *et al.* 2010.

É preciso ressaltar que a produção de trombina é oriunda das fases de amplificação e propagação. Portanto, durante a fase de amplificação, as plaquetas migram para o endotélio lesado e se ativam por meio da trombina e ocorre formação de complexos que são responsáveis por uma maior e rápida produção de trombina. Já na fase de propagação, o complexo protrombinase, leva à produção de grande quantidade de trombina a partir do instante em que esta enzima é responsável por converter a protrombina em trombina, gerando então um “boom” de trombina, que por sua vez culmina na produção de um coágulo de fibrina, através da conversão do fibrinogênio. Desse modo, as plaquetas têm a função de regular o processo de geração de trombina (ROBERTS *et al.* 2006; BONAR *et al.* 2017; REDDEL *et al.* 2019).

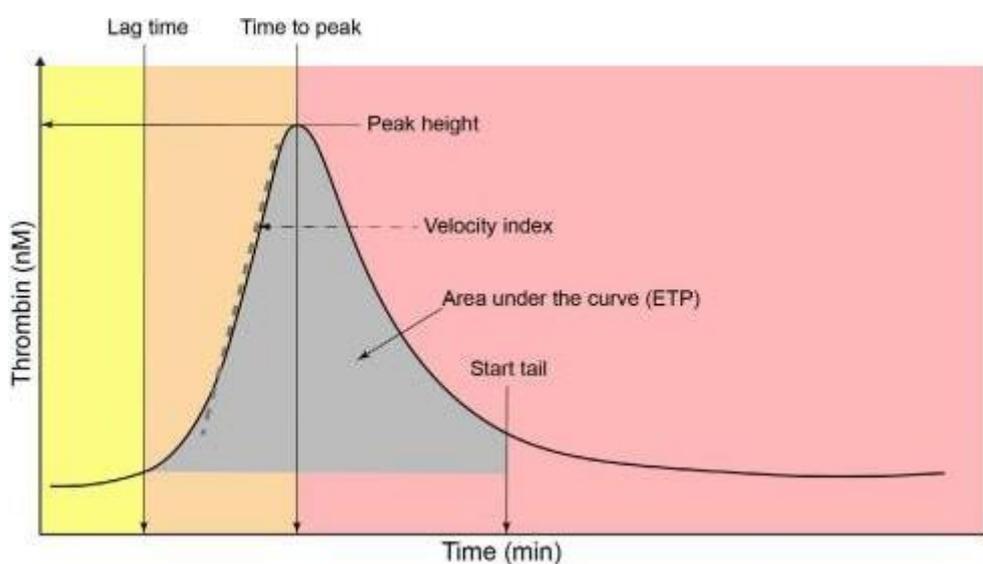
## 2.6 Teste de geração de trombina

Descrito na década de 50 como um ensaio manual e trabalhoso, muitos esforços têm sido feitos ao longo dos anos para padronizar o teste de geração de trombina (TGT), bem como para torná-lo mais acessível aos pesquisadores e laboratórios clínicos. Conforme revisto por Depasse et al., 2021, o TGT permite uma avaliação global da hemostasia, ao contrário dos testes convencionais, como tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial, dosagem de fatores da coagulação ou da anticoagulação, os quais avaliam apenas parte deste processo. Deve-se ressaltar ainda que o TGT apresenta muitas aplicações clínicas e não clínicas, sendo uma ferramenta bastante versátil, cuja técnica pode ser modificada mediante acréscimo de diferentes substâncias de acordo com o propósito do estudo.

O TGT (método de CAT- Calibrated Automated thrombogram) (HEMKER et al., 2003), se baseia na adição de fator tissular ao plasma para dar início à ativação da coagulação que leva à formação de trombina. Essa cliva proteoliticamente um substrato sintético, o qual libera um cromógeno ou fluoróforo, cuja intensidade é medida continuamente, sendo proporcional à quantidade de trombina gerada, a qual é expressa em um trombograma (HEMKER e KREMERS , 2013; TRIPODI, 2016; DUARTE *et al.* 2017; DEPASSE et al., 2021). A cinética de reação compreende três estágios: iniciação, amplificação e fase de resolução. O trombograma apresenta vários parâmetros que servem para melhor interpretar a condição hemostática de uma dada amostra de plasma, usualmente pobre em plaquetas, de um indivíduo. Usando um calibrador de concentração conhecida, é possível quantificar a geração de trombina em nanomolares. Os parâmetros e sua respectiva interpretação seguem abaixo (LE CUT et al., 2015; DEPASSE et al., 2021):

- Tempo de latência (*lagtime*): descreve o tempo desde o início da reação até que a primeira trombina seja gerada; corresponde ao momento em que o coágulo de fibrina é formado (= tempo de coagulação convencionais). É expresso em minutos.
- Tempo até o pico (*time to peak*): corresponde ao tempo até que a quantidade máxima de trombina seja formada. É expresso em minutos.
- Início da cauda (*start tail*): corresponde ao tempo em que a geração de trombina chegou ao fim. É expresso em minutos.

- Altura do pico (*peak height*): corresponde à geração máxima de trombina. Quando calibrado, é expresso em nanomolares.
- Índice de velocidade (*velocity index*): corresponde à inclinação de geração de trombina entre o *lagtime* e o *time to peak*.
- Potencial de trombina endógena (ETP – *endogen thrombin potential*): corresponde à área sob a curva (trombograma) e representa a trombina formada resultante do equilíbrio entre forças procoagulantes e anticoagulantes.



**Figura 4-** Parâmetros do Trombograma expressando a geração de trombina em nM em função do tempo em minutos. Lagtime = período de latência; Time to peak = tempo para alcançar o pico; Velocity index = índice de velocidade; Area under the Curve = área sob a curva; ETP (*endogen thrombin potential*) = potencial de trombina endógeno; Start tail= início da cauda. Fonte: Depasse et al., 2021.

O TGT permite avaliar a formação de trombina a partir da utilização de fator tissular e de fosfolípidos, como ativadores da coagulação, utilizando plasma rico (PRP) ou pobre (PPP) em plaquetas para a avaliação tanto da hipocoagulabilidade, quanto hipercoagulabilidade, ou seja, pode ser empregado na avaliação do risco de trombose ou hemorragia (DUARTE *et al.* 2017, DUARTE *et al.*, 2019; DEPASSE *et al.*, 2021; BINDER *et al.*, 2021).

Uma das vantagens do TGT é que o mesmo pode ser utilizado em situações de hipo e hipercoagulabilidade. Assim, dentre as possíveis aplicações do TGT, pode-se citar a utilização do mesmo para monitorar pacientes com hemofilia A em uso de FVIII recombinante. A determinação da dose de FVIII recombinante que deve ser administrada é baseada nas características clínicas do paciente (tipo de sangramento) e/ou risco de hemorragia após cirurgia ou outro procedimento invasivo. Os níveis de FVIII devem ser medidos antes e após a infusão desse fator, através de testes coagulométricos (TTPa modificado) ou cromogênico. Entretanto, esses testes são pouco sensíveis para a detecção de baixas concentrações de fator (0-2 UI/dL). O TGT é considerado um teste sensível para a detecção do estado de hipocoagulabilidade relacionado a diferentes concentrações de FVIII. Pacientes com hemofilia A grave (FVIII < 1 UI/dL) podem apresentar diferentes fenótipos, uns sangram mais que outros e essa diferença não é detectada pelos testes coagulométricos tradicionais. Utilizando o TGT, pode ser possível a distinção entre esses diferentes riscos de sangramento (TRIPODI, 2016).

Pacientes com tromboembolismo venoso (TEV) e que sofrem de episódios agudos, devem receber tratamento imediato, utilizando heparina não fracionada, que possui ação muito rápida para inibir a formação de trombos. Os pacientes também podem utilizar antagonista de vitamina K ou anticoagulante oral de ação direta para a prevenção do TEV recorrente. Levando em consideração tais fatores, o TGT é uma ferramenta promissora visando a investigação de pacientes com risco de TEV e a tomada de decisões sobre a terapia com anticoagulantes (TRIPODI, 2016).

Outra vantagem, é que o TGT pode ser utilizado para a avaliação de estados de hipercoagulabilidade. No estudo realizado por Macchia *et al.* 2012, o TGT foi utilizado para comparar o efeito do ácido acetilsalicílico (AAS) e da atorvastatina na prevenção primária de eventos tromboembólicos em pacientes com diabetes mellitus. Foi observada uma inibição da GT nos pacientes em uso de atorvastatina, comparados ao grupo controle. Não foram observadas diferenças nos níveis de pico de trombina entre os pacientes em uso de AAS e o grupo controle. A partir desses resultados, foi possível demonstrar o efeito antitrombótico da estatina. Em contrapartida, foi observado que o AAS não foi capaz de diminuir o pico e a quantidade total de GT. Logo, o AAS pode ser uma estratégia ineficiente no que diz respeito à sua eficácia para reduzir eventos de trombos em pacientes diabéticos (MACCHIA *et al.* 2012).

Conforme revisado por Binder et al., 2021, personalização do tratamento pode ser possível valendo-se do TGT, uma vez que o resultado final deste teste expressa o equilíbrio entre forças procoagulantes e anticoagulantes. Dessa forma, o TGT pode ser uma útil ferramenta para identificar pacientes hemofílicos com tendência a sangramentos graves que requerem profilaxia prévia com FVIII e, ainda, para otimizar e monitorar eficácia do tratamento. A predição de risco de sangramento em cirurgia cardíaca também pode ser estimada pelo TGT (BOSH et al., 2013 e 2014). Ainda de acordo com Binder et al., 2021, TGT é também um poderoso método para diagnóstico de distúrbios tromboticos e coagulopatia relacionada à infecção. Assim, o TGT pode ser útil também para predição de risco de TVP, bem como de sua recorrência. Com relação à aterotrombose e doenças arteriais coronarianas, o TGT reflete um estado de hipercoagulabilidade, podendo ser útil na escolha de agentes antitrombóticos e anticoagulantes mais potentes para prevenir geração de trombina em tais pacientes. Em suma, o TGT permite uma avaliação do *status* hemostático de dado indivíduo em função de um número de doenças e /ou condições que afetam o sistema hemostático, o que tem possibilitado a ampliação do entendimento da fisiopatologia das mesmas e o seu manejo.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Conforme já mencionado anteriormente, os pacientes que apresentam alguma doença autoimune, como é o caso do LES, AR, síndrome de Sjogren, síndrome de Behçet e vasculites, além de outras, apresentam uma inflamação crônica como parte de seu processo fisiopatológico, constituindo por si só um estado de hipercoagulabilidade (KLEIN & MOLAD, 2021). Tais pacientes, particularmente aqueles com LES e AR, são propensos a desenvolver aterosclerose e doenças cardiovasculares cerca de 5 vezes mais do que a população em geral. O dano endotelial macro vascular pode justificar parcialmente este aumento na frequência de tais ocorrências. Sabe-se que a maioria dos pacientes com LES, durante o decorrer da doença, desenvolve alguma alteração hematológica, além de muitas outras como precipitação de complexos imunes, causando distúrbios endoteliais direta e indiretamente, o que pode resultar em anormalidades da coagulação e da fibrinólise. Por outro lado, pacientes com AR apresentam elevado risco de desenvolvimento de aterosclerose, uma vez que a disfunção endotelial pode fazer parte de sua patogênese, ocorrendo redução da resposta vasodilatadora e tendência pró-trombótica (INOH *et al.* 1996; ATEHORTÚA

*et al.* 2017). Adicionalmente, a inflamação acomete também os vasos de pequeno e grande calibre, podendo causar vasculite reumatoide (ATEHORTÚA *et al.* 2017).

Neste contexto, o presente estudo visa avaliar os perfis hematológico e hemostático de mulheres com LES ou AR, em comparação com um grupo de mulheres híginas como controles, tendo sido o perfil hemostático determinado pelo teste de geração de trombina (TGT). Torna-se oportuno ressaltar aqui que, em relação aos marcadores laboratoriais que investigam possíveis alterações hemostáticas, o TGT como um teste que avalia globalmente a hemostasia, é bastante promissor. Apesar de apresentar limitações no que diz respeito ao seu uso em laboratório clínico, pode-se antever a superioridade do TGT sobre os testes convencionais, uma vez que o mesmo é capaz de avaliar situações tanto de hipo quanto hipercoagulabilidade. Constitui um dos poucos testes laboratoriais capaz de detectar alteração no plasma referente à hipercoagulabilidade.(LE CUT *et al.*, 2015; TRIPODI *et al.* 2016; DUARTE *et al.* 2017; ITO *et al.* 2019; JOHNSON *et al.* 2019; DEPASSE *et al.*, 2021; BINDER *et al.*, 2021).

O presente estudo foi motivado pelos constantes achados na literatura de eventos trombóticos em pacientes com doenças autoimunes, conforme revisado por Klein & Molad (2021), cujos resultados podem agregar algum valor ao conhecimento da fisiopatologia de tais doenças e, conseqüentemente, possíveis melhorias no diagnóstico e tratamento. Ressalta-se que, atualmente, o diagnóstico do LES é realizado por meio de complexos critérios desenvolvidos pelo *American College of Rheumatology*, que reúne uma série de alterações associadas à doença, porém tais critérios reunidos ainda apresentam limitações quanto à sensibilidade e especificidade. Dessa forma, pode ocorrer erros no diagnóstico mesmo realizado por profissionais experientes e, conseqüentemente, comprometer o tratamento adequado. Diante das dificuldades no diagnóstico de doenças autoimunes que podem afetar a tomada de decisões certas, há necessidade de mais entendimento sobre a sua fisiopatologia e busca por mais biomarcadores que possam contribuir para a melhoria deste diagnóstico, como também do tratamento e seu manejo.

Diante do exposto acima, este estudo teve como hipótese a existência de importantes alterações hemostáticas tanto no LES como na AR, objetivando traçar um perfil acerca de tais alterações em cada doença em nosso meio, em um número limitado de amostras de pacientes. Isso posto, o presente estudo abordou as seguintes questões, dentre outras:

- a) Os parâmetros do hemograma e seus índices derivados podem distinguir entre casos de LES em atividade ou não?
- b) Com base na amostra de pacientes utilizada, as doenças autoimunes avaliadas (LES e AR) foram capazes de perturbar o equilíbrio hemostático deixando os pacientes mais hipercoaguláveis?
- c) A geração de trombina que é fundamental para a formação de fibrina correlacionou com a gravidade do processo inflamatório? Com base no desempenho do TGT, esse apresentou potencial para ser utilizado na clínica para a avaliação do status hemostático/gravidade dos pacientes com LES e AR?
- d) Houve correlação entre marcadores hemostáticos relacionados à ativação da coagulação e marcadores inflamatórios (PCR e índices hematológicos) e índice de atividade do LES como o SLEDAI?

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar os perfis hematológico e hemostático de mulheres com LES ou AR, em comparação com um grupo de mulheres hígdas como controles, em nosso meio.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Determinar os parâmetros hematológicos em mulheres com LES ou AR, por meio do hemograma convencional, e calcular os índices inflamatórios com base nos dados extraídos do hemograma;
- Determinar o potencial de geração de trombina em mulheres com LES ou AR, juntamente com o grupo controle, por meio do TGT, utilizando o método de CAT (*Calibrated Authomated Thrombogram*);
- Correlacionar os valores dos índices inflamatórios com aqueles obtidos das análises de TGT em mulheres com LES ou AR;

- Correlacionar os valores dos índices inflamatórios e aqueles obtidos das análises de TGT em mulheres com LES com a atividade da doença medida pelos valores de SLEDAI.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Casuística e aspectos éticos**

As pacientes deste estudo foram recrutadas no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), enquanto as mulheres voluntárias que compuseram o grupo controle, de mesma faixa etária, foram selecionadas na Faculdade de Farmácia da UFMG.

A seleção de participantes ocorreu de agosto de 2016 a abril de 2017.

As amostras de plasma que foram utilizadas no presente projeto integraram uma dissertação de mestrado defendida por Luan Carlos Vieira Alves, orientado pelo Prof. Dr. Vicente de Paulo Coelho Peixoto Toledo, os quais gentilmente nos cederam tais amostras para alguns estudos hematológicos e hemostáticos. Dessa forma, o tamanho da amostra utilizada no presente estudo foi determinada por conveniência.

As participantes do presente estudo foram distribuídas em três grupos distintos, a saber:

a) Mulheres com LES (n=21), diagnosticadas pela equipe de reumatologistas do HC/UFMG, de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR), em acompanhamento clínico sob tratamento ou não, e sem outra condição autoimune, tendo o score SLEDAI-2k modificado calculado pelo médico no momento da consulta. De acordo com os valores de SLEDAI 2K, escore utilizado no HC/UFMG, as pacientes foram distribuídas em dois subgrupos: LES com baixa atividade (SLEDAI 2K  $\leq$ 4, n=13) e LES com atividade moderada/alta (SLEDAI 2K  $>$ 4, n = 12).

b) Mulheres com AR (n=10), diagnosticadas pela equipe de reumatologistas do HC/UFMG, de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR), e da Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR), em acompanhamento clínico sob tratamento ou não;

c) mulheres autoreferidas como saudáveis e sem qualquer manifestação clínica ou uso de medicamento, as quais constituíram o grupo controle (n=6).

Os dados clínicos e laboratoriais de cada paciente foram obtidos através de consulta aos respectivos prontuários médicos devidamente arquivados no ambulatório do HC-UFMG.

## **5.2 Critérios de inclusão e exclusão para LES**

Foram incluídas mulheres com idade superior a 18 anos com diagnóstico de LES conforme critérios da ACR em tratamento ou não, as quais concordaram em participar do estudo tendo assinado o TCLE. Como critérios de exclusão, foram eliminadas as mulheres com soropositividade para HIV, as gestantes e aquelas com outras condições patológicas, seja infecciosa ou inflamatória no momento da coleta ou nos 30 dias precedentes e ainda aquelas que se recusaram a assinar o TCLE.

## **5.3 Critérios de inclusão e exclusão para AR**

Foram incluídas mulheres com idade superior a 18 anos com diagnóstico de AR conforme os critérios citados acima, em tratamento ou não, as quais concordaram em participar do estudo tendo assinado o TCLE. Como critérios de exclusão, foram eliminadas as mulheres com soropositividade para HIV, as gestantes e aquelas com outras condições patológicas, seja infecciosa ou inflamatória no momento da coleta ou nos 30 dias precedentes e ainda aquelas que se recusaram a assinar o TCLE;

#### **5.4 Critérios de inclusão e exclusão para Controles**

Foram incluídas mulheres saudáveis, não gestantes, com idade superior a 18 anos e similar às mulheres com LES e AR, não portadoras de doenças infecciosas, inflamatórias ou autoimunes em evidência no momento da coleta ou com sintomas nos 30 dias precedentes, como também não usuária de qualquer medicamento ou droga (autorrelato), as quais concordaram em assinar o TCLE (ANEXO E) . Como critérios de exclusão, foram eliminadas as mulheres com soropositividade para HIV, as gestantes e aquelas em uso de qualquer medicamento e/ou com condições patológicas, seja infecciosa ou inflamatória, ou outras, no momento da coleta ou nos 30 dias precedentes e ainda aquelas que se recusaram a assinar o TCLE.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) sob número de protocolo CAAE - 01928412.8.0000.5149 (ANEXO C) e pela gerência de ensino e pesquisa do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG), sob o número 061/16 (ANEXO D).

As participantes selecionadas para o estudo foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa, e as que estavam de acordo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO E), autorizando a coleta de sangue e o uso de informações constantes do prontuário médico.

#### **5.5 Amostras biológicas**

Foram coletados 15 mL de sangue venoso de cada paciente e controles pelo sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson Bioscience), na seguinte sequência: 5 mL sem aditivo para a obtenção de soro; 5 mL em EDTA para obtenção de sangue total e 5 mL em citrato de sódio para obtenção de plasma para uso nas análises de geração de trombina. As amostras sem aditivo e com citrato de sódio foram processadas em centrífuga não refrigerada para separação do soro e plasma, respectivamente e, em seguida, transferidas para micro tubos estéreis e identificados, os quais foram armazenados a uma temperatura de – 80°C até o momento do uso. As amostras em EDTA foram utilizadas logo após a coleta do sangue para a determinação dos parâmetros hematológicos (Hemograma automatizado).

## 5.6 Métodos

A parte experimental deste estudo foi realizada no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia/UFMG

### 5.6.1 Hemograma e índices derivados

O hemograma de cada participante foi realizado em analisador de células automatizado, cujos parâmetros são a contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos (MCV, MCH, MCHC, RDW), contagem global de leucócitos, diferencial de leucócitos (relativa e absoluta) e contagem de plaquetas. A partir dos parâmetros celulares acima foram calculados os índices inflamatórios abaixo:

**NLR** = Neutrófilos/ Linfócitos

**PLR** = Plaquetas/Linfócitos

**LMR** = Linfócitos/Monócitos

**dNLR** (*derived* NLR) = Neutrófilos / Global leucócitos – Neutrófilos

**SIRI** (*systemic inflammation response index* ou índice de resposta à inflamação sistêmica) = Neutrófilos x Monócitos / Linfócitos

**AISI** (*aggregate index of systemic inflammation* ou índice agregado de inflamação sistêmica) = Neutrófilos x Monócitos x Plaquetas / Linfócitos

**SII** (*systemic immune-inflammation index* ou índice de inflamação imunológica sistêmica) = Plaquetas x Neutrófilos / Linfócitos

### 5.6.2 Teste de Geração de Trombina: princípio e procedimento

O Teste de Geração de Trombina (TGT) pelo método de CAT (*Calibrated Automated Thrombogram*) foi realizado de acordo com Hemker *et al.* 2003, utilizando amostra de plasma pobre em plaquetas (PPP). Para a análise, foram utilizadas amostras de plasma citratado na presença de fator tissular (FT) tanto em baixa quanto em alta concentração, a fim de ajustar a técnica para melhor avaliação das vias intrínseca, extrínseca e comum da coagulação, respectivamente.

O TGT tem como base a adição de fator FT (em baixa ou em alta concentração) + fosfolípidos a fim de desencadear o mecanismo hemostático em plasma pobre (PPP)

ou rico (PRP) em plaquetas. Em seguida, é adicionado o substrato fluorogênico (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) de baixa afinidade pela trombina, o qual contém cálcio, elemento essencial às reações da coagulação.

Resumidamente, o TGT foi realizado em uma placa de 96 *wells*, onde foram adicionados 80  $\mu$ L de PPP de cada amostra a ser testada, juntamente com 5  $\mu$ L do tampão HNBSA (Hepes + albumina bovina). Para cada amostra, foi adicionado um *well* para o calibrador, constituído de PPP, HNBSA e o reagente *Thrombin Calibrator* (*Diagnostica Stago, France*), que consiste em uma trombina ligada à  $\alpha$ 2-macroglobulina, de concentração conhecida. Após a placa ser preenchida com as amostras de plasma a serem testadas e seus respectivos calibradores, esta foi colocada em um fluorímetro (*Fluoroskan Ascent, Thermo Laboratories*) para a incubação a 37°C por um período de 10 minutos. Decorrido o tempo de incubação, foram adicionados aos *wells* já com as amostras de PPP a serem testadas, 20  $\mu$ L de fator tissular em alta (*PPP Reagent High*) ou em baixa (*PPP-Reagent Low*) concentração, ambos da *Diagnostica Stago, France*. Em seguida, um volume de 20  $\mu$ L do substrato fluorescente (*Fluca-Kit – Diagnostica Stago, France*) foi dispensado em todos os *wells*, para imediatamente ser realizada a leitura da placa durante 60 minutos utilizando um fluorímetro (*Fluorocan Ascent®*). O software *Thrombinoscope* foi utilizado para a construção da curva de GT, dada em tempo (minutos) *versus* concentração de trombina (nM) e para o cálculo dos parâmetros de GT. Tais parâmetros incluem *lagtime* (ou o tempo de latência, que corresponde à fase de iniciação da coagulação); *time to peak* (*ttPeak*) e *peak* (refletem a cinética de geração de trombina e quantidade de trombina formada); e *Endogen Thrombin Potential –ETP* (quantidade total de trombina formada, refletindo o equilíbrio entre as forças pró-coagulantes e anticoagulantes). Quando altas concentrações de FT são utilizadas como gatilho, as reações são muito rápidas e, portanto, não são sensíveis o suficiente para capturar as mudanças na via intrínseca, uma vez que essa via requer mais tempo para ser ativada. Assim, quando uma alta concentração de FT é utilizada, apenas fatores da via extrínseca da coagulação influenciam os resultados do TGT. Em suma, o TGT avalia o equilíbrio entre as forças pró-coagulantes e anticoagulantes. Parâmetros ETP e *Peak* aumentados e *Lagtime* e *ttPeak* diminuídos indicam ativação exacerbada da coagulação (tendência protrombótica), enquanto os parâmetros ETP

e *Peak* diminuídos e *Lagtime* e *ttPeak* aumentados são compatíveis com capacidade de coagulação reduzida (tendência hemorrágica) (LECUT *et al.* 2015).

## 6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software *Statistical Package for the Social Sciences*® (versão 19.0), e a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram expressos em média e desvio padrão, se normais, ou em mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3), se não normais. Para comparação entre dois grupos, os dados normais foram analisados pelos testes “t” de Student, enquanto os não normais por Mann Whitney. Para comparação entre três grupos, os dados normais foram analisados por ANOVA e Hochberg’s GT2 pós teste, enquanto os não normais por Kruskal-Wallis com Dunn-Bonferroni pós teste. Para comparar as variáveis discretas foi utilizado o teste de  $X^2$ . As correlações entre as variáveis foram calculadas por meio do teste de correlação de Spearman. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 7 RESULTADOS

Esta seção será apresentada abaixo na forma de um artigo elaborado com os dados experimentais do presente estudo.

### **LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATOIDE: AVALIAÇÃO DOS PERFIS HEMATOLÓGICO E HEMOSTÁTICO AVALIADO PELO TESTE DE GERAÇÃO DE TROMBINA**

Lícia Maria Silva Paes<sup>1</sup>, Luan Carlos Vieira Alves<sup>1</sup>, Vicente de Paulo Coelho Peixoto Toledo<sup>1</sup>, Gilda Aparecida Ferreira<sup>2</sup>, Paulo Madureira de Pádua<sup>2</sup>, Rita Carolina Figueiredo Duarte<sup>1</sup>, Ieda de Fátima Oliveira Silva<sup>1</sup>, Maria das Graças Carvalho<sup>1</sup>

1-Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG/Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da UFMG.

2- Faculdade de Medicina da UFMG e Hospital da Clinicas da UFMG

## RESUMO

**Introdução:** O lúpus eritematoso sistêmico (LES) se caracteriza por ser uma doença auto imune, de caráter inflamatório e de causa ainda desconhecida, decorrente da produção de anticorpos direcionados contra antígenos nucleares e citoplasmáticos, afetando diferentes órgãos com numerosas manifestações clínicas. Outra doença autoimune de relevância é a artrite reumatoide (AR) que se caracteriza por ser uma doença crônica, inflamatória e que afeta as articulações, causando uma dor articular crônica e intensa. Ambas as doenças podem apresentar alterações hematológicas e hemostáticas e ocorrem predominantemente no sexo feminino. Uma análise da literatura sobre tais alterações como componente do quadro fisiopatológico das doenças autoimunes LES e AR revela inconsistência e, portanto, estudos adicionais são necessários. **Objetivo:** Nesse contexto, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar o impacto do LES e da AR sobre os perfis hematológico e hemostático e comparar os resultados entre si e com aqueles obtidos de um grupo de mulheres hígdas (controles). **Metodologia:** Após consentimento livre e esclarecido, um total de 40 mulheres participaram do estudo, compreendendo 21 com LES e 10 com AR, além de 6 mulheres hígdas. As alterações hematológicas foram investigadas por meio do hemograma, cujos parâmetros foram utilizados para calcular vários índices relacionados à inflamação como a razão de neutrófilos/linfócitos (NLR), plaquetas/linfócitos (PLR), índice de resposta à inflamação sistêmica (SIRI), índice agregado de inflamação sistêmica (AIS), e índice de inflamação imunológica sistêmica (SII). Quanto às alterações hemostáticas, essas foram investigadas por meio do Teste de Geração de Trombina (método de CAT). **Resultados:** Os parâmetros do hemograma e índices derivados não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados, porém o índice de inflamação dRN/L sugere um processo inflamatório maior nas pacientes com LES comparadas àquelas com AR. Uma análise conjunta dos parâmetros do TGT indicou maior ativação do mecanismo hemostático em pacientes com LES, em comparação à AR, com base nos valores de ETP (*Endogen Thrombin Potential*), para ambas as concentrações de Fator Tissular ( $p=0,005$  para *Low Tissue Factor* e  $p=0,001$  para *High Tissue Factor*).

**Conclusão:** Tais resultados podem apresentar perspectiva clínica dado que uma tendência à hipercoagulabilidade em mulheres com LES em atividade foi observada por meio do TGT no presente estudo.

**Palavras-chave:** Lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, doenças autoimunes, hemograma, teste de geração de trombina, hipercoagulabilidade.

## ABSTRACT

**Introduction:** Systemic lupus erythematosus (SLE) is characterized by being an autoimmune disease, of inflammatory nature and of unknown cause, resulting from the production of antibodies directed against nuclear and cytoplasmic antigens, affecting different organs with numerous clinical manifestations. Another relevant autoimmune disease is rheumatoid arthritis (RA), which is characterized as a chronic, inflammatory disease that affects the joints, causing chronic and intense joint pain. Both diseases can present hematological and hemostatic alterations and occur predominantly in females. An analysis of the literature on such alterations as a component of the pathophysiological picture of autoimmune diseases SLE and RA reveals inconsistency and, therefore, additional studies are needed. **Objective:** In this context, the general objective of the present study was to evaluate the impact of SLE and RA on the hematological and hemostatic profiles and compare the results among themselves and with those obtained from a group of healthy women (controls). **Methodology:** After free and informed consent, a total of 40 women participated in the study, including 21 with SLE and 10 with RA, in addition to 6 healthy women. Hematological alterations were investigated using whole blood counts, whose parameters were used to calculate various indices related to inflammation, such as the neutrophil/lymphocyte ratio (NLR), platelet/lymphocyte ratio (PLR), systemic inflammation response index (SIRI), aggregate systemic inflammation index (ASII), and systemic immune inflammation index (SII). As for hemostatic alterations, these were investigated using the Thrombin Generation Test (CAT method). **Results:** The hemogram parameters and derived indices did not show significant difference between the studied groups, however the dRN/L inflammation index suggests a greater inflammatory process in patients with SLE compared to those with RA. A joint analysis of TGT parameters indicated more hemostatic changes in SLE compared to RA based on ETP (Endogen Thrombin

Potential) values, for both Tissue Factor concentrations ( $p=0.005$  for Low Tissue Factor and  $p=0.001$  for High Tissue Factor). **Conclusion:** These results may have a clinical perspective given that a tendency towards hypercoagulability in women with active SLE was observed using the TGT in the present study.

**Keywords:** Systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, autoimmune diseases, whole blood count, thrombin generation test, hypercoagulability.

## INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune inflamatória crônica que pode afetar qualquer parte do corpo, incluindo pele, fígado, rins e sangue. A trombose é uma manifestação frequente no LES, contribuindo significativamente para a morbimortalidade do paciente (DHILLON & ADAMS, 2013 (DHILLON & ADAMS, 2013). Outra doença autoimune de relevância é a artrite reumatoide (AR) que se caracteriza por ser uma doença crônica, inflamatória e que afeta as articulações, causando uma dor articular crônica e intensa. Ambas as doenças podem apresentar alterações hematológicas e hemostáticas (EMMI et al, 2015; KLEIN & MOLAD, 2021) e ocorrem predominantemente no sexo feminino. Na clínica prática, a inflamação sistêmica pode ser indicada diretamente por alteração nas contagens de células de imunidade e inflamação do sangue periférico (células de rotina como neutrófilos, linfócitos e monócitos, além das plaquetas) e proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa. Novos índices de inflamação baseados na integração desses parâmetros inflamatórios convencionais, como a razão de neutrófilos/linfócitos (NLR), plaquetas/ linfócitos (PLR), índice de resposta à inflamação sistêmica (SIRI), índice agregado de inflamação sistêmica (AIS), e índice de inflamação imunológica sistêmica (SII), mostraram valores prognósticos potenciais em vários estudos. Esses índices combinam os tipos de células acima e refletem a interação complexa entre células imunes e inflamatórias. Como no LES e a AR há envolvimento do sistema imune e inflamação, pode ser interessante investigar a capacidade de tais índices em revelar aspectos clínicos de relevância, como por exemplo, a atividade ou gravidade da doença, além de alterações hemostáticas. É amplamente sabido que a inflamação

afeta vários mecanismos hemostáticos (ESMON, 2008), incluindo células do sangue, favorecendo o estado de hipercoagulabilidade ((IBA & LEVY, 2018). Isso posto, o teste de geração de trombina (TGT), um ensaio global que explora o sistema da hemostasia de forma contínua, pode ser uma ferramenta potencialmente útil e mais representativa do *status* hemostático do paciente do que os testes convencionais que avaliam a coagulação. Os resultados de TGT refletem o equilíbrio entre os procoagulantes e anticoagulantes naturais e, dessa forma, são capazes de revelar alterações hemostáticas predisponentes a eventos hemorrágicos ou trombóticos.

Uma análise da literatura sobre alterações hemostáticas como componente do quadro fisiopatológico das doenças autoimunes LES e AR ainda revela inconsistência e, portanto, estudos adicionais são necessários. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os perfis hematológico e hemostático de mulheres com LES ou AR entre si e em comparação com um grupo de mulheres hígdas como controles, em nosso meio.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Casuística e aspectos éticos**

As pacientes deste estudo foram recrutadas no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), enquanto as mulheres voluntárias que compuseram o grupo controle, de mesma faixa etária, foram selecionadas na Faculdade de Farmácia da UFMG, Brasil.

As participantes do presente estudo foram distribuídas em três grupos distintos, a saber:

- a) Mulheres com LES (n=21), diagnosticadas de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR), em acompanhamento clínico sob tratamento ou não, e sem outra condição autoimune, tendo o score SLEDAI-2k modificado calculado no momento da consulta para avaliação da atividade da doença. De acordo com os valores de SLEDAI 2K, score utilizado no HC/UFMG, as pacientes foram distribuídas em dois subgrupos: LES com baixa atividade (SLEDAI 2K  $\leq$ 4) e LES com atividade moderada/alta (SLEDAI 2K  $>$ 4); b) Mulheres com AR (n=10), diagnosticadas de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) e da Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR), em acompanhamento clínico sob tratamento ou não; e c) mulheres autoreferidas como saudáveis e sem qualquer manifestação clínica ou uso de medicamento, as quais constituíram o grupo controle (n=6).

Os dados clínicos e laboratoriais de cada paciente foram obtidos através de consulta aos respectivos prontuários médicos. As mulheres com LES e AR apresentavam idade superior a 18 anos e concordaram em participar do estudo tendo assinado o TCLE (ANEXO E). Como critérios de exclusão, foram eliminadas as mulheres com soropositividade para HIV, as gestantes e aquelas com outras condições patológicas, seja infecciosa ou inflamatória no momento da coleta ou nos 30 dias precedentes e ainda aquelas que se recusaram a assinar o TCLE. Como controles, foram incluídas mulheres saudáveis, não gestantes, com idade superior a 18 anos e similar às mulheres com LES e AR, não portadoras de doenças infecciosas, inflamatórias, autoimunes ou outras em evidência no momento da coleta ou com sintomas nos 30 dias precedentes, como também não usuárias de qualquer medicamento ou droga (autorrelato), as quais concordaram em assinar o TCLE. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) sob número de protocolo CAAE - 01928412.8.0000.5149 (ANEXO C) e pela gerência de ensino e pesquisa do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG), sob o número 061/16 (ANEXO D), Brasil.

### **Amostras biológicas**

Foram coletados 15 mL de sangue venoso de cada paciente e controles pelo sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson Bioscience), na seguinte sequência: 5 mL sem aditivo

para a obtenção de soro; 5 mL em EDTA para obtenção de sangue total e 5 mL em citrato de sódio para obtenção de plasma para uso nas análises de geração de trombina. As amostras sem aditivo e com citrato de sódio foram processadas em centrífuga não refrigerada para separação do soro e plasma, respectivamente, e em seguida, transferidas para micro tubos estéreis e identificados, os quais foram armazenados a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. As amostras em EDTA foram utilizadas logo após a coleta do sangue para a determinação dos parâmetros hematológicos (Hemograma automatizado).

## Métodos

### Hemograma e índices derivados

O hemograma de cada participante foi realizado em analisador de células automatizado. A partir dos parâmetros celulares foram calculados os índices inflamatórios abaixo: **NLR** = Neutrófilos/ Linfócitos; **PLR** = Plaquetas/Linfócitos; **LMR** = Linfócitos/Monócitos; **dNLR** (*derived NLR*) = Neutrófilos / Global leucócitos – Neutrófilos; **SIRI** (*systemic inflammation response index* ou índice de resposta à inflamação sistêmica) = Neutrófilos x Monócitos / Linfócitos; **AISI** (*aggregate index of systemic inflammation* ou índice agregado de inflamação sistêmica) = Neutrófilos x Monócitos x Plaquetas / Linfócitos e **SII** (*systemic immune-inflammation index* ou índice de inflamação imunológica sistêmica) = Plaquetas x Neutrófilos / Linfócitos.

### Teste de Geração de Trombina: princípio e procedimento

O Teste de Geração de Trombina (TGT) foi realizado pelo método de CAT (*Calibrated Automated Thrombogram*), segundo Hemker *et al.* 2003, utilizando amostra de plasma pobre em plaquetas (PP, em placa de 96 wells. Para a análise, foram utilizadas amostras de plasma citratado na presença de fator tissular (FT) tanto em baixa quanto em alta concentração (PPP reagent low and PPP reagent high, Diagnostica Stago, France), a fim de ajustar a técnica para melhor avaliação das vias intrínseca, extrínseca e comum da coagulação, respectivamente. O TGT tem como base a adição de fator FT (em baixa ou em alta concentração) + fosfolípidos a fim de desencadear o mecanismo hemostático em plasma pobre (PPP) ou rico (PRP) em plaquetas. Em seguida, é adicionado o substrato fluorogênico (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) de baixa afinidade pela trombina (Fluca, Diagnostica Stago, France), o qual contém cálcio, elemento essencial às reações da coagulação. Para cada amostra foi feito

também um well contendo um calibrador de concentração conhecida (Calibrator, Diagnostica Stago, France). Em seguida, procede-se à leitura da placa durante 60 minutos utilizando um fluorímetro (*Fluoroscan Ascent®*), enquanto o software *Thrombinoscope*, acoplado ao equipamento, é utilizado para a construção da curva de GT (trombograma), dada em tempo (minutos) *versus* concentração de trombina (nM) e para o cálculo dos parâmetros do TGT. Tais parâmetros incluem *lagtime time*; *time to peak (ttPeak)*; *peak*; *Endogen Thrombin Potential (ETP)*; *velocity index* e *start tail*. Parâmetros ETP e *Peak* aumentados e *Lagtime* e *ttPeak* diminuídos indicam ativação exacerbada da coagulação (tendência protrombótica), enquanto os parâmetros ETP e *Peak* diminuídos e *Lagtime* e *ttPeak* aumentados são compatíveis com capacidade de coagulação reduzida (tendência hemorrágica) (LECUT *et al.* 2015).

### **Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no software *Statistical Package for the Social Sciences®* (versão 19.0), e a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram expressos em média e desvio padrão, se normais, ou em mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3), se não normais. Para comparação entre dois grupos, os dados normais foram analisados pelos testes “t” de Student, enquanto os não normais por Mann Whitney. Para comparação entre três grupos, os dados normais foram analisados por ANOVA e Hochberg’s GT2 pós teste, enquanto os não normais por Kruskal-Wallis com Dunn-Bonferroni pós teste. Para comparar as variáveis discretas foi utilizado o teste de  $\chi^2$ . As correlações entre as variáveis foram calculadas por meio do teste de correlação de Spearman. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## **RESULTADOS**

Algumas características demográficas, clínicas e laboratoriais das pacientes com LES e AR do estudo estão apresentadas na Tabela 1. Todas as participantes foram mulheres com médias de idades diferentes entre LES e AR ( $< 0,001$ ), sendo que as mulheres com LES forem bem mais jovens em relação às aquelas com AR, conforme

esperado. As mulheres com LES foram classificadas segundo o score (SLEDAI-2K) em dois subgrupos:  $\leq 4$  e  $>4$ . As manifestações clínicas observadas foram hipertensão arterial sistêmica (8), nefrite (2), dislipidemia (2), nefrite (2), vasculite (2), dislipidemia (1) e fibromialgia (1) nas mulheres com LES; enquanto naquelas com AR, foram observados casos de hipertensão arterial sistêmica (6), dislipidemia (3), doença pulmonar intersticial (1) e fibromialgia (1). Os medicamentos mais utilizados nos casos de LES foram Hidroxicloroquina (19), Prednisona (21), Metotrexato (3), Azatioprina (2) e Pulsoterapia com ciclofosfamida (5), enquanto o Metotrexato (5), Prednisona (3), Hidroxicloroquina (1), além dos imunobiológicos [Tocilizumabe (2), Rituximabe (1) e Golimumabe (2)], foram os observados nas mulheres com AR. Adicionalmente, aquelas pacientes com hipertensão arterial e dislipidemia estavam sendo tratadas com anti-hipertensivos e antilipêmicos, respectivamente. Conforme mostrado na Tabela 1, apesar do n limitado, pacientes com AR apresentaram um valor de PCR significativamente mais alto em relação àquelas com LES ( $P=0,020$ ). O grupo com LES apresentou mais casos de HAS comparado ao grupo com AR ( $P=0,050$ ), porém este último grupo apresentou mais casos de dislipidemia ( $p=0,049$ ).

**Tabela 1:** Algumas características clínicas e demográficas dos grupos LES, AR e controle.

<b>Característica*</b>	<b>LES (n=21)</b>	<b>AR (n=10)</b>	<b>Controle (n=6)</b>	<b>Valor-p</b>
<b>Idade (anos)</b>	39 ± 11	65 ± 9	44 ± 7	<0,001*
<b>Hipertensão:</b>				
<b>sim</b>	08	06	0	0,057**
<b>Dislipidemia:</b>				
<b>sim</b>	01	03	0	0,077**
<b>Antiplaquetário:</b>				
<b>sim</b>	02	01	0	0,728**

PCR	5,00 (2,50-6,00)	22,09 (6,05-35,48)	-	0,010***
-----	------------------	--------------------	---	----------

\* Dados normais expressos em média e desvio padrão. Anova. \*\*Qui quadrado\*\*\* Dados não normais expressos em mediana e Q1 e Q3. Teste de Mann-Whitney

A tabela 2 mostra a comparação entre os parâmetros do hemograma e índices inflamatórios derivados de tais parâmetros para os grupos LES, AR e Controle. Nenhuma das comparações apresentou diferença significativa. Todos os parâmetros celulares estão dentro dos valores de referência, o que refletiu nos índices, exceto o dNLR que se mostrou com tendência ao aumento nos casos de LES ( $p=0,064$ ).

**Tabela 2:** Parâmetros do hemograma e índices derivados dos grupos LES, AR e controle.

Parâmetros	LES	AR	Controle	Valor-p
Hemoglobina (g/dL)	12,85 ± 1,17 n= 21	13,17 ± 1,10 n= 10	13,52 ± 0,29 n=4	0,481*
Hematócrito (%)	39,58 ± 3,06 n=20	40,55 ± 2,98 n= 10	41,82 ± 1,18 n=4	0,333*
HCM (pg)	29,03 ± 1,92 n=18	29,95 ± 1,51 n= 7	29,95 ± 1,51 n= 4	0,525*
VCM ( $\mu^3$ )	88,71 ± 5,64 n= 19	91,40 ± 2,89 n= 10	90,02 ± 2,36 n= 4	0,353*
Leucócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	5,90 ± 2,70 n= 20	5,06 ± 2,16 n= 10	5,12 ± 1,44 n= 4	0,680*
Neutrófilos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	3,07 (2,14-4,85) n= 19	3,44 (2,00-4,52) n= 10	-	0,769***
Linfócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	1,56 ± 0,63 n= 20	2,07 ± 1,02 n= 7	-	0,257**
Monócitos ( $\times 10^3//\text{mm}^3$ )	0,39 (0,00-0,58)	0,52 (0,24-0,60)	-	0,393***

	n= 21	n= 10		
Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	213 ± 64,64 n= 19	216,90 ± 88,36 n= 10	264 ± 33,59 n= 4	0,214*
RN/L	2,68 ± 1,28 n= 19	2,05 ± 1,33 n= 7	-	0,294**
RP/L	163 ± 73 n= 18	152 ± 82 n= 6	-	0,780**
RM/L	0,38 ± 0,20 n= 14	0,27 ± 0,19 n= 7	-	0,228**
dNLR	1,72 ± 0,66 n= 19	1,23 ± 0,63 n= 10	-	0,064**
SIRI	1,29 (0,63- 2,31) n= 14	0,82 (0,29- 2,00) n=7	-	0,443***
AISI	274 (122- 469) n= 15	241,50 (41- 673) n= 6	-	0,910***
SII	470 (371- 778) n= 18	468 (130- 1018) n= 6	-	0,770***

HCM= Hemoglobina corpuscular média; VCM=Volume corpuscular médio; **NLR** = Neutrófilos/Linfócitos; **PLR** = Plaquetas/Linfócitos; **LMR** = Linfócitos/Monócitos; **dNLR** (*derived NLR*) = Neutrófilos / Global leucócitos – Neutrófilos; **SIRI** (*systemic inflammation response index* ou índice de resposta à inflamação sistêmica) = Neutrófilos x Monócitos / Linfócitos; **AISI** (*aggregate index of systemic inflammation* ou índice agregado de inflamação sistêmica) = Neutrófilos x Monócitos x Plaquetas / Linfócitos e **SII** (*systemic immune-inflammation index* ou índice de inflamação imunológica sistêmica) = Plaquetas x Neutrófilos / Linfócitos; \*Dados normais expressos em média e desvio padrão. Anova e Hochberg's GT2 pós teste \*\* Dados normais expressos em média e desvio padrão. Teste t de Student \*\*\*Dados não normais expressos em mediana e Q1 e Q3. Teste de Mann-Whitney

A tabela 3 mostra a comparação entre os parâmetros do teste de geração de trombina com baixa concentração de fator tissular entre os grupos de LES, AR e grupo controle, é possível observar que ao analisar o *Lagtime*, o grupo controle apresentou diferença significativa com o grupo de LES, e o grupo de LES apresentou diferença significativa

com o grupo de AR. Ao analisar *ttPeak*, ETP e *Start tail*, o grupo LES apresentou diferença significativa com o grupo AR.

**Tabela 3:** Parâmetros do Teste de Geração de Trombina (TGT), com baixa concentração de fator tissular (Low TF) dos grupos LES, AR e Controle

Parâmetros	LES (n=21)	AR (n=10)	Controle (n=6)	Valor-p
Lagtime (min)	6,67 (5,33- 8,50) n= 21	4,83 (4,33- 5,63) n= 10	4,18 (4,18- 5,01) n= 05	<0,001**ab
tt Peak (min)	9,33 (7,67- 11,16) n= 21	7,00 (6,58- 8,05) n= 10	7,18 (6,51- 9,35) n= 05	0,004**b
Peak (nM)	462,21 ± 81 n= 21	458,94 ± 75 n= 10	370,46 ± 144 n= 05	0,127*
ETP (nM)	2419 ± 329 n= 21	1991 ± 378 n= 10	2039 ± 340 n= 05	0,005*b
Vindex (min)	194,17 ± 59 n= 21	205,93 ± 52 n= 10	148,71 ± 98 n= 05	0,255*
Start tail (min)	26,67 (25,00- 28,16) n= 21	22,50 (20,83- 24,58) n= 10	23,22 (22,88- 29,56) n= 05	0,001**b

ETP= *Endogen Thrombin Potential*; \* Dados normais paramétricos expressos em média e desvio padrão, Anova e Hochberg's GT2 pós teste; \*\* Dados não normais paramétricos expressos em mediana e Q1 e Q3, Kruskal-Wallis com Dunn-Bonferroni pós teste; a= grupo controle diferente de LES; b= LES diferente de AR. \* Dados normais expressos em média e desvio padrão. Anova e Hochberg's GT2 pós teste \*\* Dados não normais expressos em mediana e Q1 e Q3. Kruskal-Wallis com Dunn-Bonferroni pós teste a= grupo controle diferente de LES, b= LES diferente de AR.

Ao analisar os parâmetros do teste de geração de trombina com alta concentração de fator tissular entre os grupos de LES, AR e grupo controle, é possível perceber que o grupo LES apresentou diferença significativa nos parâmetros *Lagtime*, *ttPeak*, ETP e *Start tail* com o grupo controle e AR (tabela 4).

**Tabela 4:** Parâmetros do Teste de Geração de Trombina (TGT), com alta concentração de fator tissular (High TF) dos grupos LES, AR e Controle

Parâmetros	LES (n=21)	AR (n=10)	Controle (n=6)	Valor-p
Lagtime (min)	3,16 (2,75-4,33) n= 20	2,33 (2,00-2,67) n= 09	2,17 (1,84-13,70) n= 06	0,001**ab
tt Peak (min)	5,50 (5,00-7,00) n= 20	4,33 (4,00-5,00) n= 09	4,18 (4,09-15,86) n= 06	0,002**ab
Peak (nM)	448,73 ± 79 n= 20	444,44 ± 79 n= 09	374,30 ± 152 n= 06	0,240*
ETP (nM)	2475 ± 407 n= 20	1928 ± 345 n= 09	1646 ± 868 n= 06	0,001*ab
Vindex (min)	190,68 ± 56 n= 20	209,73 ± 48 n= 09	176,48 ± 61 n= 06	0,498*
Start tail (min)	23,67 (22,08-25,00) n= 20	20,67 (19,33-21,27) n= 09	20,71 (14,91-21,55) n= 06	<0,001**ab

\* Dados normais expressos em média e desvio padrão. Anova e Hochberg's GT2 pós teste \*\* Dados não normais expressos em mediana e Q1 e Q3. Kruskal-Wallis com Dunn-Bonferroni pós teste a= grupo controle diferente de LES, b= LES diferente de AR.

Ao comparar os parâmetros do Teste de Geração de Trombina com baixa concentração de fator tissular do grupo LES de acordo com o SLEDAI-2K, nenhuma das comparações apresentou diferença significativa (tabela 5).

**Tabela 5:** Parâmetros do Teste de Geração de Trombina (TGT), com baixa concentração de fator tissular (Low TF) do grupo LES de acordo com o índice SLEDAI -2K ( $\leq 4$  e  $>4$ )

Parâmetros	LES (SLEDAI $\leq 4$ )	LES (SLEDAI $>4$ )	Valor-p
Lagtime (min)	7,17 (5,83-8,67) n= 10	6,33 (5,33-8,00) n= 11	0,468**
tt Peak (min)	10,33 (8,16-11,33) n= 10	8,67 (7,67-10,67) n= 11	0,387**
Peak (nM)	442,50 $\pm$ 108 n= 10	480,13 $\pm$ 44 n= 11	0,325*
ETP (nM)	2459,55 $\pm$ 420 n= 10	2381,90 $\pm$ 232 n= 11	0,602*
Vindex (min)	174 $\pm$ 71 n= 10	212 $\pm$ 40 n= 11	0,166*
Start tail (min)	27,50 (26,58-28,41) n= 10	25,33 (24,00-28,33) n= 11	0,085**

\* Dados normais expressos em média e desvio padrão. Teste t de Student

\*\*Dados não normais expressos em mediana e Q1 e Q3. Teste de Mann-Whitney

A tabela 6 mostra a comparação dos parâmetros do Teste de Geração de Trombina com alta concentração de fator tissular do grupo LES de acordo com SLEDAI, nenhuma das comparações apresentou diferença significativa.

**Tabela 6:** Parâmetros do Teste de Geração de Trombina (TGT), com alta concentração de fator tissular (High TF) do grupo LES de acordo com o índice SLEDAI-2K ( $\leq 4$  e  $>4$ )

<b>Parâmetros</b>	<b>LES (SLEDAI <math>\leq 4</math>)</b>	<b>LES (SLEDAI <math>&gt;4</math>)</b>	<b>Valor-p</b>
Lagtime (min)	3,33 (2,83-6,66) n= 09	3,00 (2,67-3,33) n= 11	0,370**
tt Peak (min)	5,67 (5,00-9,83) n= 09	5,33 (5,00-6,00) n= 11	0,603**
Peak (nM)	424,89 $\pm$ 98 n= 09	468,24 $\pm$ 58 n= 11	0,234*
ETP (nM)	2447 $\pm$ 458 n= 09	2497,36 $\pm$ 382 n= 11	0,794*
Vindex (min)	180,59 $\pm$ 71 n= 09	198,93 $\pm$ 40 n= 11	0,478*
Start tail (min)	24,00 (22,50-26,16) n= 09	23,67 (20,67-23,67) n= 11	0,131**

\* Dados normais expressos em média e desvio padrão. Teste t de Student

\*\*Dados não normais expressos em mediana e Q1 e Q3. Teste de Mann-Whitney

Ao analisar os índices inflamatórios derivados do hemograma do grupo LES, de acordo com SLEDAI, nenhuma das comparações apresentou diferença significativa (tabela 7).

**Tabela 7:** Parâmetros inflamatórios derivados do hemograma do grupo LES de acordo com o índice SLEDAI-2K ( $\leq 4$  e  $>4$ )

Parâmetros	LES (SLEDAI $\leq 4$ )	LES (SLEDAI $>4$ )	Valor-p
RN/L	2,20 $\pm$ 1,18 n= 10	3,19 $\pm$ 1,25 n= 09	0,093*
RP/L	140 $\pm$ 39 n= 09	185 $\pm$ 93 n= 09	0,199*
RM/L	0,36 $\pm$ 0,12 n= 08	0,42 $\pm$ 0,29 n= 06	0,580*
dNLR	1,50 $\pm$ 0,59 n= 10	1,97 $\pm$ 0,68 n= 09	0,122*
SIRI	1,29 (0,67-1,75) n= 08	1,45 (0,61-2,97) n= 06	1,000**
AISI	275 (170-453) n= 08	217 (37-469) n= 07	0,536**
SII	464 (338-656) n= 08	477 (393-892) n= 09	0,605**

\* Dados normais expressos em média e desvio padrão. Teste t de Student

\*\*Dados não normais expressos em mediana e Q1 e Q3. Teste de Mann-Whitney

Além dos dados apresentados acima nas Tabelas, buscou-se investigar se havia correlação entre os parâmetros do TGT e os valores de SLEDAI-2K, índice que mede a atividade do LES. Nenhuma correlação significativa foi observada. O mesmo resultado ocorreu

quando se investigou se havia correlação entre os valores de SLEDAI-2K e os índices inflamatórios RN/L, RP/L, RM/L, dRN/L, SIRI, AISI e SII. Porém, quando se investigou se havia correlação entre os parâmetros do TGT (Low TF) e os valores dos índices inflamatórios RN/L, RP/L, RM/L, dRN/L, SIRI, AISI e SII, verificou-se uma tendência à obtenção de correlações significativas tanto para o *Peak* como também para o ETP, conforme mostrado abaixo:

Correlações entre parâmetros do TGT *versus* SII em pacientes com LES

Peak (nM)	0,394	0,077*
ETP (nM)	0,424	0,056*

TGT=teste de geração de trombina; SII= *systemic immune-inflammation index* ou índice de inflamação imunológica sistêmica; ETP= Endogen Thrombin Potential ou potencial endógeno de trombina; \*Spearman

Todas as correlações investigadas acima para LES foram feitas também com o grupo de AR, mas nenhuma correlação significativa ou com tendência foi observada.

## DISCUSSÃO

O presente estudo comparou os perfis hematológico e hemostático de um reduzido número de mulheres com LES ou AR sob tratamento, além de mulheres híginas como controles, em nosso meio.

Conforme mostrado na Tabela 1, apesar do n bastante limitado, o grupo com LES apresentou uma tendência a ter mais casos de HAS comparado ao grupo com AR ( $p=0,057$ ), enquanto este último grupo apresentou tendência para ter mais dislipidemia ( $p=0,077$ ). Com relação ao uso de anticoagulantes e antiagregantes, medicamentos com maior potencialidade de afetar o TGT, não houve diferença significativa entre ambos os grupos, o que sugere que diferenças encontradas entre LES e AR para os parâmetros hemostáticos, aparentemente não devem ter sido afetadas pelo uso de tais medicamentos.

Após uma análise do perfil hematológico de tais mulheres, todos as médias e medianas dos grupos estudados apresentaram valores dentro dos intervalos de

referência (Tabela 2). Porém, quando os dados foram analisados individualmente, verificou-se que algumas pacientes do grupo com LES e outras do grupo AR se mostraram anêmicas, leucopênicas e/ou trombocitopênicas, o que se justifica pela própria doença ou uso de medicamentos que podem interferir na produção de células do sangue (KLEIN & MOLAD, 2021). Exames de sangue de rotina para a avaliação de processos inflamatórios são frequentemente úteis e, em particular, o hemograma que fornece parâmetros quantitativos e morfológicos. A combinação de diversos tipos celulares tem fornecido índices de inflamação, com potencial utilidade para auxiliar no diagnóstico, progresso e estratificação de risco de doenças inflamatórias (POLIOGIANNIS et al., 2018; ZINELLU et al., 2020). Mais recentemente, as razões neutrófilo/linfócito (RN/L), dRN/L derivado, plaqueta/linfócito (RP/L), monócito/linfócito (RM/L) e resposta inflamatória sistêmica (SII) demonstraram ser úteis para o diagnóstico e avaliação da gravidade da COVID-19, assim como o índice de resposta inflamatória sistêmica (SIRI) e índice agregado de inflamação sistêmica (AISI) (PENG et al., 2020; YANG et al., 2020; FOIS et al., 2020). Não é do nosso conhecimento a avaliação da capacidade prognóstica dos índices SIRI, AISI e SII em doenças autoimunes como LES e AR. No entanto, vários estudos têm reportado que a relação neutrófilo/linfócito (RN/L) e plaqueta/linfócito (RP/L) estão associados com a atividade da doença em algumas doenças reumatológicas (MERCAN et al., 2016; HAMMAD et al., 2018; PARK et al., 2018), como também com pior prognóstico após cirurgia de revascularização (URBANOWICZ et al., 2021 e 2022). Novos índices inflamatórios tais como o SIRI, AISI e SII tem sido associados com predição de mortalidade/gravidade em diferentes doenças cardiovasculares ou não (PALIOGIANNIS et al., 2018; FOIS et al., 2020; Peng et al., 2020; EISSA et al., 2021), os quais envolvem marcadores inflamatórios celulares tais como neutrófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas.

Os índices inflamatórios RN/L, RP/L, RL/M, dRN/L, AISI SIRI, SII obtidos de nosso estudo não apresentaram diferença significativa entre o grupo com LES e aquele com AR, porém, cabe ressaltar que o índice dRN/L apresentou tendência a ser mais alto naquelas mulheres com LES ( $p=0,064$ ). Nos casos de LES, há sabida redução do número de linfócitos (RIVIERO et al., 1978; SCHULZE-KOOPS, 2004), o que contribui para reduzir a contagem global de leucócitos, favorecendo o aumento desta relação em função da linfopenia. Dessa forma, este índice nos pareceu promissor se aplicado

a um número muito maior de pacientes com LES, para a investigação de atividade da doença e/ou gravidade.

Quanto ao perfil hemostático, observado nas Tabelas 3 e 4, ressalta-se que os parâmetros do TGT *Lagtime*, *ttPeak*, *ETP* e *Start tail* foram bastante semelhantes nas duas concentrações de TF utilizadas (*Low* e *High* TF). Tais parâmetros foram significativamente mais altos nas pacientes com LES em comparação àquelas com AR ( $p < 0,001$ ; 0,004; 0,005 e 0,001, respectivamente para LTF e  $p = 0,001$ ; 0,002; 0,001 e  $< 0,001$  respectivamente para HTF). Apesar do *Lagtime* e *ttPeak* no LES indicarem menos ativação da coagulação por estarem prolongados, é possível que este resultado seja compatível com níveis mais altos de TFPI nas pacientes com LES em relação àquelas com AR. Conforme reportado por Winckers et al., 2011, mulheres jovens com infarto do miocárdio apresentaram aumento nos níveis de TFPI quando comparadas aos controles, o que guarda alguma similaridade com o grupo de LES aqui estudado, ou seja, também mulheres jovens são predispostas a desenvolverem doenças cardiovasculares. Níveis mais elevados de TFPI em função do processo inflamatório mais pronunciado no LES em comparação a AR, poderia justificar este achado já que este anticoagulante age inibindo o complexo TF-FVII, fundamental para a produção inicial de trombina (fase de iniciação da coagulação). Apesar do n limitado e conforme já reportado acima, verificou-se um aumento do ETP no LES em relação a AR, utilizando baixa e alta concentração de FT. Com baixa concentração de FT, pode-se avaliar melhor os componentes da via intrínseca, enquanto o teste com alta concentração de FT, é a condição ideal para a avaliação dos componentes da via comum e para verificar a influência da anticoagulação natural mediada principalmente pela antitrombina, e proteínas C e S sobre a trombina formada. Vale lembrar que as proteínas C (PCa) e S agem em conjunto e inibem FVa (parte do complexo protrombinase que age na via comum), sendo que estas proteínas inibem também o FVIIIa (parte do complexo tenase que age na via intrínseca) (ESMON, 2006). Os resultados aqui reportados indicam tendência a maior geração de trombina nas pacientes com LES em relação aos casos de AR, possivelmente por deficiência da anticoagulação natural, resultando em menos inibição do FVa, ou seja, favorecendo estado de hipercoagulabilidade. Corroborando com nossos resultados, Pereira et al., 2006, realizou um estudo com micropartículas plaquetárias (MPPs) extraídas de pacientes com LES, cujo número se mostrou significativamente aumentado em

relação aos controles. Conforme salientado pelos autores mencionados anteriormente, plaquetas ativadas podem participar do processo de coagulação já que as mesmas liberam micropartículas que são fonte de fosfolípidos de carga negativa e fator tissular, o que favorece o estado procoagulante. Esses autores avaliaram também o TGT (ETP) sem adição de FT+fosfolípidos exógeno e observaram valores também significativamente mais altos para o ETP dos pacientes em relação aos controles. Este achado significa que a geração de trombina dependeu diretamente do número de MPs do plasma dos pacientes com LES, o que sugere que o número destas MPs pode ter um papel importante na patogênese do estado protrombótico no LES (PEREIRA et al., 2006).

É amplamente sabido que a AR trata-se de uma grave doença inflamatória conforme revisado por Klein & Molad (2021), porém no presente estudo pacientes com LES apresentaram tendência a maiores alterações quando comparadas àquelas com AR. Kern et al., 2016, reportou um estudo também utilizando o método de CAT para avaliar a funcionalidade do sistema de coagulação em pacientes com AR comparado a um grupo controle hígido. Os autores não observaram maior capacidade de geração de trombina nos pacientes com AR, o que está em concordância com nossos achados. Uma clara explicação nos falta para justificar este achado, talvez uso de diferentes medicamentos ou tempo de doença, ou mesmo características fisiopatológicas inerentes a cada uma dessas doenças que possam justificar em parte os dados obtidos.

Apesar de não ter havido diferenças significativas em relação aos outros grupos, os parâmetros do TGT referentes ao grupo controle, foram consistentes com o esperado, ou seja, o ETP se mostrou “menor”, por exemplo, sinalizando para menos geração de trombina. Com relação ao parâmetro *Start tail*, esse se mostrou significativamente alargado nas pacientes com LES comparando-as às com AR. Tal parâmetro é muito pouco explorado nos estudos, todavia, pode-se sugerir que o maior tempo para se atingir o fim da reação é resultante de mais trombina na amostra, a qual foi menos inibida consequente à possível redução dos componentes da anticoagulação natural.

Quando as pacientes com LES foram estratificadas em SLEDAI  $\leq 4$  e  $>4$ , nas condições de *Low* e *High TF* (Tabelas 5 e 6), não se observou diferença significativa para nenhum parâmetro entre aquelas com maior atividade (SLEDAI $>4$ ) e menor

atividade da doença (SLEDAI  $\leq 4$ ). Diante deste achado, acredita-se que seria necessário um número muito maior de pacientes com LES para a investigação de atividade da doença e/ou gravidade. Em 1993, Ginsberg et al, reportaram aumento da geração de trombina utilizando os marcadores de hipercoagulabilidade fragmento 1+2 da protrombina (F1+2) e fibrinopeptídeo A (FPA), em pacientes com LES e anticorpos anticardiolipina (ACA) em função da atividade da doença. Os resultados deste estudo suportaram a hipótese de que a presença de tais anticorpos em pacientes com LES está associada a um estado protrombótico. Mais recentemente, CICARINI et al., 2020, explorou a relação entre possíveis alterações hemostáticas e manifestações clínicas do LES em função de uma maior ou menor atividade da doença de acordo com os critérios do SLEDAI-2K, os quais concluíram que as medidas de trombotrombolina, dímero D e geração de trombina se mostraram potencialmente úteis para discriminar entre maior e menor atividade do LES. Estes mesmos autores sugeriram que uma maior atividade da doença pode causar injúria endotelial resultando em maior geração de trombina e, conseqüentemente, um estado de hipercoagulabilidade que contribui para o desenvolvimento de eventos trombóticos, frequentes em doenças inflamatórias.

Quanto aos índices inflamatórios derivados do hemograma de pacientes com LES (tabela 7), nenhuma diferença significativa foi observada entre as pacientes com SLEDAI  $\leq 4$  e SLEDAI  $>4$ . Esta falta de significância pode ter ocorrido provavelmente por causa do  $n$  bastante limitado utilizado, o que foi indubitavelmente uma grande limitação de nosso estudo. O advento da pandemia da COVID-19 prejudicou bastante a obtenção das amostras, portanto, o andamento da presente investigação.

Finalmente, algumas correlações “quase” significativas entre parâmetros do TGT (*Peak* e ETP) e o índice inflamatório SII foram observadas, as quais reforçam a relação entre inflamação e ativação do sistema hemostático (ESMON, 2008), incluindo doenças autoimunes (SOLFIETTI et al., 2016; KLEIN & MOLAD, 2021).

Cumpramos ressaltar também várias limitações deste estudo. O tamanho amostral de cada grupo foi muito limitado, particularmente o grupo controle, o que dificultou muito as análises, precludendo o achado de diferenças significativas entre os diversos parâmetros avaliados. Outra importante limitação consistiu no uso de terapia imunossupressora pelas pacientes, o que pode ter influenciado nos perfis hematológico e hemostático (KLEIN & MOLAD, 2021). No entanto, a utilização do TGT

pode ser um ponto forte deste estudo, pois trata-se de um método global de avaliação da hemostasia, cujos resultados refletem o equilíbrio entre as forças procoagulantes e anticoagulantes, enquanto os métodos convencionais são capazes de avaliar apenas partes da cascata de coagulação (LECUT, 2015; DEPASSE et al., 2021; BINDER et al., 2021). Apesar do n limitado para os grupos e do uso de medicação específica para doenças autoimunes, deve-se ressaltar a tendência à hipercoagulabilidade provocada pelas doenças aqui estudadas, o que em parte favorece o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Como mensagem final, baseado nos resultados obtidos no presente estudo, recomenda-se especial atenção à avaliação do sistema hemostático de pacientes com doenças autoimunes, visando investigar anormalidades que podem ser úteis no manejo de tais pacientes.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo investigou os perfis hematológico e hemostático em uma pequena amostra de pacientes com doenças autoimunes, particularmente LES e AR. Com base nas médias e medianas das pacientes analisadas, observou-se uma tendência à redução dos elementos celulares do sangue, porém ainda dentro dos valores de referência, embora algumas pacientes individualmente apresentaram anemia, leucopenia e trombocitopenia, em consonância com achados anteriores (BOWMAN, 2002; NEWMAN et al., 2013; CARLI et al., 2015; KADO et al., 2019; KLEIN & MOLAD, 2021). Bastante interessante também foi a aplicação dos índices inflamatórios derivados de parâmetros do hemograma, com destaque para o dN/LR (Neutrófilos / Global leucócitos – Neutrófilos); bem como do índice **SII** (*systemic immune-inflammation index* ou índice de inflamação imunológica sistêmica) =  $\text{Plaquetas} \times \text{Neutrófilos} / \text{Linfócitos}$ ), que se mostraram mais promissores para avaliação das pacientes com LES. Os nossos achados para o perfil hemostático também sugerem que o processo inflamatório conduz a maior geração de trombina, evento crucial no processo de coagulação. Em condições fisiológicas, o sistema de coagulação encontra-se balanceado, com diminuição simultânea de fatores pró- e anticoagulantes. Porém, quanto mais trombina, mais predisposição a eventos trombóticos, quanto menos trombina, mais predisposição a eventos hemorrágicos. Neste contexto, a avaliação da hemostasia pelo TGT se enquadra perfeitamente, já que os testes convencionais não se prestam à avaliação da hemostasia de forma global e, portanto, não correlacionam com a Clínica, particularmente nos casos de

hipercoagulabilidade. Então, testes que avaliam globalmente o processo da coagulação são capazes de refletir melhor o risco hemorrágico ou trombótico (Hemker et al., 2003; Lecut et al., 2015). Essa técnica é versátil, reflete as três fases da coagulação (iniciação, propagação, finalização) e seus resultados são mais fiéis à realidade da coagulação *in vivo* (KEMKER et al., 2003; LECUT et al., 2015, BINDER et al., 2021; DEPASE et al., 2021). Trata-se de um teste de bastante potencial e que precisa ser mais estudado e validado em termos clínicos, incluindo valores de *cutoff* para risco de trombose e sangramento (Ay et al., 2011; ten Cate, 2012 ; Hemker, 2015). Segundo LAAT-KREMERS et al., 2023, os avanços no campo dos testes de geração de trombina permitirão seu uso na Clínica como um preditor para estratégias terapêuticas personalizadas, além de avaliação das alterações hemostáticas em pacientes com COVID-19 e da validação do MidCAT para uso em estudos com pequenos volumes de plasma.

Apesar de todo o esforço despendido na realização do presente estudo, este foi bastante prejudicado pela pandemia e outros inconvenientes, o que dificultou em muito o aumento do n amostral e o andamento deste estudo. No entanto, esforços foram envidados para a sua conclusão. Apesar das limitações citadas no manuscrito, as ferramentas utilizadas no estudo em pauta contribuíram em muito para a nossa formação pós-graduada, o que certamente terá reflexos altamente positivos na vida profissional, nos posicionando em patamares superiores.

## **9 CONCLUSÕES**

A análise conjunta dos dados obtidos no presente estudo não revelou alterações significativas no perfil hematológico entre os grupos LES e AR, porém o índice de inflamação dRN/L sugere um processo inflamatório maior nas pacientes com LES. Quanto à geração de trombina, apesar da limitação do n amostral e do uso de medicamentos, uma maior ativação da coagulação foi observada nas pacientes com LES, o que reflete uma relação entre a inflamação própria da doença e alterações hemostáticas, conforme esperado. A forte tendência à obtenção de correlações significativas observadas entre alguns parâmetros do TGT e o índice inflamatório SII nas pacientes com LES corroboram a afirmativa acima. Dessa forma, tais resultados extraídos do TGT apresentam potencial para utilização na Clínica para a avaliação

do *status* hemostático de pacientes com LES, o mesmo não sendo válido à princípio para a AR, conforme sugerido no presente estudo.

## 10 AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a toda equipe do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG por sua valiosa ajuda na seleção dos pacientes. Em especial, agradecemos a todos os pacientes que generosamente aceitaram participar deste estudo. Agradecemos também o auxílio financeiro da FAPEMIG (APQ 03295-17) e do CNPq (Processo número 311185/2019-3)

## REFERÊNCIAS DO ARTIGO

AKBOGA, S.A.; GOKCE, A.; HATIPOGLU, M.; BEYOGLU, M.A.; INAN, K.; SEZEN, A.I.; DAL, H.C.; AKKAS, Y.; TURAN, S.; KOCER, B. The relationship between mortality and inflammatory markers and the systemic immune inflammatory index in patients in the intensive care unit with a pneumothorax as a complication of COVID-19 disease. **Ir. J. Med Sci.** 2021, 2021, 1–6.

ALESSANDRO G. FOIS, PANAGIOTIS PALIOGIANNIS, VALENTINA SCANO, STEFANIA CAU, SERGIO BABUDIERI, ROBERTO PERRA, GIULIA RUZZITTU, ELISABETTA ZINELLU, PIETRO PIRINA, CIRIACO CARRU, LUIGI B. ARRU, ALESSANDRO FANCELLU, MICHELE MONDONI, ARDUINO A. MANGONI,<sup>8</sup> AND ANGELO ZINELLU. The Systemic Inflammation Index on Admission Predicts In-Hospital Mortality in COVID-19 Patients. *Molecules*. 2020 Dec; 25(23): 5725.

BEYAN, E.; BEYAN, C.; TURAN, M. Hematological presentation in systemic lupus erythematosus and its relationship with disease activity. **Hematology**. 2007 Jun;12(3):257-61.

BOWMAN, S.J. Hematological manifestations of rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**. 2002;31(5):251-9.

CARLI L, TANI C, VAGNANI S, SIGNORINI V, MOSCA M. Leukopenia, lymphopenia, and neutropenia in systemic lupus erythematosus: Prevalence and clinical impact--A systematic literature review. **Semin Arthritis Rheum**. 2015 Oct;45(2):190-4.

CICARINI WB, DUARTE RCF, FERREIRA KS, LOURES CMG, CONSOLI RV, NEIVA CLS, DE PÁDUA PM, NUNES FFC, ALVES LCV, REIS EA, MOREIRA CC, GUIMARÃES TMPD, DE TOLEDO VPCP, CARVALHO MDG. Impact of markers of endothelial injury and hypercoagulability on systemic lupus erythematosus. **Lupus**. 2020 Feb;29(2):182-190.

EISSA, M.; SHAARAWY, S.; ABDELLATEIF, M.S. The Role of Different Inflammatory Indices in the Diagnosis of COVID-19. **Int. J. Gen. Med**. 2021, 14, 7843–7853.

ELISABETTA CASTOLDI & JAN ROSING. Thrombin generation tests. **Thrombosis research** .volume 127, supplement 3, s21-s25, february 01, 2011.

ESMON CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. **Maturitas**. 2008 Sep-Oct;61(1-2):122-31.

ESMON, C.T. Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. **Semin Thromb Hemost**. 2006 Apr;32 Suppl 1:49-60.

ESMON, C.T. Inflammation and thrombosis. **J Thromb Haemost**. 2003 Jul;1(7):1343-8.

FOIS, A.G.; PALIOGIANNIS, P.; SCANO, V.; CAU, S.; BABUDIARI, S.; PERRA, R.; RUZZITTU, G.; ZINELLU, E.; PIRINA, P.; CARRU, C.; et al. The Systemic Inflammation Index on Admission Predicts In-Hospital Mortality in COVID-19 Patients. **Molecules** 2020, 25, 5725.

GINSBERG JS, DEMERS C, BRILL-EDWARDS P, JOHNSTON M, BONA R, BURROWS RF, WEITZ J, DENBURG JA. Increased thrombin generation and activity in patients with systemic lupus erythematosus and anticardiolipin antibodies: evidence for a prothrombotic state. **Blood**. 1993 Jun 1;81(11):2958-63.

HAMMAD M, SHEHATA OZ, ABDEL-LATIF SM, et al. Neutrophil/lymphocyte ratio and platelet/lymphocyte ratio in Behcet's disease: which and when to use? **Clin Rheumatol**. 2018;37:2811–2817.

HEMKER HC, GIESEN P, AL DIERI R, REGNAULT V, DE SMEDT E, WAGENVOORD R, LECOMPTE T, BÉGUIN S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33(1):4-15.

IBA, T.; LEVY, J. H. Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. **J Thromb Haemost**. 2018 Feb;16(2):231-241.

KADO R, MCCUNE WJ. Treatment of primary and secondary immune thrombocytopenia. **Curr Opin Rheumatol**. 2019 May;31(3):213-222.

KERN, A.; BALOG, A.; DULIC, S.; BARABA´S, E.; KISZELA´K, M.; VASARHELYI, B. Alterations of the thrombin generation profile in rheumatoid arthritis. **J Thromb Thrombolysis**. 2016 Apr;41(3):359-64.

KLEIN, A & MOLAD, Y. Hematological manifestations among patients with rheumatic diseases. **Acta haematol**. 2021;144:403-412.

LECUT, C.; PETERS, P.; MASSION, P.B.; GOTHOT, A. Is there a place for thrombin generation assay in routine clinical laboratory? **Ann Biol Clin (Paris)**. v.73. p.137–149. 2014.

LUO, H.; HE, L.; ZHANG, G.; YU, J.; CHEN, Y.; YIN, H.; GOYAL, H.; ZHANG, G.-M.; XIAO, Y.; GU, C.; et al. Normal Reference Intervals of Neutrophil-To-Lymphocyte Ratio, Platelet-To-Lymphocyte Ratio, Lymphocyte-To-Monocyte Ratio, and Systemic Immune Inflammation Index in Healthy Adults: A Large Multi-Center Study from Western China. **Clin. Lab**. 2019, 65, 65–74.

MERCAN, R.; BITIK, B.; TUFAN, A. et al. The association between neutrophil/lymphocyte ratio and disease activity in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. **J Clin Lab Anal.** 2016;30:597–601.

MEYER A, GUFFROY A, BLAISON G, DIEUDONNE Y, AMOURA Z, BONNOTTE B, FIEHN C, KIEFFER P, LORENZ HM, MAGY-BERTRAND N, MAURIER F, PENNAFORTE JL, PETER HH, SCHWARTING A, SIBILIA J, ARNAUD L, MARTIN T, VOLL RE, KORGANOW AS; LBBR/Rarenet group. Systemic lupus erythematosus and neutropaenia: a hallmark of haematological manifestations. **Lupus Sci Med.** 2020 Jul;7(1):e000399.

NEWMAN K, OWLIA MB, EL-HEMAIDI I, AKHTARI M. Management of immune cytopenias in patients with systemic lupus erythematosus - Old and new. **Autoimmun Rev.** 2013 May;12(7):784-91.

PALIOGIANNIS, P.; GINESU, G.C.; TANDA, C.; FEO, C.F.; FANCELLU, A.; FOIS, A.G.; MANGONI, A.A.; SOTGIA, S.; CARRU, C.; PORCU, A.; et al. Inflammatory cell indexes as preoperative predictors of hospital stay in open elective thoracic surgery. **ANZ J. Surg.** 2018, 88, 616–620.

PALIOGIANNIS, P.; SATTA, R.; DELIGIA, G.; FARINA, G.; BASSU, S.; MANGONI, A.A.; CARRU, C.; ZINELLU, A. Associations between the neutrophil-to-lymphocyte and the platelet-to-lymphocyte ratios and the presence and severity of psoriasis: A systematic review and meta-analysis. **Clin. Exp. Med.** 2018, 19, 37–45.

PARK, H. J.; JUNG, S.M.; SONG, J. J. et al. Platelet to lymphocyte ratio is associated with the current activity of ANCA-associated vasculitis at diagnosis: a retrospective monocentric study. **Rheumatol Int.** 2018;38:1865–1871.

PENG, J.; QI, D.; YUAN, G.; DENG, X.; MEI, Y.; FENG, L.; WANG, D. Diagnostic value of peripheral hematologic markers for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A multicenter, cross-sectional study. **J. Clin. Lab. Anal.** 2020, 34, e23475.

PENG, Y.; HUANG, W.; SHI, Z.; CHEN, Y.; MA, J. Positive association between systemic immune-inflammatory index and mortality of cardiogenic shock. **Clin. Chim. Acta** 2020, 511, 97–103.

PEREIRA J, ALFARO G, GOYCOOLEA M, QUIROGA T, OCQUETEAU M, MASSARDO L, PÉREZ C, SÁEZ C, PANES O, MATUS V, MEZZANO D. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. **Thromb Haemost.** 2006 Jan;95(1):94-9.

SOLFIETTI<sup>1</sup>, L.; B BINELLO, G;<sup>1</sup> STELLA<sup>1</sup>, S.; BAZZAN<sup>1</sup>, M.; SALIERNO<sup>1</sup>, M.; ROCCATELLO, D. Thrombin generation assay: interactions between chronic inflammation and haemostasis in patients with autoimmune diseases. **Clin Exp Rheumatol.** 2016 Sep-Oct;34(5):925-928.

URBANOWICZ, T.; MICHALAK, M.; G ĄSECKA, A.; PEREK, B.; RODZKI, M.; BOCIA ŃSKI, M.; STRABURZY ŃSKA-MIGAJ, E.; JEMIELITY, M. Postoperative Neutrophil to Lymphocyte Ratio as an Overall Mortality Midterm Prognostic Factor following OPCAB Procedures. **Clin. Pract.** 2021, 11, 587–597.

URBANOWICZ, T.; MICHALAK, M.; OLASI ŃSKA-WI ŃNIEWSKA, A.; RODZKI, M.; WITKOWSKA, A.; G ĄSECKA, A.; BUCZKOWSKI, P.; PEREK, B.; JEMIELITY, M. Neutrophil Counts, Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, and Systemic Inflammatory Response Index (SIRI) Predict Mortality after Off-Pump Coronary Artery Bypass Surgery. **Cells** 2022, 11, 1124

WINCKERS, K.; SIEGERINK, B.; DUCKERS, C.; MAURISSEN, L.F.; TANS, G.; CASTOLDI, E.; SPRONK, H. M. H.; TEN CATE, H.; ALGRA, A.; HACKENG, T. M.; ROSENDAAL, F.R. Increased tissue factor pathway inhibitor activity is associated with myocardial infarction in young women: results from the RATIOstudy. **J Thromb Haemost** 2011;9: 2243–50.

YANG, A.-P.; LIU, J.-P.; TAO, W.-Q.; LI, H.-M. The diagnostic and predictive role of NLR, d-NLR and PLR in COVID-19 patients. **Int. Immunopharmacol.** 2020, 84, 106504.

YATABE, S.; ETO, K.; HARUKI, K.; SHIBA, H.; KOSUGE, M.; OHKUMA, M.; ITO, D.; TAKEDA, Y.; SUGANO, H.; SASAKI, S.; et al. Signification of Systemic Immune-Inflammation Index for prediction of prognosis after resecting in patients with colorectal cancer. **Int. J. Colorectal Dis.** 2020, 35, 1549–1555.

ZINELLU, A.; PALIOGIANNIS, P.; SOTGIU, E.; MELLINO, S.; MANGONI, A.A.; ZINELLU, E.; NEGRI, S.; COLLU, C.; PINTUS, G.; SERRA, A.; et al. Blood Cell Count Derived Inflammation Indexes in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Lung** 2020, 198, 821–827.

## REFERÊNCIAS EM GERAL

ADHYA, Z.; BOROZDENKOVA, S.; KARIM, M. Y. The role of cytokines as biomarkers in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. **Nephrology Dialysis**

ALEEM, A.; ARFAJ, A. S. A.; KHALIL, N.; ALARFAJ, H. Haematological abnormalities in systemic lupus Erythematosus. **Acta Reumatológica Portuguesa**. v. 39, n. 3, p. 236-241, 2014.

ALUNNO, A.; CARUBBI, F.; GIACOMELLI, R.; GERLI, R. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: new players and therapeutic targets. **BMC Rheumatology**. p. 1-13, 2017.

ALVES, L. C. V.; CARVALHO, M. G.; NUNES, F. F. C.; REIS, E. A.; FERREIRA, G. A.; CALDERARO, D. C.; CARVALHO, J. S.; PÁDUA, P. M.; CICARINI, W. B.; GONDIM, I. M.; FERREIRA, L. F.; GUIMARÃES, T. M. P. D.; TOLEDO, V. P. C. P. Evaluation of potential biomarkers for the diagnosis and monitoring of Systemic Lupus Erythematosus using the Cytometric Beads Array (CBA). **Clinica Chimica Acta**. v. 499, p. 16-23, 2019.

ANGIOLILLI, C.; GRABIEC, A. M.; FERGUSON, B. S.; OSPELT, C.; FERNANDEZ, B. M.; ES, I. E.; BAARSEN, L. G. M.; GAY, S.; MCKINSEY, T. A.; TAK, P. P.; BAETEN, D. L.; REEDQUIST, K. Inflammatory cytokines epigenetically regulate rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte activation by suppressing HDAC5 expression. **Annals of the Rheumatic Diseases**. p. 430-438, 2017.

APOSTOLIDIS, S. A.; LIEBERMAN, L. A.; TOTH, K. K.; CRISPÍN, J. C.; TSOKOS, G. C. The Dysregulation of Cytokine Networks in Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v. 31, n. 10, p. 769-779, 2011.

ATEHORTÚA, L.; ROJAS, M.; VÁSQUEZ, G. M.; CASTAÑO, D. Endothelial Alterations in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis: Potential Effect of Monocyte Interaction. **Mediators of Inflammation**. v. 2017, p. 1-12, 2017.

BASHAL, F. Hematological Disorders in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **The Open Rheumatology Journal**. v. 7, p. 87-95, 2013.

BARBHAIYA, M.; COSTENBADER, K. Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 23, n. 6, p. 588–595, 2014.

BINDER, N. B; DEPASSE, F.; MUELLER, J.; WISSEL, T.; SCHWERS, S.; GERMER, M.; HERMES, B.; TURECEK, P. L. Clinical use of thrombin generation assays. **J Thromb Haemost**. 2021 Dec;19(12):2918-2929. Review.

BONAR, R.A.; LIPPI, G.; FAVALORO, E.J. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. **Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. 1. ed. New York: Humana Press, 2017. p. 3-27.

CANIZARES, N. V.; WAHEZI, D.; PUTTERMAN, C. Diagnostic and Prognostic Tests in Systemic Lupus Erythematosus. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**. v. 31, p. 351-363, 2017.

COJOCARU, M.; COJOCARU, I.M.; SILOSI, I.; VRABIE, C.D. Manifestations of systemic lupus erythematosus. *Mædica*, v. 6, n. 4, p. 330–336, 2011.

COSTA, A, L, P.; JÚNIOR, A, C, S, S.; PINHEIRO, A, L. Fatores associados à etiologia e patogênese das doenças autoimunes. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. P.92-106. 2019.

CUNHA, J. S.; SEIBERT, K. G. Systemic Lupus Erythematosus: A Review of the Clinical Approach to Diagnosis and Update on Current Targeted Therapies. **Rhode Island Medical Journal**. v. 99, p. 23-27, 2016.

DAVIE, E.W.; RATNOFF, O.D. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. **Science**. v. 145, p. 1310-1312, 1964.

DEPASSE, F.; BINDER, N. B.; MUELLER, J.; WISSEL, T.; SCHWERS, S.; GERMER, M.; HERMES, B.; TURECEK, P. L. Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine. **J Thromb Haemost**. 2021 Dec;19(12):2907-2917.

DUARTE, R.C.F.; FERREIRA, C.N.; RIOS, D.R.A.; REIS, H.J.; CARVALHO, M.G. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 39, n. 3, p. 259-265, 2017.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, M. L; CARVALHO, M. G. Avaliação do dímero D (D-Di) na doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n. 3, p. 199-202, 2003.

ERRE, G. L.; PALIOGIANNIS, P.; CASTAGNA, F.; MANGONI, A. A.; CARRU, C.; PASSIU, G.; ZINELLU, A. (2019) Meta-analysis of neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratio in rheumatoid arthritis. **Eur J Clin Invest** 49: e13037.

FAYYAZ, A.; IGOE, A.; KURIEN, B. T.; DANDA, D.; JAMES, J. A.; STAFFORD, H. A.; SCOFIELD, R. H. Haematological manifestations of lupus. **Lupus Science & Medicine**. v. 2, n. 1, p. 1-18, 2015.

FERREIRA, C.N.; SOUSA, M.O.; DUSSE, L.M.S.; CARVALHO, M.G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FORTUNA, G.; BRENNAN, M. T. Systemic Lupus Erythematosus. Epidemiology, Pathophysiology, Manifestations and Management. **Dental Clinics of North America**. v. 57, p. 631-655, 2013.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**. v. 34, p. 229-237, 2001.

FOIS, A.G.; PALIOGIANNIS, P.; SCANO, V.; CAU, S.; BABUDIERI, S.; PERRA, R.; RUZZITTU, G.; ZINELLU, E.; PIRINA, P.; CARRU, C.; et al. The Systemic Inflammation Index on Admission Predicts In-Hospital Mortality in COVID-19 Patients. *Molecules* 2020, 25, 5725.

FU, Q.; CHEN, X.; CUI, H.; GUO, Y.; CHEN, J.; SHEN, N.; BAO, C. Association of elevated transcript levels of interferon-inducible chemokines with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus patients. **Arthritis Research & Therapy**. v. 10, n. 5, p. 1-10, 2008.

GARCÍA, A. V.; CASTRO, S. G.; ISENBERG, D. A. The diagnosis and management of the haematologic manifestations of lupus. **Journal of Autoimmunity**. v. 30, p. 1-22, 2016.

GERARDINO, G. P.; RODRÍGUEZ, M. C.; RUBIO, J. L. C.; FERNÁNDEZ, R. R.; CENTENO, N. O.; MEDINA, B. R. Diet Quality and High-Sensitivity C-Reactive Protein in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. **Biological Research For Nursing**. v. 21, p. 107-113, 2019.

GOTTSHALK, T. A.; TSANTIKOS, E.; HIBBS, M. L. Pathogenic inflammation and its therapeutic targeting in systemic lupus Erythematosus. **Frontiers in Immunology**. v. 6, p. 1-14, 2015.

HAMAD, D.A.; ALY, M.M.; ABDELHAMEID, M.A.; AHMED, S.A.; SHALTOUT, A.S.; ABDEL-MONIEM, A.E.; RAGHEB, A.M.R.; ATTIA, M.N.; MESHREF, T.S. Combined Blood Indexes of Systemic Inflammation as a Mirror to Admission to Intensive Care Unit in COVID-19 Patients: A Multicentric Study. **J. Epidemiol. Glob. Health** 2021, 12, 64–73.

HEMKER HC, GIESEN P, AL DIERI R, REGNAULT V, DE SMEDT E, WAGENVOORD R, LECOMPTE T, BÉGUIN S. Calibrated

automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33(1):4-15.

HEMKER, H.C.; KREMERS, R. Data management in Thrombin Generation. **Thrombosis Research.** v. 131, n. 1, p 3-11, 2013.

HOCHBERG, M. C for the Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American College of Rheumatology Updating the ACR revised criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis Rheum** 1997, 40:1725.

HOFFMAN, M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. **Blood Reviews.** v. 17, n. 1, p. 51-55, 2003.

IGHE, A.; DAHLSTRÖM, O.; SKOGH, T.; SJÖWALL, C. Application of the 2012 Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria to patients in a regional Swedish Systemic lupus erythematosus register. **Arthritis Research & Therapy.** v. 17, p. 1-8, 2015.

INOH, M.; TOKUDA, M.; KIUCHI, H.; KURATA, N.; TAKAHARA, J. Evaluating systemic lupus Erythematosus disease activity using molecular markers of hemostasis. **ARTHRITIS & RHEUMATISM.** v. 39, n. 2, p. 287-291, 1996.

ITO, T.; THACHIL, J.; ASAKURA, H.; LEVY, J. H.; IBA, T. Thrombomodulin in disseminated intravascular coagulation and other critical conditions - a multi-faceted anticoagulante protein with therapeutic Potential. **Critical Care.** v. 23, p. 1-11, 2019.

JAMES, J.A.; ROBERTSON, J.M. Lupus and Epstein-Barr. **Current Opinion in Rheumatology,** v. 24, n. 4, p. 383–388, 2012.

JANG, S.; KWONK, E. J.; LEE , J. J. Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. **Int. J. Mol. Sci.** 2022, 23, 905.

JOHNSON, E. D.; SCHELL, J. C.; RODGERS, G. M. The D-dimer assay. **American Journal of Hematology**. v. 94, n. 7, p. 833-839, 2019.

KLEIN A, MOLAD Y. Hematological Manifestations among Patients with Rheumatic Diseases. **Acta Haematol**. 2021;144(4):403-412.

KAUL, A.; GORDON, C.; CROW, M.K.; TOUMA, Z.; UROWITZ, M.B.; VAN VOLLENHOVEN, R.; RUIZ-IRASTORZA, G.; HUGHES, G. Systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. June, p. 1–22, 2016.

KONG, K. O.; TAN, A. W.; THONG, B. Y. H.; LIAN, T. Y.; CHENG, Y. K.; TEH, C. L.; KOH, E. T.; CHNG, H. H.; LAW, W. G.; LAU, T. C.; LEONG, K. P.; LEUNG, B. P.; HOWE, H. S. Enhanced expression of interferon-inducible protein-10 correlates with disease activity and clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 156, n. 1, p. 134-140, 2009.

KRENSKY, A. M; AHN, Y. T. Mechanisms of Disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal Disease. **Nature Reviews Nephrology**. v. 3, n. 3, p. 164-170, 2007.

KUHN, A.; BONSMANN, G.; ANDERS, H. J.; HERZER, P.; TENBROCK, K.; SCHNEIDER, M. The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. **Deutsches Ärzteblatt International**. v. 112, p. 423-432, 2015.

LAM, G.K.W.; PETRI, M. Assessment of systemic lupus erythematosus. Clinical and experimental rheumatology, v. 23, n. 5 Suppl 39, p. S120–S132, 2005.

LECUT, C.; PETERS, P.; MASSION, P.B.; GOTHOT, A. Is there a place for thrombin generation assay in routine clinical laboratory? **Ann Biol Clin (Paris)**. v.73. p.137–149 .2014.

LORENZI, T.F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 723 p.

MACCHIA, A.; LAFFAYE, N.; COMIGNANI, P.D.; PUCCI, E.C.; IGARZABAL, C.; SCAZZIOTA, A.S.; HERRERA, L.; MARIANI, J.A.; BRAGAGNOLO, J.C.; CATALANO, H.; TOGNONI, G.; NICOLUCCI, A. Statins but not aspirin reduce thrombotic risk assessed by thrombin generation in diabetic patients without cardiovascular events: The RATIONAL Trial. **Plos One**. v. 7, n. 3, p 1-7, 2012

MAIDHOF, W.; HILAS, O. Lupus: an overview of the disease and management options. **P & T : a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 37, n. 4, p. 240–249, 2012.

MATHIAN, A.; HIE, M.; AUBART, F. C.; AMOURA, Z. Targeting Interferons in Systemic Lupus Erythematosus: Current and Future Prospects. **Springer**. v. 8, p. 835-846, 2015.

MATOS, M. B. P.; DIAS, E. P.; ARRUDA, A. C.; JUNIOR, N. A. A.; GALERA, M. F.; LEITE, C. A. Alterações eritrocitárias em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**. v. 49, n. 1, p. 45-51, 2016.

MOTA, L. M. H.; BRENOL, C. V.; PALOMINOS, P.; PINHEIRO, G. R. C. Rheumatoid arthritis in Latin America: the importance of an early diagnosis. **Clinical Rheumatology**. v. 34, p. 29-44, 2015.

MOTA, L. M. H.; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; PEREIRA, I. A.; FRONZA, L. S. R.; BERTOLO, M. B.; FREITAS, M. V. C.; SILVA, N. A.; JUNIOR, P. L.; GIORGI, R. D. N.; LIMA, R. A. C.; PINHEIRO, G. R. C. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 51, n. 53, p. 1-13, 2011.

NIU, X.; CHEN, G. Clinical Biomarkers and Pathogenic-Related Cytokines in Rheumatoid Arthritis. **Journal of Immunology Research**. v. 2014, p. 1-7, 2014.

OKAMOTO, H.; KOBAYASHI, A.; YAMANAKA, H. Cytokines and Chemokines in Neuropsychiatric Syndromes of Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2010, p. 1-8, 2010.

PALIOGIANNIS, P.; GINESU G. C.; TANDA, C.; FEO, C. F.; FANCELLU, A.; FOIS, A. G.; MANGONI, A. A.; SOTGIA, S.; CARRU, C.; PORCU, A.; ZINELLU, A.(2018). Inflammatory cell indexes as preoperative predictors of hospital stay in open elective thoracic surgery. **ANZ J Surg** 88: 616-620.

PARKS, C.G.; DE SOUZA, A.E.S.; BARBHAIYA, M.; COSTENBADER, K.H. Understanding the role of environmental factors in the development of systemic lupus erythematosus. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 306–320, 2017.

PÉREZ-GÓMEZ, F.; BOVER, R. La nueva cascada de la coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. **Revista Española de Cardiología**, v. 60, n. 12, p. 1217-1219, 2007.

PUTZU, C.; CORTINOVIS, D. L.; COLONESE, F.; CANOVA, S.; CARRU, C.; ZINELLU, A.; PALIOGIANNIS, P. (2018) Blood cell count indexes as predictors of outcomes in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with Nivolumab. **Cancer Immunol Immunother** 67: 1349-1353.

RADU, A. F.; BUNGAU, S. G. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. **Cells** **2021**, 10, 2857.

REDDEL, C.J.; TAN, C.W.; CHEN, V.M. Thrombin generation and cancer: contributors and consequences. **Cancers**. v. 11, n. 100, p 1-20, 2019.

RESS, F.; DOHERTY, M.; GRAINGE, M. J.; LANYON, P.; ZHANG, W. The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies. **Rheumatology (Oxford)**. 2017;56(11):1945-61.

RIVERO,S. J.; DÍAZ-JOUANEN, E.; ALARCÓN-SEGOVIA, D. Lymphopenia in systemic lupus erythematosus. Clinical, diagnostic, and prognostic significance. **Arthritis Rheum**. 1978 Apr;21(3):295-305.

ROBERTS, H.R.; HOFFMAN, M.; MONROE, D.M. A Cell-Based Model of Thrombin Generation. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v. 32, n. 1, p 32-38, 2006.

ROMY DE LAAT-KLEMERS, STEPHANE ZULLY AND BAS DE LAAT. Editorial: Advances in thrombin Generation. **Front. Cardiovasc. Med**. 10:1183718. 2023.

SENNA, E. R.; DE BARROS, A. L.; SILVA, E. O.; COSTA, I. F; PEREIRA, L. V.; CICONELLI, R. M.; et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **J Rheumatol**. 2004;31(3):594-7.

SCHULZE-KOOPS, H. Lymphopenia and autoimmune diseases. **Arthritis Res Ther**. 2004;6(4):178-80.

SHAHZAD, A.; KNAPP, M.; LANG, I.; KÖHLER, G. Interleukin 8 (IL-8) - a universal biomarker? **International Archives of Medicine**. v. 3, n. 11, p. 1-4, 2010.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCLNNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **Lancet**. v. 388, p. 2023-2038, 2016.

THONG, B.; OLSEN, N. J. The SLE review series: working for a better standard of care - Systemic lupus erythematosus diagnosis and management. **Rheumatology**. v. 53, p. 3-13, 2017.

TAN, E. M.; COHEN, A. S.; FRIES, J. F.; MASI, A. T.; MCSHANE, D. J.; ROTHFIELD, N. F.; SCHALLER, J. G.; TALAL, N.; WINCHESTER, R. J. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**. 1982 Nov;25(11):1271-7.

TRIPODI, A. Thrombin generation assay and its application in the clinical laboratory. **Clinical Chemistry**. v. 62, n. 5, p 699-707, 2016.

VILAR, M. J.; SATO, E. I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**. 2002;11(8):528-32.

VINE, A.K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina**. v. 29, n. 1, p 1-7, 2009.

WANG, J.; NIU, R.; JIANG, L.; WANG, Y.; SHAO, X.; WU, M.; MA, Y. The diagnostic values of C-reactive protein and procalcitonin in identifying systemic lupus erythematosus infection and disease activity. **Medicine**. v. 98, p. 1-8, 2019.

WEITZ, J. I.; FREDENBURGH, J. C.; EIKELBOOM, J. W. A Test in Context: D-Dimer. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 70, n. 19, p. 2411-2420, 2017.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Tratado de hematologia**. 1. ed. Belo Horizonte: Atheneu, 2014. 849 p.

ZHANG, A.; LEE, Y. C. Mechanisms for Joint Pain in Rheumatoid Arthritis (RA): from Cytokines to Central Sensitization. **Current Osteoporosis Reports**. v. 5, p. 603-610, 2019.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinics**. v. 45, p. 27-37, 2007.

## ANEXOS

### ANEXO A – Critérios do *American College of Rheumatology (ACR)* para diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistêmico

<b>Critérios</b>	<b>Definição</b>
<b>1. Erupção malar</b>	Eritema constante, plano ou elevado, sobre as eminências malares, tendendo para os sulcos nasolabiais.
<b>2. Erupção discóide</b>	Aumento de manchas eritematosas com descamação queratoide e tamponamento folicular; cicatrizes atróficas podem ocorrer em lesões mais antigas.
<b>3. Fotossensibilidade</b>	Erupção cutânea por reação anormal à exposição à luz solar, seja por relato do paciente ou observação médica.
<b>4. Úlcera oral</b>	Ulceração oral ou nasofaríngeal, geralmente indolor, observada por médico.
<b>5. Artrite</b>	Artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, associada à hipersensibilidade, tumefação e derrame.
<b>6. Serosite</b>	<p>a) Pleurite—convincente histórico de dor pleurítica, ou atrito ouvido pelo médico ou evidência de derrame pleural.</p> <p><i>OU</i></p> <p>b) Pericardite — documentada por ECG, ou atrito ou evidência de derrame pericárdico.</p>
<b>7. Distúrbio renal</b>	<p>a) Proteinúria persistente maior que 0,5g por dia ou maior que 3+ se não for realizada quantificação.</p> <p><i>OU</i></p> <p>b) Cilindros celulares – podendo ser hemático, granular, tubular ou misto.</p>
<b>8. Distúrbio neurológico</b>	<p>a) Convulsões – na ausência de drogas tóxicas ou distúrbios metabólicos conhecidos; ex. uremia, cetoacidose ou desbalanço eletrolítico.</p> <p><i>OU</i></p> <p>b) Psicose—na ausência de drogas tóxicas ou distúrbios metabólicos conhecidos; ex. uremia, cetoacidose ou desbalanço eletrolítico.</p>

**9. Distúrbio hematológico**

a) Anemia hemolítica—com reticulocitose.

OU

b) Leucopenia— total menor que 4.000/mm<sup>3</sup> em duas ou mais ocasiões.

OU

c) Linfopenia— menor que 1.500/mm<sup>3</sup> em duas ou mais ocasiões.

OU

d) Trombocitopenia—menor que 100.000/mm<sup>3</sup> na ausência de drogas tóxicas.

**10. Distúrbios imunológicos**

a) Presença de anticorpos anti-fosfolípidos.

OU

b) Anti-DNA: anticorpo anti-DNA nativo em títulos anormais.

OU

c) Anti-Sm: presença de anticorpos anti-Sm.

OU

d) Testes sorológicos falso-positivos para sífilis por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-abs negativo.

**11. Anticorpo antinuclear**

Título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência ou teste equivalente em qualquer momento na ausência de drogas que sabidamente estão associadas com o Lúpus induzido.

**ANEXO B – Índice de atividade utilizado no LES, SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*)**

<b>Pts</b>	<b>Presença</b>	<b>Manifestações clínicas</b>	<b>Descrição</b>
8	<input type="checkbox"/>	Convulsão	Início recente, excluídas causas metabólicas infecciosas e secundárias ao uso de drogas.
8	<input type="checkbox"/>	Psicose	Distúrbio severo da percepção da realidade, excluídas causas metabólicas e drogas. Incluem alucinações, incoerência, perda marcada das associações de ideias, pensamento pobre, ilógico; comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico.
8	<input type="checkbox"/>	Síndrome cerebral orgânica	Alteração abrupta e flutuante das funções mentais, atingindo a orientação, a atenção, a memória e outras funções intelectuais. Inclui a redução da vigília, com diminuição da atenção, acompanhada de pelo menos dois sintomas descritos a seguir – perturbação da percepção, discurso incoerente, insônia ou hipersonia diurna, aumento ou redução da atividade psicomotora. Exclui causas metabólicas, infecciosas ou secundárias ao uso de drogas.
8	<input type="checkbox"/>	Distúrbios visuais	Alteração da retina caracterizada por corpos cistóides,

			hemorragias retinianas, exsudatos serosos ou hemorragias do plexo coroide ou neurite óptica. Excluir hipertensão, infecções e drogas.
8	<input type="checkbox"/>	Comprometimento de pares cranianos	Neuropatia sensorial ou motora, de início ou reinício recente.
8	<input type="checkbox"/>	Cefaléia lúpica	Severa e persistente, do tipo enxaqueca que não responde a analgésicos convencionais.
8	<input type="checkbox"/>	AVC	Presença de AVC. Excluir causa aterosclerótica.
8	<input type="checkbox"/>	Vasculite	Ulcerações, gangrenas, infartos periungueais, nódulos digitais dolorosos, áreas hemorrágicas subungueais, biópsia ou angiografia de qualquer área do corpo apresentando vasculite.
4	<input type="checkbox"/>	Artrites	Envolvimento de duas ou mais articulações com sinais e sintomas de inflamação (palpação dolorosa, tumefação ou derrame articular). Inflamação (palpação dolorosa, tumefação ou derrame articular).
4	<input type="checkbox"/>	Miosites	Dor ou fraqueza muscular proximal acompanhada de aumento de CPK/aldolase, eletromiografia alterada, biópsia compatível com miosite.
4	<input type="checkbox"/>	Cilindros urinários	Hemáticos, granulosos ou eritrocitários.
4	<input type="checkbox"/>	Hematúria	Mais de 5 eritrócitos/campo. Excluir outras causas

			tais como litíase renal ou infecções.
4	<input type="checkbox"/>	Proteinúria	Concentração > a 0,5 g/24 horas.
4	<input type="checkbox"/>	Piúria	Mais de 5 leucócitos/campo na ausência de infecção.
2	<input type="checkbox"/>	Rash cutâneo	Início recente ou recorrente, caráter inflamatório.
2	<input type="checkbox"/>	Alopecia	Início recente ou recorrente, excessiva, difusa ou localizada de perda de cabelo.
2	<input type="checkbox"/>	Úlcera de mucosa	Início recente ou recorrente de úlceras nasais ou orais.
2	<input type="checkbox"/>	Pleurite	Dor pleurítica com atrito, derrame ou espessamento. pleural.
2	<input type="checkbox"/>	Pericardite	Dor no peito, com atrito ou derrame pericárdico, confirmado por eletrocardiograma.
2	<input type="checkbox"/>	Complemento baixo	CH50; C3 ou C4 abaixo dos valores de referência.
2	<input type="checkbox"/>	Anti-DNA	Acima dos valores de referência do laboratório.
1	<input type="checkbox"/>	Febre	Temperatura axilar >38°, na ausência de processo infeccioso.
1	<input type="checkbox"/>	Trombocitopenia	Concentração de plaquetas inferior a 100 000/mm <sup>3</sup> (excluídas causas farmacológicas).
1	<input type="checkbox"/>	Leucopenia	Concentração de leucócitos inferior a 3 000/mm <sup>3</sup> (excluídas causas farmacológicas).

**ANEXO C – Folha de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP**



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

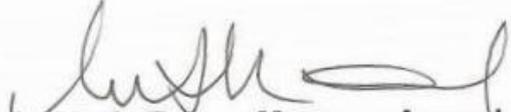
**Projeto: CAAE – 01928412.8.0000.5149**

**Interessado(a): Profa. Maria das Graças Carvalho  
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 27 de junho de 2012, o projeto de pesquisa intitulado **"Lúpus eritematoso sistêmico: aspectos hematológicos e imunológicos"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

  
**Profa. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**

**ANEXO D – Folha de aprovação do projeto de pesquisa pela Gerência de Ensino e Pesquisa do Hospital das Clínicas - UFMG**



Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas  
Gerência de Ensino e Pesquisa

**EBSERH**  
HOSPITAIS UNIVERSITÁRIOS FEDERAIS

Belo Horizonte, 04 de julho de 2016.

**PROJETO DE PESQUISA nº 061/16: "Lúpus eritematoso sistêmico: aspectos hematológicos e imunológicos."**

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e a aprovação pelo COEP/UFMG em 27/06/12, esta Gerência aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à GEP **relatório** parcial ou final após um ano.

Atenciosamente,

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira

Gerente de Ensino e Pesquisa do HC-UFMG

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira  
Gerente de Ensino e Pesquisa do HC/UFMG  
Filial EBSERH  
Insc. 181196 - PT: 937 de 17/11/14

Sr<sup>a</sup>  
Prof<sup>a</sup> Maria das Graças Carvalho  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia - UFMG

**ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de amostras biológicas**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

**BANCO DE DADOS E DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DESTINADO AO ESTUDO DE PARÂMETROS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS RELACIONADOS A DOENÇAS AUTOIMUNES.**

**Projeto de pesquisa:**

“Lupus eritematoso sistêmico: aspectos hematológicos e imunológicos”

Prezado(a) Senhor(a),

O Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais está realizando um estudo em amostras de sangue de pacientes com “Lupus Eritematoso Sistêmico”. Este estudo tem como objetivo a obtenção de conhecimentos importantes sobre esta doença, podendo facilitar, no futuro, o tratamento. Os dados clínicos e laboratoriais que serão obtidos nesta pesquisa poderão ajudar o médico a entender melhor esta doença.

As informações obtidas nesta pesquisa poderão não lhe trazer benefícios imediatos, mas poderão trazer benefícios para outros indivíduos com a mesma doença no futuro. Se você quiser participar desta pesquisa, poderá fazê-lo doando uma amostra de 15mL de sangue para realizarmos exames laboratoriais. A retirada da pequena amostra de sangue poderá lhe causar um leve desconforto proveniente da picada da agulha e o local onde se coletou o sangue pode ficar roxo.

Caso você não queira participar desta pesquisa não haverá qualquer prejuízo no seu tratamento. Toda informação obtida nessa pesquisa será mantida em segredo. Sua amostra de sangue deverá fazer parte de um banco de dados e de amostras biológicas que poderão ser utilizadas no futuro para novas pesquisas. Todas as informações e amostras receberão um código de modo que ninguém saberá que esta amostra é sua, com exceção dos pesquisadores deste projeto. No entanto, qualquer pesquisa futura com o seu sangue deverá ser aprovada por um comitê de ética, sem necessidade de contactar você.

Qualquer outra informação sobre esta pesquisa poderá ser obtida com a pesquisadora principal Professora Maria das Graças Carvalho (31-34096881) ou com o médico reumatologista responsável Dra. Gilda Aparecida Ferreira (31- 32489300).

Desde já, agradecemos a sua colaboração!

**Termo de consentimento**

Declaro que, após convenientemente esclarecido(a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, autorizo a coleta de 15mL de sangue para ser utilizado na pesquisa acima.

Nome completo \_\_\_\_\_/

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura Data

Para contato:

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa Av. Antônio Carlos, 6627

Unidade Administrativa II - 2º andar

Sala 2005

Campus Pampulha

Belo Horizonte, MG - Brasil

31270-901

**Termo de consentimento**

Declaro que, após convenientemente esclarecido(a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, autorizo a coleta de 15mL de sangue para ser utilizado na pesquisa acima.

Nome completo \_\_\_\_\_/

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura Data

Para contato:

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa Av. Antônio Carlos, 6627

Unidade Administrativa II - 2º andar

Sala 2005

Campus Pampulha

Belo Horizonte, MG - Brasil

31270-901