

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS

GIOVANNA NATÁLIA ANGELI

**EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE OS ÍNDICES
PLAQUETÁRIOS EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL**

Belo Horizonte - MG

2020

GIOVANNA NATÁLIA ANGELI

**EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE OS ÍNDICES
PLAQUETÁRIOS EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Paula Lucas Mota

Área de Concentração: Hematologia

Belo Horizonte

2020

Angeli, Giovanna Natália.
A582e Efeito do tempo de armazenamento sobre os índices plaquetários em amostras de sangue total / Giovanna Natália Angeli. – 2020.
98 f. : il.

Orientadora: Ana Paula Lucas Mota.

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

1. Plaquetas (Sangue) – Teses. 2. Contagem de plaquetas – Teses. 3. Índices plaquetários – Teses. 4. Sangue – Exame – Teses. I. Mota, Ana Paula Lucas. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD:616.15



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE OS ÍNDICES PLAQUETÁRIOS EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL

GIOVANNA NATÁLIA ANGELI

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

Aprovada em 30 de março de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Profª. Ana Paula Lucas Mota - Orientadora
UFMG

Profª. Maria das Graças Carvalho
UFMG

Profª. Chams Bicalho Maluf
UFMG

Belo Horizonte, 30 de março de 2020.

Prof. André Luís Branco de Barros
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Análises Clínicas e
Toxicológicas da UFMG

Prof. André Luís Branco de Barros
Coordenador Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas – PPGACT

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Paula, pela oportunidade concedida no curso de Atualização em Hematologia Clínica e Laboratorial, onde tive o primeiro contato com o esboço do atual estudo realizado, pelo encorajamento a fazer parte do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, por me aceitar em seu grupo de pesquisa e pelo incentivo constante no processo de orientação.

Difícil é transmitir com palavras o sentimento de gratidão à minha família, que acreditaram e confiaram em mim em todas as circunstâncias, desde a graduação até a pós-graduação. Agradeço pelos valores que guardei, pela perseverança que aprendi e principalmente pelo encorajamento à concretização dos meus desejos. Nada pode apagar esta história.

Ao meu amor, Luma Martins, dizer obrigada não é suficiente para agradecer o quão presente, estimuladora, paciente e apoiadora você foi nessa jornada. Eu tive sorte de encontrar você. Gostaria de poder retribuir da mesma forma todo auxílio proporcionado a mim em momentos futuros de nossa vida.

Agradeço à UFMG, que mesmo passando por períodos de dificuldade financeira e retrocessos de ordem política, permaneceu com o compromisso educacional de qualidade, assegurando condições que me proporcionaram dias de aprendizagem muito ricos, além de assumir postura de resistência e perseverar na luta da valorização da educação pública assim como no processo de fortalecimento da ciência, cultura e tecnologia.

Ao IPSEMG, meu local de trabalho, que permitiu a realização deste estudo em seu domínio físico e que se manteve favorável à manutenção do projeto de pesquisa dentro das adversidades decorridas durante o percurso, expresso minhas congratulações.

Agradeço também a todos os pacientes voluntários que prontamente se dispuseram a colaborar com este trabalho através da doação de amostras de sangue, concedendo-me a oportunidade de fazer ciência e trazer retorno à sociedade.

Meu reconhecimento e gratidão à Horiba Instruments®, que favoreceu e

viabilizou a efetivação de todo processamento de amostras, estimulando à produção científica no Brasil.

Aos colegas do SPCML: meu muito obrigada para aqueles que doaram amostras de sangue para a finalização deste projeto, pelo consentimento e apoio da chefia e por compartilhar momentos de descontração e troca de experiências.

E por fim, parabênizo à mim por me permitir iniciar um projeto de pesquisa, por arriscar, apesar das consequências, por acreditar em minha potência e capacidade, por persistir quando tudo parecia ir contra, por relevar situações adversas e desencontradas e por florescer após este processo.

RESUMO

Plaquetas são fragmentos citoplasmáticos derivados dos megacariócitos da medula óssea que estão envolvidos no funcionamento de diversas funções além da hemostasia. Atualmente, a investigação laboratorial não se resume apenas na contagem de plaquetas, onde resultados obtidos em analisadores hematológicos modernos trazem um grupo de índices plaquetários derivado da contagem destas células – volume plaquetário médio (VPM), coeficiente de variação do volume plaquetário (PDW) e o plaquetócrito (PCT) – que não estão totalmente inseridos na rotina de investigação laboratorial devido à dificuldade de padronização e interferência de variáveis pré-analíticas. Este estudo foi realizado para averiguar o efeito do tempo de armazenamento sob estes índices utilizando-se o equipamento Yumizen H2500, por meio da análise de 60 amostras em diferentes tempos: até 15 minutos (T0), 30 minutos (T1), 1 hora (T2), 2 horas (T3) e 3 horas (T4) após a coleta. As médias da contagem de plaquetas não demonstraram diferença significativa nos tempos avaliados; já as médias obtidas de VPM indicaram diferença estatística, com aumento do VPM, entre T0 e T2, T0 e T3 e T0 e T4; por sua vez a análise dos resultados de PCT indicou que houve diferença significativa entre T0 e T4, com aumento do mesmo; e por fim houve aumento estatisticamente significativo nas médias de PDW entre os tempos T0 e T3 e T0 e T4. O estudo demonstrou que não existe correlação entre PCT e PDW e entre PCT e VPM; por outro lado, houve correlação inversamente proporcional entre a contagem de plaquetas e a determinação de VPM nos tempos analisados assim como entre a contagem de plaquetas e PDW nos tempos T0 e T1; já entre a contagem de plaquetas e PCT e entre VPM e PDW houve correlação diretamente proporcional entre as variáveis. Portanto, foi demonstrado que os valores dos índices plaquetários sofrem impacto do tempo com aumento de seus valores, exceto a contagem de plaquetas e que o tempo de análise depois da coleta deve ser padronizado em até 30 minutos para liberação de todos os parâmetros estudados no laudo do hemograma.

Palavras-chave: Índices plaquetários. VPM. PCT. PDW. Contagem de plaquetas.

ABSTRACT

Platelets are cytoplasmic fragments derived from bone marrow megakaryocytes that are involved in the functioning of several functions in addition to hemostasis. Currently, laboratory investigation is not limited to platelet counting, where results obtained in modern hematological analyzers bring a group of platelet indexes derived from the counting of these cells - mean platelet volume (MPV), platelet distribution width (PDW) and the plateletcrit (PCT) - which are not fully inserted in the routine of laboratory investigation due to the difficulty of standardization and interference of pre-analytical variables. This study was carried out to verify the effect of the storage time under these indexes using the Yumizen H2500 equipment, by analyzing 60 samples at different times: up to 15 minutes (T0), 30 minutes (T1), 1 hour (T2), 2 hours (T3) and 3 hours (T4) after collection. Platelet count means did not show significant difference in the evaluated times; the means obtained from MPV indicated a statistical difference, with an increase in MPV, between T0 and T2, T0 and T3 and T0 and T4; in turn, the analysis of the PCT results indicated that there was a significant difference between T0 and T4, with an increase in the same; and finally, there was a statistically significant increase in PDW averages between times T0 and T3 and T0 and T4. The study demonstrated that there is no correlation between PCT and PDW and between PCT and MPV; on the other hand, there was an inversely proportional correlation between the platelet count and the determination of MPV in the analyzed times as well as between the platelet count and PDW in the times T0 and T1; between platelet count and PCT and between MPV and PDW there was a directly proportional correlation between the variables. Therefore, it was demonstrated that the values of the platelet indexes are impacted by time with an increase in their values, except for the platelet count and that the analysis time after collection must be standardized within 30 minutes to release all parameters studied in the report of blood count.

Keywords: Platelet indexes. MPV. PCT. PDW. Platelet count.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microscopia de um megacariócito corado por hematoxilina-eosina	24
Figura 2 – Esquema da cascata de ativação plaquetária levando à formação do tampão hemostático	26
Figura 3 – Esquematização da metodologia óptica de detecção e contagem de células do sangue	29
Figura 4 – Histograma da distribuição do tamanho das plaquetas e definição do PDW.....	30
Figura 5 – Citograma normal de plaquetas no analisador Advia® 120	31
Figura 6 – Distensão sanguínea feita com amostra anticoagulada com EDTA demonstrando ausência de grumos plaquetários e satelitismo plaquetário	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Contagem de plaquetas nas diferentes condições de tempo de análise	45
Gráfico 2 – Distribuição das medias de VPM frente às condições estabelecidas..	46
Gráfico 3 – Valores de PCT nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4.....	47
Gráfico 4 – Resultados de PDW nos tempos de análise delineados	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Correlação entre contagem de plaquetas e VPM nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4.....	49
Tabela 2 – Correlação entre contagem de plaquetas e PCT nas diversas condições	49
Tabela 3 – Correlação entre contagem de plaquetas e PDW frente aos diferentes tempos de ensaio	49
Tabela 4 – Correlação entre VPM e PCT	50
Tabela 5 – Correlação entre VPM e PDW.....	50
Tabela 6 – Correlação entre PCT e PDW	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP – Adenosina Difosfato

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FVW – Fator de Von Willebrand

fL – Fentolitros

GP IIb/IIIa – Glicoproteína IIb/IIa

GP IIb/V/IX – Glicoproteína IIb/V/IX

HGIP – Hospital Governador Israel Pinheiro

ON – Óxido Nítrico

PCT – Plaquetócrito

PDW – Coeficiente de Variação do Volume Plaquetário

PGI₂ – Prostaglandina I₂

SPCML – Serviço de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial

T0 – Tempo Zero

T1 – Tempo Um

T2 – Tempo Dois

T3 – Tempo Três

T4 – Tempo Quatro

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TPO – Trombopoietina

VCM – Volume Corpuscular Médio

VPM – Volume Plaquetário Médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Plaquetas	23
2.1.1 <i>Biogênese</i>	23
2.1.2 <i>Função</i>	25
2.2 Métodos de Determinação de Plaquetas e Índices Plaquetários	27
2.2.1 <i>Métodos de contagem de plaquetas</i>	27
2.2.2 <i>Métodos de determinação dos índices plaquetários</i>	29
2.2.3 <i>Interferências na determinação de plaquetas e dos índices plaquetários</i>	30
2.3 Importância Clínica dos Índices Plaquetários	33
2.4 Intervalo de Referência	35
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Aspectos Éticos	39
4.2 Casuística	39
4.2.1 <i>Crterios de inclusão</i>	40
4.2.2 <i>Crterios de exclusão</i>	40
4.3 Métodos	41
4.3.1 <i>Análise automatizada: Processamento das amostras no equipamento Yumizen H2500</i>	41
4.3.2 <i>Análises das amostras nos tempos pré-estabelecidos</i>	42
4.3.3 <i>Confecção de lâminas hematoscópicas no equipamento SPS Evolution</i>	43
4.3.4 <i>Análise microscópica dos esfregaços sanguíneos</i>	43
4.4 Análises Estatísticas	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Testes comparativos dos parâmetros plaquetários nos diversos tempos avaliados	45
5.2 Testes de Correlação dos parâmetros plaquetários nos diversos tempos avaliados	48
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	59
8 PERSPECTIVAS DO ESTUDO	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	71
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP UFMG	77
ANEXO B – Autorização da Coordenação do Comitê de Pesquisa e Ensino do Hospital Governador Israel Pinheiro	83
ANEXO C – Contrato de Cooperação Técnico Científica Horiba	87
ANEXO D – Parecer Consubstanciado do CEP IPSEMG	91

1 INTRODUÇÃO

Em 1882, o patologista italiano Giulio Bizzozzero foi o primeiro estudioso a descrever as plaquetas como o terceiro elemento morfológico do sangue não relacionado aos eritrócitos e aos leucócitos, além de reconhecer também seu papel na coagulação e trombose (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015; RIBATTI, 2007). Mais recentemente, está bem estabelecida sua definição como fragmentos citoplasmáticos derivados dos megacariócitos da medula óssea, detentoras de uma sofisticada complexidade intracelular e atuação em eventos diversos, não limitadas apenas à agregação inicial e formação de um tampão hemostático (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015; RONDINA, 2015).

Anteriormente, os estudos plaquetários limitavam-se à contagem de plaquetas e às referências morfológicas sobre macroplaquetas, satelitismo e agregação plaquetária. Com a emergência dos analisadores hematológicos de segunda geração, na década de 1980, tornou-se possível a determinação automática de vários parâmetros (FARIAS; DAL BÓ, 2010). Esses instrumentos são capazes de determinar, além da contagem plaquetária, os parâmetros volume plaquetário médio (VPM), coeficiente de variação do volume plaquetário (PDW, do inglês, *platelet distribution width*) e o plaquetócrito (PCT).

O advento destes indicadores permitiu a análise integral das plaquetas, uma vez que, embora a avaliação cuidadosa do tamanho destas partículas em uma distensão sanguínea seja rápida e acurada, ela é subjetiva, pois a morfologia é enganosa para a estimativa do tamanho plaquetário. (MALUF, 2011; FARIAS; DAL BÓ, 2010). Além disso, a análise dos resultados dos parâmetros plaquetários pode indicar anormalidades clínicas significativas, mesmo se a contagem de plaquetas estiver nos limites normais (FARIAS; DAL BÓ, 2010). Recentemente, estes parâmetros obtiveram destaque no meio acadêmico, pois numerosos estudos foram realizados comprovando a utilidade e a relação desses parâmetros com diversas condições clínicas (RODRIGUES *et al*, 2013; BUCH *et al*, 2017; MONTEIRO, 2017; MONTEIRO JÚNIOR; TORRES; SOBRAL FILHO, 2019).

A contagem e o cálculo dos parâmetros plaquetários feitos por meio dos analisadores hematológicos automatizados é de fácil execução, baixo custo e disponível

na maioria dos laboratórios clínicos (MALUF, 2011). Embora seja uma metodologia de baixa complexidade, muitos laboratórios ignoram a informação dos índices plaquetários por serem pouco compreendidos e utilizados, tendo em vista algumas limitações relacionadas com a dificuldade de padronização e interferência de variáveis pré-analíticas, como temperatura e tempo de estocagem do material (MALUF, 2011; MONTEIRO, 2017; WENDLAND *et al*, 2009). Ademais, pouco se conhece a respeito dos valores de referência desses índices.

Levando em principal consideração o tempo de estocagem das amostras sanguíneas, é sabido que a retirada do sangue da circulação para conservação *in vitro* transfere as células sanguíneas para um ambiente diferente do encontrado no organismo vivo, o que promove uma série de alterações hematológicas, morfológicas, hemogasométricas e bioquímicas, que em conjunto são conhecidas como lesões de armazenamento (SOUSA *et al*, 2012). As plaquetas e índices plaquetários não fogem a essa regra, onde estudos prévios relataram, por exemplo, que os valores de VPM aumentam em um padrão tempo-dependente, devido ao inchaço plaquetário, quando EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) é usado como anticoagulante (MONTEIRO, 2017; RODRIGUES *et al*, 2013).

Tendo em vista o exposto anteriormente, estudos adicionais são necessários para promover maiores esclarecimentos em relação a esses parâmetros e sua padronização. A proposta deste trabalho foi avaliar a variação dos valores obtidos nas contagens de plaquetas e nas determinações do VPM, PCT e PDW em amostras sanguíneas coletadas em EDTA em cinco períodos pré-estabelecidos. Esta análise mostra-se relevante, pois considerando as fases pré-analítica e analítica, a padronização deste procedimento é essencial para que o mesmo se torne útil na rotina clínica, tendo como objetivo diminuir a dificuldade de interpretação da heterogeneidade do tamanho plaquetário, esclarecer aos profissionais analistas clínicos sobre o valor dos índices plaquetários, além de auxiliar na emissão de laudos com informações mais completas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plaquetas

2.1.1 Biogênese

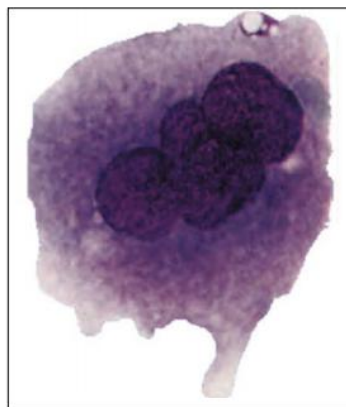
As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos anucleados, com cerca de 2 - 4 μm de diâmetro e espessura em torno de 1 μm , que possuem formato discóide característico (RODRIGUES *et al*, 2013; MACHLUS, 2013). Quando examinadas ao microscópio ótico, tingida por corantes de *Romanovsky*, tem limites pouco precisos, contendo finos grânulos azurófilos dispersos no citoplasma ou no centro da célula (BAIN, 2016; LORENZI, 2006). Entretanto, vistas ao microscópio eletrônico, são estruturas de constituição muito complexa (LORENZI, 2006).

Apesar da falta de um núcleo, as plaquetas são partículas metabolicamente ativas porque contêm retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e mitocôndrias, além de sintetizarem proteínas através do RNA mensageiro e possuírem uma variedade diferente de grânulos (MANCUSO; SANTAGOSTINO, 2017). O metabolismo das plaquetas se baseia na glicólise anaeróbica e na fosforilação oxidativa das mitocôndrias. Estes processos são executados a fim de conseguir a energia necessária de que precisam para manter o equilíbrio osmótico dos níveis de Na^+ , K^+ , H^+ e Ca^{2+} , manter a integridade estrutural da célula, regular os processos sintéticos e permitir a resposta das plaquetas ao estímulo (GREER, 2014).

São formadas e liberadas na corrente sanguínea por células precursoras chamadas megacariócitos que residem principalmente dentro da medula óssea, também podendo ser encontrados no pulmão e, mais raramente, no sangue periférico (LEFRANÇAIS *et al*, 2017; PATEL, 2005). Os megacariócitos são formados no sistema hematopoiético a partir da célula primitiva *stem cell*, sendo as maiores (50-100 μm) e também uma das células mais raras na medula óssea, constituindo menos de 1% dessas células (Figura 1) (RODRIGUES *et al*, 2013; MACHLUS, 2013; PATEL, 2005.). Sua produção é controlada pela trombopoietina (TPO), produzida no

rim e no fígado, sendo considerada a única citocina conhecida necessária para que os megacariócitos mantenham uma massa plaquetária constante. (RODRIGUES *et al*, 2013; PATEL, 2005). A TPO age em conjunto com outros fatores, incluindo as interleucinas IL-3, IL-6 e IL-11, embora estas citocinas não sejam essenciais para a maturação dos megacariócitos (PATEL, 2005). Além disso, o microambiente da medula é indispensável para a produção das plaquetas (BUDAG, 2013). Este último é um microambiente indutivo complexo constituído por células produtoras de citocinas e fatores de crescimento, assim como proteínas de matriz extracelular, que em conjunto são responsáveis pela estimulação da hematopoese e promoção de um local adequado para a sobrevivência, sustentação das células hematopoiéticas e diferenciação celular (CARMO, 2012; ANJOS; ALVARES-SILVA; BORELLI, 2000).

Figura 1 – Microscopia de um megacariócito corado por hematoxilina-eosina.



Megacariocito

Fonte: Adaptado de Rivadeneyra *et al* (2016, p. 235).

A produção de plaquetas pelos megacariócitos requer uma série de eventos de remodelação que resultam na libertação de milhares de plaquetas a partir de um único megacariócito. Durante a maturação, os megacariócitos aumentam de tamanho, tornando-se poliploides sem a divisão do citoplasma. A replicação do DNA ocorre e conduz à expansão de proteínas citoesqueléticas e do seu conteúdo citoplasmático, criando extensões pseudopodiais ramificadas chamadas pró-plaquetas. (LEFRANÇAIS; LOONEY, 2019; MACHLUS, 2013; PATEL, 2005). Estas atravessam para o lúmen dos vasos sanguíneos sinusoidais da medula óssea, se fragmentam do corpo do megacariócito sob ação de cisalhamento e fluxo turbulento sanguíneo,

permeiam o sangue periférico e amadurecem em plaquetas enquanto em circulação (LEFRANÇAIS; LOONEY, 2019; MACHLUS, 2013; PATEL, 2005).

A vida das plaquetas no sangue dura em média de 9 a 12 dias e ao final desse período vão ficando mais velhas, lesadas ou não funcionantes, quando são removidas da circulação pelas células reticuloendoteliais do baço e fígado (RODRIGUES *et al*, 2013). Após serem liberadas da medula óssea pelos megacariócitos, aproximadamente 70% das plaquetas estão presentes na circulação e 30% estão retidas no baço (BUDAG, 2013). Normalmente a medula óssea produz todos os dias aproximadamente 30.000 plaquetas por mililitro de sangue (RODRIGUES *et al*, 2013).

2.1.2 Função

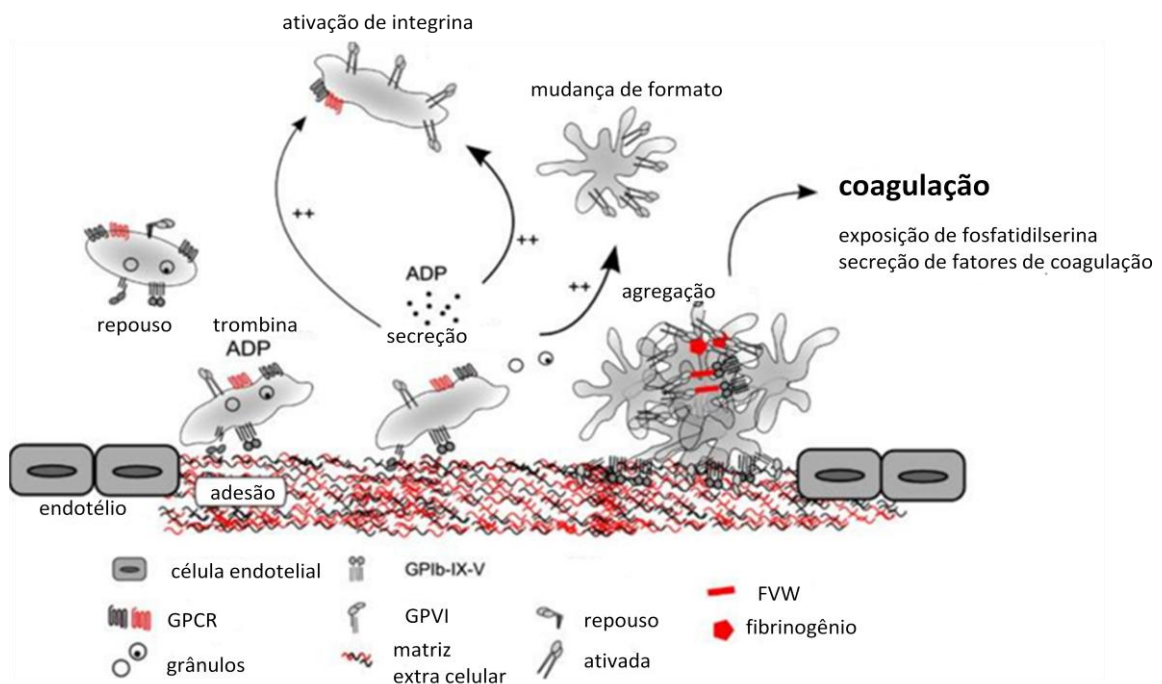
Tradicionalmente, as plaquetas desempenham um papel central tanto na hemostasia normal quanto na hemorragia patológica e na trombose (PAKALA, 2011). Estas partículas circulam nas proximidades das paredes vasculares como citoplastos anucleados em estado de repouso, sendo protegidas contra ativação prematura pela monocamada endotelial saudável, que fornece uma barreira natural à trombose, juntamente com a liberação de inibidores pelo endotélio intacto, como óxido nítrico (ON) e prostaglandina I₂ (PGI₂) (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015). Em resposta a sinais de ativação, ou seja, após lesão do vaso sanguíneo, as plaquetas entram em contato com a matriz extracelular subjacente, seu fenótipo quiescente muda para uma partícula efetora e versátil, desempenhando funções como adesão, agregação e formação do tampão hemostático primário (Figura 2) (OLIVEIRA *et al*, 2013).

A adesão plaquetária ao colágeno subentotelial do vaso danificado ocorre por meio da interação do receptor plaquetário Glicoproteína Ib/V/IX (GP Ib/V/IX) com a molécula de adesão Fator de Von Willebrand (FVW), ocorrendo dentro de 1-3 segundos após a injúria vascular (KICKLER, 2006). Segundo Castro (2006), essas moléculas são consideradas responsáveis pela regulação primária da adesão plaquetária. Assim, essa adesão leva as plaquetas a iniciarem a liberação do conteúdo dos seus grânulos citoplasmáticos, constituídos principalmente de adenosina difosfato

(ADP) e tromboxano A_2 , importantes, respectivamente, na ativação de outras plaquetas e vasoconstrição, além da mobilização de Ca^{2+} do sistema tubular denso (RODRIGUES *et al*, 2013; SANGKUH *et al*, 2011). Com a consequente secreção destas substâncias, a morfologia da plaqueta se modifica, assumindo uma conformação com pseudópodes, o que auxilia a agregação das plaquetas entre si (KICKLER, 2006).

Em seguida, ocorre a agregação plaquetária (ligação plaqueta-plaqueta), processo que envolve o fibrinogênio e o receptor de superfície Glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), formando um grande conglomerado plaquetário, chamado de tampão hemostático primário. No estado de repouso, o fibrinogênio não se liga às plaquetas, mas com o processo de ativação ocorrem alterações conformacionais do receptor GP IIb/IIIa, permitindo a junção de ambos (KICKLER, 2006). Esse tampão é reversível, tornando-se definitivo apenas após a ativação da cascata de coagulação e geração de trombina, a qual converte o fibrinogênio em fibrina dentro e sobre o tampão plaquetário, criando uma massa fundida de plaquetas, correspondendo ao tampão hemostático secundário (RODRIGUES *et al*, 2013).

Figura 2- Esquema da cascata de ativação plaquetária levando à formação do tampão hemostático.



As plaquetas aderem ao tecido subendotelial no local da lesão via receptores GP IIb/IIIa e FwW e, por fim, se agregam juntas. Os grânulos liberados pelas plaquetas ati-

vam outras, e o início da coagulação leva à formação de fibrina e agregação plaquetária, que ajuda a estabilizar o coágulo e interrompe o sangramento. Fonte: Adaptado de Golebiewska e Poole (2015, p. 154).

Em adição a esse papel das plaquetas na formação de trombos na hemostasia normal, essencialmente a mesma sequência de eventos resulta em doenças trombóticas e no desenvolvimento das complicações ditas isquêmicas, tais como infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico e doença vascular periférica (SAHRMA; BERGER, 2011). As manifestações do quadro clínico isquêmico poderão ter maiores ou menores consequências, dependendo da artéria ocluída, da intensidade da isquemia, do tempo de evolução do quadro isquêmico e da presença de circulação colateral de suplência (CASTRO *et al*, 2006).

Desde o início dos anos 2000 até os dias mais recentes, novas observações e descobertas estabeleceram adicionais desempenhos plaquetários. Os processos ditos não tradicionais destas partículas abrangem atividades como iniciar e amplificar a inflamação, sintetizar proteínas, interagir com células da resposta imune, participar na progressão tumoral, angiogênese e metástase (MANCUSO; SANTAGOSTINO, 2017; OLIVEIRA *et al*, 2013).

2.2 Métodos de Determinação de Plaquetas e Índices Plaquetários

2.2.1 Métodos de contagem de plaquetas

A contagem de plaquetas em amostras sanguíneas é utilizada para diagnosticar e auxiliar no tratamento das doenças hemorrágicas, sendo importante na caracterização da trombocitopenia e da trombocitose (BUDAG, 2013).

No início, as contagens eram feitas manualmente, onde as plaquetas podiam ser identificadas por métodos diretos e indiretos. Nos métodos diretos, as plaquetas eram analisadas em hemocitômetros, ao microscópio óptico comum ou de contraste de fase, onde as amostras eram diluídas com proporções e em compostos específicos conforme a técnica empregada. A técnica de *Brecher-Cronkite* utilizava o oxalato de amônio como diluente, o qual é capaz de lisar as hemácias, ocasionando uma

contagem mais alta e mais exata que a técnica de *Rees-Ecker*, que utilizava formol-citrato e mantinha os eritrócitos intactos (BAIN, 2016; DANTAS *et al*, 2010). Já no método indireto de *Fônio* era realizado por meio de uma estimativa em lâmina de esfregaço corada, calculando-se a proporção de plaquetas encontradas para cada 1.000 eritrócitos. Este último método nos traz uma contagem mais elevada em comparação com os outros dois (BUDAG, 2013).

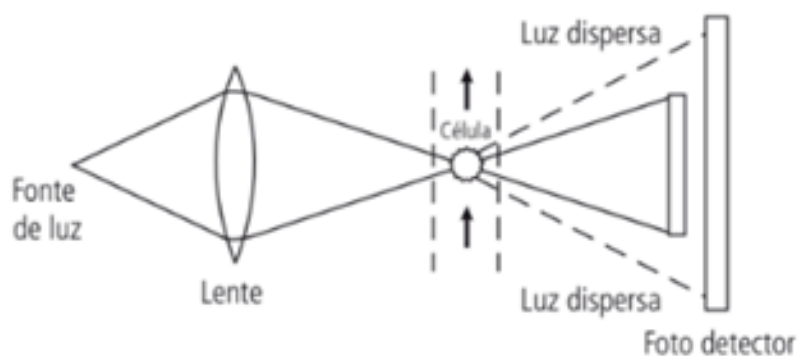
Em geral, as contagens nos hemocítomos são mais imprecisas, trabalhosas, morosas e sofrem interferências de alguns fatores, como a experiência do analista e a qualidade do microscópio e dos reagentes. É de conhecimento que a contagem manual de plaquetas ainda é usada rotineiramente em laboratórios de pequeno porte, porém é também utilizada em laboratórios bem equipados, nos casos de análise de amostras com grande proporção de plaquetas gigantes. Além disso, esses métodos poderiam ser empregados para fins didáticos, em pesquisas e/ou em conferências intralaboratoriais. Fora estas condições, a contagem de plaquetas feita em equipamentos totalmente automatizados tem precisão bastante superior à das contagens manuais (DANTAS *et al*, 2010).

A contagem eletrônica iniciou com a patente, por Wallace Coulter, em 1950, de um dispositivo capaz de contar e medir os pulsos de condutividade causados pela passagem de partículas suspensas em líquido através de um orifício pelo qual flui uma corrente elétrica, tendo assim criado o primeiro método de estimar eletronicamente as células sanguíneas, a impedância elétrica (FAILACE, 2009). A contagem por impedância é baseada na análise dimensional, onde um pulso representa uma célula e o tamanho do pulso é proporcional ao tamanho da célula (ZANDECKI *et al*, 2007). Atualmente, neste princípio, eritrócitos e plaquetas geralmente compartilham um mesmo canal de impedância, sendo distinguidos pelo limiar de volume, onde as plaquetas normalmente são menores que 20 fL e os eritrócitos maiores que 30 fL (princípio utilizado pelos equipamentos Horiba Instruments® e Beckman Coulter®, por exemplo) (BUDAG, 2013; SILVA *et al*, 2016).

Outro procedimento automatizado utilizado para se enumerar as plaquetas é o método óptico ou por dispersão de luz (Figura 3). Este sistema pode ser utilizado como metodologia primária (por exemplo, equipamentos da Siemens® Diagnostics) ou em conjunto com a impedância (exemplo equipamentos da Sysmex®) para a análise dos componentes sanguíneos. As células deslocam-se por uma câmara de

fluxo por onde passa um feixe de *laser*, e a interação entre os dois provoca alterações no feixe luminoso, onde a intensidade e o ângulo da luz são medidos, permitindo a quantificação (número de vezes que a luz dispersa incide sobre o fotodetector do sistema) e determinação do tamanho da célula e granularidade (desvio da luz frontal e lateral) (MALUF, 2011; SILVA *et al*, 2016).

Figura 3 – Esquemática da metodologia óptica de detecção e contagem de células do sangue.



No sistema óptico, a interação das células com o feixe de *laser* monocromático proveniente da fonte de luz provoca a dispersão da luz em várias direções. Essas alterações são captadas pelo fotodetector e conforme o padrão é reconhecido, as células são contadas e classificadas. Fonte: Adaptado de Silva *et al* (2016, p. 21).

Em refinamento mais recentemente, as plaquetas podem ser contadas em citômetro de fluxo após marcação com anticorpos monoclonais fluorescentes anti-proteínas específicas expressas na superfície da membrana das plaquetas, como o CD61 (equipamentos Abbott® Diagnostics) (BAIN, 2016; FAILACE, 2009; BRIGSS, 2007).

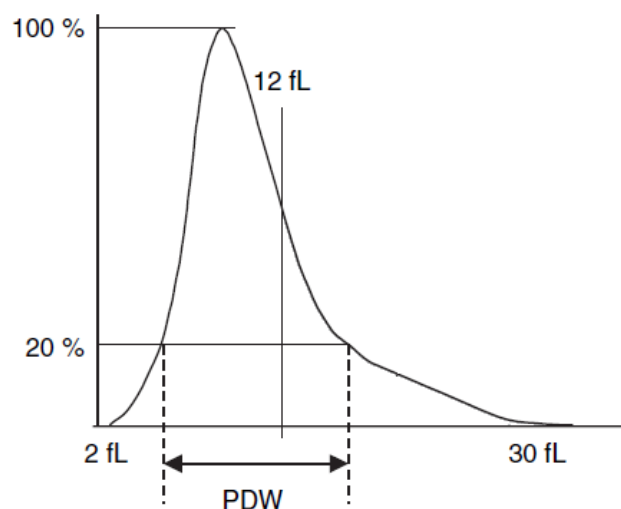
2.2.2 Métodos de determinação dos índices plaquetários

Nos analisadores hematológicos, a classificação das células depende de uma discriminação com base na forma e na amplitude dos sinais gerados em decorrência das interações entre as células e a região de detecção. Nos equipamentos que utilizam a impedância como método de contagem de plaquetas, o analisador plota as células em uma curva de Gauss com distribuição log normal conforme seu volume, onde a abscissa refere-se propriamente ao volume e a ordenada à frequência da

detecção da célula (FAILACE, 2009; SILVA *et al*, 2016). Assim, o histograma de volume de plaquetas permite uma observação visual da distribuição desta série hematólogica e a partir dele certos parâmetros são derivados (Figura 4).

O PDW corresponde à largura da curva de distribuição ao nível de 20% do pico (o pico do histograma equivale a 100%), medido em fentolitros (fL) (OZTURK, 2016). Já o VPM é determinado diretamente pela análise do histograma, onde o mesmo é calculado a partir de uma transformação logarítmica da curva, produzindo uma média geométrica (BUDAK, 2016). Há a possibilidade também de ser determinado por meio de fórmula, onde $VPM (fL) = [(PCT (\%)/ \text{contagem de plaquetas} (x10^9/L))] \times 10^5$, similar ao cálculo do volume médio das hemácias (VCM, volume corpuscular médio) (KAITO *et al*, 2005; BRIGGS, 2009). Por sua vez, o PCT representa a razão entre o volume de plaquetas e o volume de sangue total, sendo análogo ao hematócrito dos eritrócitos (OZTURK, 2016).

Figura 4 – Histograma da distribuição do tamanho das plaquetas e definição do PDW.

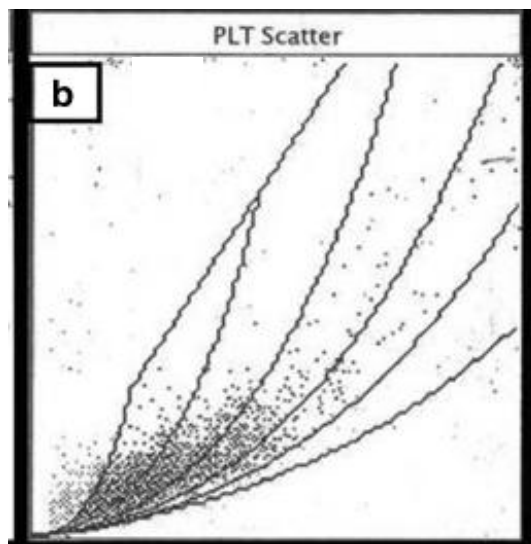


O PDW é calculado a partir do histograma de plaquetas. O eixo Y corresponde ao número de células, expresso por frequência relativa (%), enquanto o eixo X corresponde ao volume de células, em fentolitros (fL). Fonte: Adaptado de Kaito *et al* (2005, p. 699).

Nos casos de contagem de células com método óptico, a quantidade de luz dispersa (em um, dois ou mesmo quatro ângulos para alguns analisadores) é proporcional à área e, portanto, ao volume da partícula. Os sinais detectados são transpostos em um gráfico chamado citograma, levando em consideração seu volume e

valores de índices refrativos (ZANDECKI *et al*, 2007). Nestes analisadores, os índices plaquetários são derivados a partir do citograma de plaquetas (Figura 5).

Figura 5 – Citograma normal de plaquetas no analisador Advia® 120.



Este citograma é a representação gráfica da detecção de plaquetas por duas medidas de dispersão de luz, em um ângulo estreito (2-3°) e um ângulo mais largo (5-15°), onde cada célula é um ponto no gráfico, separados por limiares curvilíneos. Plaquetas maiores situam-se nas zonas superiores e plaquetas de tamanho normal e menores situam-se em zonas inferiores (BAIN, 2017). Fonte: Adaptado de Kakkar, John e Mathew (2015, p.63).

2.2.3 Interferências na determinação de plaquetas e dos índices plaquetários

Existe uma série de fatores que podem interferir em um resultado de uma análise sanguínea e, mesmo nos analisadores hematológicos mais recentes, a maioria das interferências está relacionada ou a uma condição específica do paciente, à condição de amostragem ou ao princípio da tecnologia utilizada para a análise de amostras de sangue (ZANDECKI *et al*, 2007). É importante notar que cada equipamento é afetado com pelo menos uma parte de medidas espúrias, embora o grau seja variável.

Fatores genéticos e adquiridos, como raça/cor/etnia, tabagismo, consumo de álcool e atividade física modificam a contagem de plaquetas e de VPM (BUDAK, 2016; BRASIL, 2018).

Variáveis pré-analíticas podem contribuir para resultados inadequados. Os fatores de interferência principais são relacionados à coleta, como tempo prolongado da mesma ou punção incorreta, ao transporte do material, à temperatura de conservação da amostra e à demora entre a coleta e o processamento do exame (BUDAG, 2013). Da mesma forma, o enchimento excessivo dos tubos de coleta a vácuo afeta a análise devido a uma mistura inadequada da amostra com o anticoagulante (ZANDECKI *et al*, 2007).

Existem vários relatos que destacam o anticoagulante EDTA como potencial interferente em contagens de plaquetas e alterações de alguns índices plaquetários (SHAH *et al*, 2014; MALUF, 2011; DASTJERDI *et al*, 2006). Embora o EDTA seja o anticoagulante de rotina mais utilizado para contagem de células sanguíneas, ele pode induzir alterações na forma das plaquetas tornando-as esféricas em influência de tempo e temperatura (FARIAS; DAL BÓ, 2010). Este anticoagulante promove um aumento da concentração intracelular de AMP cíclico e altera a permeabilidade da membrana citoplasmática, induzindo intumescência progressiva e diminuição da densidade óptica. Assim, conseqüentemente, o VPM aumenta em função do tempo de coleta quando determinado por impedância e diminui quando determinado por método óptico (COMAR, 2009). O aumento aparente causado é de aproximadamente 20% no VPM nas duas primeiras horas em exposição ao EDTA, em relação às amostras coletadas com citrato de sódio (FARIAS; DAL BÓ, 2010; WENDLAND, 2009). Por sua vez, valores diminuídos de VPM podem ser obtidos pelo estouro das plaquetas, também causado pelo EDTA.

Além disso, pode ocorrer um fenômeno *in vitro* chamado de pseudotrombocitopenia, que é causado pela interação de proteínas específicas das amostras com plaquetas, apenas em sangue anticoagulado com EDTA, gerando aglomerados de plaquetas que não são enumeradas pelos analisadores hematológicos, o que leva a contagens falsamente baixas (ZANDECKI *et al*, 2007). Também foram relatados casos de pseudotrombocitopenia causada por outros anticoagulantes que não o EDTA (citrato, oxalato e heparina), porém com menor frequência. Nos pacientes em que se destaca pseudotrombocitopenia, o VPM geralmente não é alterado (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2004).

Há também, mais raramente, a ocorrência de adesão das plaquetas aos leucócitos (com maior frequência em neutrófilos) na presença de EDTA, um fenômeno referido como satelitismo plaquetário. Quando o mesmo ocorre, as contagens de plaquetas são moderadamente reduzidas, levando à pseudotrombocitopenia em alguns, mas não em todos os casos (ZANDECKI *et al*, 2007).

Como mencionado anteriormente, na metodologia de impedância, as plaquetas e os eritrócitos são analisados no mesmo canal e o tamanho é o principal parâmetro para separar ambos, porém na presença de células vermelhas fragmentadas, micrócitos, crioglobulinas, ou qualquer outra causa que gere a formação de *debris*, são geradas curvas errôneas de histogramas e resultados de PDW alterados (FARIAS; DAL BÓ, 2010; ZANDECKI *et al*, 2007). Fragmentos citoplasmáticos de células leucêmicas, em leucemias agudas ou crônicas, também podem influenciar da mesma maneira. Como quaisquer partículas com menos de 20 fL podem ser contadas como plaquetas, a contagem fica espuriamente elevada e o VPM fica alterado, refletindo o tamanho do fragmento (FARIAS; DAL BÓ, 2010).

Em pacientes com hiperlipidemia, em amostras coletadas após refeições ou nutrição parenteral, os lipídios podem formar pequenas gotas *in vitro*, as quais aumentam a contagem de plaquetas em analisadores que usam o método ótico, devido ao alto índice refratário dos lipídeos (FARIAS; DAL BÓ, 2010). A metodologia de impedância parece não ser afetada.

Por fim, bactérias também podem induzir contagens de plaquetas falsamente elevadas e interferir na determinação do VPM e PDW, devido à sua presença *in vivo*. Embora seja uma situação rara, o histograma é anormal, onde é apresentado um pico de partículas de pequeno tamanho, correspondendo a bactérias ou a aglomerados bacterianos (ZANDECKI *et al*, 2007).

2.3 Importância Clínica dos Índices Plaquetários

Os parâmetros plaquetários ajudam na detecção de mudança na estrutura das plaquetas, se comportando como biomarcadores da ativação plaquetária, o que pode detectar precocemente um potencial estado protrombótico (BUCH *et al*, 2017).

Eles permitem extensas investigações clínicas refletindo sobre os valores de diagnóstico e prognóstico em uma variedade de aspectos, sem trazer custos extras aos laboratórios (BUDAK, 2016).

Em indivíduos saudáveis, a relação inversa entre VPM e contagem de plaquetas tem sido observada por vários pesquisadores (LI *et al*, 2017; FARIAS; DAL BÓ, 2010; BUTTARELLO; MEZZAPELLE; PLEBANI, 2018). Quando a produção de plaquetas diminui, a medula óssea inicia sua produção e as libera rapidamente para a circulação, sendo que as plaquetas jovens são maiores, metabolicamente e enzimaticamente mais ativas e com maior potencial trombótico (BUCH *et al*, 2017; BUDAK, 2016). Isso reflete no aumento de VPM, o qual pode ser usado como um marcador de taxa de produção e ativação plaquetárias (BUDAK, 2016; LI *et al*, 2014). Por sua vez, uma redução simultânea da contagem de plaquetas e do PCT indica que as plaquetas foram excessivamente consumidas (BUDAK, 2016)

Estudos comprovam que plaquetas grandes são consideradas como um fator de risco para o desenvolvimento de trombose e, assim, são relacionadas a um possível risco cardiovascular. É relatado um aumento do VPM e PDW em tromboembolia venosa e trombose, infarto agudo do miocárdio, doença cerebrovascular, angina instável e doença arterial coronariana e periférica (SALTO *et al*, 2012, RODRIGUES, 2013). Em desordens mieloproliferativas, como a leucemia mieloide crônica e a mielofibrose, as plaquetas frequentemente, mas não sempre, são grandes e anormalmente heterogêneas, refletindo em alterações nos índices plaquetários (LUCIJANIC *et al*, 2018; FARIAS; DAL BÓ, 2010).

A associação do aumento de VPM, PDW e contagem de plaquetas com doenças relacionadas à disfunção endotelial, como síndrome metabólica, diabetes mellitus e malignidade tem sido demonstrada em outros estudos (BUCH *et al*, 2017; LI *et al*, 2017). As lesões endoteliais causadas pela hiperglicemia sustentada, dislipidemia e resistência à insulina nos pacientes com diabetes mellitus são consideradas como um estado protrombótico. Todos esses fatores tornam as artérias suscetíveis à aterosclerose, podendo alterar as propriedades funcionais do endotélio, com consequente ativação de plaquetas, as quais são maiores e metabolicamente mais ativas (FERRONI *et al*, 2004). Assim, o estado hiperglicêmico pode repercutir no aumento do VPM e PDW (BUCH *et al*, 2017).

A correlação entre a estimulação plaquetária e a propagação do câncer tem sido demonstrada nos últimos anos. Segundo Li e colaboradores (2017) e Franco, Corken e Ware (2015), as plaquetas dão suporte à progressão do câncer, sustentando sinais proliferativos, resistindo à morte celular, induzindo a angiogênese, ativando invasão e metástase, evitando a detecção imune e apoiando as células-tronco do câncer. Em pacientes com câncer, é comum uma alta contagem de plaquetas, sendo que plaquetas ativadas desempenham um papel fundamental na capacidade de extensão do câncer através da liberação de citocinas e quimiocinas além da expressão de vários receptores de adesão (LI *et al*, 2017; OLIVEIRA *et al*, 2013).

Alguns estudos têm demonstrado a importância dos índices plaquetários em condições clínicas de trombocitopenias congênitas, como na Síndrome de Bernard-Soulier e na anomalia de May-Hegglin, onde macroplaquetas são vistas no esfregaço sanguíneo (FARIAS; DAL BÓ, 2010; ALTHAUS; GREINACHER, 2009; NORIS *et al*, 2013).

Em contraste, Gunluoglu e colaboradores (2014) demonstraram que o VPM está diminuído na tuberculose, o que poderia ser explicado pelo fato de a megacariopoiese ser afetada pelo excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda que diminuem o tamanho das plaquetas, portanto, plaquetas menores seriam liberadas da medula óssea.

Finalmente, os índices plaquetários também foram usados para avaliar a qualidade e a viabilidade de concentrados de plaquetas utilizados em transfusões (SALTO *et al*, 2012). Foi demonstrado que o VPM é uma medida confiável da função residual das plaquetas nos concentrados de plaquetas armazenados, onde seu aumento representa a deterioração do produto destinado às transfusões, e a utilização deste tipo de concentrado de plaquetas culmina em diminuição da função hemostática dessas partículas após a transfusão e à má recuperação pós-transfusional (SINGH; CHAUDHARY; RAY, 2003).

2.4 Intervalos de Referência

Os valores de referência para contagem de plaquetas são similares em ambos os sexos e independentes da idade. A contagem normal de plaquetas é amplamente citada como 150 a 400.000/mm³ de sangue total (BRIGGS, 2007).

A determinação dos valores de referência para os índices plaquetários é mais difícil, visto que sofre diversas interferências, conforme relatado anteriormente. Alguns valores de referência publicados para VPM e PDW para aparelhos que utilizam o princípio da impedância são 8 a 13 fL e 9 a 14 fL, respectivamente. Já os valores correspondentes para contadores com sistema óptico, são 7,4 a 11,2 fL e 44 a 56% (COMAR, 2009). Alguns autores têm proposto que o VPM não tem apenas um simples intervalo de referência, mas vários, os quais são altos em contagens baixas e diminuem progressivamente conforme a contagem de plaquetas aumenta, uma vez que há correlação inversamente proporcional entre a contagem de plaquetas e o VPM (COMAR, 2009; BRIGGS, 2007; RODRIGUES, 2013). Em condições fisiológicas, há uma relação direta entre VPM e PDW; ambos mudando na mesma direção (BUDAK, 2016).

Sob condições fisiológicas, a quantidade de plaquetas no sangue é mantida num estado de equilíbrio por regeneração e eliminação, e essa relação é tal que a massa plaquetária é relativamente constante, o que resulta em valores estáveis de PCT (SILVA *et al*, 2016, BUDAK, 2016). O valor de referência para o PCT é de 0,22–0,24% (BUDAK, 2016)

Em virtude dos diversos obstáculos relatados e da dificuldade de interpretação da heterogeneidade do tamanho plaquetário, sob condições normais e anormais, essas medidas são interpretadas com extrema cautela, sendo aconselhável que cada laboratório estabeleça seu próprio valor de referência (FARIAS; DAL BÓ, 2010). A utilização dos índices plaquetários na rotina clínica e laboratorial permanece, portanto, como um desafio, tanto do ponto de vista técnico quanto interpretativo. Cabe ao laboratório contribuir para sua padronização e interpretação, buscando sua utilização cada vez mais precisa na prática médica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tempo de armazenamento de amostras de sangue total colhidas em EDTA sobre os resultados das contagens de plaquetas e índices plaquetários.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a contagem de plaquetas e os índices plaquetários VPM, PCT e PDW em amostras de sangue total colhidas ao longo de cinco tempos distintos pré-estabelecidos;
- b) Avaliar as alterações encontradas nos índices VPM, PCT e PDW ao longo dos tempos de análise;
- c) Avaliar em lâminas hematoscópicas as alterações encontradas em plaquetas, para detecção de possíveis interferentes analíticos.
- d) Avaliar as correlações encontradas entre os resultados dos índices plaquetários e a contagem de plaquetas nos diversos tempos avaliados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa e seu Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram aprovados pelo Comitê de ética em pesquisa da UFMG (COEP-UFMG) sob número 93370318.7.0000.5149 (Anexo A) e pelo Comitê de ética em pesquisa do IPSEMG (CEP-IPSEMG) sob número 4.169.108 (Anexo D). O TCLE (Apêndice A) foi obtido daqueles que concordaram em participar do referido estudo, com o intuito de informar sobre os procedimentos da pesquisa, bem como a forma de participação dos envolvidos e a contribuição deste tipo de estudo para o desenvolvimento das ciências da saúde.

Ciente dos objetivos, métodos e técnicas que foram utilizados nessa pesquisa, a Coordenação do Comitê de Pesquisa e Ensino do Hospital Governador Israel Pinheiro manifestou sua autorização e apoio ao presente estudo por meio do Termo de Anuência (Anexo B).

No tocante ao auxílio financeiro, a empresa Horiba Instruments® subsidiou a aquisição dos reagentes para determinação do hemograma, e a formalização do patrocínio deu-se pelo Contrato de Cooperação Técnico Científica (Anexo C).

4.2 Casuística

Foram avaliadas 60 amostras provenientes de pacientes do atendimento ambulatorial do Hospital Governador Israel Pinheiro (HGIP) e de voluntários desta Instituição. A venopunção foi realizada nos turnos matutino e vespertino, não sendo exigido tempo mínimo de jejum. O procedimento operacional da flebotomia foi instituído seguindo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial – SBPC/ ML (2014) para coleta e preparo da amostra biológica. Foram coletadas amostras biológicas de sangue venoso em tubos à vácuo contendo anti-coagulante K3-EDTA 1,8mg/mL, utilizando-se adaptadores e agulhas 0,8x25mm ou 0,7x25mm descartáveis, obtendo-se em média o volume de 5mL de amostra. A população do estudo incluiu indivíduos sem alterações importantes nos resultados con-

tidos no hemograma, não gestantes, na faixa etária acima de 18 e abaixo de 65 anos, sendo 09 amostras de pacientes masculinos e 51 amostras de pacientes femininos.

As amostras foram avaliadas em função do tempo de exposição ao EDTA (tempo após a coleta) no analisador hematológico do Serviço de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (SPCML) do HGIP em cinco tempos de análise, sendo:

- a) T0: imediatamente após a coleta de sangue ou até o prazo máximo de 15 minutos;
- b) T1: 30 minutos após a coleta;
- c) T2: 60 minutos após a coleta;
- d) T3: 120 minutos após a coleta;
- e) T4: 180 minutos após a coleta.

Para as determinações dos tempos de avaliação e do “N” amostral foram levados em consideração estudos presentes na literatura, como descrito nas avaliações de Dastjerdi *et al* (2006), Budag e Cadore (2013) e Spezia *et al* (2018).

4.2.1 Critérios de inclusão

- a) Amostras coletas em tubos com anticoagulante EDTA;
- b) Amostras de indivíduos que não possuíam alterações importantes nos resultados contidos no hemograma;
- c) Amostras de indivíduos com ou sem jejum;
- d) Amostras de indivíduos adultos (acima de 18 anos e abaixo de 65 anos).

4.1.2 Critérios de exclusão

- a) Amostras que apresentaram trombocitopenia ou trombocitose, coágulos ou microcoágulos, amostras com satelitismo plaquetário, amostras de pacientes com pseudotrombocitopenia e amostras com crioaglutininas, as quais foram avaliadas por análise hematoscópica;
- b) Amostras que foram processadas fora dos tempos pré-estabelecidos;
- c) Amostras com hemólise excessiva, com hiperlipidemia ou hiperbilirrubinemia, as quais foram avaliadas macroscopicamente;
- d) Amostras de gestantes.

4.3 Métodos

4.3.1 *Análise automatizada: Processamento das amostras no equipamento Yumizen H2500*

As determinações dos parâmetros plaquetários foram realizadas no Setor de Hematologia do SPCML do HGIP no analisador hematológico multiparamétrico Yumizen H2500 (Horiba Instruments®, França) com capacidade para avaliar os índices plaquetários VPM, PCT e PDW. Neste equipamento, as amostras podem ser processadas em modo automático ou manual. No primeiro, os tubos de amostras fechados são colocados diretamente nas bandejas (*rack*) do equipamento, onde estas são internalizadas pela máquina, havendo a homogeneização automática por rotação das mesmas e identificação dos tubos por meio da leitura de etiquetas com código de barras, onde a extração do espécime para a análise é feita por um mecanismo de perfuração de tampa, sendo necessário um volume mínimo de 1 mL de sangue. Já no segundo modo, o operador deve manipular cada amostra individualmente, realizando sua identificação por meio de leitura de etiquetas com código de barras ou por inserção dos dados por digitação, homogeneizando a mesma manualmente por inversão suave e inserindo-a em um suporte de tubos que também será internalizado no equipamento para aspiração da amostra (com ou sem tampa), com volume mínimo de 500 µL de sangue para tubos de coleta convencionais e 250 µL

de sangue para microamostras (situações pediátricas e geriátricas) (MANUAL do usuário, 2017). Para o desenvolvimento dos testes deste experimento, optou-se pela análise em modo manual.

Em ambos os modos, são aspirados 110 µL de sangue do tubo primário, o qual segue para a válvula de amostragem, que distribui partes em volume do mesmo para as câmaras de medição, conforme a especificação de cada análise. Para a contagem de plaquetas, 0,5 µL do volume total da amostra aspirada é diluído com 5 mL de diluente eletrolítico (fluido condutor de corrente eletrônica) e homogeneizado. Essa diluição é injetada na câmara RBC/PLT, a qual contém a fotocélula analisadora. As plaquetas são contadas no mesmo canal dos eritrócitos entre 2 a 5 segundos pelo método eletrônico de variação de impedância, sendo consideradas plaquetas as partículas com volume inferior a 20 fL. Nesse método, as plaquetas em suspensão são contadas ao passarem por um orifício que contém dois eletrodos em cada lado da abertura, através dos quais uma corrente elétrica passa continuamente, onde cada célula que transpassa essa corrente gera um pulso elétrico que é proporcional em intensidade ao tamanho e volume da célula. (MANUAL do usuário, 2017).

Os parâmetros plaquetários são derivados da medida da impedância. O VPM é derivado diretamente da análise da curva de distribuição de plaquetas. O PCT é calculado de acordo com a fórmula: $PCT = PLT \times VPM / 10^6$, enquanto o PDW é equacionado a partir do histograma de distribuição de tamanho plaquetário, sendo correspondente à largura da curva ao nível de 20% do pico de frequência do histograma (MANUAL do usuário, 2017).

O analisador foi calibrado de acordo com as instruções do fabricante e passou regularmente por procedimentos de manutenção preventiva, além de ter sido verificado diariamente através de controles de qualidade comerciais em três níveis (baixo, normal e alto), com valores conhecidos, examinados no período matutino. O uso desses controles na rotina diária do laboratório vale-se para a certificação de que o equipamento está operando dentro dos limites especificados, monitorando assim a sua precisão.

4.3.2 Análises das amostras nos tempos pré-estabelecidos

As amostras de sangue total foram examinadas rigorosamente dentro dos cinco períodos de tempo pré-estabelecidos, sendo desconsideradas aquelas que por ventura não foram processadas nos intervalos descritos. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente (18° a 25°C) durante todo o procedimento analítico. Entre os intervalos dos tempos pré-estabelecidos (0-15, 30, 60, 120 e 180 minutos) de análise, as amostras permaneceram em repouso sobre a bancada, sendo homogeneizadas manualmente por inversão de 08 a 10 vezes antes de cada processamento pelo equipamento.

4.3.3 Confeção de lâminas hematoscópicas no equipamento SPS Evolution

A confeção de lâminas hematoscópicas foi operada pelo equipamento SPS Evolution (Horiba Instruments®, França), o qual realiza o esfregaço sanguíneo, identificação das lâminas hematoscópicas e gerenciamento completo da coloração.

O equipamento realiza automaticamente a aspiração de 75 µL de amostra, a qual será pipetada na parte superior da lâmina. O preparo do esfregaço é feito através de uma cunha com uma fita de esfregaço. A fita de esfregaço é colocada em 45° sobre a lâmina e o sangue previamente depositado migra ao longo da sua extensão. Após, a fita se movimenta uniformemente ao longo da lâmina de modo a dispor o sangue em uma fina camada, confeccionando o esfregaço. A identificação da amostra, data e hora são impressos na parte fosca da lâmina e depois da impressão, a lâmina é transferida para um verticalizador e dali segue para os poços de coloração (MANUAL do usuário, 2017).

A coloração é feita nos poços de coloração pela combinação de dois corantes, um alcalino e outro ácido: *May Grünwald* e *Giemsa*. Esses dois corantes são utilizados conjuntamente, onde após fixação do esfregaço pelo metanol e coloração pelo *May Grünwald*, se processa uma segunda coloração com o corante *Giemsa* (MANUAL do usuário, 2017). Os componentes celulares são corados seletivamente de acordo com a composição química de cada um.

4.3.4 Análise microscópica dos esfregaços sanguíneos

Após a coloração, as extensões sanguíneas foram analisadas utilizando-se um microscópio ótico binocular modelo CX31 (Olympus®, Japão) disponível no SPCML do HGIP. A visualização celular deu-se por meio de lentes objetivas com aumento de 100x em imersão em óleo. A análise morfológica concentrou-se na porção central do corpo do esfregaço sanguíneo e nas bordas e cauda do mesmo, com o intuito de identificar-se a presença de microcoágulos, satelitismo plaquetário, pseudotrombocitopenia, presença de aglomerado de hemácias e/ou hemácias em *rouleaux* (que possam sugerir a presença de crioaglutininas), fragmentação hemática e degranulações de leucócitos (especialmente eosinófilos), considerados como interferentes analíticos. Se alguns destes estivessem presentes, a amostra em questão era considerada inapta para avaliação dos índices plaquetários neste estudo.

4.4 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados utilizando-se o programa GraphPad PRISM (versão 5.0). A normalidade dos dados foi testada pelo método *Shapiro-Wilk*. Para comparação entre os grupos, o teste de Análise de Variância (*Analysis of Variance – ANOVA*) foi aplicado, com o objetivo de julgar variações estatisticamente significativas entre as médias dos parâmetros estudados. Para as situações em que foram identificadas diferenças significativas, tendo em vista a avaliação do nível de significância de $p \leq 0,05$, foi utilizado o teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

A investigação de correlação entre os parâmetros avaliados foi realizada pelo método de Pearson, considerando significativo o valor $p \leq 0,05$. Para os resultados conceituados como tal, o coeficiente de correlação linear do Pearson (r) foi avaliado na intenção de averiguar a intensidade e a direção da relação entre as variáveis. Os resultados de r mais próximos de +1 ou -1 foram julgados como associações fortes entre os parâmetros, ao passo que correlações próximas de zero foram consideradas como fracas.

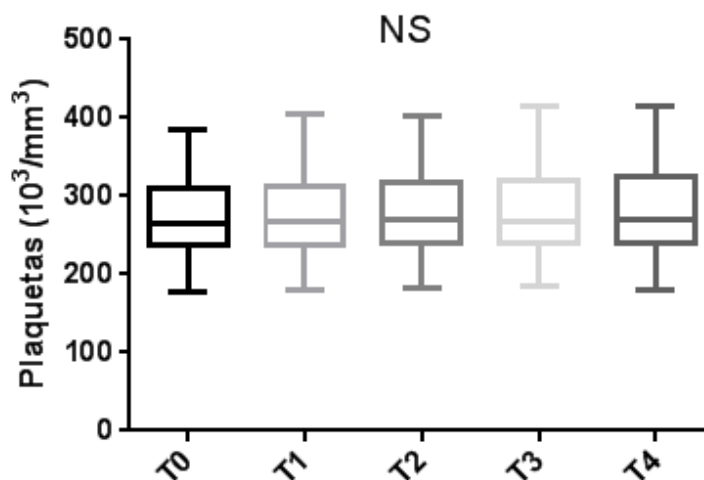
5 RESULTADOS

5.1 Testes comparativos dos parâmetros plaquetários nos diversos tempos avaliados

Analisando os dados coletados pelo teste de *Shapiro-Wilk*, observou-se que todos os valores comportam-se de acordo com uma distribuição normal. Após aplicado o teste de normalidade descrito, foram realizados os testes de comparação que resultaram nas verificações apresentadas a seguir.

A contagem de plaquetas no T0 apresentou média de 267.300 e desvio padrão de $\pm 51.370/\text{mm}^3$, no T1 $272.400 \pm 51.940/\text{mm}^3$, no T2 $274.300 \pm 53.840/\text{mm}^3$, no T3 $277.200 \pm 53.100/\text{mm}^3$ e em T4 $278.500 \pm 54.720/\text{mm}^3$, não havendo diferença significativa na distribuição dos valores ($p=0,797$) (Gráfico 1).

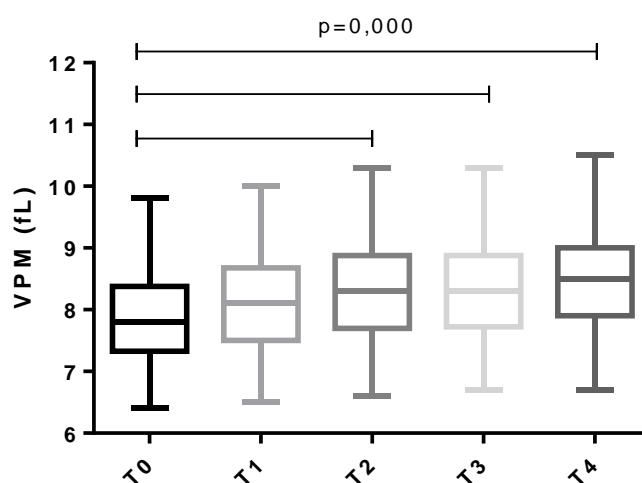
Gráfico 1 – Resultados de contagem de plaquetas nos tempos de análise estabelecidos.



NS: Não significativo; T0: imediatamente após a coleta de sangue ou até o prazo máximo de 15 minutos; T1: 30 minutos após a coleta; T2: 60 minutos após a coleta; T3: 120 minutos após a coleta; T4: 180 minutos após a coleta. Fonte: Dados da pesquisa

As determinações do VPM nas diferentes condições apresentaram médias de $7,885 \pm 0,700$ fL para o T0, $8,133 \pm 0,739$ fL para T1, $8,283 \pm 0,763$ fL para T2, $8,350 \pm 0,760$ fL para T3 e $8,468 \pm 0,755$ fL para T4, indicando diferença estatística, com aumento do VPM, entre T0 e T2, T0 e T3 e T0 e T4 ($p=0,000$) (Gráfico 2).

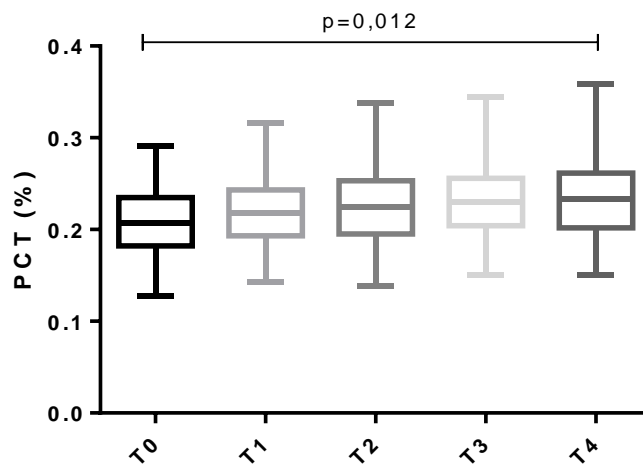
Gráfico 2 – Resultados de VPM nos tempos de análise estabelecidos.



VPM: volume plaquetário médio; T0: imediatamente após a coleta de sangue ou até o prazo máximo de 15 minutos; T1: 30 minutos após a coleta; T2: 60 minutos após a coleta; T3: 120 minutos após a coleta; T4: 180 minutos após a coleta. Fonte: Dados da pesquisa.

Quando comparados os valores de PCT nos tempos de análise determinados, obteve-se as seguintes médias e desvios-padrão: $0,210 \pm 0,038\%$, $0,220 \pm 0,039\%$, $0,226 \pm 0,043\%$, $0,230 \pm 0,042\%$, e $0,235 \pm 0,045\%$ para T0, T1, T2, T3 e T4, respectivamente. A análise desses resultados indica que houve diferença significativa entre T0 e T4, com aumento do PCT ($p=0,012$) (Gráfico 3).

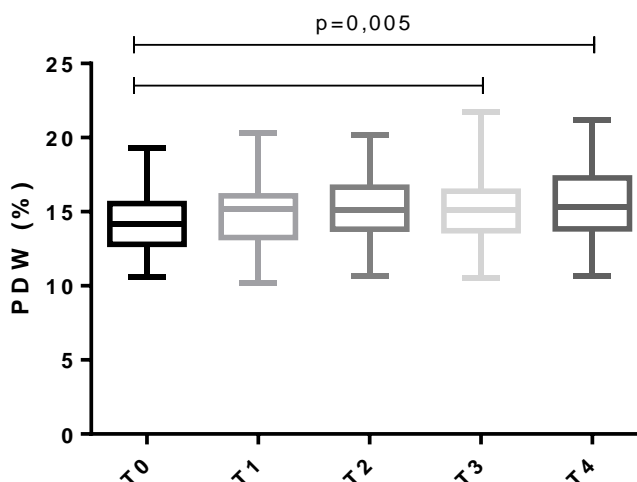
Gráfico 3 – Resultados de PCT nos tempos de análise estabelecidos.



PCT: plaquetócrito; T₀: imediatamente após a coleta de sangue ou até o prazo máximo de 15 minutos; T₁: 30 minutos após a coleta; T₂: 60 minutos após a coleta; T₃: 120 minutos após a coleta; T₄: 180 minutos após a coleta. Fonte: Dados da pesquisa

Analisando-se os dados obtidos entre as comparações dos valores de PDW, teve-se como resultado para T₀ a média de $14,27 \pm 1,95$ %, para T₁ $14,97 \pm 2,14$ %, para T₂ $15,34 \pm 2,09$ %, para T₃ $15,36 \pm 2,24$ % e para T₄ $15,69 \pm 2,25$ %. Verificou-se que houve diferença significativa entre T₀ e T₃ e T₀ e T₄ ($p=0,005$), com aumento do PDW (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Resultados de PDW nos tempos de análise estabelecidos.



PDW: coeficiente de variação do volume plaquetário; T0: imediatamente após a coleta de sangue ou até o prazo máximo de 15 minutos; T1: 30 minutos após a coleta; T2: 60 minutos após a coleta; T3: 120 minutos após a coleta; T4: 180 minutos após a coleta. Fonte: Dados da pesquisa.

5.2 Testes de Correlação dos parâmetros plaquetários nos diversos tempos avaliados

De forma a evidenciar a existência de relação ou de não relação entre as variáveis, recorreu-se à análise do método de *Pearson*, onde o coeficiente de correlação (r) foi analisado quando obtida a significância estatística expressa pelo valor $p < 0,05$. Estipulou-se realizar as correlações de todos os parâmetros plaquetários fixando-se os dados obtidos em T0 como referencial, visto que são os resultados com maior representatividade do estado *in vivo* (natural) das plaquetas, onde T0 é o tempo em que houve menor exposição destas células a fatores interferentes.

Em primeiro lugar, foi avaliada a associação entre contagem de plaquetas e a determinação de VPM. Verificou-se que a correlação entre as variáveis nos tempos T0, T1, T3 e T4 é negativa e moderada (Tabela 1), indicando que quanto menor a

contagem de plaquetas, maior o valor de VPM obtido. No tempo T2 não houve diferença significativa ($p=0,051$).

Tabela 1 – Correlação entre contagem de plaquetas e VPM.

	Plq T0	Plq T0	Plq T0	Plq T0	Plq T0
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
	VPM T0	VPM T1	VPM T2	VPM T3	VPM T4
Correlação de Pearson (r)	-0,3306	-0,3415	-0,2537	-0,3025	-0,2762
Valor de p	0,010	0,008	0,051	0,019	0,033

Plq: Contagem de Plaquetas; VPM: Volume Plaquetário Médio; -: Correlação negativa. Fonte: Dados da pesquisa.

Quando se confronta a contagem de plaquetas com os dados obtidos nas determinações de PCT, pode ser notado que há diferença significativa em todos os tempos avaliados e que a correlação entre estes é positiva e forte, fato que demonstra proporcionalidade direta entre as variáveis, ou seja, quanto maior a contagem de plaquetas, maior o valor de PCT (Tabela 2).

Tabela 2 – Correlação entre contagem de plaquetas e PCT.

	Plq T0	Plq T0	Plq T0	Plq T0	Plq T0
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
	PCT T0	PCT T1	PCT T2	PCT T3	PCT T4
Correlação de Pearson (r)	0,8834	0,8689	0,8642	0,8658	0,8630
Valor de p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Plq: Contagem de Plaquetas; PCT: Plaquetócrito; Fonte: Dados da pesquisa.

Por sua vez, quando se trata de contagem de plaquetas *versus* PDW, os dados indicam que nos tempos T0 e T1 há significância estatística com correlação negativa moderada, o que aponta que nesses dois períodos de análise quanto menor a contagem de plaquetas, maior o valor de PDW. Em contrapartida, nos tempos T2, T3 e T4 não houve correlação estatística (Tabela 3).

Tabela 3 – Correlação entre contagem de plaquetas e PDW.

	Plq T0	Plq T0	Plq T0	Plq T0	Plq T0
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
	PDW T0	PDW T1	PDW T2	PDW T3	PDW T4
Correlação de Pearson (<i>r</i>)	-0,3059	-0,3530	0,2403	0,2357	0,2269
Valor de <i>p</i>	0,018	0,006	0,064	0,070	0,081

Plq: Contagem de Plaquetas; PDW: Coeficiente de Variação do Volume Plaquetário; -: Correlação negativa. Fonte: Dados da pesquisa.

Em seguida, a relação entre as variáveis VPM e PCT sinalizou que não houve diferença estatística em nenhum dos tempos de ensaio, onde todos os valores de $p > 0,05$ (Tabela 4).

Tabela 4 – Correlação entre VPM e PCT.

	VPM T0	VPM T0	VPM T0	VPM T0	VPM T0
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
	PCT T0	PCT T1	PCT T2	PCT T3	PCT T4
Correlação de Pearson (<i>r</i>)	0,1418	0,1063	0,1092	0,08749	0,08740
Valor de <i>p</i>	0,280	0,419	0,406	0,506	0,507

VPM: Volume Plaquetário Médio; PCT: Plaquetócrito. Fonte: Dados da pesquisa.

Calculando o coeficiente de correlação de *Pearson* para VPM e PDW, encontra-se a indicação de uma forte correlação linear positiva entre as duas variáveis em todos os tempos de análise, pressupondo que à medida que se aumenta os valores de VPM, os valores de PDW também aumentam (tabela 05).

Tabela 5 – Correlação entre VPM e PDW.

	VPM T0	VPM T0	VPM T0	VPM T0	VPM T0
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
	PDW T0	PDW T1	PDW T2	PDW T3	PDW T4
Correlação de Pearson (<i>r</i>)	0,9138	0,9100	0,8957	0,8837	0,8710
Valor de <i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

VPM: Volume Plaquetário Médio; PDW: Coeficiente de Variação do Volume Plaquetário. Fonte: Dados da pesquisa.

Por último, para PCT e PDW, os dados revelam que não houve diferença estatística em nenhum dos tempos analisados ($p > 0,05$) (tabela 06).

Tabela 6 – Correlação entre PCT e PDW.

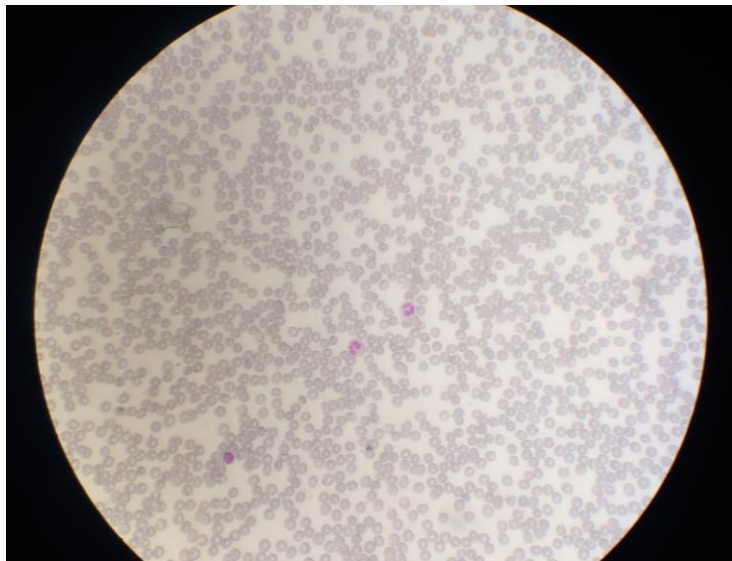
	PCT T0	PCT T0	PCT T0	PCT T0	PCT T0
	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
	PDW T0	PDW T1	PDW T2	PDW T3	PDW T4
Correlação de Pearson (<i>r</i>)	0,1269	0,07808	0,1995	0,1913	0,1951
Valor de <i>p</i>	0,334	0,553	0,127	0,143	0,135

PCT: Plaquetócrito; PDW: Coeficiente de Variação do Volume Plaquetário. Fonte: Dados da pesquisa.

5.3 Resultados da análise microscópica dos esfregaços sanguíneos

Dentre as amostras avaliadas, não foram observadas alterações morfológicas nem presença de interferentes analíticos como grumos plaquetários, satelitismo plaquetário, pseudotrombocitopenia, hemácias aglutinadas e/ou em *rouleaux* que possam sugerir a presença de crioaglutininas (Figura 6).

Figura 6 – Distensão sanguínea feita com amostra anticoagulada com EDTA demonstrando ausência de grumos plaquetários e satelitismo plaquetário.



Fonte: Dados da pesquisa

6 DISCUSSÃO

O principal objetivo de qualquer determinação laboratorial é produzir resultados precisos e confiáveis o suficiente para uso clínico. Várias linhas de evidência atestam que aproximadamente 70% dos erros de laboratório emergem de atividades da fase pré-analítica e não das fases analítica e pós-analítica (DAVES *et al*, 2015). A estabilidade da amostra é uma dessas atividades da fase pré-analítica de aspecto crucial para a qualidade do diagnóstico laboratorial, sendo este ponto colocado como foco principal neste estudo. Desse modo, a padronização e o conhecimento real da variabilidade analítica do equipamento em uso é essencial para a correta interpretação dos resultados hematológicos.

Uma diversa gama de estudos foi publicada sobre a confiabilidade dos testes hematológicos em amostras de sangue anticoaguladas com EDTA, avaliadas em distintos analisadores hematológicos dentro de determinadas condições de armazenamento (BUORO *et al*, 2016; MANNUS *et al*, 2016, SENIV *et al*, 2017). O presente estudo concentrou sua análise na recente geração de analisadores da marca Horiba®, a linha Yumizen, desenvolvida com novas tecnologias e inovações incorporadas em comparação com as linhas anteriores, sendo previsível a substituição das antigas séries Pentra e Nexus em laboratórios clínicos devido à descontinuidade de fabricação destas.

Quando avaliamos os resultados das médias obtidas nas contagens de plaquetas nos diferentes tempos pré-estabelecidos, não houve diferença estatisticamente significativa para estes dados, demonstrando que há constância na contagem celular, visto que o número de células não é modificável, mesmo após decorrido o tempo máximo de 3 horas de análise. Os resultados de Mehmood *et al* (2018) onde foram avaliadas as contagens de plaquetas em 15 minutos e 4 horas após a coleta, os de Buoro *et al* (2016) obtidas em 2, 4, 6, 8, 24, 36 e 48 horas após a coleta e Diaz-Ricart *et al* (2010) em 30 min e em 1, 3, 6 e 24 horas após a coleta constatarem, assim como o presente estudo, que não houve impacto do tempo sobre as contagens de plaquetas.

É sabido que a contagem plaquetária sofre interferência analítica de extensas causas que geram a formação de *debris* (FARIA, 2010; MONTEIRO, 2017), porém lâminas hematoscópicas foram preparadas a partir de cada amostra, de forma a garantir a inspeção visual destes interferentes, assim como agregação plaquetária em EDTA e satelitismo plaquetário, condições de causa idiopática que podem ocorrer em alguns pacientes (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2004). Na verificação microscópica não foram encontrados achados correlacionados a estes fatos. É importante ressaltar que a análise das lâminas proporciona uma visualização representativa dos componentes celulares, a qual possui menor acurácia em comparação à avaliação pelos equipamentos hematológicos. Contudo, tendo em vista que a população estudada foi composta por indivíduos saudáveis, considera-se insignificante a possível presença de interferentes não observados na análise microscópica e que por ventura foram contabilizados pelo equipamento.

Os grupos apresentaram aumento nas médias de VPM entre T0 e T2, T0 e T3 e T0 e T4 indicando diferença estatística a partir de 60 minutos após a coleta. Esses dados corroboram com achados na literatura. Buttarello, Mezzapelle, e Plebani, (2018) também encontraram em seu estudo diferença significativa do VPM após 60 minutos em amostras coletadas em EDTA. Por sua vez, Shah *et al* (2014) determinaram que o tempo ideal de medição deve ser realizado em até 120 minutos após a punção venosa. Já Pintér *et al* (2015) demonstraram que alterações significativas foram observadas nos valores de VPM após 8 horas de armazenamento à temperatura ambiente. Tendo em vista todas as colaborações anteriores e os dados do presente estudo, conclui-se que realmente há perda de estabilidade para este parâmetro.

Conforme citaram os autores Shah *et al* (2014), Maluf (2011) e Dastjerdi *et al* (2006), valores de VPM aumentam em um padrão tempo-dependente devido ao inchaço plaquetário decorrente da ação do EDTA sobre as plaquetas, que induz o aumento de AMP cíclico intracelular e altera a permeabilidade da membrana citoplasmática, ocasionando intumescência progressiva e ativação plaquetária. Embora o EDTA seja percebido como um anticoagulante ideal para contagem de células e análise diferencial de glóbulos brancos, estudos apontam que esse anticoagulante

não é o mais adequado para a preservação das capacidades estruturais das plaquetas, levando à modificação morfológica discoide usual das plaquetas para uma forma esférica (DAVES *et al*, 2015; RODRIGES *et al*, 2013; DIAZ-RICART *et al*, 2010). Por outro lado, a substituição deste anticoagulante por outro ou inserção de aditivos nas fórmulas de EDTA significaria a introdução de novos protocolos, aquisição de outros insumos e necessidade de validações adicionais, o que poderia encarecer o processo de obtenção destes índices.

Na comparação das médias de PCT dentro dos tempos de análise determinados, houve diferença significativa entre T0 e T4, o que traduz em aumento nos valores de PCT a partir de 180 minutos após a coleta. Este foi o parâmetro plaquetário que se manteve mais estável dentre os outros parâmetros avaliados, excluindo-se a contagem de plaquetas que não apresentou nenhuma significância estatística entre os períodos estabelecidos. Por ser um parâmetro diretamente relacionado com a contagem de plaquetas, e em tese o número destas não é modificável após a coleta como demonstrado anteriormente, presume-se uma menor variação ou até nenhuma diferença estatística, como constatado por Buoro *et al* (2016). Neste último estudo os valores de PCT mostraram-se estáveis por até 48 horas após a coleta, assim como os valores de contagem de plaquetas.

Por sua vez, as médias dos valores de PDW demonstraram diferença significativa entre T0 e T3 e T0 e T4, refletindo perda de estabilidade da amostra para esse parâmetro a partir de 120 minutos após a coleta. Tendo em vista o exposto anteriormente onde estudos demonstram o impacto do EDTA sobre o tamanho das plaquetas quando estas são expostas por tempo prolongado, é de se esperar que haja diferenças estatisticamente significantes nos valores de PDW, sendo que este parâmetro por definição mede diretamente a variabilidade no tamanho plaquetário. Essa diferença já fora relatada em experimentos prévios. Maluf (2011) avaliou alterações do PDW após 1 hora (tempo 1) e 6 horas (tempo 2) da coleta das amostras, sendo que os valores no tempo 2 foram significativamente mais elevados do que no tempo 1. MANNUS *et al* (2016) concluíram em sua análise que há um aumento dos valores de PDW após 180 minutos da coleta em tubos com EDTA como anticoagulante.

A análise da associação entre contagem de plaquetas e a determinação de VPM revelou que a correlação entre as variáveis é inversamente proporcional em quase a totalidade dos tempos pesquisados, excetuando-se o tempo T2 (correspondente a 60 minutos após a coleta) que demonstrou valor de p limítrofe ($p=0,0505$). Buttarello, Mezzapelle e Plebani (2018) defenderam a ideia que existe *in vivo* uma correlação inversa entre VPM e a contagem de plaquetas, onde os valores de VPM tendem a aumentar em indivíduos com menor número de plaquetas. Isso implica que o número e tamanho destas são governados pela conservação da massa, onde seu volume é determinado ao nível de sua célula progenitora, a qual pode ser estimulada a liberar plaquetas de maior tamanho através da influência de citocinas (DASTJERDI *et al*, 2006; PINTO; BARROS; COSTA, 2008).

Analogamente às citocinas, o EDTA é um fator de ativação plaquetária *in vitro* capaz de induzir alterações na morfologia dessas partículas, ocasionando aumento do VPM conforme o tempo de exposição das plaquetas a ele. Este fato poderia explicar em parte a correlação entre contagem de plaquetas e a determinação de VPM.

Quando se equiparou os valores de contagem de plaquetas com os dados obtidos nas determinações de PCT, os resultados demonstraram diferença estatística em todos os tempos avaliados e apontaram que quanto maior a contagem de plaquetas, maior o valor de PCT. Estes dados apresentaram os índices de correlação mais fortes dentre as correlações feitas com contagem de plaquetas e índices plaquetários. Isto pode ser explicado, pois o PCT corresponde ao volume total de plaquetas num determinado volume de sangue (MONTEIRO, 2017). Esta proporcionalidade também foi observada nos trabalhos de Salto *et al* (2012) e de Pinto, Barros e Costa (2008). Paralelamente, sob condições fisiológicas, uma redução simultânea da contagem de plaquetas e PCT indicou que as plaquetas foram excessivamente consumidas (BUDAK, 2016), demonstrando novamente a correlação entre ambas as determinações.

Por sua vez, a equiparação de contagem de plaquetas e PDW indicou significância estatística com correlação negativa fraca nos tempos de análise T0 (0 a 15 minutos após a coleta) e T1 (30 minutos após a coleta). Sachdev *et al* (2014) repor-

taram em seu estudo correlação negativa entre a contagem de plaquetas e PDW em amostras de pacientes saudáveis anticoaguladas com EDTA analisadas dentro de 2 horas após a coleta. Também foi encontrada correlação negativa entre a contagem de plaquetas e PDW nas análises de Costa, Ribeiro e Costa (2007). Este achado traduz-se, *in vivo*, na associação do aumento do esforço medular nos casos em que há redução da quantidade de plaquetas circulantes, onde plaquetas com volume maior seriam liberadas pela medula na tentativa de compensação (COSTA; RIBEIRO E COSTA, 2007; PINTO; BARROS; COSTA, 2008). Analisando-se *in vitro*, o aumento do PDW se dá através da ativação plaquetária pelo EDTA, aumentando o número de pseudópodes destas partículas, possivelmente afetando o resultado PDW (MANNUS *et al*, 2016; VAGDATLI *et al*, 2010).

Em contrapartida, nos tempos T2, T3 e T4 não houve correlação estatística entre PDW e contagem de plaquetas. A perda de correlação poderia, em parte, ser explicada pelo fato de que as amostras avaliadas foram obtidas de voluntários saudáveis com número de plaquetas dentro da normalidade, sendo que as médias destas contagens não apresentaram variação estatística significativa dentro dos tempos estabelecidos neste estudo, além de que as correlações obtidas nos tempos T0 e T1 foram consideradas fracas. Já as médias encontradas para PDW revelaram uma tendência ao aumento. Neste raciocínio, apesar de haver correlação negativa entre PDW e plaquetas nos tempos T0 e T1, é aceitável que, em condições adversas, as plaquetas se modifiquem, alterando a sua forma e distribuição, demonstrável pelo PDW, antes mesmo que variações no número de plaquetas sejam evidenciadas. Além disso, sabe-se que um aumento no PDW pode ocorrer tanto em patologias de hipoprodução quanto nas patologias de hiperprodução (BAIN *et al*, 2016).

Outro ponto a ser considerado é que as possíveis alterações de PDW esperadas para pacientes (*in vivo*) não poderiam necessariamente ser reproduzidas *in vitro*.

Continuando a avaliação das correlações, o aumento do VPM associou-se ao aumento do PDW nos resultados deste estudo. Budak (2016), Pinto, Barros e Costa (2008) e Salto *et al* (2012) reportaram o mesmo fato. Como dito anteriormente, o VPM traduz o volume das plaquetas e o PDW expressa a heterogeneidade da morfologia destas partículas, sendo índices que aumentam durante a ativação plaquetária.

ria (VATANKULU *et al*, 2014). Tendo em vista que as plaquetas mudam sua conformação após contato com o EDTA e estas mudanças refletem diretamente no VPM e no PDW, a correlação encontrada exprime o que acontece *in vitro*. Em adição, a base de cálculo para ambos os parâmetros é oriunda da distribuição do volume das plaquetas, sendo lógico afirmar que à medida que se aumenta os valores de VPM, os valores de PDW também aumentam.

Por último, não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre PCT e os demais índices plaquetários (VPM e PDW), assim como Salto *et al* (2012).

Apesar de existirem estudos referentes aos índices plaquetários em diversas condições clínicas, a utilização na prática clínica ainda se demonstra tímida, devido a questões relacionadas à metodologia e interferentes pré-analíticos descritos desde o início de seu uso. A definição destes dados na população estudada é de grande importância para o setor de Hematologia do SPCML do HGIP, pois atualmente os índices plaquetários não são emitidos na impressão do hemograma liberado ao médico e ao paciente, ficando disponíveis apenas para consulta no *software* do equipamento, de tal forma que muitas vezes passam despercebidos pelos analistas, e conseqüentemente são levados ao desconhecimento sobre a interpretação e função dos mesmos. Esses dados também possuem relevância para a empresa Horiba®, a fim de gerar maior confiança e conhecimento para seus atuais e futuros clientes frente à inserção destes índices na rotina, levando em consideração o equipamento utilizado. Em vista disso, é importante salientar que ante os resultados obtidos não há estabilidade de amostra para liberação dos índices plaquetários estudados, vez que a liberação dos resultados de hemograma no SPCML do HGIP é em média de duas horas para amostras consideradas urgentes, não sendo viável na prática a adição dos índices plaquetários no laudo do hemograma, considerando-se o tempo de entrega desses resultados.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste estudo, pode-se concluir que:

1. Os valores dos parâmetros plaquetários obtidos em amostras colhidas com EDTA sofrem impacto do tempo; seus valores aumentam quanto maior o tempo de armazenamento.
2. O emprego do EDTA como anticoagulante ainda representa um dos principais obstáculos na padronização das medidas dos índices plaquetários.
3. A contagem de plaquetas permanece inalterada após decorrido o tempo máximo de análise, demonstrando estabilidade deste parâmetro dentro das condições deste estudo.
4. Em condições ideais, o tempo de análise depois da coleta deveria ser padronizado em até 30 minutos para o VPM dentro das condições estabelecidas neste estudo.
5. Para resultados mais fidedignos de PCT, obtidos no equipamento utilizado, o tempo máximo de 120 minutos após a coleta para análise da amostra deverá ser obedecido.
6. Há perda de estabilidade da amostra para o parâmetro PDW a partir de 60 minutos após a coleta, devendo este ser estabelecido como tempo máximo para análise nesta linha de equipamento.
7. Amostras de indivíduos saudáveis em geral não apresentam alterações morfológicas ou interferências pré-analíticas capazes de inviabilizar a avaliação dos índices plaquetários.

8 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

1. Avaliar se haveria alterações e impacto na obtenção dos parâmetros plaquetários em voluntários doentes;
2. Validar os parâmetros avaliados para inserção na rotina de liberação do hemograma no SPCML do HGIP e até mesmo em outros serviços;
3. Determinar potenciais valores de referência para diferentes tempos de análise em relação aos índices plaquetários estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Althaus, K. e Greinacher, A. **MYH9-Related Platelet Disorders**. Semin Thromb Hemost, v.35, p.189-203, 2009.

Anjos, A. R. dos; Alvares-Silva, M.; Borelli, P. **Matriz Extracelular e Leucemia**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. São José do Rio Preto, v. 22, n. 3, p. 404-412, 2000.

Bain, B.J. **Células sanguíneas: um guia prático**. 5. ed. Porto Alegre (RS): Artmed, 2016, 504 p.

Buch, A. *et al.* **Platelet volume indices as predictive biomarkers for diabetic complications in Type 2 diabetic patients**. Journal of Laboratory Physicians, v. 9, n. 2, p.84-88, 2017.

Budag, C.C.; Cadore, G.A. **Interferência do transporte e uso de diferentes anti-coagulantes na contagem de plaquetas, no Volume Plaquetário Médio (VPM) e no Coeficiente de Variação do Volume Plaquetário (PDW)**. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2013.

Budak, Y.U; Polat, M.; Huysal, K. **The use of platelet indices, plateletcrit, mean platelet volume and platelet distribution width in emergency non-traumatic abdominal surgery: a systematic review**. Biochemia Medica, v. 26, n. 2, p.178-193, 2016.

Buoro, S. *et al.* **Assessment of blood sample stability for complete blood count using the Sysmex XN-9000 and Mindray BC-6800 analyzers**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., v. 38, n. 3, p. 225-239, 2016.

Buttarelo, M.; Mezzapelle, G.; Plebani, M. **Effect of preanalytical and analytical variables on the clinical utility of mean platelet volume**. Clin Chem Lab Med., v. 56, n. 5, p.830-837, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de implementação do quesito Raça/Cor/Etnia. Ministério da Saúde**. Universidade de Brasília, Brasília, 2018, 38 p.

Briggs, C. **Quality Counts: new parameters on blood cell counting**. Int. Jnl. Lab. Hem., v. 31, p. 277–297, 2009.

Briggs, C.; Harrison, P.; Machin, S. J. **Continuing developments with the automated platelet count**. *Int. Jnl. Lab. Hem.*, v. 291, p. 77–91, 2007.

Carmo, L.S. **Proliferação e diferenciação *in vitro* de células mononucleares medulares após estímulo com fatores de crescimento em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica**. 2012. 114 fl. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Castro, H.C. *et al.* **Plaquetas: ainda um alvo terapêutico**. *J Bras Patol Med Lab*, v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.

Comar, S.R; Silva, P.H. **Determinação laboratorial e aplicação clínica dos parâmetros de volume plaquetário**. *RBAC*, v. 41, n. 4, p. 257-265, 2009.

Costa, A.C; Ribeiro, B.; Costa, E. **Índices plaquetários em indivíduos com doença hepática alcoólica crônica**. *Arq Gastroenterol*.v. 44, n.3, p. 201-204, 2007.

Dantas, T.A.C. *et al.* **Estudo Comparativo entre Métodos de Contagem de Plaquetas**. *NewsLab*, ed. 98, p. 88-95, 2010.

Daves, M. *et al.* **Sample stability for complete blood cell count using the Sysmex XN haematological analyser**. *Blood Transfus.* v.13, n.4, p. 576–582, 2015.

Dusse, L. M. S; Vieira, L. M.; Carvalho, M.G. **Pseudotrombocitopenia**. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 40, n. 5, p. 321-324, 2004.

Dastjerdi, M.S. *et al.* **Mean platelet volume measurement, EDTA or citrate?** *Hematology*, v.11, n:5-6, p. 317-31, 2006.

Diaz-Ricart, M. *et al.* **Preanalytical treatment of EDTA-anticoagulated blood to ensure stabilization of the mean platelet volume and component measured with the ADVIA counters**. *Thromb Res.*, v. 126, n.1, p.30-35, 2010.

Failace, R. R. **Hemograma: manual de interpretação**. 6. ed. Porto Alegre (RS): Art-med, 2015, 482 p.

Farias, M.G; Dal Bó, S. **Importância clínica e laboratorial do volume plaquetário médio.** J Bras Patol Med Lab, v. 46, n. 4, p. 275-281, 2010.

Ferroni, P. *et al.* **Platelet activation in type 2 diabetes mellitus.** J Thromb Haemost. v.2, n.8, p.1282-91, 2004.

Franco, A. T.; Corken, A.; Ware, J. **Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer.** Blood, v.126, n.5, p.582–588, 2015.

Golebiewska, E.M.; Poole, A.W. **Platelet secretion:** From haemostasis to wound healing and beyond. Blood, v. 29, n.3,p. 153–162, 2015.

Greer JP *et al.* **Wintrobe's Clinical Hematology.** 13 ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins, 2014, 2312 p.

Gunluoglu, G. *et al.* **Mean platelet volume as an inflammation marker in active pulmonary tuberculosis.** Multidiscip Respir Med. v.9, n.1, 2014..

Kaito, K. *et al.* **Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia.** British Journal of Haematology, v. 128, p. 698–702, 2005.

Kakkar, N.; John, M. J.; Mathew, A. **Macrothrombocytopenia in north India: Role of Automated Platelet Data in the Detection of an Under Diagnosed Entity.** Indian J Hematol and Blood Transfus., v. 31, n.1, p.61–67, 2015.

Kickler, T.S. **Platelet biology** – an overview. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine, v. 2 ,p. 79–85, 2006.

Lefrançois, E.; Looney, M.R. **Platelet biogenesis in the lung circulation.** Physiology, v. 34, p. 392–401, 2019.

Lefrançois E. *et al.* **The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors.** Nature, 2017.

Li, H. *et al.* **Lack of association between platelet indices and disease stage in osteosarcoma at diagnosis.** PLoS ONE, v.12, 2017.

Li, J.Y. *et al.* **Elevated mean platelet volume is associated with presence of colon cancer.** Asian Pac J Cancer Prev., v.15, p.10501–4, 2014.

Lorenzi, T.F. **Manual de hematologia:** propedêutica e clínica. 4. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, MEDSI, 2006.

Lucijanic, M. *et al.* **Increased mean platelet volume (MPV) is an independent predictor of inferior survival in patients with primary and secondary myelofibrosis.** Int J Hematol., v.107, p.166–172, 2018.

Machlus, K.R.; Italiano, J.E. **The incredible journey:** From megakaryocyte development to platelet formation J. Cell Biol. v. 201, n. 6, p. 785–796, 2013

Maluf, C.B. **Intervalos de referência dos parâmetros de volume plaquetário: estudo longitudinal de saúde do adulto – Minas Gerais (ELSA-MG).** 2011. 94 fl. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

Mancuso, M.E.; Santagostino, E. **Platelets:** much more than bricks in a breached wall. British Journal of Haematology, v.178, p. 209–219, 2017.

MANUAL do usuário Yumizen H2500 e Yumizen SPS. Horiba Medical. Ref: RAB303B-PT, 2017, 294 p.

Mannuß, S. *et al.* **Measurement of Platelet Counts and Volume Using Magnesium Sulfate as an Anticoagulant:** Comparison of Impedance and Light-Scatter Technology. American Journal of Clinical Pathology, v. 146, n. 5, p. 538–545, 2016.

Mehmood, R. *et al.* **Evaluation of di- potassium and tri- potassium EDTA evacuated tubes for routine haematological testing.** J Clin Lab Anal.,v. 32, p. 1-4, 2018.

Monteiro, L. **Valores de referência dos índices plaquetários e construção de algoritmo para liberação do plaquetograma.** RBAC. v.49, n.3, p.263-7, 2017.

Monteiro Júnior, J.G.M.; Torres, D.O.C.; Sobral Filho, D.C. **Hematological Parameters as Prognostic Biomarkers in Patients with Cardiovascular Diseases.** Current Cardiology Reviews, v. 15, n.4, p. 274-282, 2019.

Noris, P. *et al.* **Platelet size for distinguishing between inherited thrombocytopenias and immune thrombocytopenia: a multicentric, real life study.** British journal of haematology, v. 162, n.1, p. 112-119, 2013.

Oliveira, I. *et al.* **Plaquetas: Papéis tradicionais e não tradicionais na hemostasia, na inflamação e no câncer.** ABCS Health Sci, v. 38, n. 3, p. 153-161, 2013.

Ozturk, N. *et al.* **E. Changes in platelet parameters in leukocytosis.** The Pan African Medical Journal. v. 24, n.185, 2016

Pakala, R.; Waksman, R. **Currently available methods for platelet function analysis: advantages and disadvantages.** Cardiovascular Revascularization Medicine, v. 12, p. 312–322, 2011.

Patel, S. R.; Hartwig, J.H.; Italiano J.E. Jr. **The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets.** J Clin Invest., v.115, n. 12, p. 3348-3354, 2005.

Pintér, E. *et al.* **The stability of quantitative blood count parameters using the ADVIA 2120i hematology analyzer.** Pract Lab Med., v. 4, p.16-21, 2015.

Pinto C, Barros C, Costa E. **Índices Plaquetários em Doentes Infectados com Vírus da Imunodeficiência Humana e com Trombocitopenia.** ABO, v. 34, p. 21-25, 2008.

Ribatti, D.; Crivellato, E. **Giulio Bizzozero and the discovery of platelets.** Leuk Res, v. 31, p. 1339-41, 2007.

Rivadeneira, L. *et al.* **The birth of a platelet: A trip from bone marrow megakaryocytes to circulating platelets.** Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, v. 50, n.2, p.233-245, 2016.

Rodrigues, B. R. *et al.* **Análise do volume plaquetário médio (VPM) em pacientes com doença arterial coronariana.** Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba, v. 15, n. 1, p. 192 - 197, 2013.

Rondina, M. T.; Weyrich, A. S. **Regulation of the Genetic Code in Megakaryocytes and Platelets.** Journal of thrombosis and haemostasis, v. 13, p. S26–S32, 2015.

Sachdev, R. *et al.* **Establishing biological reference intervals for novel platelet parameters (immature platelet fraction, high immature platelet fraction, platelet distribution width, platelet large cell ratio, platelet-X, plateletcrit, and platelet distribution width) and their correlations among each other.** Indian Journal of Pathology and Microbiology, v. 57, n. 2, p. 231-235, 2014.

Salto, A. B. *et al.* **Valoración de índices plaquetarios en las trombocitopenias.** Acta Bioquím. Clín. Latinoam., v. 46, n. 1, p. 23-30, 2012.

Sanguhl, K. *et al.* **Platelet aggregation pathway.** Pharmacogenet Genomics, v. 21, n. 8, p. 516–521, 2011.

Seniv, L. *et al.* **Análise da temperatura, do tempo e da relação sangue/ anticoagulante no hemograma.** RBAC, v.49, n.2, p.181-8, 2017.

Spezia, J. *et al.* **Anticoagulant choices affect the mean platelet volume measurement by impedance.** Clin Lab, v.1, n. 64, p 217-220, 2018.

Shah, B. *et al.* **Mean platelet volume reproducibility and association with platelet activity and anti-platelet therapy.** Platelets, v. 25, n.3, p.188-192, 2014.

Sharma, G.; Berger, J.S. **Platelet activity and cardiovascular risk in apparently healthy individuals: a review of the data.** J Thromb Thrombolysis, v.32, p.201–208, 2011.

Silva, P.H. *et al.* **Hematologia Laboratorial: teoria e procedimentos.** 1 ed. Porto Alegre (RS): Artmed, 2016, 448 p.

Singh, H.; Chaudhary, R.; Ray, V. **Platelet indices as quality markers of platelet concentrates during storage.** Clin Lab Haematol. v.25, n.5, p.307-10, 2003.

Sousa, R.S. *et al.* **Lesões de armazenamento durante a conservação de sangue nas diferentes espécies: uma revisão.** Acta Veterinaria Brasilica, v.6, n.2, p.68-79, 2012.

Vagdatli, E. *et al.* **Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation.** Hippokratia, v. 14, n.1, p. 28-32, 2010.

Vatankulu, M.A. et al. **A new parameter predicting chronic total occlusion of coronary arteries: platelet distribution width.** *Angiology*, v. 65, n.1, p. 60-64, 2014.

Wendland, E. A. *et al.* **Mean platelet volume and cardiovascular disease.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 45, p.371-378, 2009.

Zandecki, M. *et al.* **Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets.** *International Journal of Laboratory Hematology*, v.29, p. 4–20, 2007.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE OS ÍNDICES PLAQUETÁRIOS EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL

Professor orientador e pesquisador responsável:

Ana Paula Lucas Mota

Giovanna Natalia Angeli

Você está sendo convidado para participar como voluntário de uma pesquisa proposta intitulada “EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE OS ÍNDICES PLAQUETÁRIOS EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL”, que está descrita a seguir:

O exame hemograma proporciona a análise dos tipos de células sanguíneas (leucócitos, hemácias e plaquetas) quanto à forma, tamanho quantidade e porcentagem. Apesar de ser um teste consolidado na rotina média e laboratorial, existem algumas limitações relacionadas com a dificuldade de padronização e interferência de variáveis pré-analíticas, como temperatura e tempo de estocagem do material. A retirada do sangue da circulação para os tubos de coleta transfere as células sanguíneas para um ambiente diferente do encontrado no organismo vivo, o que promove uma série de alterações que em conjunto são conhecidas como lesões de armazenamento.

A proposta deste trabalho é avaliar em quatro períodos pré-estabelecidos (T0, T1, T2 e T3) a variação dos valores obtidos nas contagens de plaquetas e nas determinações dos índices plaquetários em amostras sanguíneas coletadas em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A padronização deste procedimento é essencial para que ele se torne útil na rotina clínica, tendo como objetivo diminuir a dificuldade de interpretação do tamanho plaquetário sob condições normais e anormais e trazer mais confiança na liberação dos resultados do exame de hemograma.

Você está sendo convidado para participar desta pesquisa de forma voluntária e gratuita.

Para decidir se você deve concordar ou não em participar desta pesquisa, leia atentamente todos os itens a seguir que irão informá-lo (a) e esclarecê-lo(a) de todos os procedimentos, riscos e benefícios pelos quais você passará segundo as exigências da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

1. Objetivo da pesquisa:

Avaliar as alterações morfológicas das plaquetas, expressas pelos índices plaquetários, frente ao tempo de armazenamento das amostras de sangue colhidas em EDTA (tubo roxo).

2. Descrição detalhada e explicação dos procedimentos realizados:

Sua participação é voluntária e se dará por meio da disponibilização da sua amostra de sangue total colhida em EDTA, a qual já haverá sido colhida para realização do seu exame solicitado. Todo material colhido já é rotineiramente armazenado no Hospital Governador Israel Pinheiro por 3 dias entre 2 e 8 °C, onde permanece utilizável para outros fins. Os tubos serão descartados conforme preconizado pela Unidade de Gestão Ambiental do Hospital.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa envolvem possíveis incômodos durante a punção venosa, como dor local, tonteira ou sensação de desmaio e, após a coleta, o possível surgimento de uma mancha roxa, devido ao extravasamento de sangue de um vaso sanguíneo. Geralmente não há complicações e essa mancha roxa desaparece em poucos dias.

3. Descrição dos benefícios da pesquisa:

Se você aceitar participar, estará contribuindo para a conquista da padronização dos resultados do exame hemograma, bem como irá contribuir para a geração de materiais didáticos, que possuem o objetivo de instruir e esclarecer a comunidade médica sobre a aplicabilidade dos índices plaquetários e melhor avaliação dos resultados fornecidos por este exame.

4. Despesas, compensações e indenizações:

Você não terá despesa pessoal nessa pesquisa. A coleta será realizada quando você comparecer ao laboratório para realizações de exames já solicitados pelo seu médico. Você não terá compensação financeira relacionada à sua participação nessa pesquisa.

5. Direito de confidencialidade:

Você tem assegurado que todas as suas informações pessoais obtidas durante a pesquisa serão consideradas estritamente confidenciais e os registros estarão disponíveis apenas para os pesquisadores envolvidos no estudo. Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão ser publicados com fins científicos, mas sua identidade será mantida em sigilo.

6. Acesso aos resultados da pesquisa:

Você tem direito de acesso atualizado aos resultados da pesquisa, ainda que os mesmos possam afetar sua vontade em continuar participando da mesma.

7. Liberdade de retirada do consentimento:

Você tem direito de retirar seu consentimento, a qualquer momento, deixando de participar da pesquisa, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu cuidado e/ou tratamento na instituição.

8. Acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa:

Você tem garantido o acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca de procedimentos, riscos, benefícios, etc., através dos contatos abaixo:

Professora orientadora: Ana Paula Lucas Mota

Telefone: (031) 3409-6896 e-mail: aplmota@yahoo.com.br

Pesquisador responsável: Giovanna Natalia Angeli

Telefone: (031) 3237-2513 e-mail: giovanna_angeli05@hotmail.com.br

9. Acesso à instituição responsável pela pesquisa:

Você tem garantido o acesso, em qualquer etapa da pesquisa, à instituição responsável pela mesma, para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca dos procedi-

mentos éticos, através do contato abaixo:

Comitê de ética do campus da UFMG: Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901.

Telefone (031) 3409-4592. email: coep@prpq.ufmg.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Fui informado verbalmente e por escrito sobre os dados dessa pesquisa e minhas dúvidas com relação a minha participação foram satisfatoriamente respondidas.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, os desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos pesquisadores e à instituição de ensino.

Tive tempo suficiente para decidir sobre minha participação e concordo voluntariamente em participar desta pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a mesma, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

A minha assinatura neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dará autorização aos pesquisadores, ao patrocinador do estudo e ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais de utilizarem os dados obtidos quando se fizer necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando minha identidade.

Assino o presente documento em duas vias de igual teor e forma, ficando uma em minha posse e a outra com o pesquisador responsável.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____

Voluntário da pesquisa

Nome Completo e assinatura

Pesquisador Responsável

Nome Completo e assinatura

ANEXO A

Parecer Consubstanciado do CEP UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito do Tempo de Armazenamento sobre os Índices Plaquetários em Amostras de Sangue Total

Pesquisador: Ana Paula Lucas Mota

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 93370318.7.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: HORIBA INSTRUMENTS BRASIL LTDA
PRO REITORIA DE PESQUISA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.810.305

Apresentação do Projeto:

De acordo com os pesquisadores a retirada do sangue da circulação para conservação in vitro transfere as células sanguíneas para um ambiente diferente do encontrado no organismo vivo, o que promove uma série de alterações hematológicas, morfológicas, hemogasométricas e bioquímicas, que em conjunto são conhecidas como lesões de armazenamento. As plaquetas e índices plaquetários não fogem a essa regra, onde estudos prévios relataram, por exemplo, que os valores de VPM aumentam em um padrão tempo-dependente, devido ao inchaço plaquetário, quando EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) é usado como anticoagulante. Dentro deste contexto, a proposta deste trabalho é avaliar em quatro períodos pré-estabelecidos (T0, T1, T2 e T3) a variação dos valores obtidos nas contagens de plaquetas e nas determinações do VPM, PCT e PDW em amostras sanguíneas. Para tanto, serão coletadas 60 amostras biológicas de sangue venoso em anticoagulante K3-EDTA 1,8mg/mL. A população do estudo incluirá pacientes

saudáveis, não gestantes, entre as faixas etárias acima de 18 anos e abaixo de 65 anos provenientes do atendimento ambulatorial do Hospital Governador Israel Pinheiro. As amostras serão processadas no equipamento Pentra 120 DF. Serão confeccionadas lâminas hematológicas para conferência de alterações morfológicas das plaquetas ao microscópio. Espera-se com este estudo responder às questões relativas à influência do

tempo de armazenamento sobre a estabilidade de plaquetas e índices plaquetários em amostras

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 2.810.305

biológicas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar as alterações morfológicas das plaquetas, expressas pelos índices plaquetários, frente ao tempo de armazenamento das amostras de sangue colhidas em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

Objetivo Secundário:

- Determinar os índices plaquetários em amostras colhidas de pacientes provenientes do Serviço de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial do

Hospital Governador Israel Pinheiro, nos tempos T0, T1, T2 e T3 pré-estabelecidos;

- Correlacionar estatisticamente os diferentes resultados

obtidos desde o tempo T0 até o tempo T3;

- Avaliar o impacto do tempo de armazenamento sobre os índices plaquetários.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram apresentados os seguintes riscos e benefícios:

Riscos:

Os riscos para os pacientes participantes da pesquisa envolvem possíveis incômodos durante a punção venosa, como dor local, tonteira ou sensação de desmaio e, após a coleta, o possível surgimento de uma mancha roxa, devido ao extravasamento de sangue de um vaso sanguíneo. Geralmente não há complicações e a mancha roxa desaparece em poucos dias.

Benefícios

Contribuição para a conquista da padronização dos resultados do exame hemograma, no tocante aos índices plaquetários, bem como geração de materiais didáticos, que possuem o objetivo de instruir e esclarecer a comunidade médica sobre a aplicabilidade dos índices plaquetários e melhor avaliação dos resultados fornecidos por este exame.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante na área de Ciências da Saúde.

A hipótese dos proponentes é que a alteração tempo-dependente dos valores dos índices plaquetários após a coleta e o desfecho Primário é que o tempo de armazenamento influencia na análise hematológica, aumentando os valores de VPM, PDW e PCT.

A natureza da Intervenção é a Análise Laboratorial Automatizada. A previsão de término da pesquisa é 29/03/2018.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.610.305

A proposta está clara de acordo com a justificativa e os objetivos apresentados, os pesquisadores não pedem despesa do TCLE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão corretos em sua apresentação, foram apresentados os seguintes documentos:

- Informações Básicas do Projeto;
- Declaração de Concordância do Chefe de Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia/UFMG;
- TCLE;
- Projeto Completo;
- Folha de Rosto.

A Instituição Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas é co-participante da pesquisa.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do Projeto. No entanto favor, acrescentar aos Riscos da Pesquisa (TCLE) quais serão as medidas adotadas para minimizar os danos apresentado. Por causa do número de páginas do documento (TCLE), solicita-se o cuidado de obter a rubrica do participante da pesquisa e do pesquisador nas demais folhas do TCLE, considerando-se a proteção do participante bem como da pesquisador.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

SMJ, sou favorável a aprovação do projeto Título da Pesquisa: Efeito do Tempo de Armazenamento sobre os Índices Plaquetários em Amostras de Sangue Total

Pesquisador Responsável: Ana Paula Lucas Mota.

Sugere-se apenas que seja acrescentado aos Riscos da Pesquisa (no TCLE) quais serão as medidas adotadas para minimizar os danos apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 8627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.810.305

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1072621.pdf	29/06/2018 16:04:34		Aceito
Outros	ParecerCamaraDepartamental.pdf	29/06/2018 16:03:49	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEProjetoGiovanna.docx	29/06/2018 16:03:16	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoGiovannaVersaoFinal.docx	29/06/2018 16:03:02	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoAssinada.docx	29/06/2018 15:56:17	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Outros	93370318parecer.pdf	09/08/2018 12:20:36	Vivian Resende	Aceito
Outros	93370318aprovacao.pdf	09/08/2018 12:20:51	Vivian Resende	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 09 de Agosto de 2018

Assinado por:
Vivian Resende
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO B

**Autorização da Coordenação do Comitê de Pesquisa e Ensino do Hospital
Governador Israel Pinheiro**

Belo Horizonte, 10 de setembro de 2017

De: Comitê de Pesquisa e Ensino - COMPE – Pesquisa

Para: Dr. José Luiz Cruz

Diretoria de Saude – DISA – IPSEMG

Solicitada avaliação para realização no IPSEMG e posterior cadastro na Plataforma Brasil do CONEP e análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, do projeto de pesquisa "Efeito do tempo de armazenamento sobre os índices plaquetários em amostras de sangue total"

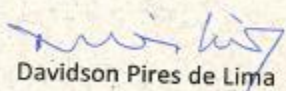
Interessados: Giovanna Natália Angeli

Pofª Drª Ana Paula Lucas Mota

Histórico e avaliação: O estudo se propõe a avaliar em quatro tempos pré-estabelecidos a variação dos valores obtidos nas contagens plaquetárias e nas determinações de seus índices: VPM (volume plaquetário médio), VCM (volume corpuscular médio) e PDW (coeficiente de variação do volume), em 60 amostras de sangue coletadas em EDTA. Por meio do equipamento Pentra 120, fornecido sem ônus como cooperação técnico-científica pela empresa Horiba Medical, especificamente para a realização do projeto, as amostras serão mensuradas quanto aos indicadores plaquetários e comparadas estatisticamente. As amostras serão utilizadas após a entrada no Serviço de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial do HGIP, sem necessidade de qualquer informação clínica dos pacientes, e portanto dispensa-se do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O projeto foi analisado e aprovado pela RT/Coordenação Serviço de Medicina Laboratorial HGIP, Drª Ana Maria Campos de Faria, com a cópia em anexo.

Julgamos que o projeto atende os preceitos éticos, foi ajustado ao funcionamento regular do IPSEMG, e pode ser aprovado para encaminhamento à plataforma Brasil – CONEP.


Davidson Pires de Lima

Coordenador COMPE – Comitê de Pesquisa e Ensino IPSEMG


José Luiz de Almeida Cruz
Diretor de Saúde
IPSEMG
18/09/17

ANEXO C**Contrato de Cooperação Técnico Científica Horiba**

HORIBA
Medical

HORIBA Medical
Avenida das Nações Unidas, 21735
Jundiaí - São Paulo - Brasil
CEP 04795-100
Fone : +5511 5545 1500
Fax : +5511 5545 1570

PROPOSTA CONTRATO
DE COOPERAÇÃO TÉCNICO CIENTÍFICA

Jundiaí, 26 de junho de 2017.

Cliente: IPSEMG
Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 225
Cidade: Belo Horizonte
A/C: Giovanna N. Angeli
Fone/fax: (31) 3237-2103
Email: giovanna.angeli@ipsemg.mg.gov.br

Prezado Cliente:

Estamos fornecendo abaixo proposta para cooperação técnico científica de desenvolvimentos de trabalhos utilizando os produtos da Horiba Medical.

Segue abaixo simplificadamente, algumas considerações importantes do contrato.

- Vigência 12 meses, podendo ser prorrogado conforme necessidade do trabalho.
- Visitas para acompanhamento do desenvolvimento do trabalho durante o período de vigência do contrato.
- Fornecimento de suporte e material científico durante a execução do estudo.
- Estudos realizados com seres humanos, incluindo órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Quando pertinente, o trabalho enviado deverá ser acompanhado de consentimento, por escrito, do paciente e de cópia da aprovação (certificado) do comitê de ética da instituição onde foi realizada a pesquisa.
- As drogas e substâncias químicas eventualmente utilizadas na realização do trabalho devem ser identificadas com precisão.
- Não devem ser utilizados nomes ou iniciais do paciente nem informados e/ou registros de hospitais.
- Após o término do trabalho o cliente compromete-se a produzir o artigo científico e efetuar a publicação do mesmo em uma revista pertinente ao assunto.
- O pesquisador nos autoriza a publicar os resultados do trabalho em canais de comunicação.

Segue quantidade de reagentes disponibilizados para o trabalho científico:

ABX Diluent: 1 unidade
ABX Basolyse: 1 unidade
ABX Lysebio IL: 1 unidade
ABX Leucodiff: 1 unidade
ABX Cleaner: 1 unidade

Para a aprovação ou maiores esclarecimentos:
Fone: (11) 29235400 Fax: (11) 2923-5490.

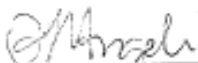
Responsáveis pelo Projeto:

COORDENADORA

(Cargo ou função)

GIOVANNA NATALIA ANGELI

(Nome legível)



(Assinatura)

Aprovação do contrato:

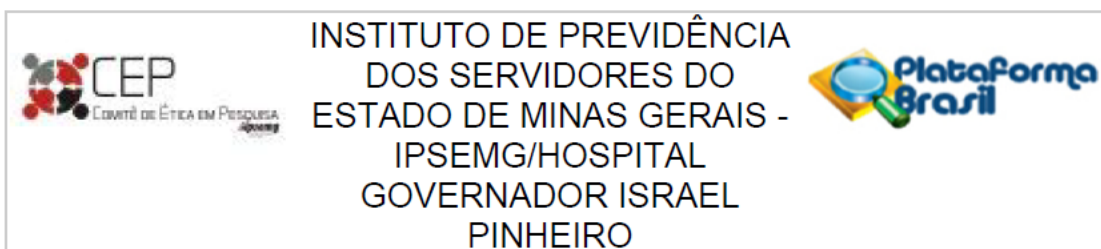
Aprovado por:


(Nome Legível)

Data: 25 / 06 / 17

ANEXO D

Parecer Consubstanciado do CEP IPSEMG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito do Tempo de Armazenamento sobre os Índices Plaquetários em Amostras de Sangue Total

Pesquisador: Ana Paula Lucas Mota

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 93370318.7.3001.5136

Instituição Proponente: Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas Gerais -

Patrocinador Principal: PRO REITORIA DE PESQUISA
HORIBA INSTRUMENTS BRASIL LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.169.108

Apresentação do Projeto:

De acordo com os pesquisadores a retirada do sangue da circulação para conservação in vitro transfere as células sanguíneas para um ambiente diferente do encontrado no organismo vivo, o que promove uma série de alterações hematológicas, morfológicas, hemogasométricas e bioquímicas, que em conjunto são conhecidas como lesões de armazenamento. As plaquetas e índices plaquetários não fogem a essa regra, onde estudos prévios relataram, por exemplo, que os valores de VPM aumentam em um padrão tempo-dependente, devido ao inchaço plaquetário, quando EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) é usado como anticoagulante. Dentro deste contexto, a proposta deste trabalho é avaliar em quatro períodos pré-estabelecidos (T0, T1, T2 e T3) a variação dos valores obtidos nas contagens de plaquetas e nas determinações do VPM, PCT e PDW em amostras sanguíneas. Para tanto, serão coletadas 60 amostras biológicas de sangue venoso em anticoagulante K3-EDTA 1,8mg/mL. A população do estudo incluirá pacientes saudáveis, não gestantes, entre as faixas etárias acima de 18 anos e abaixo de 65 anos provenientes do atendimento ambulatorial do Hospital Governador Israel Pinheiro (HGIP). As amostras serão processadas no equipamento Pentra 120 DF. Serão confeccionadas lâminas

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 225, 11º andar

Bairro: Santa Efigênia

CEP: 30.130-110

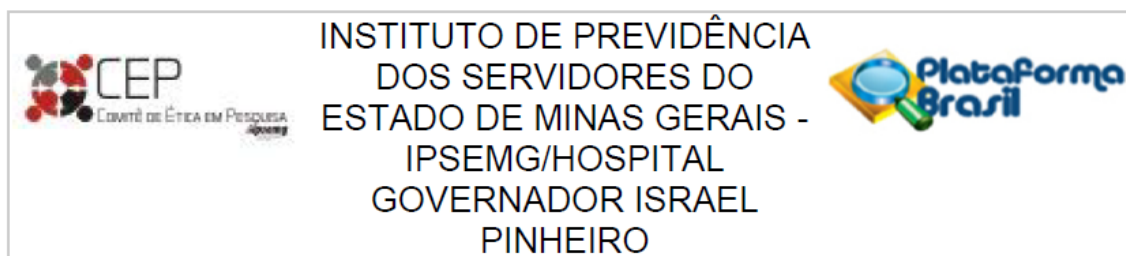
UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3237-2813

Fax: (31)3237-2273

E-mail: cep.hgip@ipsemg.mg.gov.br



Continuação do Parecer: 4.169.108

hematológicas para conferência de alterações morfológicas das plaquetas ao microscópio. Espera-se com este estudo responder às questões relativas à influência do tempo de armazenamento sobre a estabilidade de plaquetas e índices plaquetários em amostras biológicas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar as alterações morfológicas das plaquetas, expressas pelos índices plaquetários, frente ao tempo de armazenamento das amostras de sangue colhidas em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

Objetivo Secundário:

- Determinar os índices plaquetários em amostras colhidas de pacientes provenientes do Serviço de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial do

Hospital Governador Israel Pinheiro, nos tempos T0, T1, T2 e T3 pré-estabelecidos;

- Correlacionar estatisticamente os diferentes resultados obtidos desde o tempo T0 até o tempo T3;
- Avaliar o impacto do tempo de armazenamento sobre os índices plaquetários.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram apresentados os seguintes riscos e benefícios:

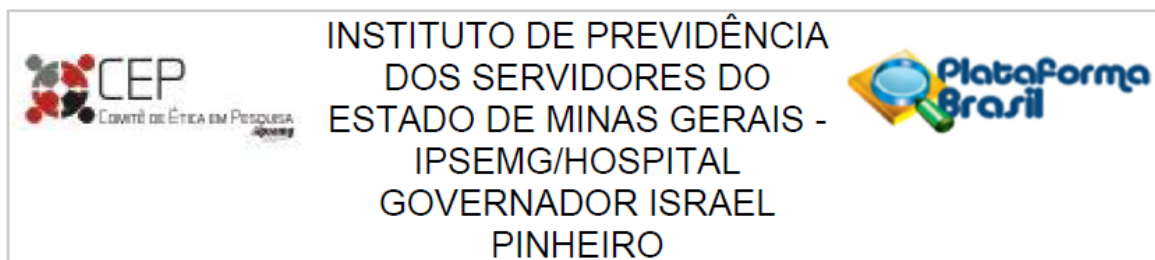
Os riscos para os pacientes participantes da pesquisa envolvem possíveis incômodos durante a punção venosa, como dor local, tonteira ou sensação de desmaio e, após a coleta, o possível surgimento de uma mancha roxa, devido ao extravasamento de sangue de um vaso sanguíneo. Geralmente não há complicações e a mancha roxa desaparece em poucos dias.

Os benefícios com a pesquisa citados foram contribuição para a conquista da padronização dos resultados do exame hemograma, no tocante aos índices plaquetários, bem como geração de materiais didáticos, que possuem o objetivo de instruir e esclarecer a comunidade médica sobre a aplicabilidade dos índices plaquetários e melhor avaliação dos resultados fornecidos por este exame.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante na área de Ciências da Saúde.

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 225, 11º andar
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.130-110
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3237-2813 **Fax:** (31)3237-2273 **E-mail:** cep.hgip@ipsemg.mg.gov.br



Continuação do Parecer: 4.169.108

A hipótese dos proponentes é que a alteração tempo-dependente dos valores dos índices plaquetários após a coleta e o desfecho Primário é que o tempo de armazenamento influencia na análise hematológica, aumentando os valores de VPM, PDW e PCT.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão corretos em sua apresentação e estão vinculados à pesquisa os seguintes documentos:

- Aprovação inicial da Gerencia de Ensino e Pesquisa datada de 18/09/2017 para encaminhamento do Projeto à Plataforma Brasil;
- Informações Básicas do Projeto;
- Projeto Completo;
- Declaração de Concordância do Chefe de Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia/UFMG datada de 12/04/2018;
- Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG emitido em 09/08/2018 e favorável à realização da pesquisa.
- Recebimento para análise ética no CEP Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas Gerais - IPSEMG/Hospital Governador Israel Pinheiro em 19/10/2018.
- Documento endereçado ao Coordenador do CEP/ IPSEMG datado de 19/02/2020.
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);

O Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas Gerais (IPSEMG) é co-participante da pesquisa.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do Projeto considerando os documentos apresentados.

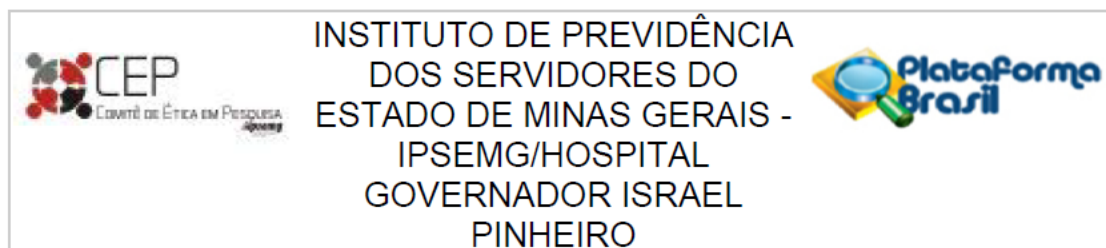
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Favorável a aprovação do projeto Título da Pesquisa: Efeito do Tempo de Armazenamento sobre os Índices Plaquetários em Amostras de Sangue Total. Pesquisador Responsável: Ana Paula Lucas Mota.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-IPSEMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 225, 11º andar
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.130-110
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3237-2813 **Fax:** (31)3237-2273 **E-mail:** cep.hgip@ipsemg.mg.gov.br



Continuação do Parecer: 4.169.108

emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa, apresentar relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1197391.pdf	20/02/2020 09:59:59		Aceito
Outros	CartarespostaparaCOEP.pdf	20/02/2020 09:59:36	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Outros	AprovacaoHGIP.pdf	08/10/2018 18:20:52	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Outros	93370318aprovacao.pdf	09/08/2018 12:20:51	Vivian Resende	Aceito
Outros	93370318aprovacao.pdf	09/08/2018 12:20:51	Vivian Resende	Aceito
Outros	93370318parecer.pdf	09/08/2018 12:20:36	Vivian Resende	Aceito
Outros	93370318parecer.pdf	09/08/2018 12:20:36	Vivian Resende	Aceito
Outros	ParecerCamaraDepartamental.pdf	29/06/2018 16:03:49	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEProjetoGiovanna.docx	29/06/2018 16:03:16	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoGiovannaVersaoFinal.docx	29/06/2018 16:03:02	Ana Paula Lucas Mota	Aceito

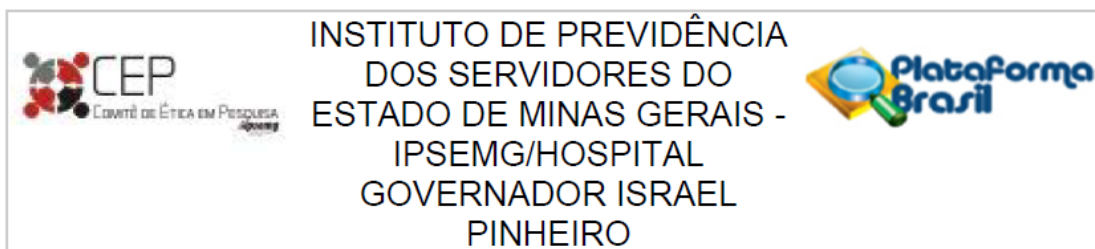
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 225, 11º andar
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.130-110
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3237-2813 **Fax:** (31)3237-2273 **E-mail:** cep.hgip@ipsemg.mg.gov.br



Continuação do Parecer: 4.169.108

BELO HORIZONTE, 22 de Julho de 2020

Assinado por:
ADIRSON MONTEIRO DE CASTRO
(Coordenador(a))