

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA

DANIELA MORAES

Avaliação dos Índices Plaquetários e Contagem Total de Plaquetas em
Gestantes Normotensas, com Síndrome de Pré-eclâmpsia e Outros
Distúrbios Hipertensivos da Gestação

Porto Alegre

2014

DANIELA MORAES

**AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES PLAQUETÁRIOS E CONTAGEM TOTAL DE
PLAQUETAS EM GESTANTES NORMOTENSAS, COM SÍNDROME DE PRÉ-
ECLÂMPSIA E OUTROS DISTÚRBIOS HIPERTENSIVOS DA GESTAÇÃO.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde – Área de Concentração em Nefrologia - da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

Co-orientadores: Prof^a. Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa

Prof^a. Dra. Terezinha Paz Munhoz

Porto Alegre

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M827a Moraes, Daniela
Avaliação dos Índices Plaquetários e Contagem Total de
Plaquetas em Gestantes Normotensas, com Síndrome de Pré-
Eclâmpsia e Outros Distúrbios Hipertensivos da Gestação / Daniela
Moraes – Porto Alegre, 2014.
81 f

Diss. (Mestrado) – Faculdade de Medicina, PUCRS
Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo.
Co-orientadores: Prof^a. Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa.
Prof^a. Dra. Terezinha Paz Munhoz

1. Plaquetas 2. Gestantes 3. Hipertensão. 4. Pré-
Eclâmpsia. I. Carlos Eduardo Poli de. II. Costa, Bartira Ercilia
Pinheiro da. III. Munhoz, Terezinha Paz. IV Título.

CDU: 618.3

Bibliotecária Responsável: Nara Lima – CRB: 10/2188

DANIELA MORAES

**AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES PLAQUETÁRIOS E CONTAGEM TOTAL DE
PLAQUETAS EM GESTANTES NORMOTENSAS, COM SÍNDROME DE PRÉ-
ECLÂMPSIA E OUTROS DISTÚRBIOS HIPERTENSIVOS DA GESTAÇÃO.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde – Área de Concentração em Nefrologia - da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dra. Helena Z. W. Grotto - UNICAMP

Prof^a. Dra. Ana Lígia Bender - PUCRS

Prof.Dr. Ivan Carlos Antonello – HSL/PUCRS

Prof^a. Dra. Myriam Fortes Perrenoud – HSL/PUCRS

Porto Alegre
2014

Dedico esta dissertação à minha família e ao meu marido Gilberto.

Minhas fontes de amor, força e incentivo sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Polí de Figueiredo pelos ensinamentos despendidos e sobretudo pela confiança e oportunidade que muito contribuíram para o meu amadurecimento profissional. Agradeço pela paciência e carinho nas orientações durante esses dois anos. À minha co-orientadora Prof^ª. Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa pela sua dedicação, disponibilidade e acolhimento em todos os momentos. Seus conselhos foram fundamentais para a conclusão desta importante etapa.

À minha co-orientadora Prof^ª. Dra. Terezinha Paz Munhoz, profissional admirável, pela compreensão, incentivo e apoio possibilitando que esse sonho fosse concretizado.

As colegas e amigas do laboratório, Annerose Barros, Marta R. Hentschke, Bruna Krauspenhar, Júlia G. Motta e Marisa R. Vieira pelo companheirismo e disponibilidade sempre. Aos demais colegas e bolsistas do laboratório, em especial ao Fernando Sontag e Luiza Lucas pela colaboração durante o trabalho.

À Dra. Myriam Fortes Perrenoud e todos os colegas do Laboratório de Hematologia, especialmente Cátia Dare, Mariângela da Silva, Nara Lima e Pedro Buffon pela colaboração e apoio.

Às colegas e amigas Vanessa Sgnaolin e Rafaela C. Lienert pelo companheirismo, conselhos e alegrias do dia-a-dia.

A todos os médicos, enfermeiras e técnicas de enfermagem do ambulatório, centro obstétrico e alojamento conjunto do Hospital São Lucas da PUCRS pela colaboração na pesquisa.

Ao Professor Dr. Mário B. Wagner pelo assessoramento estatístico e receptividade em esclarecer dúvidas.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e ao Hospital São Lucas da PUCRS.

Às pacientes pela compreensão e colaboração durante a pesquisa.

À minha família, meu irmão Mauro Moraes e especialmente meus pais, José Inácio Moraes e Maria Gesi F. Moraes por sempre acreditarem e torcerem por mim. Por me ensinarem e transmitirem uma educação com bases no amor e respeito. E acima de tudo por estarem ao meu lado em todos os momentos sempre me fortalecendo. Ao meu marido Gilberto Tadeu Seelig Júnior que de maneira incondicional me apoia e incentiva. Por nunca deixar de acreditar em mim e sempre sonhar junto comigo. Agradeço a todos os amigos e familiares, que de forma geral, me apoiaram neste momento.

RESUMO

Um desequilíbrio nos mecanismos hemostáticos pode ocorrer durante a gestação com tendência à hipercoagulabilidade e aumento do risco de trombose. Nas gestantes com distúrbio hipertensivo, principalmente nas pré-eclâmpticas, há dados na literatura que indicam haver alteração no número total de plaquetas e nos índices plaquetários, volume plaquetário médio (VPM) e fração de plaquetas imaturas (IPF). A IPF tem sido sugerida como um índice sensível para monitorar mudanças na produção e destruição plaquetária. Uma técnica automatizada para a obtenção deste parâmetro tem sido utilizada. O objetivo do presente estudo é avaliar o comportamento da IPF utilizando citometria de fluxo fluorescente em pacientes com diagnóstico de doença hipertensiva gestacional. Foi realizado estudo transversal controlado com 99 gestantes a fim de estimar os níveis de IPF no sangue materno das pacientes com síndrome de pré-eclâmpsia (SPE) comparando com hipertensas gestacionais sem proteinúria (HGSP) e gestantes normais normotensas (NT) atendidas no Hospital São Lucas/PUCRS, Porto Alegre, Brasil. O termo de consentimento livre e esclarecido foi empregado nas 34 gestantes com SPE, 32 com HGSP e nas 33 NT. A IPF foi contada através do equipamento XE-5000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan), utilizando citometria de fluxo fluorescente. A contagem de IPF e VPM em gestantes com doença hipertensiva gestacional (DHG) foi significativamente maior que no grupo controle. Não houve diferença estatística entre os grupos SPE e HGSP. O VPM foi normal em todas as gestantes do grupo controle. Detectou-se um distinto perfil dos índices plaquetários em gestantes hipertensas, e sugere-se que esses marcadores possam ser utilizados na rotina clínica diária como uma ferramenta adicional no auxílio do diagnóstico precoce da DHG.

Palavras-chave: Hipertensão, Gestação, Fração de plaquetas imaturas, volume plaquetário médio.

ABSTRACT

Imbalance in hemostatic mechanisms can occur during pregnancy with a tendency for hypercoagulability and increased thrombosis risk. Pregnant women with a hypertensive disorder, especially preeclampsia, may disclose alterations in total platelet count and the platelet indexes, mean platelet volume (MPV) and immature platelet fraction (IPF). The IPF has been suggested as a sensitive index for monitoring changes in platelet production and destruction. An automated technique for obtaining this parameter has been used. The aim of the present study was to evaluate the immature platelet fraction behavior in patients diagnosed with a gestational hypertensive disorder (GHD), using fluorescent flow cytometry. A cross-sectional study conducted at the São Lucas Hospital, Porto Alegre, Brazil to estimate IPF levels in the maternal blood of 99 pregnant women, divided into 3 groups: normotensive controls (NP), preeclampsia syndrome (PES) and non-proteinuric hypertensive pregnancy (nPHP). Following ethical approval and written informed consent, samples were collected from 33 NP, 34 PES, and 32 nPHP women. IPF levels were measured by fluorescent flow cytometry using the XE-5000[®] (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). The IPF and MPV count in pregnant women with a GHD was significantly higher than the control group. No significant difference was detected between the PES and nPHP groups. The MPV for the NP group was normal. A distinct profile in platelet indexes was detected in hypertensive pregnancies. It is suggested that these markers could be used in daily routine as an additional tool in the management of hypertensive pregnant women.

KeyWords: Hipertension, Pregnancy, Immature platelet fraction, mean platelet volume.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fluxograma de inclusão das amostras.....	22
Figura 2	Metodologia de avaliação da Fração de Plaquetas Imaturas.....	25
Figura 3	(a) Paciente gestante sem pré-eclâmpsia ou outra complicação, com valor das plaquetas imaturas normal (IPF=4%). (b) Paciente gestante com pré-eclâmpsia grave, com valor das plaquetas imaturas alterado (IPF=18%).....	28
Figura 4	Distribuição das pacientes de acordo com a Fração de Plaquetas Imaturas.....	32
Figura 5	Distribuição das pacientes de acordo com o Volume Plaquetário Médio.....	33
Figura 6	Distribuição percentual de pacientes com Fração de Plaquetas Imaturas superior a 6,1 %.....	34
Figura 7	Distribuição percentual de pacientes com Volume Plaquetário Médio superior a 12,5 fL.....	35
Figura 8	Curva ROC da Fração de Plaquetas Imaturas de Hipertensas Gestacionais sem Proteinúria e Síndrome de Pré-eclâmpsia.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados clínicos e demográficos das gestantes.....	29
Tabela 2	Dados hematimétricos.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

CV	-	Coeficiente de variabilidade
DGH	-	Doença Hipertensiva Gestacional
DP	-	Desvio Padrão
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetracético
FSC	-	Mede Volume Celular
HELLP	-	Hemólise, elevação das enzimas hepáticas e plaquetas baixas
HGsP	-	Hipertensão Gestacional sem proteinúria
HSL	-	Hospital São Lucas da PUCRS
IPF	-	Fração de Plaquetas Imaturas
NT	-	Gestantes Normotensas
PCT	-	Plaquetócrito
PDW	-	Índice de anisocitose das plaquetas
PLT	-	Plaquetas
PLT-O	-	Plaqueta Ótica
PUCRS	-	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RNA	-	Ácido Ribonucleico
SFL	-	Mede a intensidade de fluorescência da célula
SPE	-	Síndrome de Pré-Eclâmpsia
TPO	-	Trombopoetina
VPM	-	Volume Plaquetário Médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	DISTÚRBIOS HIPERTENSIVOS DA GESTAÇÃO.....	13
1.2	ÍNDICES PLAQUETÁRIOS.....	14
1.3	INDICES PLAQUETÁRIOS <i>VERSUS</i> GESTAÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1	DELINEAMENTO.....	22
3.2	SUJEITOS DA PESQUISA.....	22
3.3	ASPECTOS ÉTICOS.....	23
3.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	23
3.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	23
3.6	DEFINIÇÕES.....	23
3.7	MATERIAIS.....	24
3.8	METODOLOGIA.....	25
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
4	CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTA DISSERTAÇÃO.....	27
5	RESULTADOS.....	28
5.1	SUJEITOS.....	28
5.2	TESTES LABORATORIAIS.....	30
6	DISCUSSÃO.....	37
7	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXO A - Protocolo da Coleta.....	49
	ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	50
	ANEXO C - Aprovação do Projeto pela Comissão Científica.....	53
	ANEXO D - Aprovação do Projeto pela Comissão Científica (Parecer do Relator).....	54
	ANEXO E - Parecer Consubstanciado do CEP.....	55
	ANEXO F - Submissão	56
	ANEXO G - Artigo Original.....	57

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 DISTÚRBIOS HIPERTENSIVOS DA GESTAÇÃO

Os distúrbios hipertensivos são uma das complicações mais frequentes da gestação, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade materna e fetal (DULEY 2009; REDMAN 2011; VICTORA, *et al.* 2011). A pré-eclâmpsia, síndrome específica da gestação humana, é caracterizada por elevação da pressão arterial, proteinúria patológica e edema após a vigésima semana de gestação.

A prevalência varia dependendo do local estudado, mas é estimado 2-8% das complicações de todas as gestações (DULEY 2009). A etiologia é desconhecida e seus mecanismos fisiopatológicos estão relacionados com hipoperfusão placentária, disfunção endotelial, inflamação e alterações de coagulação, levando à circulação inadequada na mãe, no feto e na placenta (ROBERTS, *et al.* 1989).

Existem ainda outras teorias como fatores nutricionais, fatores genéticos e desordem na adaptação imunológica (SIBAI, 2004). Além disso, sugere-se que o sistema do complemento possa estar associado com a pré-eclâmpsia também em mulheres que não possuam patologias autoimunes, como lúpus e síndrome antifosfolípido.

Gestantes com pré-eclâmpsia possuem um aumento de produtos circulantes, ativadores do sistema do complemento, além de apresentarem também um aumento de produtos do complemento na placenta (SALMON, *et al.* 2011; BUURMA, *et al.* 2012).

As manifestações clínicas da pré-eclâmpsia representam as respostas sistêmicas maternas para um excesso de fatores antiangiogênicos liberados através da placenta hipoperfundida. Manifestações da doença variam de uma leve elevação da pressão sanguínea até uma grave hipertensão com síndrome HELLP (hemólise, elevação das enzimas hepáticas e plaquetas baixas) ou eclâmpsia.

A síndrome HELLP é uma das mais severas complicações da pré-eclâmpsia ocorrendo em aproximadamente 3% das gestantes com pré-eclâmpsia. Já a eclâmpsia é bastante rara afetando 1 em 2000 gestantes nos países desenvolvidos e 1 em 100 até 1 em 1700 nos países menos desenvolvidos (CLARKE, *et al.* 2008).

1.2 ÍNDICES PLAQUETÁRIOS

As plaquetas são células anucleadas produzidas e liberadas por sua célula precursora, o megacariócito. O megacariócito é uma célula mielóide rara, que se situa principalmente na medula óssea, mas pode ser também encontrado no sangue periférico, pulmão ou baço (HARRISON 2007). O processo de megacariopoiese até a formação das plaquetas ocorre dentro da medula óssea e é muito complexo e pouco compreendido. Em 1906, Wright (*apud* PEREZ RUIZ, *et al.* 1997), sugeriu que as plaquetas poderiam surgir de extensões citoplasmáticas de megacariócitos. Esta teoria ainda persiste e hoje sabemos que as plaquetas são produzidas e liberadas a partir de projeções citoplasmáticas do megacariócito, chamadas de pró-plaquetas. Durante o processo de maturação o núcleo do megacariócito replica por endomitose até se tornar granular e liberar mais de 2000 plaquetas (HARRISON, 2007).

A trombocitopenia induz a uma rápida produção de plaquetas pela medula óssea para compensação demonstrando que há um sistema regulatório do número de plaquetas. Pacientes com trombocitopenia apresentam o VPM (Volume Plaquetário Médio) aumentado enquanto que pacientes com aumento do número de plaquetas geralmente possuem o VPM diminuído. Isto sugere que há um mecanismo de autocontrole do sangue periférico para a medula óssea em relação à produção de plaquetas (HARRISON, 2007).

A trombopoetina (TPO) é o principal fator de crescimento fisiológico para a linhagem megacariocítica, possuindo ação estimulante sobre a célula tronco pluripotente e células progenitoras jovens assim como participação na maturação dos megacariócitos, aumentando a produção das plaquetas (DEUTSCH, *et al.* 2006; KAUSHANSKY, *et al.* 2009). A TPO regula todas as fases de desenvolvimento do megacariócito desde a célula tronco pluripotente até a maturação citoplasmática.

As interleucinas-3 (IL-3), 6 (IL-6) e 11 (IL-11) também promovem o crescimento de precursores trombopoieticos, a maturação de megacariócitos, estimulando o desenvolvimento e a produção de plaquetas *in vivo* (HARRISON, 2007).

As plaquetas, células metabolicamente ativas, complexas e multifuncionais, medem em torno de 2 a 4 μm . Devido a sua multifuncionalidade, elas exercem, além de suas funções principais em hemostasia e trombose, importante papel em vários processos fisiológicos como retração do coágulo, vasoconstrição, inflamação e reparação, defesa do hospedeiro e crescimento de tumores (HARRISON, 2005; 2007).

A contagem de plaquetas em indivíduos normais é de $150-400 \times 10^9/\text{L}$, com meia vida curta de aproximadamente 10 dias (BRIGGS, *et al.* 2007; HARRISON, 2007). As plaquetas têm propriedades de adesão, agregação, secreção do conteúdo de seus grânulos e uma atividade pró-coagulante, uma vez que, em sua superfície, ocorre a ativação dos fatores de coagulação. A ligação da plaqueta à superfície do endotélio vascular se dá através da ligação entre a glicoproteína Ib/IX/V, que encontra-se na superfície das plaquetas, e o colágeno que fica exposto quando ocorre lesão do endotélio. Esta ligação é facilitada pelo fator Von Willebrand que tem função de alça de ligação (HARRISON, 2007).

As plaquetas são também responsáveis pela secreção e agregação plaquetária (RODACK; FRITSMA, 2007). Todas essas responsabilidades e funções das plaquetas servem para formação rápida do trombo plaquetário que irá ocluir a lesão e prevenir o sangramento (HARRISON, 2005). Qualquer defeito em uma dessas funções ou no número total de plaquetas pode prejudicar a hemostasia e aumentar o risco de sangramento. Por outro lado, um aumento no número total ou na reatividade de plaquetas pode levar à formação inapropriada de trombos.

1.3 ÍNDICES PLAQUETÁRIOS *VERSUS* GESTAÇÃO

Alterações hemostáticas ocorrem durante a gestação deslocando o equilíbrio a favor da hipercoagulabilidade, com risco aumentado para trombose. A contagem total de plaquetas durante a gestação normal parece diminuir ou não sofrer alteração. Aparentemente este declínio no valor total das plaquetas na gestação normal parece ser dilucional, pois há evidências que não ocorre aumento na produção de plaquetas pela medula óssea (RINDER, *et al.* 1994).

A ativação plaquetária é parte da hipercoagulabilidade da gestação normal que é resultante de um aumento de pró-coagulantes, como o fator VIII, e uma diminuição dos anticoagulantes fisiológicos como a proteína S, que atua com a proteína C (BRENNER, *et al.* 2004). Sabe-se também que a gestação causa modificações na membrana das plaquetas, tendo um aumento da atividade da Ca^{2+} adenosina trifosfatase, diminuição da fluidificação de membrana e redução da concentração do colesterol (RABINI, *et al.* 1995; KAZMI, COOPER *et al.* 2011).

As mudanças hemostáticas, incluindo alterações nas plaquetas, estão acentuadas na síndrome de pré-eclâmpsia (SPE). Estruturalmente a membrana das plaquetas mostra composição anormal de lipídios com aumento de colesterol-fosfolípido além de redução na atividade Na/K-adenosina trifosfatase porém, como na gestação normal, a atividade da Ca^{2+} adenosina trifosfatase permanece elevada. É também reconhecido que a atividade da proteína C quinase no citosol e na membrana das plaquetas de pacientes com hipertensão induzida pela gestação é mais alta que em gestantes normais (COATA, *et al.* 1992; KAZMI, COOPER *et al.* 2011).

Há evidências da ativação do sistema hemostático na SPE, demonstrado através da ativação das plaquetas, elevação do fibrinogênio plasmático e do fator Von Willebrand além de elevados níveis de moléculas de adesão ao endotélio. As plaquetas expressam na sua superfície glicoproteínas, como os receptores de fibrinogênio (GPIIb/IIIa; CD41/CD61) e os receptores de Von Willebrand (Vwfr; gpIb/IX; CD42a/CD42b).

Já a P-selectina (CD62P) e glicoproteína 53 (CD63) estão localizadas nos grânulos internos das plaquetas. Na ativação plaquetária ocorre um aumento do número de receptores de membrana celular de fibrinogênio (CD61) (STAR, *et al.* 1997) e a concentração de fator de Von Willebrand na membrana celular diminui (KAWANO, *et al.* 1999). A ativação plaquetária induz o deslocamento de CD62P e CD63 dos grânulos internos das plaquetas para a superfície através de exocitose. A expressão basal de CD61, CD42a, CD62P, e adenosina difosfato (ADP), estimuladora da expressão de CD62P nas plaquetas, está aumentada em gestantes com pré-eclâmpsia quando comparadas a gestantes normotensas, mostrando a importância das plaquetas na doença (HOLTHE, *et al.* 2004).

Durante a gestação normal, as plaquetas geralmente não apresentam modificações, porém, a trombocitopenia é relativamente comum na gestação.

Número de plaquetas inferior a 150000/ μ L é reportado em cerca de 10% de todas as gestações e 1% das gestantes possuem a contagem de plaquetas menor que 100000/ μ L (AHMED, *et al.* 1993; BOEHLEN, *et al.* 2000; VALERA, *et al.* 2010).

Além da trombocitopenia durante a gestação e a pré-eclâmpsia (REDMAN, *et al.* 1978; BOEHLEN, *et al.* 2000), outros índices plaquetários também podem sofrer alterações. Os valores de VPM e PDW (Largura de Distribuição das Plaquetas) estão proporcionalmente aumentados em relação à gravidade da pré-eclâmpsia quando comparados a um grupo de gestantes normais (AHMED, *et al.* 1993; JAREMO, *et al.* 2000; ANNAM, *et al.* 2011; DADHICH, *et al.* 2012; YANG, *et al.* 2014). Apesar de haver um aumento no VPM, a utilização deste parâmetro como teste de triagem possui algumas limitações. O EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), apesar de ser o anticoagulante de escolha na coleta de sangue para a contagem das plaquetas, pode induzir alterações na forma e na ultraestrutura das mesmas. As plaquetas coletadas com o EDTA sofrem modificações com o tempo e a temperatura tornando o índice VPM bastante instável e pouco confiável (BATH, 1996; DASTJERDI, *et al.* 2006). Novos equipamentos e novas metodologias possibilitaram a quantificação das plaquetas imaturas.

As plaquetas imaturas são plaquetas maiores e mais reativas do que as plaquetas maduras. Elas contêm RNA (Ácido Ribonucleico) em seu citoplasma e são análogas aos reticulócitos da série dos eritrócitos, também chamadas de plaquetas reticuladas. O número de plaquetas imaturas refletem o grau de atividade da trombopoiese e pode ser utilizado para distinguir as causas de trombocitopenia (JUNG, *et al.* 2010) sendo um parâmetro mais estável que o VPM (BRIGGS, *et al.* 2004). Quando a trombocitopenia for causada por falha na medula óssea o percentual de plaquetas imaturas estará diminuído, enquanto que no caso da trombocitopenia causada por destruição periférica, o percentual de plaquetas imaturas estará aumentado (JUNG, *et al.* 2010).

Outra importante utilização deste parâmetro é o monitoramento da recuperação da medula óssea após o transplante (ZUCKER, *et al.* 2006). Após o transplante de células progenitoras hematopoiéticas, a contagem de plaquetas imaturas se recupera significativamente mais rápido que a contagem total das plaquetas (ZUCKER, *et al.* 2006). Elas são também utilizadas no monitoramento de transfusões sanguíneas, implementando uma política de transfusão profilática de plaquetas mais controlada e definindo limites de contagens específicos,

principalmente quando a recuperação plaquetária é iminente. Auxilia também na redução do uso de concentrados plaquetários e as possíveis infecções adquiridas por transfusão (BRIGGS, *et al.* 2006).

Pacientes que possuem a atividade do megacariócito diminuída possuem plaquetas com pouco RNA em seu citoplasma enquanto que, quando a atividade do megacariócito está elevada ocorre um aumento do RNA citoplasmático.

Estas plaquetas são quantificadas nos novos aparelhos automatizados que empregam citometria de fluxo fluorescente, através do índice chamado IPF (fração de plaquetas imaturas). A IPF é fornecido em porcentagem e em valores absolutos. O valor de referência para este parâmetro varia de 1,0-7,0% (BRIGGS,*et al.* 2004; KICKLER, *et al.* 2006; JUNG, *et al.* 2010).

A metodologia utilizada para a obtenção da IPF é a citometria de fluxo com fluorescência ótica, utilizando corantes específicos, o polimetina e o oxazina. Estes dois corantes penetram no citoplasma das plaquetas e dos eritrócitos corando o RNA das mesmas, sendo a metodologia utilizada também para contagem de reticulócitos. As células passam através de um feixe de laser semiconductor onde o volume celular e a intensidade da fluorescência gerada é mensurada. Após, um algoritmo informatizado separa as plaquetas maduras das plaquetas imaturas. Este processo de separação é realizado através das cores, as plaquetas imaturas são plotadas com pontos verdes, enquanto as plaquetas maduras são plotadas com pontos azuis.

Vários investigadores, demonstraram diminuição das plaquetas circulantes e um aumento do VPM em mulheres com pré-eclâmpsia (AHMED, *et al.* 1993; HOWARTH, *et al.* 1999; JAREMO,. 2000; DUNDAR, *et al.* 2008; ANNAM.,2011; DADHICH 2012; FREITAS, *et al.* 2013) mas raros são os dados sobre plaquetas imaturas. Na literatura há somente um estudo sugerindo aumento de plaquetas reticuladas em pacientes com distúrbios hipertensivos (RINDER, *et al.* 1994).

A contagem das plaquetas e mensuração dos índices plaquetários são métodos rápidos, baratos e de fácil obtenção em laboratórios e hospitais que trabalham com tecnologia avançada de automação, podendo ser útil, como teste de triagem, para identificação precoce de pré-eclâmpsia e eclâmpsia (ANNAM, *et al.* 2011).

A contagem da IPF é um exame de fácil obtenção que ainda necessita ser muito estudado para verificar sua relevância clínica no auxílio do diagnóstico e

diferenciação da pré-eclâmpsia, pré-eclâmpsia sobreposta e outros distúrbios hipertensivos da gestação.

DESENVOLVIMENTO

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os índices plaquetários (VPM e IPF) e a contagem total de plaquetas nas pacientes gestantes normais, com síndrome de pré-eclâmpsia e com outros distúrbios hipertensivos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a associação entre a IPF e a ocorrência de SPE.
- Comparar a IPF entre gestantes normais com gestantes com SPE ou outros distúrbios hipertensivos da gestação.
- Correlacionar marcadores de gravidade da SPE com a IPF

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO

Estudo transversal controlado.

3.2 SUJEITOS DA PESQUISA

O presente estudo foi realizado com 99 gestantes que receberam assistência no Hospital São Lucas da PUCRS. A seleção foi aleatória, de acordo com a chegada ao ambulatório, centro obstétrico e/ou alojamento conjunto. Foi preenchida ficha de inclusão que consta de dados de anamnese, exame físico e exames complementares, através do preenchimento do protocolo de coleta de dados (ANEXO A), incluindo uma coleta de 4mL de sangue. Todas pacientes foram devidamente informadas sobre a pesquisa, e foram incluídas somente após a assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B), parecer nº 105.164.

As pacientes gestantes normais foram nosso grupo controle.



Figura 1 – Fluxograma de inclusão das amostras.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

O início deste estudo ocorreu após avaliação e emissão do Parecer de Aprovação da Comissão Científica (ANEXO C e D) e pelo Comitê de Ética da instituição envolvida (ANEXO E). Foram incluídas somente as pacientes que concordaram e assinaram o TCLE.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas neste estudo gestantes normotensas, com SPE e outros distúrbios hipertensivos da gestação classificadas de acordo com relatório do *National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy* (NHBPEPWGHBPP).

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas do estudo pacientes gestantes com história de trombose venosa e arterial, doença renal e infecções. As gestantes aparentemente normais com uma cruz ou mais de proteinúria no EQU, não foram incluídas.

3.6 DEFINIÇÕES

Hipertensão arterial na gestação: Pressão arterial maior ou igual a 140/90 mmHg em pelo menos duas medidas.

Proteinúria patológica: Excreção urinária de proteínas acima de 300 mg/24 horas, ou alternativamente um índice de proteína urinária/creatinina urinária em amostra isolada de urina maior do que 0,3.

Pré-eclâmpsia: Hipertensão arterial na gestação em mulher com mais de 20 semanas de gravidez, acompanhada de proteinúria patológica.

Pré-eclâmpsia sobreposta: Hipertensão arterial na gestação em mulher com mais de 20 semanas de gravidez, acompanhada de proteinúria patológica e com história prévia de hipertensão arterial sistêmica e/ou nefropatia. Também serão consideradas aquelas pacientes que persistirem hipertensas ou com proteinúria patológica 12 semanas após o parto.

Síndrome de pré-eclâmpsia: Termo empregado para as gestantes com pré-eclâmpsia ou pré-eclâmpsia sobreposta quando não é possível definir o diagnóstico no momento da avaliação.

Hipertensão gestacional sem proteinúria: Termo empregado para as gestantes hipertensas gestacionais e hipertensas crônicas.

Gestantes normotensas: Termo empregado para classificar as gestantes sem hipertensão ou outra complicação. Utilizadas como grupo controle.

Hipertensão grave: Termo empregado para as gestantes hipertensas com pressão arterial sistólica ≥ 160 mmHg, e proteinúria ≥ 2 g (MAGEE, et al. 2008; NHBPEPWGHBPP, 2000).

3.7 MATERIAIS

As amostras foram coletadas em tubos da marca Vacuette[®] de 4mL com anticoagulante EDTA. O processamento das mesmas foi realizado no aparelho Sysmex XE-5000 Corporation, Kobe, Japão que utiliza um kit de reagentes específicos (Sysmex, Brasil) adquiridos de fornecedor exclusivo (Roche), o qual, através da doação destes reagentes possibilitou a realização do estudo.

3.8 METODOLOGIA

As contagens dos índices plaquetários e a contagem total de plaquetas nas pacientes gestantes normais, com pré-eclampsia e outros distúrbios hipertensivos da gestação do Hospital São Lucas da PUCRS foram realizadas no contador automatizado XE-5000 Sysmex Corporation, já mencionado, do Laboratório de Patologia Clínica-setor Hematologia. Esse aparelho realiza a contagem de plaquetas e parâmetros plaquetários por impedância elétrica (corrente direta), através do qual as células são classificadas por volume. Além desta metodologia o analisador também apresenta um segundo método denominado ótico com fluorescência, que classifica as células pelo volume e pela fluorescência gerada, evitando resultados não confiáveis quando há interferências. Esta metodologia apresenta um parâmetro inovador, chamado IPF que será quantificado nas pacientes do estudo.

A figura a seguir ilustra a metodologia da avaliação das plaquetas imaturas por citometria de fluxo

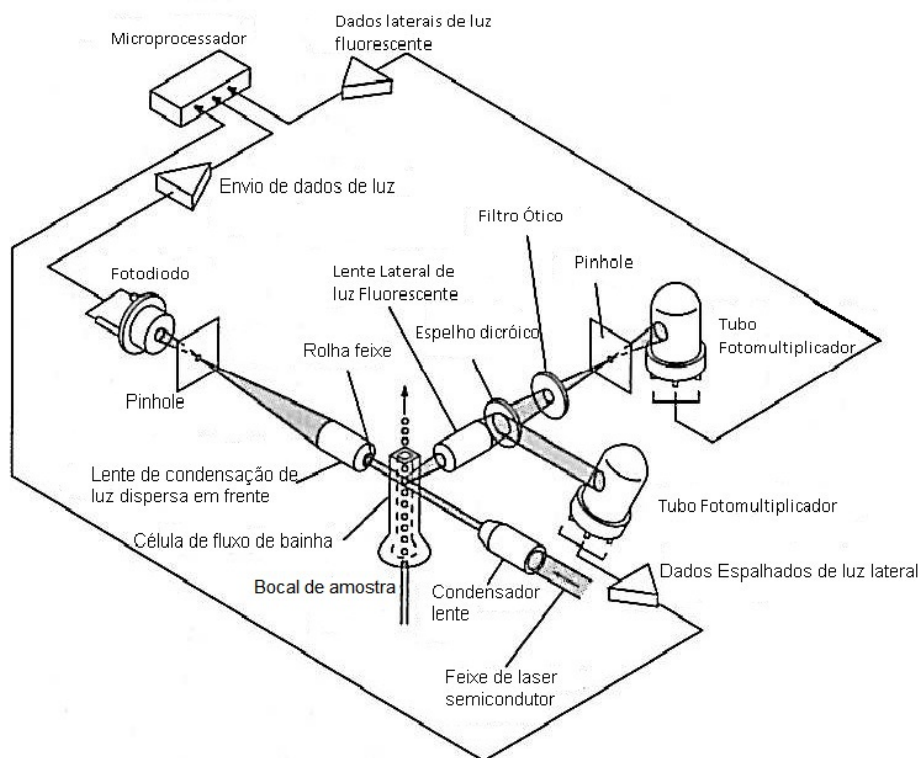


Figura 2 Metodologia de avaliação das plaquetas imaturas (Adaptado de XE-5000-Instruction for use- Sysmex).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando SPSS para Windows versão 21.0. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil para variáveis simétricas e assimétricas respectivamente. Percentagem foi utilizada para expressar variáveis categóricas. Qui-quadrado foi utilizado na comparação dessas variáveis.

Foi realizado análise de variância para as variáveis contínuas simétricas; às assimétricas foi aplicado o logaritmo da medida antes da análise de variância. ANOVA e Qui-quadrado (ou Fisher) foram empregados para comparar os três grupos. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos.

O tamanho amostral foi calculado com auxílio de estatístico considerando alfa=0.05, magnitude do efeito de 0.8 desvios padrão e poder de 90% ($\beta = 0,10$), resultando em 34 pacientes por grupo.

4 CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTA DISSERTAÇÃO

O Programa de Pós Graduação da Universidade Católica do Rio Grande do Sul segue as regras padrões para realização da dissertação final para mestrado segundo o modelo para apresentação de trabalhos Acadêmicos, Teses e Dissertações elaborado pela Biblioteca Central Irmão José Otão.

O modelo segue a **ABNT NBR 14724**: Trabalhos Acadêmicos – apresentação, atualizada em abril de 2011 e demais normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) relacionadas ao assunto.

5 RESULTADOS

A avaliação dos índices plaquetários foi realizada em 5 gestantes aleatórias para verificação da reprodutibilidade do método. Foram realizados 5 medidas por indivíduo em 5 gestantes diferentes. O coeficiente de variabilidade (CV) para a IPF foi 10,2 (DP 2,5; Min 7,57; Max 13,6) e para o VPM o CV foi de 1,3 (DP 1; Mediana 0,86; Min 0,75; Max 3,2).

As figuras 3a e 3b ilustram exemplos de gráficos da contagem das plaquetas gerados pelo equipamento Sysmex XE-5000. No gráfico 3a está a avaliação de uma gestante normal, sem pré-eclâmpsia ou outra complicação. O valor da IPF foi de 4,0%, com total de plaquetas de $234 \times 10^9/L$ e o VPM de 10,9 fL.

O gráfico da Figura 3b ilustra o caso de uma paciente gestante com pré-eclâmpsia grave. O valor da IPF é de 18%, plaquetas de $167 \times 10^9/L$ e o VPM de 13,6 fL.

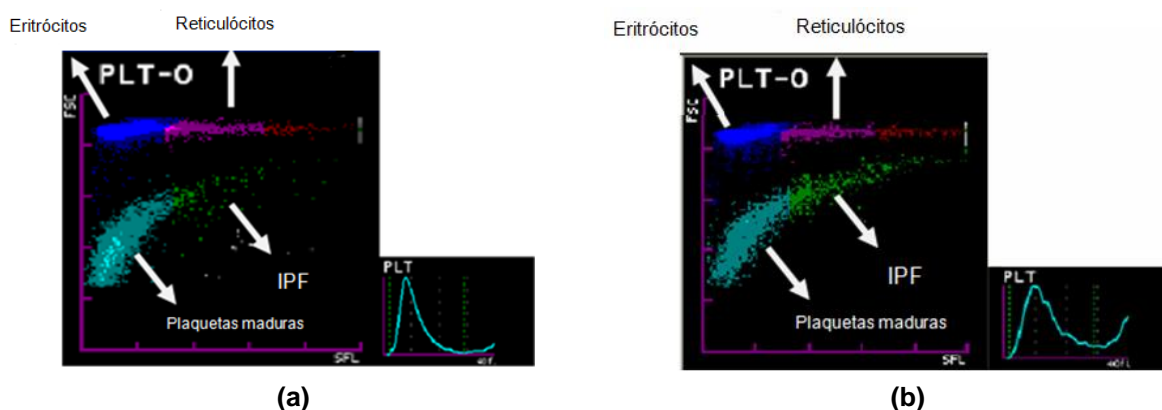


Figura 3 – (a) Paciente gestante sem pré-eclâmpsia ou outra complicação, com valor das plaquetas imaturas normal (IPF=4%). **(b)** Paciente gestante com pré-eclâmpsia grave, com valor das plaquetas imaturas alterado (IPF=18%).

PLT= Plaquetas; **FSC** = Volume celular; **SFL**= Fluorescência
IPF= Fração de Plaquetas Imaturas; **PLT-O**= Plaquetas ótica (metodologia)

5.1 Sujeitos

Os dados clínicos e demográficos de todas as participantes estão demonstrados na Tabela 1. O número de gestações não foi diferente entre os grupos, mas o número de abortos prévios foi maior no grupo controle NT 9 (28,1%),

SPE 6 (18,2%) e HGsP 3 (10%), $P= 0,047$). As idades materna e gestacional não foram diferentes entre os grupos ($P=0,762$) no momento da coleta, entretanto houve diferença significativa na idade gestacional no momento do parto ($P=0,001$), assim como nos níveis pressóricos ($P< 0,001$) e peso do neonato ($P=0,006$).

Tabela 1 - Dados clínicos e demográficos das gestantes

	NT (n=33)	SPE (n=34)	HGsP (n=32)	P
Idade, anos (média ± DP)	24,7±6,6	27,5±7,7	27,8± 7,3	0,167
Caucasiano, n (%)	24 (72,7)	20 (58,8)	15 (46,9)	0,155
Gestações, n (%)	13 (39,4)	20 (58,8)	15 (46,9)	0,116
Idade gestacional, semanas (média ± DP) na coleta	36,3±3,1	35,8±3,6	36,4±3,4	0,762
Idade gestacional, semanas (média ± DP) no parto	39,3±1,6 ^a	36,6±2,9 ^b	37,6±2,2 ^b	<0,001
Pressão arterial sistólica, mmHg (média ± DP)	114,1±11,2 ^a	156,7±13,5 ^b	157,1±11,3 ^b	<0,001
Pressão arterial diastólica, mmHg (média ± DP)	72,4±11,1 ^a	101,4±8,8 ^b	100,3±12,26 ^b	<0,001
Razão Proteinúria/Creatininúria (P/C), g/g (mediana – IIQ)	*	2,15(0,412,80) ^a	0,14(0,0810,19) ^b	<0,001
Parto normal, n (%)	13(65) ^a	8 (24,2) ^b	19(61,3) ^b	0,007
Peso do Rn, Kg (média ± DP)	3366±516 ^a	2737,7±779 ^b	2,948±737 ^b	0,006
Classificação do RN				
AIG, n (%)	19(82,6)	26 (78,8)	23 (74,2)	0,243
GIG, n (%)	19(82,6)	1 (3,0)	2 (6,5)	
PIG, n (%)	1 (4,3)	6 (18,2)	6 (19,4)	

NT: Normotensas; SPE: Síndrome de Pré-eclâmpsia ; HGsP: Hipertensão Gestacional sem proteinúria; IIQ: Intervalo interquartil; * Grupo NT teste de proteinúria negativo na fita reagente. P: ANOVA ou Qui-Quadrado . AIG: Normal para idade gestacional; GIG: Grande para idade gestacional; PIG: Pequeno para idade gestacional. ^{a, b} Letras índices diferentes mostram as diferenças estatisticamente significativas.

5.2 Testes Laboratoriais

Os parâmetros hemoglobina, leucócitos, eritrócitos e número total de plaquetas não se mostraram significativamente diferentes entre os grupos de gestantes SPE, HGsP e NT ($P>0,05$). Quatro pacientes do grupo SPE (11,7%) e cinco pacientes no grupo HGsP (15,6%) apresentaram o número total de plaquetas abaixo de $150 \times 10^9/L$, enquanto que somente uma paciente no grupo NT (3,0%) apresentou contagem de plaquetas abaixo de $150 \times 10^9/L$ ($P= 0,24$, Teste de Fisher). Apesar de ter sido encontrado uma diferença aparente entre os grupos, esta ainda não é estatisticamente significativa. A contagem mais baixa de plaquetas $104000/\mu L$ foi em uma paciente com pré-eclâmpsia.

Os índices plaquetários IPF, VPM e PDW foram estatisticamente diferentes entre o grupo NT e os grupos SPE e HGsP ($P<0,05$). Os dados estão apresentados na Tabela 2 e Figuras 4 e 5.

Não encontramos associação entre a gravidade do distúrbio hipertensivo e a IPF. A IPF não apresentou diferença estatística nas pacientes com proteinúria acima de 2 g/g de creatinúria em comparação com aquelas com valores menores (Proteinúria $\geq 2g/g$ - mediana 5,75% e IIQ 4,98-11,83; Proteinúria $<2g/g$ mediana 6,70% e IIQ 5,05-9,93; $P= 0,757$). Não encontramos diferença na IPF das pacientes com hipertensão grave em comparação com aquelas com hipertensão arterial considerada não grave - pressão arterial sistêmica < 160 mmHg (Hipertensão grave - mediana 5,95% e IIQ 4,75-8,70; Hipertensão não grave - mediana 7,35% e IIQ 5,30-10,38; $P= 0,415$).

Quando comparamos aquelas gestantes com proteinúria $\geq 2g$ e com pressão arterial sistólica ≥ 160 mmHg com aquelas sem estes marcadores de gravidade, verificamos que a IPF nas pacientes com ambos marcadores de gravidade presentes (mediana 5,9%; IIQ 4,0-8,95) não foi diferente daquelas sem os 2 marcadores de gravidade (mediana 6,6%; 5,2-10,30; $P= 0,970$). As pacientes com estes 2 marcadores presentes apresentavam VPM médio de 11,7 fL ($DP \pm 1,20$) versus média 11,8 fL ($DP \pm 0,99$; $P= 0,950$) nas demais gestantes. O PDW apresentou resultados semelhantes com 14,66 fL ($DP \pm 2,62$) versus 15,69 fL ($DP \pm 2,84$) respectivamente ($P=0,654$). Considerando o peso do recém nascido como um marcador de desfecho, não ocorreu diferença na IPF nos diferentes

estratos de adequação do peso do recém nascido em relação a idade gestacional (Normal para idade gestacional: mediana 5,6% (IIQ 3,80-9,50), Grande para idade gestacional: mediana 5,2% (1,70-8,050), Pequeno para idade gestacional: mediana 6,1% (4,7-9,0) $P= 0,820$). Se considerarmos o ponto de corte de 6,1% para a IPF, verificamos que 3 (50%) com hipertensão grave apresentavam IPF acima do normal em comparação com 33 (55%) sem hipertensão grave. As gestantes com proteinúria grave, apresentavam IPF acima de 6,1%, em 5 casos (45,5%) comparadas com 6 (54,5%, $P= 0,529$) das demais.

Tabela 2 Dados Hematimétricos

Índices	NT	SPE	HGsP	P
Sanguíneos	(n=33)	(n=34)	(n=32)	
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	4,0±0,4	4,15±0,4	4,1±0,4	0,091
Leucócitos(μL)	10402±2063	11209±2930	10751±2073	0,389
Hematócrito(%)	35,4±2,8	36,1±3,0	35,9±2,9	0,538
Hemoglobina (g/dL)	11,8±0,91	12,26±1,16	12,2±1,0	0,127
Plaquetas ($10^9/\text{L}$)	236±53	209±66	214±58	0,155
Plaquetas maduras ($10^9/\text{L}$)	227±53 ^a	192±64 ^b	200±61 ^b	0,047
IPF (%)	3,8(2,4-5,1) ^a	8,6(5,83-10,60) ^b	7,3(4,2-10,18) ^b	<0,001
IPF absoluto (μL)	8662±3908 ^a	16951±7424 ^b	13805±5097 ^b	<0,001
VPM (fL)	10,6±0,9 ^a	12,1±1,0 ^b	11,6±1,0 ^b	<0,001
PDW (fL)	12,8±1,7 ^a	15,963±2,7 ^b	15,259±2,9 ^b	<0,001
PCT (%)	0,25±0,05	0,25±0,08	0,24±0,05	0,940

IPF= Fração de plaquetas imaturas; VPM= Volume Plaquetário Médio; PDW= Largura de distribuição plaquetária; PCT=Plaquetócrito. ^{a, b} Letras índices diferentes mostram as diferenças estatisticamente significativas.

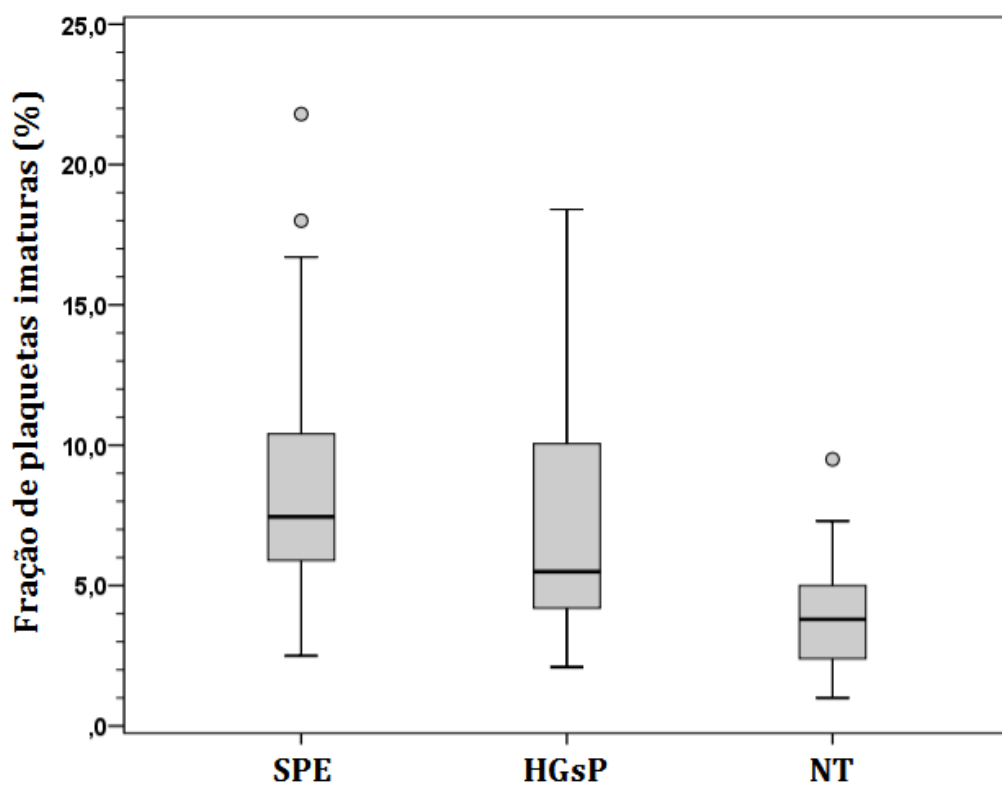


Figura 4: Distribuição das pacientes de acordo com o IPF

*SPE= Síndrome de Pré-Eclâmpsia, HGsP= Hipertensão Arterial sem Proteinúria, NT= Normotensas, IPF= Fração de Plaquetas Imaturas

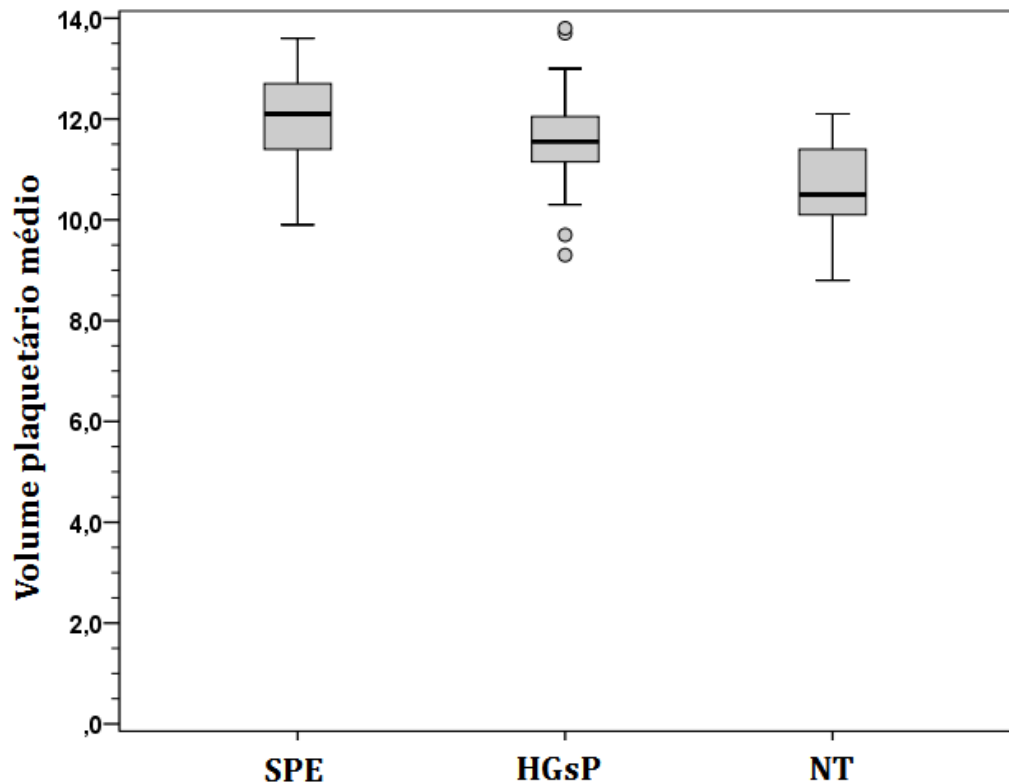


Figura 5: Distribuição das pacientes de acordo com o VPM.

***SPE**= Síndrome de Pré-Eclâmpsia, **HGsP**= Hipertensão Arterial sem Proteinúria, **NT**= Normotensas, **VPM**= Volume Plaquetário Médio

A percentagem de pacientes com SPE com IPF acima do ponto de corte de 6,1% (BRIGGS, et al. 2004) foi de 65%, já em HGsP foi de 43,8% e de 9% nas pacientes do grupo NT, $p < 0,001$ (Figura 5). Dados relativos ao VPM mostram que 34,4% das pacientes SPE possuem resultados acima do ponto de corte de 12,5% (FUZER, et al. 2005) sendo que no grupo HGsP foi de 18,8% e nenhuma paciente do grupo NT apresentou resultado aumentado para o VPM, $P < 0,001$ (Figura 6).

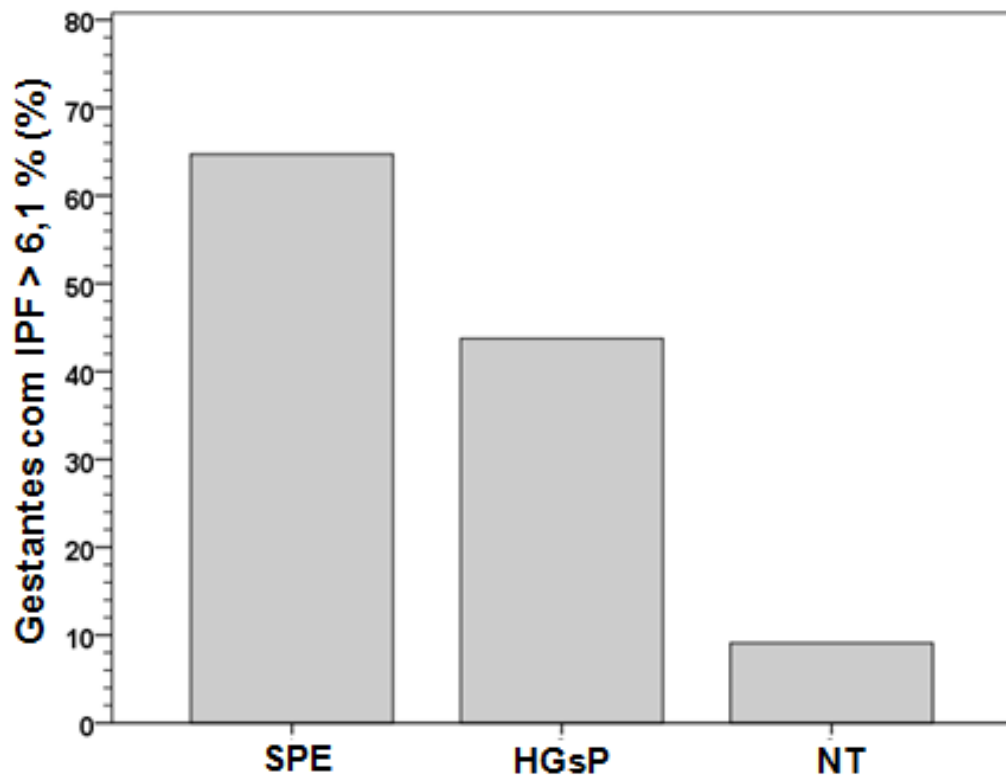


Figura 6. Distribuição percentual de pacientes com Fração de Plaquetas Imaturas superior a 6,1 %.
*SPE= Síndrome de Pré-Eclâmpsia, HGsP= Hipertensão Arterial sem Proteinúria, NT= Normotensas

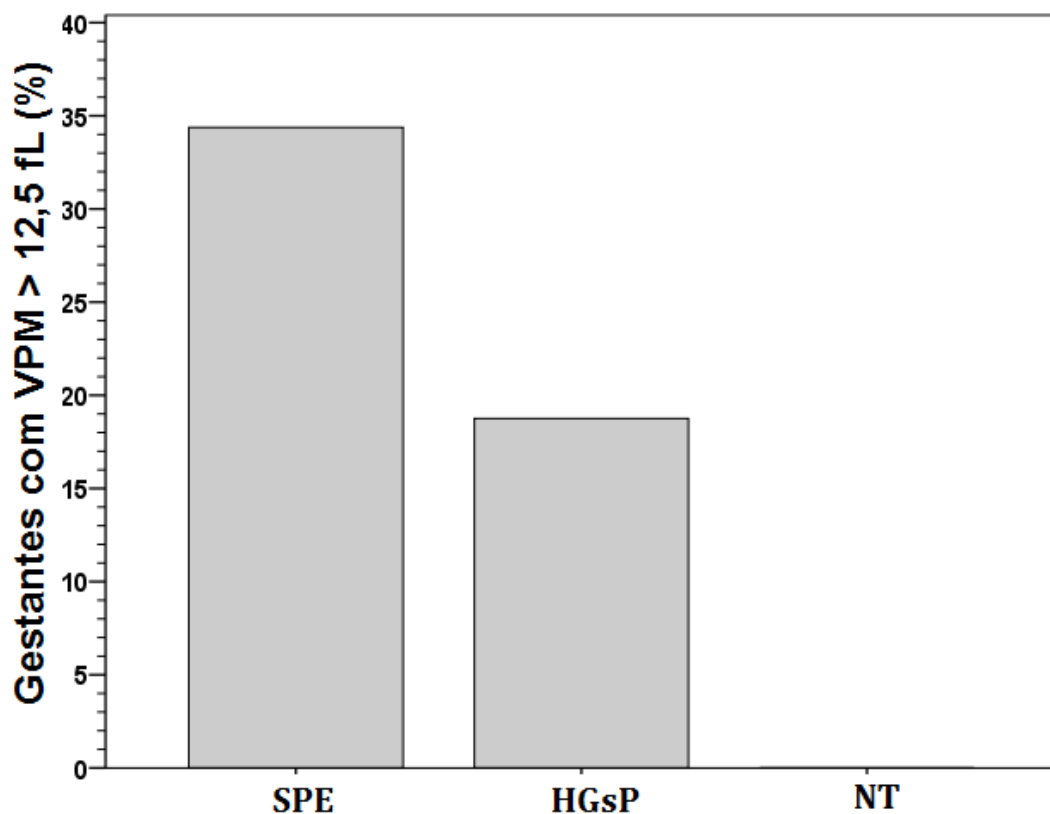


Figura 7. Distribuição percentual de pacientes com Volume Plaquetário Médio superior a 12,5 fL.

***SPE**= Síndrome de Pré-Eclâmpsia, **HGsP**= Hipertensão Arterial sem Proteinúria **NT**= Normotensas

A IPF foi também plotada na curva ROC (Receiver Operating Characteristic) para avaliar seu valor como teste de rastreamento ou diagnóstico de DHG (Figura 7). O valor da área sob a curva para o diagnóstico de hipertensão na gestação foi de 0,83. Se considerarmos o ponto de corte da literatura (Briggs et al 2004) de 6,1% a sensibilidade seria de 0,56 e a especificidade 0,88. A área sob a curva para o VPM foi discretamente inferior a da IPF (0,81), portanto o gráfico não foi apresentado.

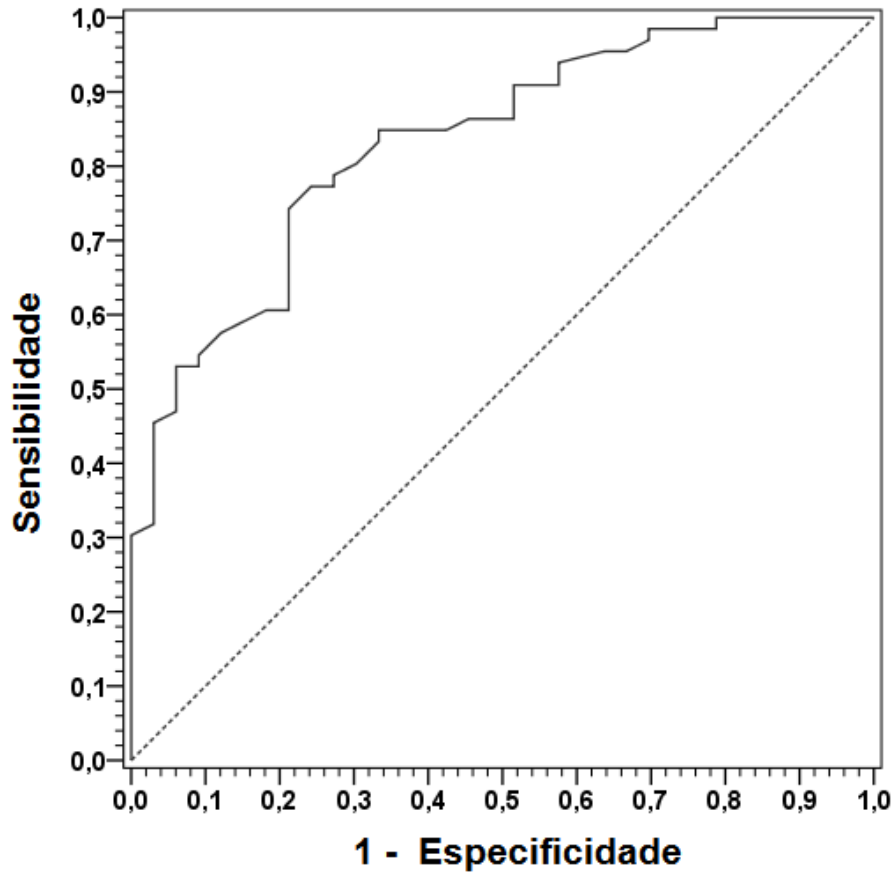


Figura 8. Curva ROC do IPF de gestantes GHsP e SPE.

IPF= Fração de Plaquetas Imaturas, HGsP= Hipertensão Arterial sem Proteinúria NT= Normotensas

6 DISCUSSÃO

Este trabalho foi concebido a partir de ideias comuns do grupo de Pesquisa de Nefrologia e o Laboratório de Patologia Clínica-Setor de Hematologia que interagem no Hospital São Lucas da PUCRS. O grupo de Pesquisa de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (FAMED-PUCRS) é uma unidade de pesquisa com especial interesse no estudo dos distúrbios hipertensivos da gestação. Juntamente com o Laboratório, que possui ampla infraestrutura e tecnologia, surgiu a ideia de pesquisar as plaquetas imaturas nas gestantes com pré-eclâmpsia. A concepção e execução do estudo são relativamente simples, mas apresentam resultados relevantes e interessantes. Os dados sobre as plaquetas imaturas na pré-eclâmpsia são escassos, pouco investigados e discutidos na literatura, justificando a realização deste projeto.

Os resultados do presente estudo apontam que tanto as pacientes com SPE, quanto aquelas com HGsP possuem plaquetas imaturas significativamente aumentadas quando comparadas ao grupo de gestantes normotensas. O mesmo foi demonstrado para o VPM e PDW.

Os grupos não apresentaram redução estatisticamente significativa na contagem total das plaquetas quando comparados entre si ou com os valores de referência. Este fato pode ser explicado pela produção contínua de plaquetas pela medula óssea, devido ao aumento do consumo periférico evidenciado pela elevação da IPF. Apesar do número de plaquetas maduras ter se apresentado estatisticamente diferente entre os grupos SPE e NT, a alteração da contagem não foi, aparentemente, clinicamente relevante. A ocorrência de plaquetas abaixo de 150000/ μ L foi mais frequente nos grupos de gestantes hipertensas do que nas gestantes normotensas, mesmo que não tenha alcançado significância estatística. Os resultados sugerem destruição aumentada de plaquetas na DHG.

Ainda há conflitos entre os resultados publicados na literatura em relação à contagem total de plaquetas e ao VPM durante a gestação normal e a pré-eclâmpsia. Alguns autores não encontraram diferenças no número total de plaquetas, assim como no VPM entre pacientes gestantes normotensas e hipertensas (MAKUYANA, et al. 2002; CEYHAN, et al. 2006). Por outro lado, vários trabalhos, como o presente estudo, evidenciaram diferenças significativas no VPM

entre gestantes normotensas e hipertensas, porém sem diferença nas contagens de plaquetas totais. É possível que essas divergências entre os estudos possam ser explicadas pelas diferentes tecnologias e anticoagulantes utilizados. Apesar do EDTA ser o anticoagulante de escolha para realização do teste o VPM aumenta significativamente na dependência da temperatura e tempo da coleta (BATH; BUTTERWORTH 1996; DASTJERDI, et al. 2006). A avaliação dos parâmetros hematológicos, no presente estudo, foi realizada em até 3 horas após a coleta. Este tempo é considerado adequado para avaliação das plaquetas imaturas, pois a IPF apresenta estabilidade por um período de 48 horas à temperatura ambiente (BRIGGS, et al. 2004).

Vários investigadores, ao longo dos anos, vêm estudando o comportamento das plaquetas e do VPM na gestação, principalmente na hipertensão (AHMED, et al. 1993; HOWARTH, et al. 1999; JAREMO, et al. 2000; DUNDAR, et al. 2008; ANNAM, 2011; FREITAS, et al. 2013). Os achados sugerem diminuição das plaquetas circulantes e um aumento do VPM em mulheres com pré-eclâmpsia. Dados sobre os demais índices são raros, especialmente em relação as plaquetas imaturas. Rinder et al (1994), publicaram o único estudo encontrado na literatura sobre as plaquetas reticuladas (imaturas) na gestação. O estudo de coorte evidencia o aumento das plaquetas imaturas em mulheres gestantes a partir de 28^a semanas de gestação antes do aparecimento dos outros sintomas clínicos da pré-eclâmpsia. Foram incluídas no trabalho mulheres nulíparas sem qualquer tipo de doença ou fazendo uso de medicações. Mulheres com história prévia de hipertensão, ou usando alguma medicação que pudesse comprometer a função plaquetária, ou história de doença vascular trombótica foram excluídas. O estudo incluiu mulheres não gestantes como grupo controle. A quantificação das plaquetas jovens foi realizada através de um método não invasivo que verifica a presença do RNA nas plaquetas circulantes por meio do corante fluorescente (o laranja de tiazole). Foi demonstrado que a diminuição das plaquetas na gestação normal não é acompanhada por um aumento de produção das mesmas pela medula óssea, o que sugere que, apesar da queda nas plaquetas, não ocorre uma resposta trombopoética compensatória. Entretanto, nas gestantes que posteriormente desenvolveram pré-elâmpsia ou hipertensão, ocorreu aumento na produção de plaquetas antes mesmo das primeiras manifestações em um pequeno número de

gestantes (RINDER *et al.* 1994). Nossos achados são compatíveis com os dados apresentados por Rinder e colaboradores.

A IPF possui importantes vantagens em relação à determinação do VPM. A principal delas é que o IPF mede o número de plaquetas recém liberadas pela medula óssea (BRIGGS, *et al.* 2007) alterações mais precoces do que aquelas apresentadas pelo VPM e pelo número total de plaquetas. Como mencionado anteriormente o tempo e temperatura podem afetar o resultado do VPM. É necessário mencionar que o VPM foi normal em todas as gestantes normotensas, fato que não ocorreu com a IPF. O foco principal na presente dissertação foi a IPF, devido a carência de dados na literatura. A partir da introdução de novas tecnologias na área laboratorial de hematologia é possível realizar de maneira rápida e acessível, inclusive na rotina assistencial, a mensuração de todos os índices plaquetários. A automação permite a realização de cerca de 180 testes por hora de maneira precisa e confiável, com custo acessível.

As plaquetas são células importantes no acompanhamento clínico das gestantes com pré-eclâmpsia e com síndrome HELLP (hemólise, alteração de enzimas hepáticas e trombocitopenia). As plaquetas são células de fácil obtenção e tem sido utilizadas em estudos na gestação e hipertensão na gestação (JAREMO, *et al.* 2000). Modificações na função plaquetária são descritas na gestação e podem servir de marcadores diagnósticos e prognósticos nos distúrbios hipertensivos da gestação.

A membrana plasmática, estrutura que delimita todas as células vivas, apresenta permeabilidade seletiva, mantendo desta maneira o equilíbrio entre os meios intra e extracelular. Porém, algumas doenças como a hipertensão arterial podem alterar propriedades da membrana, o que impede que ela exerça o seu principal papel de controle, impossibilitando que as células mantenham a concentração adequada de substâncias interna e externamente (RIBEIRO, *et al.* 1997). Na pré-eclâmpsia alteração de transporte de L-arginina e do metabolismo do óxido nítrico foram descritas em plaquetas (PIMENTEL, *et al.* 2013).

A via da L-arginina-óxido nítrico é muito importante na fisiopatologia da pré-eclâmpsia (GALAO, *et al.* 2004; PINHEIRO DA COSTA, *et al.* 2006) e está relacionada com a função endotelial. Disfunção endotelial é um achado marcante na SPE (VIEIRA, *et al.* 2013; CUNHA FILHO *et al.* 2010).

Na gestação também ocorrem modificações na membrana das plaquetas, incluindo um aumento da atividade de Ca^{2+} adenosina trifosfatase, diminuição da fluidez da membrana e redução da concentração do colesterol (RABINI, *et al.* 1995; KAZMI, *et al.* 2011). Em geral essas modificações encontradas na gestação normal estão acentuadas na pré-eclâmpsia.

As plaquetas ativadas possuem diferentes glicoproteínas em sua superfície quando comparadas com as plaquetas não ativadas. Anticorpos monoclonais específicos são utilizados para detectar diferentes estados de ativação plaquetária através da citometria de fluxo. A expressão elevada dos receptores CD61, CD42a e CD62P parecem estar associados com o aumento das plaquetas reticuladas na circulação. Na pré-eclâmpsia a implantação inadequada do citotrofoblasto pode ser o início para a disfunção endotelial e a ativação plaquetária. O contato das plaquetas com o endotélio lesado parece representar o desencadeamento da cascata de coagulação e o aumento do consumo plaquetário na circulação uteroplacentária o que resulta na diminuição das plaquetas circulantes e aumento da produção das mesmas pela medula óssea de maneira compensatória. Estudos mostram que a produção de plaquetas na DHG está aumentada em relação à gestação normal (RINDER, *et al.* 1994; DUNDAR, *et al.* 2008).

Tem sido descrito que na pré-eclâmpsia ocorre aumento da expressão de receptores na membrana das plaquetas: CD61, CD42a e CD62P, estimulando a expressão de ADP. Esses receptores relacionam-se respectivamente com fibrinogênio, fator Von Willebrand e P-selectina, o que indica ativação plaquetária associada à condição fisiopatológica da pré-eclâmpsia (KONIJNENBERG, *et al.* 1997; HOLTHE, *et al.* 2004). Estes receptores foram verificados na fração total de plaquetas, não sendo mencionada sua associação com plaquetas imaturas, pois o trabalho não diferenciou o estado de maturidade das células observadas. No presente estudo os mesmos receptores não foram investigados, entretanto sabe-se que a reatividade das plaquetas reticuladas é maior, e este fato pode estar associado ao aumento da ativação plaquetária sugerido pelo aumento da atividade dos receptores no estudo de Holthe *et al.* (2004).

O aumento do VPM e das plaquetas reticuladas foi relacionado com aumento da agregação plaquetária em resposta ao ADP e ao colágeno. Plaquetas jovens expressam níveis elevados de receptores de fibrinogênio GPIIb/IIIa entre outros, comparados com plaquetas maduras (JAREMO *et al.* 2000; McBANE *et al.*

2013), além de apresentarem uma maior propensão à formação de trombos (McBANE *et al.* 2013) o que sugere uma relação com as plaquetas reticuladas na pré-eclâmpsia. O aumento do VPM e IPF na SPE e HGsP indicam que há aumento na destruição das plaquetas evidenciado pela diminuição da meia vida das mesmas, com conseqüente aumento da renovação plaquetária e IPF. O aumento do PDW também reflete aumento da renovação plaquetária apoiando a ideia de diminuição da meia-vida e aumento da destruição das mesmas. O PDW mostra importante elevação em gestantes com pré-eclâmpsia grave sugerindo a sua utilização como biomarcador para predizer a gravidade da doença (YANG, *et al.* 2014).

A metodologia utilizada para obtenção dos índices plaquetários é acessível e simples para os laboratórios que comportam tecnologia avançada para realização do hemograma. O custo é baixo e a coleta do material sanguíneo está implantada na rotina assistencial de todos os centros hospitalares. Assim, a viabilidade de obtenção da IPF para a maioria dos laboratórios pode ser útil na avaliação de gestantes com doença hipertensiva gestacional. Novos biomarcadores tem sido procurados para diagnóstico precoce da pré-eclâmpsia. A curva ROC para a IPF mostrou uma razoável área sob a curva, porém não suficiente para que este seja um teste com grande aplicabilidade clínica para rastreamento dos distúrbios hipertensivos da gestação. Ele pode ajudar no diagnóstico diferencial em associação com as demais informações clínicas. Para que a IPF fosse considerado um bom biomarcador seria importante uma maior área sob a curva, portanto com melhor sensibilidade e especificidade.

O presente trabalho investigou a presença de plaquetas imaturas na SPE. Critérios de exclusão rígidos foram adotados rejeitando pacientes com qualquer patologia hematológica ou doença associada. A impossibilidade estatística de separar pré-eclâmpsia pura da pré-eclâmpsia sobreposta devido ao tamanho amostral, limita a análise da importância clínica da IPF na separação das mesmas. Por outro lado, há poucas evidências na literatura discutindo dados semelhantes. A importância deste estudo é o fornecimento de novas informações, investigando a relevância das plaquetas nesta síndrome. As plaquetas imaturas parecem estar associadas com as manifestações da DHG na gestação e este dado pode ser relevante na rotina assistencial. A continuidade deste trabalho investigando o comportamento da IPF ao longo da gestação e seus desfechos hipertensivos pode auxiliar no diagnóstico precoce da SPE.

CONCLUSÃO

7 Conclusão

Os índices plaquetários estão alterados nos distúrbios hipertensivos da gestação, com aumento da IPF e do VPM. Os índices plaquetários não são diferentes entre a Síndrome de Pré-eclâmpsia e a Hipertensão Gestacional não proteinúrica, e não estão associados com gravidade da Síndrome de Pré-eclâmpsia. Estes índices podem ser facilmente introduzidos na assistência clínica de gestantes. Mais estudos são necessários para recomendar o emprego destes marcadores na rotina diária, em especial a avaliação das alterações plaquetárias com defechos maternos e defechos fetais.

REFERÊNCIAS

ANNAM, Vamseedhar, Srinivasa, K., Santhosh, K., Suresh, D.R. Evaluation of platelet indices and platelet counts and their significance in preeclampsia and eclampsia. **International Journal of Biological and Medical Research** v.2, n.1p. 425-428, 2011.

AHMED, Yusuf *et al.* Retrospective analysis of platelet numbers and volumes in normal pregnancy and in pre-eclampsia. **International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 100, n. 3, p. 216-220, 1993.

BATH, P. M. W.; BUTTERWORTH, R. J. Platelet size: measurement, physiology and vascular disease. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 7, n. 2, p. 157-161, 1996

BOEHLEN, Françoise *et al.* Platelet count at term pregnancy: a reappraisal of the threshold. **Obstetrics & Gynecology**, v. 95, n. 1, p. 29-33, 2000

BRENNER, Benjamin *et al.* Thrombophilia and pregnancy complications. **Thrombosis and Haemostasis-Stuttgart-**, v. 92, p. 678-681, 2004.

BRIGGS, C.; HARRISON, P.; MACHIN, S. J. Continuing developments with the automated platelet count1. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 29, n. 2, p. 77-91, 2007.

BRIGGS, C. *et al.* Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation. **Transfusion Medicine**, v. 16, n. 2, p. 101-109, 2006.

BRIGGS, Carol *et al.* Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. **British Journal of Haematology**, v. 126, n. 1, p. 93-99, 2004.

BUURMA, Aletta *et al.* Preeclampsia is characterized by placental complement dysregulation. **Hypertension**, v. 60, n. 5, p. 1332-1337, 2012.

CEYHAN, Temel *et al.* The effect of pre-eclampsia on complete blood count, platelet count and mean platelet volume. **Annals of hematology**, v. 85, n. 5, p. 320-322, 2006.

CLARKE, Sonji D.; NELSON-PIERCY, Catherine. Pre-eclampsia and HELLP syndrome. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 9, n. 3, p. 110-114, 2008.

COATA, Giuliana *et al.* Abnormal platelet lipid membrane composition in pregnancy induced hypertension. **Journal of Perinatal Medicine-Official Journal of the WAPM**, v. 20, n. 2, p. 123-127, 1992.

DADHICH, Shaifali *et al.* Predictive Value of Platelet Indices in Development of Preeclampsia. **Journal of South Asian Federation of Obstetrics and Gynaecology**, v. 4, n. 1, p. 17-21, 2012.

DASTJERDI, Mansour Siavash *et al.* Mean platelet volume measurement, EDTA or citrate?. **Hematology**, v. 11, n. 5-6, p. 5-6, 2006.

DEUTSCH, Varda R.; TOMER, Aaron. Megakaryocyte development and platelet production. **British journal of haematology**, v. 134, n. 5, p. 453-466, 2006.

DOUGLAS, M. Joanne *et al.* The role of platelet counts in the assessment of inpatient women with preeclampsia. **Journal of Obstetric and Gynaecology Canada**, v. 33, n. 9, p. 900-908, 2011.

DULEY, Lelia. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. In:**Seminars in Perinatology**. WB Saunders, 2009. p. 130-137

DUNDAR, Ozgur *et al.* Longitudinal study of platelet size changes in gestation and predictive power of elevated MPV in development of pre ~~Eclampsia~~ **diagnosis**, v. 28, n. 11, p. 1052-1056, 2008.

CUNHA FILHO, Edson Vieira da *et al.* Flow-mediated dilatation in the differential diagnosis of preeclampsia syndrome. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 2, p. 195-200, 2010.

FREITAS, Letícia Gonçalves *et al.* Preeclampsia: Are platelet count and indices useful for its prognostic?. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**,v.18,n. 6,p. 360-364 2013.

FUZER, S., *et al* Avaliação do VPM e P-LCR em Pacientes com Dislipidemia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR. Rio de Janeiro. 2005,.

GALÃO, Adriani O. *et al.* L-arginine erythrocyte transport increases during pregnancy and immediately postpartum. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 191, n. 2, p. 572-575, 2004.

HARRISON, Paul. Platelet function analysis. **Blood Reviews**, v. 19, n. 2, p. 111-123, 2005.

HARRISON, Paul.. Platelet Development.. **Sysmex Journal International**, v.17, p. 73-80, 2007

HARRISON, Paul. Platelet Development. **Sysmex Journal International**.*[Review Article]* .2007.

HOLTHE, Mette R. *et al.* Different levels of platelet activation in preeclamptic, normotensive pregnant, and nonpregnant women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 190, n. 4, p. 1128-1134, 2004.

HOWARTH, S. *et al.* Platelet indices during normal pregnancy and pre-eclampsia. **British Journal of Biomedical Science**, v. 56, n. 1, p. 20-22, 1998.

JÄREMO, Peter *et al.* The use of platelet density and volume measurements to estimate the severity of pre-eclampsia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 30, n. 12, p. 1113-1118, 2000.

JUNG, Haiyoung *et al.* Immature platelet fraction: establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. **The Korean Journal of Laboratory Medicine**, v. 30, n. 5, p. 451-459, 2010.

KAUSHANSKY, Kenneth. Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis. **ASH Education Program Book**, v. 2009, n. 1, p. 147-152, 2009.

KAWANO, Hironori *et al.* Down regulation of the α IIb β 3 subunit of von Willebrand factor receptor (GPIIb/IX/V complex), on the surface membrane of thrombin-stimulated platelets. **British Journal of Haematology**, v. 104, n. 1, p. 55-63, 1999.

KAZMI, Rashid S.; COOPER, Alan J.; LWALEED, Bashir A. Platelet function in pre-eclampsia. In: **Seminars in thrombosis and hemostasis**. Thieme Medical Publishers, 2011. p. 131-136.

KICKLER, Thomas S.; OGUNI, Sinichiro; BOROWITZ, Michael J. A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 125, n. 2, p. 282-287, 2006.

KONIJNENBERG, Alice *et al.* Extensive platelet activation in preeclampsia compared with normal pregnancy: enhanced expression of cell adhesion molecules. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 176, n. 2, p. 461-469, 1997.

MAGEE, Laura A. *et al.* Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy. **Journal of obstetrics and gynaecology Canada**, v. 30, n. 3 (suplemento) p. 1-48, 2008.

MAKUYANA, D. *et al.* Liver and kidney function tests in normal and pre-eclamptic gestation--a comparison with non-gestational reference values. **The Central African Journal of Medicine**, v. 48, n. 5-6, p. 55, 2002.

MCBANE II, Robert D. *et al.* Propensity for young reticulated platelet recruitment into arterial thrombi. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, p. 1-7, 2013.

PIMENTEL, Adriana ML *et al.* L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress in plasma and platelets of patients with pre-eclampsia. **Hypertension Research**, 2013.

PÉREZ RUÍZ, Andrés O. *et al.* Participación plaquetaria en la hemostasia primaria. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 16, n. 2, p. 150-155, 1997.

PINHEIRO DA COSTA, B. E. *et al.* Maternal medicine: Increased serum phosphodiesterase activity in women with pre-eclampsia. **An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 113, n. 5, p. 577-579, 2006.

RABINI, R. A. *et al.* Biochemical-morphological modifications of platelet membranes during pregnancy-induced hypertension. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 63, n. 3, p. 175-185, 1995.

REDMAN, C. W. G. Preeclampsia: a multi-stress disorder. **La Revue de Médecine Interne**, v. 32, n. S1, p. 41-44, 2011.

REDMAN, C. W.; BONNAR, J.; BEILIN, L. J. Early platelet consumption in pre-eclampsia. **British Medical Journal**, v. 1, n. 6111, p. 467, 1978.

REPORT of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 183, n. 1, (suplemento), p. S1-S22 2000.

RIBEIRO, AC Mendes *et al.* Transport of L-arginine and the nitric oxide inhibitor NG-monomethyl-L-arginine in human erythrocytes in chronic renal failure. **Clin Sci**, v. 93, n. 1, p. 57-64, 1997.

RINDER, Henry M. *et al.* Noninvasive measurement of platelet kinetics in normal and hypertensive pregnancies. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 170, n. 1, p. 117-122, 1994.

ROBERTS, James M. *et al.* Preeclampsia: an endothelial cell disorder. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 161, n. 5, p. 1200-1204, 1989.

RODAK, Bernadette F.; FRITSMA, George A.; DOIG, Kathryn. **Hematology: clinical principles and applications**. Elsevier Health Sciences, 2007.

SALMON, Jane E. *et al.* Mutations in complement regulatory proteins predispose to preeclampsia: a genetic analysis of the PROMISSE cohort. **PLoS Medicine**, v. 8, n. 3, p. e1001013, 2011.

SIBAI, Baha M. Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. **Obstetrics & Gynecology**, v. 103, n. 5, Part 1, p. 981-991, 2004.

STAR, Jami *et al.* Flow cytometric analysis of platelet activation throughout normal gestation. **Obstetrics & Gynecology**, v. 90, n. 4, p. 562-568, 1997.

VALERA, Marie-Cecile *et al.* Physiologic and pathologic changes of platelets in pregnancy. **Platelets**, v. 21, n. 8, p. 587-595, 2010.

VICTORA, Cesar G. *et al.* Measuring impact in the Millennium Development Goal era and beyond: a new approach to large-scale effectiveness evaluations. **The Lancet**, v. 377, n. 9759, p. 85-95, 2011.

VIEIRA, M.C. *et al.* Flow-mediated dilatation of brachial artery as marker of preeclampsia morbidity. **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 4, p. 4424-4425, 2013.

YANG, Seung Woo *et al.* Significance of the platelet distribution width as a severity marker for the development of preeclampsia. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 2014.

ZUCKER, Marjorie L. *et al.* Immature platelet fraction as a predictor of platelet recovery following hematopoietic progenitor cell transplantation. **Laboratory Hematology**, v. 12, n. 3, p. 125-130, 2006.

.

ANEXO A- Protocolo da Coleta

PROTOCOLO DE COLETA PADRONIZADO- LINHA DE PESQUISA HIPERTENSÃO NA GESTAÇÃO LABORATÓRIO DE NEFROLOGIA/IPB – PUCRS (RAMAL 2344)

IDENTIFICAÇÃO				ANAMNESE			
Nome:				Data da última menstruação (DUM): Certeza: <i>Sim Não</i>			
Endereço:				Idade gestacional (no dia da coleta): DUM= ECO=			
Cidade:		Bairro:		Gestações: () Partos: () Abortos: () <i>Provocado/ Espontâneos</i>			
Fone: ()				Tabagismo: não 1 a 10 cig/dia > 10 cig/dia			
Data da avaliação:				Número de consultas de pré-natal:			
Registro HSL:				HISTÓRIA MÉDICA PREGRESSA			
Nº do Lab: / / /				Infecção urinária (repetição): <i>Não Sim: Infância Fase adulta</i>			
Raça: <i>branca mista negra</i>				HAS: <i>Não Sim: Idade ou IG no diagnóstico:</i>			
Data de nascimento: / /				PE prévia: <i>Não Sim DM: Não DMI DMII DMG</i>			
Idade:				Outras doenças:			
HISTÓRIA FAMILIAR				Drogas em uso (<i>antes / durante</i> a gestação, qual):			
HAS: <i>Não Sim</i> Parentesco: mãe pai outros:				Uso de anti-hipertensivos durante a coleta:			
EXAME LABORATORIAL				EXAMES FÍSICO			
Data dos exames:				Data do exame físico:			
IG: semanas dias		TP (RND): / (%)		IG: semanas dias			
Hematócrito: %		KTTp: seg/seg		PAS: mmHg			
Hemoglobina: g/dL		Fibrinogênio: mg/dL		PAD: mmHg			
Leucócitos totais: uL		TGO: U/L TGP: U/L		Peso inicial: kg /Peso final: kg / Altura: metros			
Bastonados: % uL		LDH: U/L		Membranas: <i>Integras Bolsa rota</i> (horário que rompeu a bolsa):			
Segmentados: % uL		BD: mg/dL BI: mg/dL		DADOS DO PARTO			
Basófilos: % uL				Data: Hora:			
Eosinófilos: % uL				Tipo de parto: <i>Normal Cesário</i> Por quê?			
Monócitos: % uL		TSM: ABO: Rh:		Se parto normal: episiotomia <i>sim não</i> / uso de fórcepe <i>sim não</i>			
Linfócitos: % uL				DADOS DO RECÉM-NASCIDO			
Plaquetas: mil				Sexo: <i>Masculino Feminino</i>			
Creatinina: mg/dL		Ácido úrico: mg/dL		Apgar: 1º min 5º min			
Proteinúria de amostra: mg/dL				IGO: IGP (capuro):			
Creatinimúria de amostra: mg/dL				Classificação: <i>AIG GIG PIG</i>			
Relação prot/creat (P/C) em amostra:				Peso RN: g			
Proteinúria de 24h: mg/24h / Creatinimúria de 24h:				Peso da placenta: g			
Glicemia de jejum: mg/dL (data: / /)				CLASSIFICAÇÃO DA GESTANTE			
Exame qualitativo de urina: pH= dens= prot= +		hem= + leuc= p/c hem= p/c Céls= p/c		<i>Controle Hipertensa gestacional Hipertensa crônica</i>			
Outros:				<i>Pré-eclâmpsia pura sobreposta Eclâmpsia HELLP</i>			
				Observação:			

ANEXO B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-VERSÃO 2011

LINHA DE PESQUISA EM NEFROLOGIA

ENFOQUE NA GESTAÇÃO E PRESSÃO ARTERIAL

TCLE aprovado pelo CEP em 31/05/2005 (OF N^o 440/05)-CEP e aprovado pelo CONEP registro 11972

Pesquisadores responsáveis: **Bartira Ercília Pinheiro da Costa, Carlos Eduardo Poli de**

Figueiredo.

Entrevistador da Equipe de Pesquisa: _____

Nome da paciente: _____

SOBRE A PESQUISA: A presente linha de pesquisa avalia aspectos da gravidez, como pressão sanguínea alta na busca do aumento do conhecimento, alívio do sofrimento e melhora da saúde de mulheres e crianças. Esta Linha de Pesquisa é parte do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina e do Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

Nos estudos serão avaliados diversos aspectos que podem influenciar na doença, tais como: marcadores presentes no sangue, na urina, na placenta ou em tecidos; função dos vasos sanguíneos; função das células; função de órgãos, como os rins; sensibilidade gustativa ao sal; e fatores genéticos.

A idéia é estudar fatores que possam ser importantes para a ocorrência da doença pré-eclâmpsia, que é a elevação da pressão arterial na gestação com perda de proteína na urina. Estes testes poderão ajudar a diagnosticar as pessoas em risco ou com esta condição, ou eventualmente auxiliar na formulação de novos tratamentos.

O QUE SERÁ FEITO: Você será convidada para uma entrevista com um dos membros da equipe de pesquisa. O pesquisador lhe dirá de que se trata a linha de pesquisa e o estudo que está sendo oferecido. Então será perguntado se deseja participar da pesquisa.

Caso concorde, após assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, serão perguntados dados de sua história médica, coletado um volume de sangue venoso e/ou urina antes e depois do parto, além das coletas dos exames de rotina. Alguns dos estudos desta linha de pesquisa avaliam outros aspectos e também poderá ser coletado amostra de sangue do cordão umbilical após o parto e amostra da placenta, e/ou avaliação da função dos vasos por ecografia, e/ou medida da sensibilidade gustativa ao sal. Em alguns estudos, são avaliados a presença de marcadores genéticos. Os genes a serem estudados são extraídos do sangue ou da placenta, tentando identificar especificamente os possíveis causadores desta doença. Após o parto você poderá ser convidada a realizar acompanhamento clínico com o grupo no ambulatório Nefrologia. Este grupo atende e acompanha pacientes com hipertensão arterial sistêmica, doença hipertensiva da gestação (entre elas pré-

eclâmpsia). As mulheres que desenvolvem complicações durante a gestação, têm um maior risco de doenças vasculares no futuro. A idéia do grupo é de acompanhar estas mulheres, a longo prazo, com a finalidade de observar a evolução, detectar fatores de risco ou sinais de doença, encaminhando a prevenção e/ou tratamento destes. Meses após o parto, poderá ser solicitado um exame de cintilografia renal que visa detectar a presença de cicatrizes no rim de mulheres em risco (cicatrizes são mais comuns em mulheres que desenvolveram hipertensão na gestação). Estas avaliações não interferirão nas suas avaliações e cuidados rotineiros.

O material biológico da pesquisa será coletado e congelado até a análise pelos colaboradores do Laboratório de Nefrologia da PUCRS. Os resultados serão publicados em revistas de circulação no meio médico e em congressos.

Para que os estudos possam ser realizados, é necessário que você faça a opção autorizando ou não a coleta dos diferentes materiais ou realização dos exames:

Acompanhamento ambulatorial: _____ TORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Urina: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Placenta: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Sangue: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Sangue do Cordão Umbilical: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Ecografia dos vasos: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Análise genética: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Cintilografia renal: _____ Não solicitado _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Sensibilidade Gustativa ao Sal: _____ Não solicitado _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

*OBS: Nem todos os testes acima serão necessariamente realizados.

CONFIDENCIALIDADE: Os registros serão mantidos em segredo.

MATERIAL EM ESTUDO E ARMAZENADO: O material em estudo poderá ser utilizado apenas para esta pesquisa, ou também ser armazenado para emprego em futuro estudos. É necessário que você faça a opção autorizando ou não o armazenamento para emprego futuro: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Se houver possibilidade de fazermos novas análises com o material coletado, será novamente solicitada a aprovação das Comissões de Ética em Pesquisa para realizar a avaliação adicional. Os estudos são desenvolvidos de forma anônima. Os resultados da pesquisa estarão disponíveis a você em qualquer momento por qualquer motivo. Questionamos se você gostaria de ser comunicada sobre o resultado do estudo. É

necessário que você faça a opção escrevendo SIM ou NÃO: _____ QUERO SABER DO RESULTADO DA PESQUISA.

RISCOS E BENEFÍCIOS: Os riscos ou desconfortos dessa pesquisa são considerados mínimos. Este estudo não lhe trará nenhum tipo de discriminação individual ou coletiva. A presente pesquisa se propõe a colaborar com o conhecimento sobre a gestação e suas doenças relacionadas com o controle da pressão arterial, não trazendo benefícios diretos para as pacientes participantes.

LIBERDADE: A sua participação na pesquisa é totalmente voluntária e você pode desistir a qualquer momento, sem prejuízo do tratamento e sem necessidade de explicar o motivo.

Eu, _____ fui informada pelo
(a) _____ dos objetivos e justificativas dessa pesquisa de forma bem clara e detalhada. Recebi informações sobre cada passo que estarei envolvida. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza, e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Estou ciente que as informações por mim fornecidas serão mantidas em segredo e usadas somente conforme opção acima. Fui informada que se existirem danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização, conforme a lei. Também sei que não terei nenhum custo que seja relacionado à pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre este trabalho, posso chamar os pesquisadores pelos seguintes telefones (051) 33367700, 33369599, ou 33203000- Ramais 3174, 2344, 3345 (Comitê de Ética em Pesquisa) para qualquer dúvida como participante deste estudo.

Esta pesquisa tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS. Sob as condições acima mencionadas, concordo em participar do presente estudo. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovando-o e assinando-o após lê-lo com todo o cuidado possível.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Paciente ou Responsável

CI

Investigador

CI/CRM

***EQUIPE PARTICIPANTE:** Bartira Costa, Carlos E Poli de Figueiredo e Daniela Moraes.

ANEXO C- Aprovação do Projeto pela Comissão Científica



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
COMISSÃO CIENTÍFICA

Porto Alegre, 05 de junho de 2012.

Senhor (a) Pesquisador(a)

A Comissão Científica da Faculdade de Medicina e do Hospital São Lucas da PUCRS aprovou seu projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES PLAQUETÁRIOS E CONTAGEM TOTAL DAS PLAQUETAS EM GESTANTES COM DISTÚRBIOS HIPERTENSIVOS".

O projeto, assim como todos os documentos que o acompanharam, os quais receberam a presente aprovação, devem ser submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa / PUCRS através da Plataforma Brasil, nas mesmas versões apresentadas a esta Comissão.

Atenciosamente,

Bartira Costa

Profª Bartira E. Pinheiro da Costa
Coordenador da Comissão Científica
FAMED-HSL/PUCRS

*De acordo
para serem
membros da CC*

de acordo
Prof. Dr. Ivan Antonello
Diretor
Faculdade de Medicina - PUCRS

31.07.2012

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

PUCRS

FACULDADE DE MEDICINA - HSL/PUCRS
Av. Ipiranga, 6690 - P. 60 - 3º andar - CEP 90610-000
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3304 - Fax (51) 3320-3040
E-mail: nuclem@pucrs.br
www.pucrs.br/medicina

ANEXO D- Aprovação do Projeto pela Comissão Científica (parecer do Relator)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
COMISSÃO CIENTÍFICA

PARECER DO RELATOR

1. Título: adequado, claro, conciso?

Sim.

2. Introdução: fundamentação, justificativa e relevância adequadas e pertinentes? Hipótese é apresentada?

Sim.

3. Objetivos: claros e adequados?

Sim.

4. Métodos

a. **Delimitação:** clareza, mascaramento,...

Delimitação adequada para o propósito.

b. **Pacientes ou material:** critérios de inclusão e exclusão, fatores de confusão,...

A metodologia está apresentada no projeto.

c. **Aferição das variáveis:** limitações, subjetividade,...

O protocolo inclui as medidas e informações que são necessárias para o propósito do estudo.

d. **Estatística:** cálculo do tamanho da amostra, valor de p, poder, testes estatísticos,...

O cálculo do tamanho amostral consta no projeto (aproximadamente 180 gestantes).

5. Referências bibliográficas: revisão da literatura, estudos prévios relevantes,...

Bibliografia adequada.

6. Avaliação final

a. Aprovado

b. Retornar com modificações para avaliação

c. Reprovado

• **Questões específicas** (em caso de retorno para modificações):

O projeto já foi previamente aprovado pela Comissão Científica do PPGMCS/FAMED/PUCRS. A Comissão Científica FAMED/HSL/PUCRS ratifica o parecer de aprovação.

PUCRS

FACULDADE DE MEDICINA – HSL/PUCRS
Av. Ipiranga, 6690 – P. 6º – 3º andar – CEP 90610-000
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone: (51) 3320-3304 – Fax (51) 3320-3040
E-mail: nuclem@pucrs.br
www.pucrs.br/medicina

ANEXO E- Parecer Consubstanciado do CEP

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE DO
SUL - PUC/RS



PROJETO DE PESQUISA

Título: Avaliação dos índices plaquetários e contagem total de plaquetas em gestantes com distúrbios hipertensivos.

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 06268012.5.0000.5338

Pesquisador: Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUC/RS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 105.164

Data da Relatoria: 14/09/2012

Apresentação do Projeto:

Avaliação dos índices plaquetários, VPM e IPF, e contagem das plaquetas em gestantes com distúrbios hipertensivos, comparando pacientes com pré-eclampsia com normais e com outros distúrbios hipertensivos. Será feito exame físico e amostra de sangue venoso para avaliação, com estudo estatístico programado com 128 normais, 42 com HAS e 42 com pré-eclampsia.

Objetivo da Pesquisa:

Conhecer melhor o volume plaquetário médio, índice de plaquetas imaturas e a contagem de plaquetas em pré-eclampsia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco mínimo face exame clínico de rotina e retirada única de sangue venoso.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Importante para melhor conhecimento destes dados na pré-eclampsia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Sem pendências

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)320-3345

Fax: (51)320-3345

E-mail: cep@puccs.br

ANEXO F- Submissão

British Journal of Haematology

bjh british journal of haematology

Immature Platelet Fraction and Hypertension in Pregnancy, With and Without Preeclampsia

Journal:	<i>British Journal of Haematology</i>
Manuscript ID:	BJH-2014-00108
Manuscript Type:	Ordinary Papers
Date Submitted by the Author:	16-Jan-2014
Complete List of Authors:	Moraes, Daniela; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Hematology Laboratory Munhoz, Terezinha; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Hematology Laboratory Pinheiro da Costa, Bartira; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Diagnostic Medicine Gadonski, Giovani; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Internal Medicine Antonello, Ivan; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Internal Medicine Poli-de-Figueiredo, Carlos Eduardo; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Internal Medicine
Key Words:	PREGNANCY, PLATELET COUNT, PLATELET ACTIVATION, PLATELET DISORDERS

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO G- Artigo Original

A seguir o arquivo. PDF gerado pela submissão do artigo no periódico British Journal Of Haematology (Fator de impacto: 4,9).



Immature Platelet Fraction and Hypertension in Pregnancy, With and Without Preeclampsia

Journal:	<i>British Journal of Haematology</i>
Manuscript ID:	BJH-2014-00108
Manuscript Type:	Ordinary Papers
Date Submitted by the Author:	16-Jan-2014
Complete List of Authors:	Moraes, Daniela; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Hematology Laboratory Munhoz, Terezinha; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Hematology Laboratory Pinheiro da Costa, Bartira; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Diagnostic Medicine Gadonski, Giovanni; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Internal Medicine Antonello, Ivan; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Internal Medicine Poli-de-Figueiredo, Carlos Eduardo; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Internal Medicine
Key Words:	PREGNANCY, PLATELET COUNT, PLATELET ACTIVATION, PLATELET DISORDERS

ORIGINAL ARTICLE

Title: Immature Platelet Fraction and Hypertension in Pregnancy, With and Without Preeclampsia

Short title: Gestational hypertension and immature platelet fraction

Daniela Moraes^{1,2}, Terezinha Paz Munhoz², Bartira E. Pinheiro da Costa¹, Giovani Gadonski¹,
Ivan Carlos Antonello¹, Carlos E. Poli-de-Figueiredo¹

¹ Postgraduate Program in Medicine and Health Sciences (Nephrology), Institute of Biomedical Research - São Lucas Hospital /School of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Laboratory of Clinical Pathology - São Lucas Hospital /School of Pharmacy, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author

Carlos Eduardo Poli-de-Figueiredo

Laboratório de Nefrologia – IPB – Hospital São Lucas da PUCRS

Av. Ipiranga, 6690

Porto Alegre, RS, Brazil - ZIP code: 90610-000

Tel Fax. ++ 55 51 33367700

E-mail: cepolif@pucrs.br

Abstract

Introduction: Imbalance in hemostatic mechanisms can occur during pregnancy with a tendency for hypercoagulability and increased thrombosis risk. Pregnant women with hypertensive disorder, especially preeclampsia, show alterations in total platelet count, platelet indexes, mean platelet volume (MPV) and immature platelet fraction (IPF). IPF has been suggested as a sensitive index for monitoring changes in platelet production and destruction. Our aim was to evaluate the IPF behavior in patients diagnosed with a gestational hypertensive disorder (GHD).

Methods: A cross-sectional study was conducted at the São Lucas Hospital, Porto Alegre, Brazil to estimate maternal blood IPF levels in 99 pregnant women, divided in: normotensive pregnancy (NP), preeclampsia syndrome (PES) and non-proteinuric hypertensive pregnancy (nPHP). Following ethical approval and written informed consent, samples were collected from 33 NP, 34 PES, and 32 nPHP women. Platelet indexes were measured by fluorescent flow cytometry XE-5000[®] (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

Results: IPF and MPV count in GHD was significantly higher than the NP. No difference was detected between the PES and nPHP groups.

Conclusion: A distinct profile in platelet indexes was detected in hypertensive pregnancies. It suggests that these markers could be used in daily routine as an additional tool in the management of pregnant women.

Keywords: preeclampsia; pregnancy induced hypertension, blood platelets; mean platelet volume.

Introduction

Gestational hypertensive disorders (GHD) are one of the leading causes of maternal-fetal morbidity and mortality (Redman 2011; Duley et al 2009; Black et al 2011). According to the National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure, (NHBPEPWG), GHD in pregnancy is divided into preeclampsia (PE), superimposed preeclampsia (SPE), gestational hypertension (GH) and chronic hypertension (CH) (Gifford et al, 2000). The etiology of preeclampsia is unknown and its pathophysiological mechanisms are related to placental ischemia, endothelial dysfunction, inflammation and coagulation alterations, among others (Redman & Sargent, 2005; Roberts & Hubel, 2009, Rana et al, 2007).

Hemostatic changes occur during gestation and are exacerbated in preeclampsia. Thrombocytopenia is a relatively common finding in pregnancy (Boehlen et al, 2000; Valera et al, 2010) with approximately 12% of pregnant women presenting a platelet count of less than $150 \times 10^9/L$ and 1% having a count lower than $100 \times 10^9/L$ (Boehlen et al, 2000; Valera et al, 2010). Immature platelets, also known as reticulated platelets, are larger and more reactive than mature ones. Immature platelet fraction (IPF) corresponds to the level of platelet production in the bone marrow. It reflects the stage of thrombopoiesis and can be used to distinguish the causes of thrombocytopenia (Haiyoung et al, 2010), with it being a more stable parameter than mean platelet volume (MPV).

Increased MPV and decreased erythrocyte numbers in GHD have been suggested as auxiliary indexes for the diagnosis and classification of disease severity (Jaremo et al, 2000). We therefore hypothesized that IPF and MPV would be increased and total platelet numbers reduced in hypertensive pregnancies in comparison to normotensive. The aim of the present study was to

1
2
3 evaluate platelet indexes in hypertensive pregnancies with preeclampsia syndrome (PES), non-
4
5 proteinuric hypertensive pregnancies (nPHP), and normotensive pregnancies (NP).
6
7
8
9

10 **Methods**

11 **Subjects and selection criteria**

12
13 A cross-sectional study was conducted enrolling 99 pregnant women. Patients were
14
15 divided into 3 groups: normotensive controls (NP, n=33), preeclampsia syndrome (PE, n=34)
16
17 and non-proteinuric hypertensive pregnancies (nPHP, n=32). Women were recruited at the
18
19 Hospital São Lucas (HSL) of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS),
20
21 Porto Alegre, Brazil, and all participants signed an informed consent form. The protocol was
22
23 approved by the Research and Ethics Committee of PUCRS (Document # 105.164).
24
25
26
27
28

29 Using the VI Brazilian Hypertension Guidelines and the NHBPEPWG, preeclampsia was
30
31 defined as being blood pressure ≥ 140 mmHg systolic and/or ≥ 90 mmHg diastolic, accompanied
32
33 by new proteinuria ≥ 0.3 g/24h after 20 weeks of gestation (Gifford et al, 2000; VI Diretrizes
34
35 Brasileiras de Hipertensão, 2010; Poli-de-Figueiredo et al, 2010). A urine protein:creatinine
36
37 (UPC) ratio equal to or greater than 0.3 was considered to be equivalent to a 24-hour proteinuria
38
39 ≥ 0.3 g/24 hours for the diagnosis of PE. The term preeclampsia syndrome was employed to
40
41 describe women with either preeclampsia or superimposed preeclampsia. Women with
42
43 gestational hypertension or with chronic hypertension without proteinuria were considered to
44
45 have nPHP. Pregnant women with a history of venous and arterial thrombosis, renal disease,
46
47 infections and HELLP syndrome were excluded. Normotensive pregnant women with a
48
49 proteinuria dipstick reading of one cross were not included.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Sample Collection and blood analysis

Vacutainer[®] tubes containing EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) were used to collect 4 mL of blood from all patients from the twentieth week of gestation. Inclusion of the pregnant controls sought to maintain similarity of age and gestational age among the groups, seeking greater homogeneity between them. All samples were analyzed at the Laboratory of Clinical Pathology/HSL/PUCRS, within four hours of collection, using the XE-5000[®] (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) automated hematology system. The platelets and platelet index counts were conducted using the impedance method, which also provided MPV, Platelet Distribution Width (PDW) and plateletcrit (PCT) readings. IPF was quantified using the optical fluorescence method conducted in the reticulocyte/optical platelet channel of the same equipment. In this approach, a polymethine fluorescent dye is used to stain the RNA/DNA of the reticulated cells, platelet membranes and granules. This method allows the simultaneous counting of reticulocytes, erythrocytes and fluorescent platelets, with the latter being the IPF.

Statistical analysis

Data was analyzed using the SPSS Statistics for Windows software, Version 21.0. (IBM, Armonk, NY) and presented as mean±standard deviation (SD) or median (interquartile range), as appropriate. Categorical variables were expressed as percentages. Variance analysis was performed for the quantitative variables and with log-transformation for the asymmetric quantitative variables. A chi-square test was used for the categorical variables, and ANOVA and chi-square to compare the three groups. The null hypothesis was rejected when $P < 0.05$.

Sample size was calculated considering $\alpha = 0.05$, effect size of 0.8 standard deviation and 90% power ($\beta = 0.10$), resulting in 34 patients per group.

Results

Subjects

The demographic and clinical data are shown in Table I. Maternal and gestational age were no different between the groups ($p=0.762$) at the time of collection, however, there was a significant difference in gestational age at delivery ($p=0.001$), as well as in blood pressure levels ($p<0.001$) and neonatal birth weight ($p=0.0066$).

Biochemical measurements

Hemoglobin and red blood cell, white blood cell and platelet counts were not significantly different between the women with PE, nPHP and NP ($P>0.05$).

The IPF, MPV and PDW platelet indexes showed statistical difference between the PE and nPHP groups, compared to the NP group ($P<0.05$). The data are presented in Table II and Figures 1a and 1b.

The distribution of patients with an immature platelet fraction above the cutoff point considered normal (6.1%)(Briggs et al, 2004) was 65% for the PES group, 43.8% for the nPHP, and only 9% for patients in the NP group ($P<0.001$). Data relating to MPV shows that 34.4% of PES patients have results above the 12.5 fL cutoff point (Fuzer et al, 2005) , with the distribution of nPHP patients being 18.8% and no patients from the NP group showed increased MPV results ($P<0.001$).

The IPF was also plotted on the ROC curve (Receiver Operating Characteristics) to assess its value as a test to differentiate GHD from the controls (Figure 2). The value of the area under the curve was 0.83.

Discussion

According to the scientific literature review performed, no previous study involving pregnant women was found showing evidence of increased reticulated platelets in patients with PE, using a fluorescent optical method. The findings of the present study demonstrate that patients with preeclampsia or nPHP, both had an increased immature platelet count when compared to the normotensive group. The same was demonstrated for the MPV and PDW. On the other hand, the groups did not present a significant reduction in the total platelet count, when compared either among themselves or with the reference values. This can be explained by the continuous production of platelets by the bone marrow due to increased peripheral platelet consumption, made evident by the an higher immature platelet fraction. Despite the number of mature platelets being statistically different between the PE and NP groups, the change in the count was not considered clinically relevant.

There are still some conflicting results in the published literature in relation to the total platelet count and the MPV during normal and PE pregnancies. Some authors have found no differences in either the total number of platelets or the MPV in normotensive and hypertensive pregnant patients (Makuyana et al, 2002; Ceyhan et al, 2006), whilst other studies, including this one, have shown significant differences in the MPV but not in the total platelet count between these two groups of women. It is possible that these discrepancies can be explained by the differences in methods applied and the anticoagulants used. Although EDTA is the anticoagulant of choice for the test, MPV increases significantly in dependence on the temperature and time of collection (Bath et al, 1996; Dastjerdi et al, 2006).

Several researches have shown a decrease in the platelet count and an increase in the MPV in women with preeclampsia (Ahmed et al, 1993, Vamseedhar et al, 2011; Jaremo et al.,

1
2
3 2000; Howarth et al, 1999; Dundar et al,2008; Freitas et al, 2013; Yang et al, 2014), but data
4
5 regarding immature platelets are rare. Only one study was found in the literature with evidence
6
7 of increased reticulated platelets in patients with PE, using a different method (Rinder et al,
8
9 1994); the findings of the present study confirmed these previous results.
10
11

12
13 Pregnancy causes alterations in the platelet membrane, including heightened activity of
14
15 Ca^{2+} adenosine triphosphate (Ca-ATPase), decreased membrane fluidity and a reduction in
16
17 cholesterol concentration (Kazmi et al, 2011; Rabini et al, 1995). In addition to these changes in
18
19 preeclampsia patients, an increase has been seen in the expression of platelet membrane
20
21 receptors: CD61 (fibrinogen receptor), CD42a (von Willebrand factor receptor) and CD62P (P-
22
23 selectin), and adenosine diphosphate-stimulated CD62P expression, indicating platelet activation
24
25 associated with the physiopathology of preeclampsia (Holthe et al, 2004; Konijnenberg, et al,
26
27 1996). These receptors were verified in the total platelet fraction, without their relationship with
28
29 immature platelets being mentioned as the maturity state of the studied cells was not
30
31 differentiated. Although these receptors were not investigated by the present study, it is known
32
33 that the reactivity of reticulated platelets is greater and this fact may be associated with the
34
35 increased platelet activation suggested by the intensified activity of receptors found in the study
36
37 by Holthe et al 2004.
38
39
40
41
42

43
44 The increase in MPV and reticulated platelets has been linked with raised platelet
45
46 aggregation in response to the adenosine diphosphate and collagen (Hutt et al, 1994). Young
47
48 platelets express elevated levels of the fibrinogen receptors GPIIb/IIIa, among others, compared
49
50 with mature platelets (McBane et al, 2013). In addition, they present a greater tendency to
51
52 thrombus formation, which suggests a relationship with the reticulated platelets in PE. The rise in
53
54 MPV and IPF in PE and GH indicates increased platelet destruction, evidenced by the reduction
55
56
57
58
59
60

1
2
3 in platelet half-life and consequent increase in platelet renewal and IPF. The rise in PDW also
4
5 reflects a growth in platelet renewal, supporting again the hypothesis of a decrease in half-life
6
7 and increase in platelet destruction.
8
9

10 The present study investigated the presence of immature platelets in preeclampsia
11
12 syndrome. Strict exclusion criteria were adopted to reject patients with any hematological or
13
14 associated disease. The statistical impossibility of distinguishing pure preeclampsia from
15
16 superimposed PE due to the sample size limits analysis of the clinical importance of the IPF in
17
18 separating them. On the other hand, there are few studies in the literature discussing similar
19
20 findings. The importance of this study is the provision of new information related to the
21
22 relevance of platelets in this syndrome. The area under the ROC curve (0.83) suggests that
23
24 immature platelets can be a useful biomarker in GHD and can be relevant in the routine of health
25
26 care attention.
27
28
29
30

31 The method applied for obtaining the platelet data is simple, accessible and low-cost, and
32
33 the blood collection required is already a standard procedure implanted in all hospitals.
34
35 Therefore, the capability of the majority of laboratories to obtain the IPF can be useful in the
36
37 evaluation of pregnant women with gestational hypertensive disorders.
38
39
40

41 Finally, platelet indexes are altered in hypertensive disorders during pregnancy with an
42
43 increase in mean platelet volume and, particularly, in the immature platelet index. Both can
44
45 easily be introduced into the health care assistance for pregnant women. Further studies are
46
47 required before the use of these markers can be recommended for inclusion in clinical routine,
48
49 especially in the evaluation of platelet alterations with maternal and fetal consequences.
50
51
52
53
54

55 **Acknowledgements**

56
57
58
59
60

1
2
3 We thank all the women, medical students, nurses and doctors who participated in the
4 study and made it possible. We are also grateful to Professor Mario Wagner for the statistical
5 analysis, and to SYSMEX for provide reagents to the measurements.
6
7
8
9

10 Daniela Moraes performed the research; Terezinha Paz Munhoz, Bartira E. Pinheiro da
11 Costa, Giovani Gadonski, Ivan Carlos Antonello, Carlos E. Poli-de-Figueiredo designed the
12 research study; Terezinha Paz Munhoz, Giovani Gadonski contributed essential reagents or tools;
13 Daniela Moraes, Bartira E. Pinheiro da Costa, Carlos E. Poli-de-Figueiredo analysed the data, all
14 authors wrote the paper.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 **Conflict of interests/disclosure**

26
27 Reagents for IPF assays were provided by Roche Diagnóstica Brasil Ltda, São Paulo,
28 Brazil.
29
30
31
32
33
34

35 **Sources of Funding:** Grant support was received from the Conselho Nacional de
36 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; National Council for Scientific and
37 Technological Development), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul
38 (FAPERGS; Foundation for the Support of Research in the State of Rio Grande do Sul) and
39 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Coordination for the
40 Improvement of Higher Education Personnel Foundation). Poli-de-Figueiredo is a CNPq
41 researcher.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 **References**

55
56
57
58
59
60

1
2
3 Ahmed, Y., Iddekinge, B.V., Paul, C., Sullivan, M.H. & Elder M.G.(1993) Retrospective
4 analysis of platelet numbers and volumes in normal pregnancy and in pre-eclampsia. British
5 Journal of Obstetrics and Gynaecology,100, 216-220.
6
7
8
9

10
11
12 Bath, P.M. & Butterworth, R.J. (1996) Platelet size: measurement, physiology and vascular
13 disease. Blood Coagulation & Fibrinolysis, 7, 157-161.
14
15
16
17

18
19
20 Briggs, C., Kunka, S., Hart, D., Oguni, S. & Machin, S. (2004) Assessment of an immature
21 platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. British Journal of Haematology, 126, 93-
22 99.
23
24
25
26

27
28
29 Boehlen, F., Hohlfeld, P., Extermann, P., Perneger, T.V. & Moerloose, P. (2000) Platelet Count
30 at Term Pregnancy: A Reappraisal of the Threshold. Obstetrics & Gynecology, 95, 29-32.
31
32
33
34

35
36 Ceyhan, T., Beyan, C., Baser, I., Kaptan, K., Güngör, S. & Ifran, A. (2006) The effect of pre-
37 eclampsia on complete blood count, platelet count and mean platelet volume. Annals of
38 Hematology, 85, 320-322.
39
40
41
42
43

44
45
46 Dastjerdi, M.S., Emami, T., Najafian A. & Amini M. (2006) Mean platelet volume measurement,
47 EDTA or citrate? Hematology, 11, 317-319.
48
49
50

51
52
53 Duley, L. (2009) The global impact of pre-eclampsia and eclâmpsia. Seminars in Perinatology,
54 33, 130-137.
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 Dunder, O., Yoruk, P., Tutuncu, L., Erikci, A.A., Muhcu, M., Ergur A.R, Atay V. & Mungen E.
7
8 (2008) Longitudinal study of platelet size changes in gestation and predictive power of elevated
9
10 MPV in development of pre-eclampsia. *Prenatal Diagnosis*, 11, 1052-1056.
11
12

13
14
15 Freitas, L.G., Alpoim, P.N., Komatsuzaki, F., Carvalho, M.G. & Dusse, L.M. (2013)
16
17 Preeclampsia: Are platelet count and indices useful for its prognostic? *Hematology*, 0, 1-5.
18
19

20
21
22 Ganzevoort, W., Rep A., Bonsel, G.J., de Vries, J.I. & Wolf, H. (2004) Plasma volume and blood
23
24 pressure regulation in hypertensive pregnancy. *Journal of Hypertension*, 22, 1235-1242.
25
26

27
28
29 Gifford, R.W, August, P.A, Cunningham, G., Green, L.A., Lindheimer, M.D. & McNellis, D.
30
31 (2000) Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High
32
33 Blood Pressure in Pregnancy. *American Journal of Obstetric & Gynecology*, 183,S1-S22.
34
35

36
37
38 Holthe, M.R., Staff, A.C., Berge, L.N. & Lyberg, T. (2004) Different levels of platelet activation
39
40 in preeclamptic, normotensive pregnant, and nonpregnant women. *American Journal of*
41
42 *Obstetrics and Gynecology*, 190, 1128-1134.
43
44

45
46
47
48 Howarth, S., Marshall, R., Barr, A.L., Evans, S., Pontre, M. & Ryan, N. (1999) Platelet indices
49
50 during normal pregnancy and pre-eclampsia. *British Journal of Biomedical Science*, 56, 20-22.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Hutt, R., Ogunniyi, S.O., Sullivan, M.H.F. & Elder, M.G. (1994) Increased platelet volume and
4 aggregation precede the onset of preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology*, 83, 146-149.
5
6
7

8
9
10 Jaremo, P., Lindahl, T.L., Lennmarken, C. & Forsgren, H. (2000) The use of platelet density and
11 volume measurements to estimate the severity of pre-eclampsia. *European Journal of Clinical*
12 *Investigation*, 30, 1113-1118.
13
14
15

16
17
18 Kazmi, R.S., Cooper, A. & Lwalleed, B.A. (2011) Platelet function in Pre-eclampsia. *Seminars*
19 *in Thrombosis and Hemostasis*, 37, 131-136.
20
21
22
23

24
25
26 Konijnenberg, A., Stokkers, E.W., Post, J.A.M.V.D., Schaap, M.C.L., Boer, K., Bleker, O.P. &
27 Sturk, A. (1996) Extensive platelet activation in preeclampsia compared with normal pregnancy:
28 Enhanced expression of cell adhesion molecules. *American Journal of Obstetric and*
29 *Gynecology*, 176, 461-469.
30
31
32
33
34
35

36
37
38 Makuyana, D., Mahomed, K., Shukusho, F.D. & Majoko, F. (2002) Liver and kidney function
39 tests in normal and pre-eclamptic gestation-a comparison with non-gestacional reference values.
40 *Central African Journal of Medicine*, 48, 55-59.
41
42
43
44
45

46
47
48 McBane, 2nd R.D., Gonzalez, C., Hodge, D.O. & Wysokinski, W.E. (2013) Propensity for
49 young reticulated platelet recruitment into arterial thrombi. *Journal of Thrombosis and*
50 *Thrombolysis*, 2013 May 5.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Morrison, R., Crawford, J., MacPherson, M. & Heptinstall, S. (1985) Platelet behavior in normal
4 pregnancy, pregnancy complicated by essential hypertension and pregnancy-induced
5 hypertension. *Thrombosis and Haemostasis*, 54, 607-611.
6
7

8
9
10
11
12 Odegard, R.A., Vatten, L. J., Nilsen, S.T., Salvesen, K.A. & Austgulen, R. (2000) Risk factors
13 and clinical manifestations of pre-eclampsia. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 107,
14 1410-1416.
15
16
17

18
19
20
21
22 Poli-de-Figueiredo, C.E., Tavares, A., Freitas, E.V., Burdmann, E. de A., Oliveira, I.L. &
23 Magalhães, L.C., Sass, N., Bresolin, N.L., Bezerra, R., Koch V., Fagundes, V.G; (2010)
24 Hipertensão em situações especiais. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 32, 54-59.
25
26
27

28
29
30
31 Rabini, R.A, Salvolini, E., Staffolani, R., Pugnali, A., Simonelli, L., Biagini, G., Cester, N.,
32 Garzetti, G.G & Mazzanti, L. (1995) Biochemical-morphological modifications of platelet
33 membranes during pregnancy-induced hypertension. *Experimental and Molecular Pathology*, 63,
34 175-185.
35
36
37
38

39
40
41
42
43 Rana, S., Karumanchi, S.A., Levine, R.J., Venkatesha, S.M., Rauh-Hain, J.A., Tamez, H. &
44 Thadhani, R. (2007) Sequential Changes in Antiangiogenic Factors in Early Pregnancy and Risk
45 of Developing Preeclampsia. *Hypertension*, 50, 137-142.
46
47
48
49

50
51
52
53 Redman C.W.G. (2011) Preeclampsia: A multi-stress disorder. *Rev Med Interne*, 32, 41-44.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Redman, C.W. & Sargent, I.L. (2005) Latest Advances in Understanding Preeclampsia. *Science*,
4 308, 1592-1594.
5
6
7

8
9
10 Rinder, H.M., Bonan, J.L., Anandan, S., Rinder, C.S., Rodrigues, P.A. & Smith, B. (1994)
11 Noninvasive measurement of platelet kinetics in normal and hypertensive pregnancies. 1994
12 *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 170, 117-122).
13
14

15
16
17 Roberts J.M. & Hubel C.A. (2009) The Two Stage of Preeclampsia: Variations on the
18 Theme. *Placenta*, 30,32-37.
19
20
21

22
23
24 Santos, E.V & Meirelles J.F. (2004) Plaquetograma em gestantes normais e com pré-eclâmpsia.
25 *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 26, 201-206.
26
27
28

29
30
31 Sibai, B.M. (2004) Diagnosis, Controversies, and Management of the Syndrome of Hemolysis,
32 Elevated Liver Enzymes, and Low Platelet Count. *American College of Obstetricians and*
33 *Gynecologists*, 103, 961-991.
34
35
36
37

38
39
40 Valera, M.C., Parant, O., Vayssiere, C., Arnal, J.F. & Payrastre, B. (2010) Physiologic and
41 pathologic changes of platelets in pregnancy. *Platelets*, 21, 587-595.
42
43
44
45

46
47
48 Vamseedhar, A., Srinivasa, K., Santhosh, K. & Suresh, D.R. (2011) Evaluation of platelet
49 indices and platelet counts and their significance in Pre eclampsia and eclampsia. *International*
50 *Journal of Biological and Medical Research*, 2, 425-428.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, Arq Bras Cardiol 2010; 95(1 supl.1):1-51.
4
5
6
7

8 Yang, S.W., Cho, S.H., Kwon, H.S., Sohn, I.S., Hwang, H.S. (2014) Significance of the platelet
9 distribution width as a severity marker for the development of preeclampsia. European Journal of
10 Obstetrics&Gynecology and Reproductive Biology, *in press*.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Table I. Demographic and clinical data.

	NP	PE	nPHP	P
	(n=33)	(n=34)	(n=32)	
Age, years (mean \pm SD)	24.7 \pm 6.6	27.5 \pm 7.7	27.8 \pm 7.3	0.167
Caucasian, n (%)	24 (72.7)	20 (58.8)	15 (46.9)	0.155
Nulliparous, n (%)	13 (39.4)	20 (58.8)	15 (46.9)	0.116
Previous abortions, n (%)	9 (28.1)	6 (18.2)	3 (10)	0.047
Gestational age, weeks (mean \pm SD) at sampling	36.3 \pm 3.1	35.8 \pm 3.6	36.4 \pm 3.4	0.762
Gestational age, weeks (mean \pm SD) at delivery	39.3 \pm 1.6	36.6 \pm 2.9	37.6 \pm 2.2	0.001
Systolic blood pressure, mmHg (mean \pm SD)	114.1 \pm 11.2	156.7 \pm 13.5	157.1 \pm 11.3	< 0.001
Diastolic blood pressure, mmHg (mean \pm SD)	72.4 \pm 11.1	101.4 \pm 8.8	100.3 \pm 12.26	< 0.001
Urine protein:creatinine ratio	*	2.15 (0.41-2.80)	0.14(0.081-0.19)	< 0.001
Normal vaginal delivery, n (%)	13(65)	8 (24.2)	19(61.3)	0.007
Birth weight, kg (mean \pm SD)Peso RN	3,325 \pm 466.3	2,737 \pm 779.4	2,948 \pm 736.7	0.007

NP: Normotensive pregnancy; PE: preeclampsia syndrome; nPHP: non-proteinuric hypertensive pregnancy; * NP group checked by negative dipstick test for urinary protein. P: ANOVA or Chi-square.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Table II. Hematological profile of patients

Blood indexes	NP	PES	nPHP	P
	(n=33)	(n=34)	(n=32)	
Red cells ($10^9/uL$)	4.0 \pm 0.4	4.15 \pm 0.4	4.1 \pm 0.4	0.091
White cells (/uL)	10,402.3 \pm 2,062.8	11,209.3 \pm 2,930.2	10,750.6 \pm 2,072.9	0.389
Hematocrit (%)	35.4 \pm 2.8	36.1 \pm 3.0	35.9 \pm 2.9	0.538
Hemoglobin (g/dL)	11.8 \pm 0.91	12.3 \pm 1.16	12.2 \pm 1.0	0.127
Platelet (/uL)	235,758 \pm 53,007	209,206 \pm 65,785	213,844 \pm 57,931	0.155
Mature Platelets (/uL)	227,095 \pm 52,911	192,255 \pm 64,201	200,039 \pm 60,517	0.047
IPF (%)	3.8(2.4-5.1)	8.6(5.8-10.6)	7.3(4.2-10.2)	<0.001
IPF absolute (/uL)	8,662 \pm 3,908	16,951 \pm 7,424	13,805 \pm 5,097	<0.001
MPV (fL)	10.6 \pm 0.9	12.1 \pm 1.0	11.6 \pm 1.0	<0.001
PDW (fL)	12.80 \pm 1.7	15.96 \pm 2.7	15.26 \pm 2.9	<0.001
PCT (%)	0.25 \pm 0.05	0.25 \pm 0.08	0.24 \pm 0.05	0.940

IPF: Immature platelets fraction; MPV: Mean platelet volume; PDW: Platelet Distribution Width;

PCT: plateletcrit

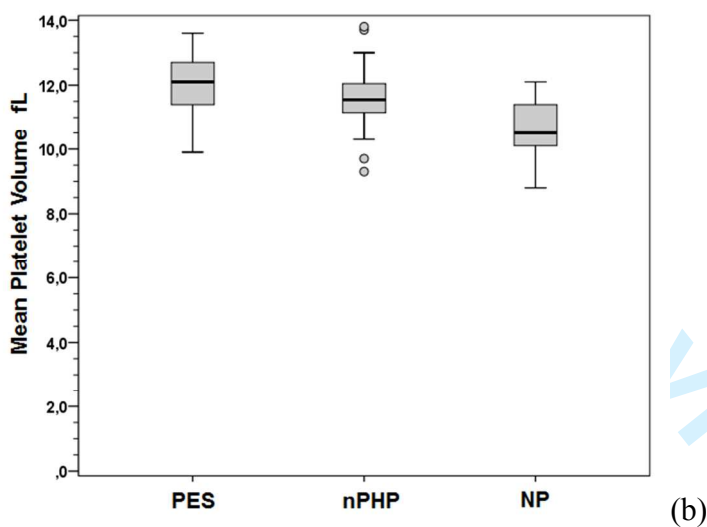
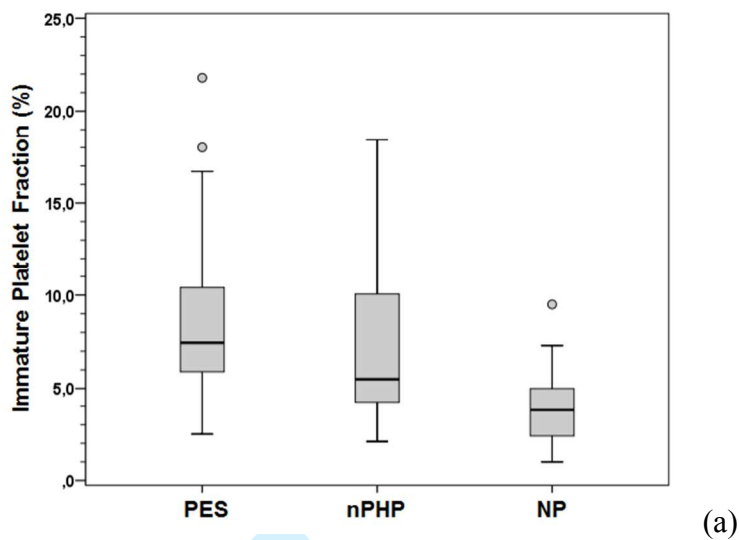


Figure 1

a. Patient distribution according to IPF result.

b. Patient distribution according to the MPV result. (PES= Preeclampsia Syndrome; NP=

Normotensive Controls; nPHP= non-proteinuric hypertensive pregnancy)

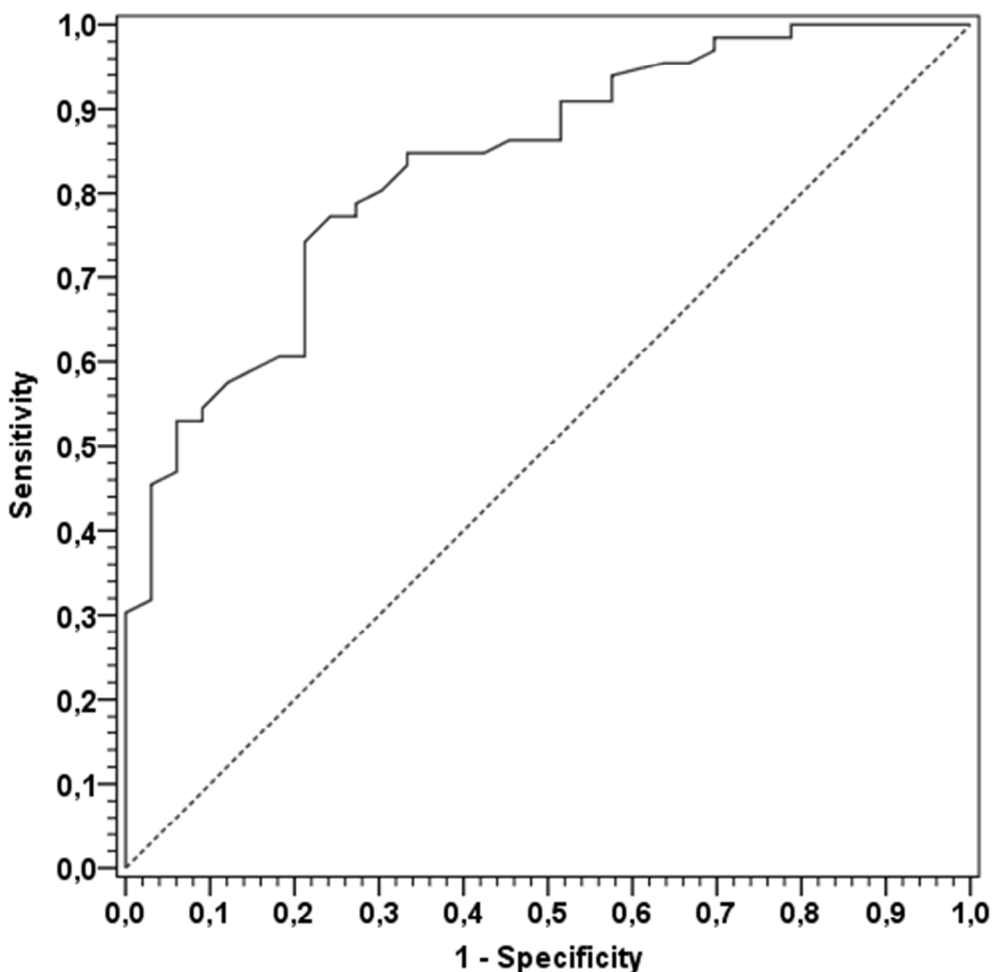


Figure 2- ROC curve of the gestational hypertension disorder and normotensive pregnancy for Imature Platelet Fraction.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60