

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LETÍCIA GONÇALVES FREITAS

**INOVAÇÕES METODOLÓGICAS EM HEMATOLOGIA CLÍNICA: USO DA  
CITOMETRIA DE FLUXO NO ESTUDO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA NA PRÉ-  
ECLÂMPZIA**

Belo Horizonte – MG

2012

LETÍCIA GONÇALVES FREITAS

**INOVAÇÕES METODOLÓGICAS EM HEMATOLOGIA CLÍNICA: USO DA  
CITOMETRIA DE FLUXO NO ESTUDO DA ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA NA PRÉ-  
ECLÂMPZIA**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luci Maria Sant'Ana  
Dusse - UFMG

Coorientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho –  
CPqRR/Fiocruz Minas

Belo Horizonte – MG

2012

F866i Freitas, Letícia Gonçalves.  
Inovações metodológicas em hematologia clínica: uso da citometria de fluxo no estudo da ativação plaquetária na pré-eclâmpsia / Letícia Gonçalves Freitas – 2012.  
159 f. : il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luci Maria Sant'Ana Dusse.  
Co-orientador: Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Pre-eclampsia – Teses. 2. Hematologia clínica – Teses. 3. Citometria de fluxo – Teses. I. Dusse, Luci Maria Sant'Ana. II. Martins Filho, Olindo Assis. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD 616.15

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**LETÍCIA GONÇALVES FREITAS**

**"Inovações Metodológicas em Hematologia Clínica:  
Uso da Citometria de Fluxo no Estudo da Ativação  
Plaquetária na Pré-eclâmpsia"**

Dissertação, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em vinte e oito de fevereiro de 2012.

### COMISSÃO EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis - UFOP

  
Prof. Dr. Sival Ferreira de Oliveira - FOMMS

  
Prof. Dr. Clindo Assis Martins Filho - CPORR

  
Profa. Dra. Lucimária Sant'Ana Duesse - UFMG

*Dedico a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Acredito, sinceramente, que um trabalho quando realizado em benefício próprio ou isoladamente possui valor limitado ou questionável. Entretanto aquele, fruto de um esforço coletivo, quando todos se sentem parte, tem valor inestimável.*

## AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Luci Maria Sant'Ana Dusse, pelo estímulo constante, pela confiança em mim, pela oportunidade de aprender e compartilhar conhecimentos. Por me convencer de que o tempo é uma grandeza, literalmente, relativa.

Ao professor e coorientador Olindo Assis Martins Filho, pelas ideias interessantes e pelo empenho no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Maria das Graças Carvalho, pelo apoio e pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

À professora Valéria Sandrim, ao Dr. Anderson Bruno, ao Dr. Sinval Oliveira; às enfermeiras Gisele e Érica; aos residentes Cíntia, Andressa, Aryanna, Roberta, Gabriela, Rogéria, Myrian e Guilherme e à técnica de enfermagem Romilda, pela colaboração durante as coletas na Maternidade Hilda Brandão da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.

À equipe médica, aos residentes, à enfermeira Marcilene, à bioquímica Julise e aos demais funcionários do Laboratório de Análises Clínicas, pela colaboração durante as coletas na Maternidade Odete Valadares.

À Dra. Daniela, à Dra. Amanda, à Dra. Regina, à residente Cláudia, às enfermeiras Ana Lúcia e Daniele e às coletoras Lourdes e Marta, pela colaboração durante as coletas no Hospital Municipal Odilon Behrens.

Aos funcionários da Unidade Básica de Saúde da Família Guanabara/Betim pela colaboração durante as coletas.

Às pacientes com pré-eclâmpsia, às gestantes normotensas e às não gestantes pelo “sim” que fez toda a diferença e pela contribuição inestimável à realização deste trabalho. E àquelas que disseram “não” e que me ensinaram a respeitar a liberdade de escolha de cada um.

Ao Laboratório São Paulo onde realizei os experimentos, em especial ao Dr. José Euclides e à Dra. Cláudia, pelo espaço cedido. À Dra. Solange, Dra. Mitiko, Aretha e Jamilson, por permitirem que, em meio à rotina do Setor de Citometria de Fluxo, fosse possível realizar este trabalho. A todos os funcionários do Laboratório, em especial a Silvana, Marlene, Washington, Débora, Laysa, Tuca e Therezinha,

pela simpatia e pela ajuda sempre que precisei dos equipamentos do Setor de Hematologia.

A Renato Avelar e Danielle Vitelli, pela colaboração e auxílio nos experimentos.

Ao Laboratório de Biomarcadores do Centro de Pesquisa René Rachou, em especial a Márcio, Roquélia, Fabiana Paixão, Salvina e Maísa, pelo suporte técnico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por viabilizar minha dedicação ao desenvolvimento deste trabalho.

Às funcionárias da Biblioteca da Faculdade de Farmácia da UFMG, Simone e Aline, pelo auxílio na pesquisa e aquisição de artigos científicos.

Ao professor Armando, coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, aos funcionários da Secretaria da Pós-graduação Eduardo, Ludimila e Silas, que sempre estiveram disponíveis para me auxiliar.

Aos Laboratórios de Biologia Molecular, de Radioisótopos e de Toxicologia Ocupacional da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo apoio técnico.

Aos amigos do Laboratório de Hematologia (extensão do meu lar) e da Faculdade de Farmácia da UFMG, em especial Márcio, Mariza e Batista, pela simpatia e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

À Fátima, pelo apoio constante, pela paciência em ouvir minhas reflexões, aflições, convicções e pelas sessões de terapia em grupo.

À Januária, pelo companheirismo e incentivo, que fizeram com que tudo estivesse sempre ótimo.

Às alunas de iniciação científica Aline Caldeira e Luiza Perucci, pela imprescindível ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Às colegas de pesquisa Fabiana, Lara, Melina e Patrícia, pelo auxílio durante as coletas.

À Flávia Komatsuzaki, pelo grande auxílio nas análises estatísticas.

Aos alunos do 9º período 02/2010 – habilitação em Análises Clínicas e Toxicológicas, com os quais realizei o Estágio em Docência, pela paciência, uma vez que ali estávamos todos aprendendo.

Ao professor Antônio Flávio de Carvalho Alcântara (Tininha), meu consultor para assuntos acadêmicos, cinematográficos e amigo, pelos primeiros passos na pesquisa e pelo incentivo constante.

À minha grande amiga Kérida, companheira de forró, sol, chuva, corrida e de qualquer programa de índio. Com ela, dividi não só a bancada, o citômetro e o *notebook*, mas muitas divagações, algumas lágrimas e risadas memoráveis.

Ao meu “amigo para sempre” (e consciência) Leonardo Fuscaldi, pela parceria constante desde o primeiro período da graduação, com quem compartilhei alegrias, frustrações, conquistas, e que fez com que o “processo solitário” não fosse tão solitário assim.

Aos Cabritos Mochileiros, pelas aventuras vividas, os risos compartilhados e os muitos quilômetros rodados.

Ao Grupo Folclórico Congá, por me ensinar que é possível sim “ser tudo na vida”.

A meu pai, companheiro de aventuras, e à mamãe, meu porto seguro, pela torcida constante, mesmo sem, às vezes, entenderem ao certo o meu trabalho. Obrigada também pela confiança depositada em mim. Amo vocês!

A minha irmã Helena, por ser meu “padrão-ouro”, empresária em minhas aventuras a qualquer hora da madrugada e minha pseudo-mãe quando precisei de colo. Por torcer a cada paciente conquistada, a cada experimento bem-sucedido e pela força em outros tantos mal-sucedidos.

A vovô e vovó, pelo carinho e pelas orações para que tudo corresse bem e para que eu fosse feliz em minhas escolhas.

A Tia Beta, pela disponibilidade em me ouvir e por me mostrar que as coisas podem ser vistas por outra perspectiva: a do outro.

A toda minha família e amigos, pelo carinho, torcida e pelas portas sempre abertas.

A Deus, pela força e coragem (buscas constantes).

A todas as pessoas que encontrei pelo caminho e que foram, cada uma a seu modo, de fundamental importância, meus sinceros agradecimentos.

*Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena  
Acreditar no sonho que se tem  
Ou que seus planos nunca vão dar certo  
Ou que você nunca vai ser alguém.*

*Renato Russo*

## RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma complicação grave da gestação associada à elevada morbidade e mortalidade materno-fetal, cuja etiologia ainda não foi estabelecida. Na forma pura, caracteriza-se pelo aparecimento, em gestante normotensa, após a 20ª semana de gestação, de hipertensão e proteinúria. As alterações hemostáticas e inflamatórias associadas à gestação normal estão mais exacerbadas na PE. Estudos sugerem acentuada ativação e agregação plaquetária que contribuem para o estado de hipercoagulabilidade nessa doença. A citometria de fluxo tem sido amplamente utilizada para avaliar a expressão de glicoproteínas da superfície plaquetária, bem como a formação de agregados plaquetas-leucócitos e a expressão de fator tissular (FT) pelos monócitos. O objetivo deste estudo foi padronizar as técnicas para avaliar a expressão de marcadores de ativação plaquetária e expressão de FT e aplicá-las no estudo da PE. Foram avaliadas 97 mulheres, das quais 35 eram gestantes com PE (15 com a forma grave-PEG e 20 com a forma leve-PEL), 31 gestantes normotensas (GN) e 31 mulheres não gestantes (CNG). Foram avaliadas as intensidades médias de fluorescência (IMF) dos biomarcadores CD41a, CD61, CD42a, CD62P e a razão entre elas, bem como a percentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup>, de agregados plaquetas-monócitos (APM), de agregados plaquetas-neutrófilos (APN) e monócitos FT<sup>+</sup>. A IMF do CD62P e a percentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup>, nos três grupos não diferiu ( $p=0,67$  e  $p=0,38$ , respectivamente). Após a subdivisão do grupo de gestantes com PE também não foi obtida diferença ( $p=0,69$  para IMF do CD62P e  $p=0,54$  para plaquetas CD62P<sup>+</sup>). A IMF do CD41a, nas gestantes com PE foi menor do que no CNG ( $p=0,004$ ) e GN em relação ao CNG ( $p=0,007$ ). A IMF do CD61 no grupo PEG foi menor do que no CNG ( $p=0,008$ ). As IMF do CD61 e CD41a no grupo PE foram menores do que no CNG, e nas GN em relação ao CNG ( $p=0,00$  para ambos). Ambas foram inferiores no PEG e PEL em relação ao CNG ( $p=0,00$  para ambos). A IMF do CD42a, mesmo após a subdivisão do grupo PE, não diferiu ( $p=0,44$  e  $p=0,57$ , respectivamente). As razões entre as IMF CD61/CD42a e CD41a/CD62P foram menores nas GN do que no CNG ( $p=0,002$  e  $p=0,007$ , respectivamente) e no grupo de PE e PEG em relação ao CNG ( $p=0,001$  para ambos). A razão IMF CD42a/CD41a foi superior no grupo PE e PEG em relação ao CNG ( $p=0,001$  para ambos) e no GN em relação ao CNG ( $p=0,002$ ). As razões de IMF do CD61/CD41a, CD61/CD62P e CD42a/CD62P, antes ( $p=0,29$ ;  $p=0,07$  e  $p=0,73$ , respectivamente) e após ( $p=0,42$ ;  $p=0,14$  e  $p=0,69$ , respectivamente) a subdivisão do grupo PE, não diferiu. A percentagem de APM antes ( $p=0,08$ ) e após a subdivisão do grupo PE ( $p=0,13$ ) não diferiu. A percentagem de APN foi menor na PE em relação ao CNG ( $p=0,01$ ). Não houve diferença na formação de APN nas gestantes com PE comparadas às GN ( $p=0,40$ ) e entre GN e CNG ( $p=0,018$ ). Não houve diferença entre os grupos após a subdivisão do grupo PE ( $p=0,02$ ). A percentagem de monócitos FT<sup>+</sup> não diferiu entre os grupos antes ( $p=0,14$ ) e após a subdivisão do grupo PE ( $p=0,26$ ). O estudo possibilitou o desenvolvimento de inovações metodológicas em Hematologia Clínica para avaliar a ativação plaquetária. A padronização da técnica por citometria de fluxo para avaliar a ativação plaquetária e formação de APM e APN foi estabelecida. A gestação é acompanhada por alterações na expressão de CD41a e CD61 na superfície plaquetária, além da redução na contagem de plaquetas. A PE é acompanhada de menor percentagem de APN em relação ao CNG. A PEG está associada a um maior número de correlações entre os biomarcadores de ativação plaquetária sugerindo que o processo é multifatorial. **Palavras-chave:** Pré-eclâmpsia, CD41a, CD61, CD42a, CD62P, agregado plaqueta-monócito, agregado plaqueta-neutrófilo.

## ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a serious complication of pregnancy associated to maternal-fetal morbidity and mortality, whose etiology has not been established. In pure form, is characterized by the appearance, in normal pregnant women after the 20th week of gestation, hypertension and proteinuria. Hemostatic and inflammatory changes associated with normal pregnancy are more exacerbated in PE. Studies suggest a marked platelet activation and aggregation contributing to the hypercoagulable state in this disease. Flow cytometry has been used to evaluate the expression of platelet surface glycoproteins, as well as the formation of platelet-leukocyte aggregates and the expression of tissue factor (TF) by monocytes. The aim of this study was to standardize techniques to evaluate the expression of platelet activation markers and expression of TF and apply them in the study of PE. We evaluated 97 women, of whom 35 were pregnant women with PE (15 with severe form-PEG and 20 with the mild form-PEL), 31 normotensive pregnant women (GN) and 31 nonpregnant women (CNG). Were evaluated mean fluorescence intensity (MFI) of the biomarkers CD41a, CD61, CD42a, CD62P and the ratio between them, and the percentage of platelets CD62P<sup>+</sup>, platelets-monocyte aggregates (APM), platelets-neutrophils aggregates (APN) and TF<sup>+</sup> monocytes. The MFI of CD62P and the percentage of CD62P<sup>+</sup> platelets in the three groups did not differ ( $p=0.67$  and  $p=0.38$ , respectively). After the subdivision of the group of women with PE it was not obtained difference ( $p=0.69$  for the IMF and  $p=0.54$  for CD62P and CD62P<sup>+</sup> platelets). The MFI of CD41a in pregnant women with PE were lower than in the CNG ( $p=0.004$ ) compared to GN and CNG ( $p=0.007$ ). The MFI of CD61 on the PEG group was lower than the CNG ( $p=0.008$ ). The MFI of CD41a and CD61 was lower in the PE group than in the CNG and the GN in relation to the CNG ( $p=0.00$  for both). Both were below the PEG and PEL in relation to the CNG ( $p=0.00$  for both). The MFI of CD42a even after the subdivision of the PE group did not differ ( $p=0.44$  and  $p=0.57$ , respectively). The rations between the MFI CD61/CD42a and CD41a/CD62P was lower in GN than in the CNG ( $p=0.002$  and  $0.007$ , respectively) and in the PE group compared to PEG and CNG ( $p=0.001$  for both). The ratio MFI CD42a/CD41a was higher in the PE group compared to PEG and CNG ( $p=0.001$  for both) and in relation to the CNG and GN ( $p=0.002$ ). The reasons for the IMF CD61/CD41a, CD61/CD62P and CD42a/CD62P before ( $p=0.29$ ;  $p=0.07$  and  $p=0.73$ , respectively) and after ( $p=0.42$ ;  $p=0.14$  and  $p=0.69$ , respectively) the subdivision of the PE group did not differ. The percentage of APM before ( $p=0.08$ ) and after division of the PE group ( $p=0.13$ ) did not differ. The percentage of APN was lower PE in relation to CNG ( $p=0.01$ ). There was no difference in the formation of APN in pregnant women with PE compared to GN ( $p=0.40$ ) and between GN and CNG ( $p=0.018$ ). There was no difference between groups after the subdivision of the PE group ( $p=0.02$ ). The percentage of TF<sup>+</sup> monocytes did not differ between groups before ( $p=0.14$ ) and after the subdivision of the PE group ( $p=0.26$ ). The study allowed the development of methodological innovations in Clinical Hematology to assess platelet activation. The standardization of the technique by flow cytometry to assess platelet activation and formation of APM and APN was established. Pregnancy is accompanied by changes in the expression of CD41a and CD61 on the platelet surface, and reduced platelet count. PE is accompanied by a lower percentage of APN in relation to CNG. The PEG is associated with a greater number of correlations between biomarkers of platelet activation suggesting that the process is multifactorial. **Keywords:** Preeclampsia, CD41a, CD61, CD42a, CD62P, platelet-monocyte aggregate, platelet-neutrophil aggregate.

## LISTA DE FIGURAS

<b>1 Atuação das plaquetas no processo de hemostasia e coagulação sanguínea</b> .....	29
<b>2 Atuação de receptores da membrana plaquetária em resposta à ativação</b> .....	31
<b>3 Ativação plaquetária e expressão de P-selectina. (A) Plaqueta no estado inativo com grânulos <math>\alpha</math>. (B) Após ativação há mudança conformacional e os grânulos <math>\alpha</math> migram para a membrana, sendo liberados no plasma. (C) Plaqueta ativada. (D) Proteases séricas digerem a P-selectina de membrana, originando a forma solúvel no plasma (BLANN &amp; DRAPER, 2011)</b> ..	33
<b>4 Interações plaqueta-monócito. Contato inicial com os monócitos via PSGL-1 e ativação de outras integrinas (van GILS <i>et al.</i>, 2009)</b> .....	38
<b>5 Etapas da Nova Teoria da Coagulação. (A) Iniciação: Ativação do FV para produzir uma pequena quantidade de trombina. (B) Amplificação: Aumento da resposta pró-coagulante. (C) Propagação: Síntese de trombina em grande escala</b> .....	42
<b>6 Funcionamento do citômetro de fluxo. (A) Partículas em suspensão passam em fila indiana através de um feixe de laser no citômetro de fluxo. (B) Incidência oblíqua do laser. (C) Incidência perpendicular do laser</b> .....	45
<b>7 Geração do pulso de voltagem</b> .....	46
<b>8 Estratégias utilizadas para a determinação da intensidade média de fluorescência de marcadores de ativação plaquetária e da percentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup>. Figuras obtidas utilizando-se o <i>software</i> Flow Jo</b> .....	66
<b>9 Estratégias utilizadas para a determinação da percentagem de agregados plaquetas-monócitos e agregados plaquetas-neutrófilos. Figuras obtidas utilizando-se o <i>software</i> Flow Jo</b> .....	69
<b>10 Estratégias utilizadas para a determinação da percentagem de monócitos expressando fator tissular. Figuras obtidas utilizando-se o <i>software</i> Flow Jo</b> .....	70
<b>11 Principais sintomas das gestantes com PE</b> .....	77
<b>12 Principais medicamentos utilizados pelo grupo de gestantes normotensas</b> .....	78
<b>13 Principais medicamentos utilizados pelo grupo de mulheres não gestantes</b> .....	78
<b>14 Mediana e intervalo interquartil dos níveis de ácido úrico, contagem de eosinófilos, proteinúria de amostra isolada e de 24 horas nos grupos de gestantes com PE grave (PEG) e leve (PEL)</b> .....	81
<b>15 Contagem de plaquetas, intensidade média de fluorescência do CD41a, CD61, CD42a, CD62P e percentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup> nos grupos PE, GN e CNG</b> .....	83
<b>16 Contagem de plaquetas, intensidade média de fluorescência do CD41a, CD61, CD42a, CD62P e percentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup> nos grupos PEG, PEL, GN e CNG</b> .....	84

<b>17 Razão entre as intensidades médias de fluorescência de CD61/CD41a, CD61/CD42a, CD42a/CD41a, CD61/CD62P, CD42a/CD62P e CD41a/CD62P nos grupos PE, GN e CNG. ....</b>	<b>86</b>
<b>18 Razão entre as intensidades médias de fluorescência de CD61/CD41a, CD61/CD42a, CD42a/CD41a, CD61/CD62P, CD42a/CD62P e CD41a/CD62P nos grupos PEG, PEL GN e CNG. ....</b>	<b>88</b>
<b>19 Percentagem de APM, APN e de monócitos expressando fator tissular nos grupos PE, GN e CNG.....</b>	<b>90</b>
<b>20 Percentagem de APM, APN e de monócitos FT<sup>+</sup> nos grupos PEG, PEL, GN e CNG. ....</b>	<b>91</b>
<b>21 Área sob a curva ROC dos parâmetros hemostáticos. ....</b>	<b>94</b>
<b>22 Coeficientes de correlação (r) para os parâmetros citométricos e para a contagem de plaquetas, por grupo avaliado. ....</b>	<b>96</b>
<b>23 Gráficos de <i>Bland e Altman</i> para o grupo de gestantes com PE.....</b>	<b>97</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>1</b>	<b>Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise das glicoproteínas plaquetárias.....</b>	<b>65</b>
<b>2</b>	<b>Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de agregados plaquetas-leucócitos e monócitos expressando fator tissular.....</b>	<b>68</b>
<b>3</b>	<b>Características clínicas das participantes do estudo.....</b>	<b>74</b>
<b>4</b>	<b>Características clínicas das participantes do estudo após subdivisão do grupo PE nas formas grave e leve.....</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>Análise de resíduo para a variável “número de gestações” nos grupos PEG, PEL, GN e CNG.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE (n=35).....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Contagem de plaquetas e marcadores de ativação plaquetária obtidos para os grupos PE (PEG e PEL), GN e CNG.....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>Razões entre as IMF dos marcadores de superfície plaquetária obtidas para os grupos PE (PEG e PEL), GN e CNG.....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Porcentagem de agregados plaquetas-monócitos, plaquetas-neutrófilos e de monócitos expressando fator tissular para os grupos PE (PEG e PEL), GN e CNG.....</b>	<b>89</b>
<b>10</b>	<b>Modelo linear generalizado de <i>Poisson</i>, considerando como variável dependente a presença e ausência de PE.....</b>	<b>92</b>
<b>11</b>	<b>Análise dos parâmetros hemostáticos pela curva ROC.....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido aracdônico
ADP	Difosfato de adenosina
ALT	Alanina aminotransferase
APL	Agregado plaquetas-leucócitos
APM	Agregado plaquetas-monócitos
APN	Agregado plaquetas-neutrófilos
AST	Aspartato aminotransferase
AT	Antitrombina
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase	Enzima que cataliza a hidrólise do trifosfato de adenosina
AUC	Área sob a curva
AVC	Acidente vascular cerebral
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CD40L	Ligante solúvel de CD40
CIUR	Crescimento intra-uterino restrito
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CF	Citometria de fluxo
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CNG	Controle não gestante
COEP	Comissão de ética em pesquisa
CPqRR	Centro de pesquisas René Rachou
diast.	Diastólica
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FHEMIG	Fundação hospitalar do estado de Minas Gerais
FIII	Fator III
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FIX	Fator IX
FIXa	Fator IX ativado

FL1	Fluorescência 1
FL2	Fluorescência 2
FL3	Fluorescência 3
FP-4	Fator plaquetário 4
FSC	<i>Forward-scattered light</i>
FT	Fator tissular
FVa	Fator V ativado
FVII	Fator VII
FVIIa	Fator VII ativado
FVIII	Fator VIII
FVIIIa	Fator VIII ativado
FvW	Fator de von Willebrand
FX	Fator X
FXa	Fator X ativado
FXI	Fator XI
FXIa	Fator XI ativado
FXII	Fator XII
G	Gram
GN	Gestante normotensa
GP	Glicoproteína
GPG	Ganho de peso na gestação
GRO- $\alpha$	Precursor do crescimento controlado da alfa proteína
H	Hora
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HELLP	<i>Haemolysis, elevated liver enzyme activity, low platelet</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Intervalo de confiança
IEP	Intervalo entre partos
IG	Idade gestacional
IMF	Intensidade média de fluorescência
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea

IQ	Intervalo interquartil
Kg	Quilograma
L	Litro
LDH	Lactato desidrogenase
LSD	<i>Least square difference</i>
M	Molar
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
Mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
MPP	Micropartícula plaquetária
Nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
PA	Pressão arterial
PAC-1	Ligante do receptor de fibrinogênio ativado do tipo 1
PAF	Fator de ativação plaquetária
PBS	Solução fosfato tamponada
PE	Ficoeritrina
PE	Pré-eclâmpsia
PECAM-1	Molécula de adesão plaqueta-célula endotelial tipo 1
PECy5	Ficoeritrina-cianina 5
PEG	Pré-eclâmpsia grave
PEL	Pré-eclâmpsia leve
PG	Prostaglandina
pH	Potencial hidrogeniônico
PMN	Polimorfonuclear
PRP	Plasma rico em plaquetas
PSGL-1	Ligante 1 da glicoproteína P-selectina
RANTES	Regulador da ativação naturalmente expresso e secretado por

	células T
RDW	<i>Red cell distribution width</i>
RP	Razão de prevalência
rpm	Rotações por minuto
ROC	<i>Receiver operating characteristic curve</i>
sCD62P	P-selectina solúvel
Sem.	Semana
Sist.	Sistólica
SSC	<i>Side-scattered light</i>
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFPI	Inibidor da via do fator tissular
TRAP	Peptídeo ativado pelo receptor de trombina
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
U	Unidade
UBSF	Unidade Básica de Saúde da Família
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGFR-121	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular 121

## LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
B	Beta
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
K <sup>+</sup>	Íon potássio
μ	Mi
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
R	Coeficiente de correlação
X <sup>2</sup>	Qui-quadrado
%	Porcentagem
°C	Grau centígrado
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
+	Positivo
±	Mais ou menos
>	Maior
<	Menor

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA.....	23
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1	Plaquetas e hemostasia primária .....	28
2.2	Ativação plaquetária.....	31
2.3	Biomarcadores de ativação plaquetária.....	32
2.3.1	<u>P-selectina (CD62P)</u> .....	32
2.3.2	<u>Glicoproteína GPIIIa (CD61)</u> .....	34
2.3.3	<u>Glicoproteína GPIIb/IIIa (CD41a)</u> .....	34
2.3.4	<u>Glicoproteína GPIX (CD42a)</u> .....	35
2.3.5	<u>Agregados plaquetas-leucócitos (APL)</u> .....	35
2.4	A nova teoria da coagulação e o papel importante do fator tissular e da superfície plaquetária.....	40
2.4.1	<u>Fator tissular</u> .....	42
2.5	Fundamentos de citometria de fluxo .....	43
2.5.1	<u>Avaliação das plaquetas por citometria de fluxo</u> .....	47
2.6	Alterações plaquetárias na gestação .....	49
2.6.1	<u>Alterações plaquetárias na pré-eclâmpsia</u> .....	50
3	OBJETIVOS .....	57
3.1	Objetivo geral .....	58
3.2	Objetivos específicos.....	58
4	CASUÍSTICA E METODOLOGIA .....	59
4.1	Aspectos Éticos .....	60
4.2	Casuística.....	60
4.2.1	<u>Grupo PE: Gestantes com PE</u> .....	60

4.2.2	<b><u>Grupo GN: Gestantes normotensas</u></b> .....	62
4.2.3	<b><u>Grupo CNG: Mulheres não gestantes</u></b> .....	62
4.3	<b>Amostras biológicas</b> .....	63
4.4	<b>Método</b> .....	63
4.4.1	<b><u>Protocolo do estudo da expressão de marcadores de ativação plaquetária</u></b> .....	63
4.4.2	<b><u>Protocolo do estudo dos agregados plaquetas-monócitos, plaquetas-neutrófilos e expressão de fator tissular em monócitos</u></b> .....	67
4.4.3	<b><u>Definição do tipo de amostra de sangue citratado</u></b> .....	70
4.5	<b>Análise estatística</b> .....	71
5	<b>RESULTADOS</b> .....	73
5.1	<b>Características clínicas dos grupos avaliados</b> .....	74
5.2	<b>Avaliação dos parâmetros laboratoriais das gestantes com PE</b> .....	78
5.3	<b>Avaliação de marcadores plaquetários e da expressão de fator tissular em monócitos</b> .....	81
5.4	<b>Análise multivariada dos parâmetros clínicos e hemostáticos</b> .....	91
5.5	<b>Avaliação do poder diagnóstico dos marcadores hemostáticos</b> .....	92
5.6	<b>Correlação entre contagem de plaquetas e parâmetros citométricos</b> ... 95	
5.7	<b>Avaliação da concordância entre as análises feitas por citometria de fluxo</b> .....	97
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	98
6.1	<b>Considerações gerais</b> .....	99
6.2	<b>Características clínicas dos grupos avaliados</b> .....	100
6.3	<b>Parâmetros hematológicos e bioquímicos</b> .....	104
6.4	<b>Marcadores plaquetários</b> .....	108
6.4.1	<b><u>Cuidados na fase pré-analítica</u></b> .....	108
6.4.2	<b><u>Contagem de plaquetas</u></b> .....	108
6.4.3	<b><u>Expressão de marcadores de ativação plaquetária</u></b> .....	111
6.4.4	<b><u>Expressão de fator tissular em monócitos</u></b> .....	123

6.4.5	<b><u>Análise multivariada dos parâmetros clínicos e hemostáticos</u></b> .....	125
6.5	<b>Avaliação do poder diagnóstico da contagem de plaquetas e dos parâmetros citométricos pela Curva ROC</b> .....	126
6.6	<b>Análise da correlação da contagem de plaquetas e parâmetros citométricos</b> .....	127
6.7	<b>Avaliação da concordância entre análises feitas por citometria de fluxo</b> .....	127
6.8	<b>Considerações finais</b> .....	128
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	130
7.1	<b>Perspectivas de estudos</b> .....	131
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	132
	<b>ANEXO A</b> .....	146
	<b>ANEXO B</b> .....	147
	<b>ANEXO C</b> .....	148
	<b>ANEXO D</b> .....	149
	<b>ANEXO E</b> .....	150
	<b>ANEXO F</b> .....	151
	<b>ANEXO G</b> .....	154
	<b>ANEXO H</b> .....	159
	<b>ANEXO I</b> .....	161

# **1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA**

A pré-eclâmpsia (PE) é uma complicação grave da gestação, associada à elevada morbidade e mortalidade. Essa doença, na forma pura, é caracterizada pelo aparecimento de hipertensão e proteinúria, após a 20ª semana de gestação, em gestantes até então normotensas. Clinicamente é importante distinguir a forma grave da doença, quando os níveis pressóricos e de proteinúria são ainda mais elevados.

A gestação normal está associada a um estado inflamatório e à exacerbação da coagulação. A hipercoagulabilidade visa proteger a mulher de uma potencial hemorragia no momento do parto. Um aumento fisiológico na concentração de vários fatores da coagulação e uma hiperativação plaquetária, mediada pela elevação de cálcio, tem sido observado ao longo da gestação.

A PE cursa com um estado de hipercoagulabilidade e inflamação ainda mais acentuado do que na gestação normal. A formação exagerada de fibrina nessa doença pode resultar em oclusão da luz de vasos da microcirculação, especialmente a uteroplacentária e renal. As plaquetas vêm assumindo um papel relevante na fisiopatologia da PE. Uma produção deficiente de prostaglandinas e uma biossíntese excessiva de tromboxano (TXA<sub>2</sub>) têm sido relatadas. Há, ainda, evidências de que a ativação e agregação das plaquetas precedam o aparecimento dos sintomas clínicos.

Atualmente, está bem estabelecido que as plaquetas, além da ação essencial no processo hemostático, participam da resposta inflamatória. A citometria de fluxo (CF) tem sido amplamente utilizada para avaliar a expressão de marcadores de ativação plaquetária, como glicoproteínas (GP) de superfície e a formação de agregados plaquetas-leucócitos (APL) em diversas condições clínicas. A avaliação desses marcadores em gestantes pré-eclâmpicas tem resultado em conclusões conflitantes.

A ativação plaquetária resulta em alteração conformacional da GPIIb/IIIa, localizada na superfície das plaquetas, favorecendo a ligação ao fibrinogênio e a agregação plaquetária seguida da liberação do conteúdo de seus grânulos. Tem sido sugerido que a degranulação plaquetária contribui para alterações vasculares placentárias e sistêmicas, especialmente pela liberação de substâncias vasoativas, mitogênicas e mioproliferativas, como TXA<sub>2</sub>, fatores de crescimento e de transformação derivados das plaquetas.

A interação entre plaquetas e leucócitos, formando agregados, é observada em muitos processos inflamatórios, trombóticos e doenças autoimunes. Admite-se

que os APL constituem uma superfície de ancoragem para células inflamatórias, além de secretar diferentes proteases que aumentam a adesão plaquetária.

A P-selectina constitui o marcador de ativação plaquetária mais estudado. Após a ativação plaquetária, a P-selectina rapidamente se transloca para a superfície e interage principalmente com o receptor PSGL-1 dos monócitos, formando agregados, embora possa interagir, em menor extensão, também com os neutrófilos. Os agregados plaquetas-monócitos (APM) têm um papel relevante na indução da ativação de outras plaquetas e monócitos, a partir da expressão e secreção de citocinas.

Os neutrófilos ligados a plaquetas (agregados plaquetas-neutrófilos-APN) secretam ativadores do endotélio, facilitam a estagnação desses nos pequenos vasos, iniciam a produção de citocinas inflamatórias e liberam o conteúdo dos grânulos, ricos em proteases, desencadeando processos inflamatórios e trombóticos. Além disso, os APN são capazes de causar embolização pela adesão de estruturas da microcirculação, resultando em lesão vascular, possivelmente devido ao aumento da síntese e difusão de radicais livres.

O recrutamento de monócitos a partir da formação dos APM pode amplificar a produção de pró-coagulantes, em especial o fator tissular (FT). A expressão de FT em monócitos é regulada por citocinas pró-inflamatórias e pela P-selectina. Além de ativar a cascata da coagulação, o FT interage com a P-selectina acelerando a formação e o depósito de fibrina no sítio lesado.

Uma revisão dos estudos da literatura relativos à avaliação da expressão de marcadores de ativação plaquetária revela que ainda não há consenso quanto ao método ideal para essa análise. Alguns questionamentos referem-se à definição do anticoagulante a ser utilizado na coleta da amostra sanguínea, o tipo de amostra (sangue total ou plasma rico em plaquetas), a especificação dos anticorpos e o uso ou não de fixador no processamento da amostra. Outro aspecto importante é a grande variabilidade, na população em geral, da expressão desses, o que dificulta o estabelecimento do *cut-off* para os mesmos.

No presente estudo, a padronização das técnicas para avaliar as GP de superfície das plaquetas, bem como a formação de APL e a expressão de FT pelos monócitos foi criteriosamente estabelecida, com base nos estudos da literatura e na análise crítica das possíveis interferências nas fases pré-analítica e analítica, que pudessem resultar na indução da ativação plaquetária. Certamente, este estudo

propiciou maior conhecimento acerca do papel das plaquetas na fisiopatologia da PE, bem como das técnicas para avaliação laboratorial da ativação plaquetária. A padronização das técnicas para avaliar GP plaquetárias, formação de APL e expressão de FT pelos monócitos, indubitavelmente, será uma contribuição importante para o avanço dos estudos envolvendo plaquetas em outras condições clínicas.

É oportuno lembrar a dificuldade do diagnóstico da PE, estabelecido com base nos níveis pressóricos e na proteinúria. Até o presente, nenhum marcador laboratorial que apresente a relação custo-efetividade favorável foi proposto para o diagnóstico dessa doença. O entendimento do papel das plaquetas na fisiopatologia da PE que resulta na necessidade da interrupção precoce da gestação, na maioria das vezes, colocando em risco a vida da gestante e/ou do bebê, certamente é de grande valor.

Considerando a complexidade da PE, bem como as lacunas existentes na literatura, além das dificuldades inerentes à avaliação *in vitro* das plaquetas, este estudo se justificou plenamente e contribuiu para gerar conhecimentos que poderão resultar em benefícios para o diagnóstico e prognóstico dessa doença, bem como para o entendimento da fisiopatologia da mesma.

# **2 REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 Plaquetas e hemostasia primária

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos. Esses estão presentes na medula óssea e sua diferenciação e maturação depende da trombopoietina e de interleucinas (IL) IL-3, IL-6 e IL-11. A fragmentação citoplasmática dos megacariócitos ocorre na medula óssea e as plaquetas são lançadas na circulação, isoladas ou agrupadas. Em condições normais, as plaquetas apresentam diâmetro de 3µm a 4µm e cerca de 1µm de espessura. Não possuem material nuclear e apresentam vida média de oito a dez dias. O intervalo de referência da contagem de plaquetas no sangue periférico é de 150.000 a 400.000/µL (HARTWIG *et al.*, 1995).

Por muito tempo as plaquetas foram consideradas meras espectadoras na hemostasia (JURK & KEHREL, 2005). Atualmente, está claro que elas exercem um papel essencial nesse processo e apresentam outras funções importantes, como a manutenção do tônus vascular, por meio da secreção de diversas substâncias incluindo serotonina, tromboxano (TXA<sub>2</sub>) e prostaglandinas (PG) (HARTWIG *et al.*, 1995).

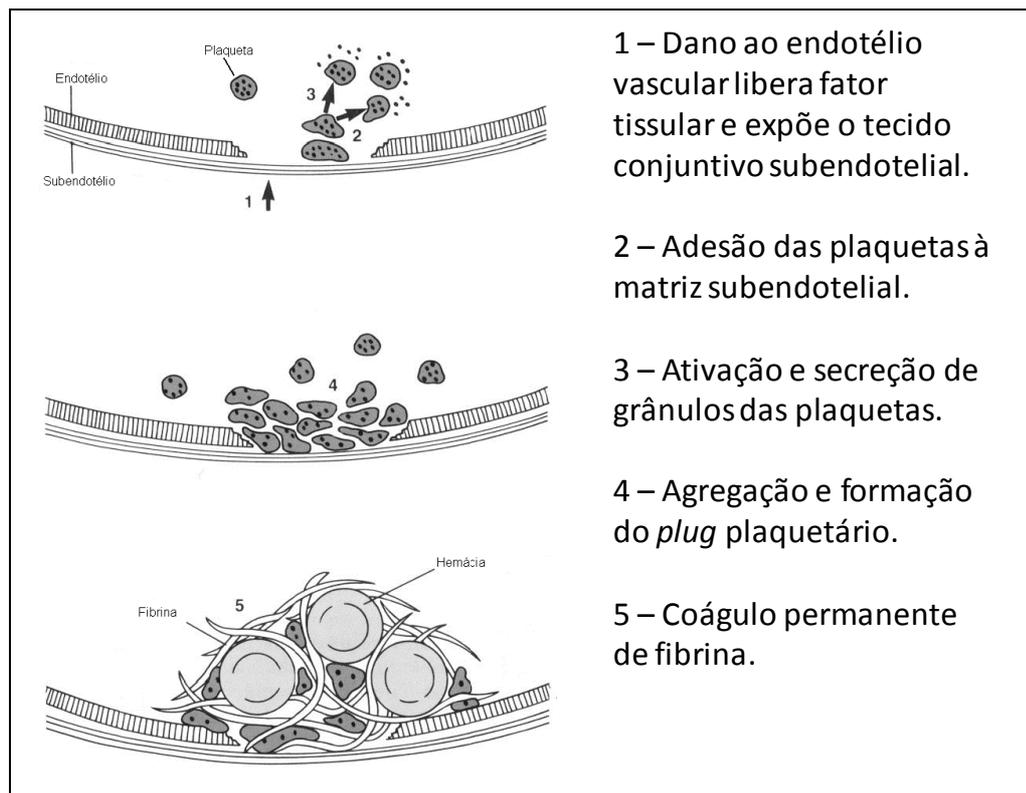
Atualmente, está bem estabelecida a participação das plaquetas como contribuidoras e moduladoras de diversos distúrbios, incluindo doença arterial coronariana, trombose venosa profunda, doenças mieloproliferativas, fibrilação atrial, câncer, acidente vascular cerebral (AVC), infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), doença renal, diabetes, doença intestinal inflamatória e esclerose múltipla (HARTWING & ITALIANO-JR, 1995; GURNEY *et al.*, 2002; FARIAS & BÓ, 2008; SHEREMATA *et al.*, 2008; van GILS *et al.*, 2009; HESS & GRANT, 2011).

A função das plaquetas no processo hemostático inclui o recrutamento das mesmas da circulação sanguínea para a matriz subendotelial sempre que ocorre dano vascular e liberação de fator tissular (FT). Quando ativadas, as plaquetas expressam rapidamente glicoproteínas (GP) de superfície que interagem com outras plaquetas, endotélio vascular e células inflamatórias (HARTWIG *et al.*, 1995; LÖWENBERG *et al.*, 2010).

As reações plaquetárias são mediadas por moléculas de adesão expressas na superfície que estabelecem interações entre plaquetas (homotípicas), leucócitos,

células endoteliais e matriz extracelular (heterotípicas) (FREEDMAN & LOSCALZO, 2002; THÉORÉT *et al.*, 2006).

Uma sucessão de eventos incluindo contato, adesão, ativação, secreção e agregação culmina na formação do *plug* plaquetário, que impede temporariamente a perda sanguínea, como mostrado na **Figura 1** (JURK & KEHREL, 2005).



**Figura 1 - Atuação das plaquetas no processo de hemostasia e coagulação sanguínea.**

As etapas que envolvem a participação das plaquetas no processo hemostático estão descritas a seguir:

a) Contato com o local lesado: As plaquetas não ativadas circulam isoladas ou agrupadas, sem aderirem à parede vascular, mesmo estando cercadas pelos vários fatores da coagulação. Quando um vaso é lesado, o colágeno subendotelial é exposto, ocorre liberação de FT, vasoconstrição reflexa e as plaquetas tendem a circular mais próximas do local da injúria (LORENZI, 2006).

b) Adesão plaquetária: As plaquetas interagem com proteínas da matriz extracelular do subendotélio a partir de GP específicas de adesão, expressas na superfície das plaquetas. A proteína plasmática multimérica, fator de von Willebrand (FvW), associa-se ao colágeno subendotelial e funciona como uma superfície de

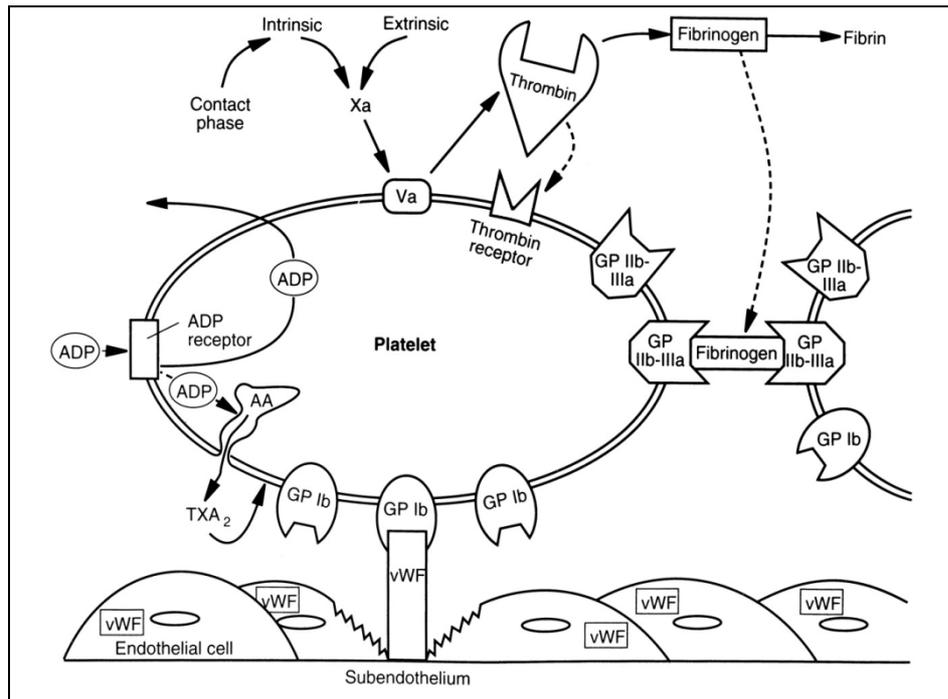
ancoragem para as plaquetas, via interação com o complexo GPIb/IX/V (JURK & KEHREL, 2005).

c) Ativação plaquetária: A interação entre receptores plaquetários e seus agonistas (especialmente a trombina) promove uma mudança conformacional das proteínas do citoesqueleto na membrana plaquetária, da forma oval para a estelar, com a formação de pseudópodes os quais expõem de maneira mais efetiva as GP de membrana (JURK & KEHREL, 2005).

d) Secreção plaquetária: Uma vez ativadas, as plaquetas liberam o conteúdo de seus grânulos que estimulam o recrutamento de outras plaquetas para o local da lesão. Os grânulos densos contêm os agonistas difosfato de adenosina (ADP) e serotonina, enquanto os grânulos  $\alpha$  são constituídos de uma grande quantidade de proteínas de adesão, fatores mitogênicos, fatores da coagulação e inibidores de proteases, os quais são liberados imediatamente após a ativação plaquetária (JURK & KEHREL, 2005).

e) Agregação plaquetária: As plaquetas ativadas interagem entre si via ligação da GPIIb/IIIa ao fibrinogênio, formando um *plug*. Inicialmente, a GPIIb/IIIa está na forma inativa e somente após a exocitose dos grânulos  $\alpha$  se torna capaz de interagir com o fibrinogênio. Esse processo é seguido de alteração conformacional das plaquetas que desencadeia fosforilações em cascata e sinalização intracelular (JURK & KEHREL, 2005).

Posteriormente, as plaquetas também contribuem para a hemostasia secundária, ativando a cascata da coagulação, na qual ocorre a formação do coágulo de fibrina, tamponando de forma mais eficiente o local lesado (**Figura 2**).



**Figura 2 – Atuação de receptores da membrana plaquetária em resposta à ativação.**

## 2.2 Ativação plaquetária

A ativação plaquetária ocorre basicamente por dois mecanismos: liberação de substâncias solúveis (proteases, metabólitos do ácido aracônico-AA, peróxidos, fator de ativação plaquetária-PAF e catepsina G, em condições patológicas) e pelo contato direto com células inflamatórias. A ativação resulta em um aumento na expressão de moléculas de adesão superficiais via GPIIb/IIIa na plaqueta e CD11b/CD18 nos leucócitos. Essas GP leucocitárias estabelecem ligações secundárias com as plaquetas (PANASLUK *et al.*, 2005).

A trombina ativa plaquetas por meio de receptores de proteinase ativados, que coordenam o aumento intracelular de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e estimulam eventos de sinalização, culminando com a translocação das glicoproteínas P-selectina e GPIIb/IIIa, conferindo capacidade de atuar em processos inflamatórios e hemostáticos (THÉORÊT *et al.*, 2006).

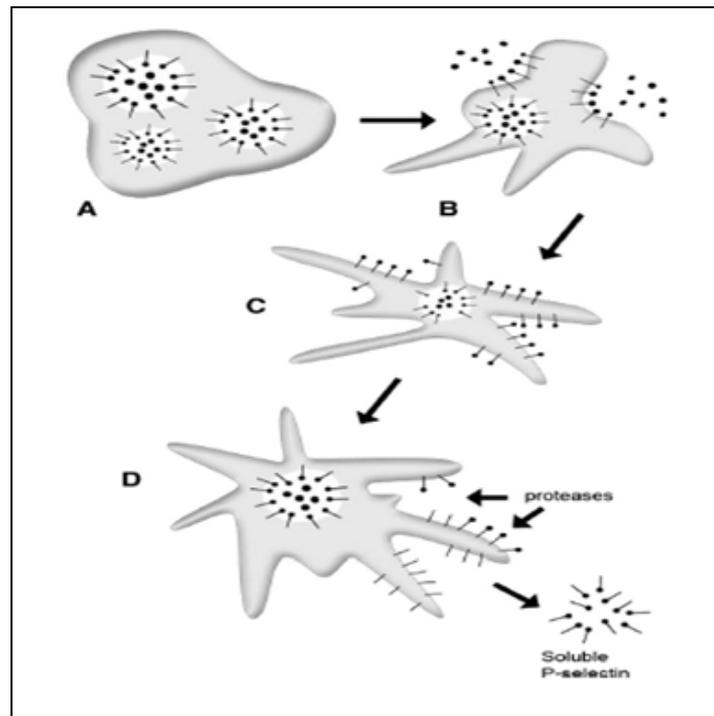
## 2.3 Biomarcadores de ativação plaquetária

A P-selectina e a GPIIb/IIIa são os biomarcadores de ativação plaquetária mais utilizados na pesquisa. Além desses, a proteína lisossomal (CD63), as glicoproteínas p24 (CD9), GPIIa (CD29), GPIV (CD36), GPIb $\alpha$  (CD42b), GPIb $\beta$  (CD42c), GPIa (CD49b), GPIc (CD49f) e a molécula de adesão plaqueta-célula endotelial tipo 1 (PECAM-1 ou CD31) têm sido estudadas (LAZARUS *et al.*, 1995).

### 2.3.1 P-selectina (CD62P)

A P-selectina (CD62P) é uma glicoproteína da superfície plaquetária que media a adesão das plaquetas ativadas a monócitos e neutrófilos. Os anticorpos monoclonais dirigidos contra essa GP, somente se ligam às plaquetas degranuladas e não àquelas no estado inativo (MICHELSON, 1996; MICHELSON *et al.*, 2000).

A P-selectina é sintetizada pelo megacariócito ou pelas células endoteliais e posteriormente estocada nos grânulos  $\alpha$  plaquetários e nos corpos de Weibel-Palade das células endoteliais (GURNEY *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2009; LÖWENBERG *et al.*, 2010). Quando exposta na superfície plaquetária, a P-selectina media interações entre endotélio, plaquetas e leucócitos, bem como estabiliza inicialmente a interação GPIIb/IIIa-fibrinogênio até a formação do tampão plaquetário (GURNEY *et al.*, 2002; THÉORÉT *et al.*, 2006). Entretanto, esse biomarcador é instável e desprende-se da superfície plaquetária rapidamente, embora permaneça funcional no plasma (**Figura 3**).



**Figura 3 – Ativação plaquetária e expressão de P-selectina. (A)** Plaqueta no estado inativo com grânulos  $\alpha$ . **(B)** Após ativação há mudança conformacional e os grânulos  $\alpha$  migram para a membrana, sendo liberados no plasma. **(C)** Plaqueta ativada. **(D)** Proteases séricas digerem a P-selectina de membrana, originando a forma solúvel no plasma (BLANN & DRAPER, 2011).

A P-selectina solúvel (sCD62P) é sabidamente indutora de um estado pró-coagulante em monócitos e é considerada um potente ativador de células T, endotélio, plaquetas e essencial para estabilizar um trombo arterial (JURK & KEHREL, 2005). Aumento nos níveis plasmáticos desse biomarcador tem sido observado na púrpura trombocitopênica trombótica, síndrome hemolítica urêmica, diabetes, câncer, inflamações sistêmicas, aterosclerose, síndrome coronariana aguda, em outros eventos cardiovasculares e em tabagistas (GURNEY *et al.*, 2002; LÖWENBERG *et al.*, 2010).

Jin *et al.* (2010) avaliaram a expressão de P-selectina endotelial, por diagnóstico de imagem, como mediador precoce do recrutamento de leucócitos na isquemia aguda e do dano na barreira hematoencefálica, após um AVC, em modelo murino. Observaram que a expressão desse marcador reflete a disfunção cerebral 24 horas após a isquemia.

Admite-se que a P-selectina apresenta papel relevante como elemento conectivo entre inflamação e trombose. Seus níveis plasmáticos se elevam poucas

horas após a ocorrência de trombose venosa e mantêm-se elevados por muitos meses (MASOPUST *et al.*, 2011).

Sheremata *et al.* (2008) avaliaram CD62P, micropartículas e a formação de microagregados plaquetários em pacientes com esclerose múltipla. Verificaram um aumento na expressão dos dois primeiros em relação ao grupo controle e concluíram que as plaquetas encontram-se cronicamente ativadas devido a um estado pró-coagulante, decorrente da liberação de FT e da formação de fibrina secundárias à doença.

Yang *et al.* (2009) sugeriram que o fibrinogênio é necessário para a expressão de P-selectina pelas plaquetas, uma vez que os níveis de CD62P estavam reduzidos significativamente em quadros de hipofibrinogenemia murina e humana. Dessa forma, sabendo que a concentração de fibrinogênio varia significativamente em uma população, é necessário cautela para utilizar a P-selectina como marcador de ativação plaquetária.

### **2.3.2 Glicoproteína GPIIIa (CD61)**

A GPIIIa (CD61) é uma glicoproteína transmembrana, integrina  $\beta 3$ , expressa em plaquetas, megacariócitos, osteoclastos e endotélio. Essa GP associa-se à GPIIb (CD41) para formar o complexo GPIIb/IIIa, o qual media a agregação plaquetária e ao CD51 para formar o complexo CD51/CD61, um receptor de vitronectina. Além disso, liga-se ao fibrinogênio, fibronectina, FvW e trombospondina para mediar o processo de adesão (di MINNO *et al.*, 2009).

### **2.3.3 Glicoproteína GPIIb/IIIa (CD41a)**

A GPIIb/IIIa (CD41a) foi primeiramente descrita na década de 1980 em eventos desencadeados por ativação plaquetária. Essa GP é ativada após um sinal intra-plaquetas iniciado com a formação do complexo FvW-GPIb/IX/V. A GPIIb/IIIa é capaz de se ligar ao fibrinogênio, fibronectina, FvW, vitronectina e trombospondina (MICHELSON, 1996; GURNEY *et al.*, 2002; DELGADO *et al.*, 2003).

O aumento dos níveis plasmáticos de GPIIb/IIIa mostrou-se útil para avaliar a atividade pró-trombótica em várias condições clínicas, incluindo angioplastia coronariana, doença falciforme na fase de remissão e durante a crise dolorosa e na hipertensão decorrente da gravidez, principalmente na PE (TOMER, 2004).

Clinicamente, os inibidores da agregação plaquetária cujo alvo é a GPIIb/IIIa são eficazes para reduzir desordens trombóticas durante intervenções coronarianas (FREEDMAN & LOSCALZO, 2002; THÉORÉT *et al.*, 2006).

#### **2.3.4 Glicoproteína GPIX (CD42a)**

A GPIX (CD42a) forma o complexo GPIb/IX/V, um receptor para o FvW, essencial no processo de adesão das plaquetas ao subendotélio vascular, quando ocorre lesão. Contrariamente aos anticorpos que, de modo geral, têm maior afinidade pelos receptores plaquetários quando as plaquetas estão ativadas, o CD42 apresenta maior afinidade por plaquetas no estado inativo. Isso provavelmente ocorre devido à translocação do complexo para a membrana ligada ao sistema de canais (MICHELSON, 1996).

Em pacientes submetidos à hemodiálise foi observada uma redução na expressão de CD42b imediatamente após o procedimento. No dia seguinte, muitos desses pacientes apresentaram um aumento na expressão de CD42b, sugerindo que a hemodiálise está associada à disfunção plaquetária temporária, resultando em redução da expressão de GPIb (SLOAND & SLOAND, 1997).

#### **2.3.5 Agregados plaquetas-leucócitos (APL)**

A interação entre plaquetas e leucócitos é observada em muitos processos inflamatórios, trombóticos e doenças autoimunes (PANASLUK *et al.*, 2005). Hirafuji & Shinoda (1991) demonstraram que o PAF induz a adesão plaquetária ao endotélio vascular na presença de polimorfonucleares (PMN) e que há uma forte interação plaqueta-PMN nesse processo.

A formação de agregados plaquetas-leucócitos (APL) estimula uma sucessão de eventos intracelulares a partir da expressão de FT e CD11b/CD18 na superfície

dessas células. O colágeno extracelular, agonista plaquetário, também estimula o aumento da expressão de CD11b em leucócitos. O FT liga-se ao fator VII (FVII), desencadeando a cascata da coagulação (KAZMI *et al.*, 2011).

Plaquetas e APL têm um papel importante na lesão em sítios ateromatosos e na ruptura da placa. A P-selectina interage com seu ligante natural, ligante 1 da glicoproteína P-selectina (PSGL-1), em monócitos e neutrófilos (em menor extensão) com o intuito de formar agregados heterotípicos e fornecer uma superfície de ancoragem para células inflamatórias em plaquetas ativadas (ASHMAM *et al.*, 2003). Dessa forma, favorece o recrutamento leucocitário para plaquetas ativadas e células endoteliais, facilitando o metabolismo transcelular e a sinalização intracelular. Em modelos animais, a inibição dos APL a partir de anticorpos anti-P-selectina ou anti-PSGL-1 apresentou-se benéfica em diversas patologias cardiovasculares associadas a desordens trombóticas (THÉORÉT *et al.*, 2006).

Estudos morfológicos do tampão plaquetário e do coágulo de fibrina frequentemente demonstram a presença marcante dos PMN (HIRAFUJI & SHINODA, 1991). Os leucócitos, ao formarem agregados com plaquetas, influenciam a estrutura do trombo. Uma vez ativados, secretam diferentes proteases (elastase, catepsina G, metaloproteinases de matriz) que aumentam a adesão plaquetária dependente do FvW. Além disso, essas enzimas atuam na fibrinólise a partir da digestão direta da fibrina ou indiretamente, modulando a degradação parcial de zimogênio e proteases inibidoras da coagulação e fibrinólise (WOHNER, 2008).

As plaquetas ao interagirem com os leucócitos formando APL que podem liberar quimiocinas (ligante solúvel de CD40-CD40L, regulador da ativação naturalmente expresso e secretado por células T-RANTES e o precursor do crescimento controlado da alfa proteína-GRO- $\alpha$ ) capazes de ativá-los, contribuindo para desencadear processos inflamatórios e trombóticos (MELLEBAKKEN *et al.*, 2001).

A formação de APL constitui um parâmetro prognóstico importante em condições clínicas caracterizadas por injúria vascular e microangiopatia. A percentagem de APL formados depende não somente de condições pró-adesivas, mas também da presença de membranas de contato, representadas pela superfície plaquetária e dos leucócitos (AREFIEVA *et al.*, 2001; HU *et al.*, 2004).

A geração de APL após isquemia e reperfusão coronariana contribui para a amplificação do processo inflamatório local e do dano tecidual a partir da regulação

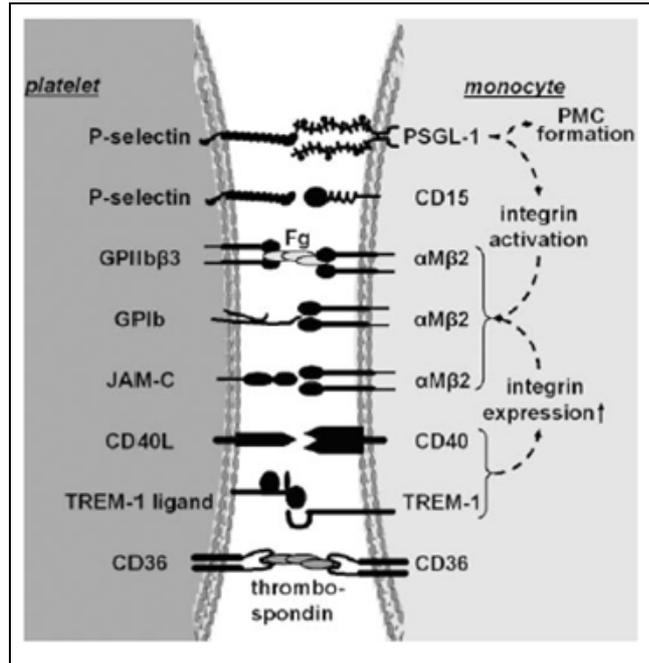
da expressão de integrina leucocitária e da adesão ao endotélio (SBRANA *et al.*, 2007).

A quantificação de APL parece refletir melhor a instabilidade da placa aterosclerótica e o consequente avanço da trombose e da inflamação. Assim, constitui um marcador da ativação plaquetária mais sensível do que a P-selectina uma vez que ela não é mais observada após a degranulação das plaquetas, enquanto os APL continuam sendo detectados (FREEDMAN & LOSCALZO, 2002). Entretanto, o papel dos APL em doenças cardiovasculares permanece ainda incerto. Um estudo desenvolvido por Tugurt *et al.* (2011) indicou que as plaquetas encontram-se ativadas na fase aguda do AVC, mas as interações plaquetas-leucócitos somente foram observadas em casos agudos de AVC não embólico.

#### **2.3.5.1 Agregados plaquetas-monócitos (APM)**

A formação de agregados plaquetas-monócitos (APM) parece aumentar a capacidade adesiva e migratória das plaquetas, bem como facilitar o recrutamento de leucócitos não complexados (da COSTA MARTINS *et al.*, 2002; van GILS *et al.*, 2009).

As substâncias que ativam a ligação plaqueta-monócito (trombina, colágeno, TXA<sub>2</sub>, serotonina, PAF, catecolaminas) originam-se do endotélio lesado, leucócitos ativados, macrófagos ou do trombo (PANASLUK *et al.*, 2005). Os APM promovem a ativação do endotélio vascular a partir da liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo a IL 1 $\beta$  e o PAF, constituindo-se fatores de risco para trombose (ROBB *et al.*, 2010). Esses agregados não são simplesmente um reflexo da ativação plaquetária, mas têm um papel relevante na indução da ativação de outras plaquetas e monócitos, a partir da expressão e secreção de citocinas. Além disso, amplificam a adesão do monócito e migração para o tecido, quando se diferenciam em macrófago (van GILS *et al.*, 2009). Podem, também, constituir um marcador precoce e sensível da ativação plaquetária em várias situações clínicas, além de mediar a inflamação vascular, aterosclerose e trombose (GKALIAGKOUSI *et al.*, 2009). O mecanismo proposto para a formação de APM está representado na **Figura 4**:



**Figura 4** – Interações plaqueta-monócito. Contato inicial com os monócitos via PSGL-1 e ativação de outras integrinas (van GILS *et al.*, 2009).

A extensão com que se formam os APM depende da ativação plaquetária e do próprio monócito. A P-selectina é crítica na etapa inicial e outros ligantes apresentam papel complementar. O tempo que os APM permanecem na circulação *in vivo* não foi elucidado. Em estudos realizados com pacientes sob intervenção coronariana, os APM foram detectados até 24 horas após o evento. Decorrido esse período, retornaram a níveis basais, provavelmente pela fagocitose das plaquetas pelos monócitos (van GILS *et al.*, 2009).

A ativação plaquetária resulta num aumento de APM na doença vascular periférica, hipertensão, síndrome coronariana aguda ou estável, AVC ou diabetes. O aumento dos níveis de APM mostrou-se um marcador precoce de infarto agudo do miocárdio (IAM) (van GILS *et al.*, 2009). Os APM mostraram-se importantes na patogenia de síndromes coronarianas em humanos, inflamação vascular, trombose e placas ateromatosas instáveis, podendo se tornar marcadores mais promissores para doença coronariana do que os marcadores de lesão do músculo cardíaco, amplamente empregados (ASHMAN *et al.*, 2003).

A formação aumentada de APM foi observada em pacientes no estágio terminal da doença renal, associado ao aumento do risco de doença cardiovascular.

Isso sugere que a ativação de plaquetas e a interação com células é um importante fator de risco para aterosclerose (ASHMAN *et al.*, 2003).

A investigação do papel dos APM na patogênese da lesão e cirrose hepáticas revelou que eles não estão associados a essas patologias. Contudo, a trombocitopenia observada nesses pacientes pode ser devida ao consumo plaquetário para formar os APM (PANASLUK *et al.*, 2005).

O óxido nítrico (NO), produzido pelas células endoteliais e plaquetas, é um importante inibidor da agregação plaquetária e da formação de APL. Experimentos em modelo animal demonstraram que o aumento da pressão arterial contribui para uma maior expressão de P-selectina, para a formação de APM, bem como inibe a síntese de NO. Entretanto, o mecanismo pelo qual a pressão arterial regula esse processo ainda não foi estabelecido (GKALIAGKOUSI *et al.*, 2009).

Experimentos com seres humanos revelaram que os APM contribuem para a formação de agregados monócito-monócito e posterior adesão desses ao endotélio vascular. Dessa forma, os APM na circulação podem ser pró-aterogênicos e participar do recrutamento leucocitário bem como exacerbar a inflamação. Evitar a formação de APL pode ser uma possível estratégia para modular a aterogênese (da COSTA MARTINS *et al.*, 2004).

### **2.3.5.2 Agregados plaquetas-neutrófilos (APN)**

As plaquetas interagem com os neutrófilos via P-selectina e integrinas  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . As plaquetas que formam os agregados plaquetas-neutrófilos (APN) secretam ativadores do endotélio e facilitam a estagnação desses nos pequenos vasos (PANASLUK *et al.*, 2005). Os neutrófilos iniciam a produção de citocinas inflamatórias e liberam grânulos contendo proteases, desencadeando processos inflamatórios e trombóticos (WOHNER, 2008).

Os grânulos neutrofílicos incluem os específicos, que contêm metaloproteinase de matriz e os azurófilos, ricos em serino proteases (elastase, catepsina G e proteinase 3). Após estímulo, as proteases contidas nos grânulos são liberadas e suas enzimas são capazes de influenciar a coagulação e a fibrinólise. As metaloproteinases, por sua vez, clivam a trombina, desencadeando a formação do coágulo e ativação plaquetária. A elastase neutrofílica atua de duas maneiras

distintas no processo hemostático. Uma envolvendo o plasminogênio e a outra o inibidor da via do fator tissular (TFPI). A elastase degrada diretamente a fibrina ao estimular uma via alternativa da ativação do plasminogênio e promover a clivagem do plasminogênio em miniplasminogênio. Esse metabólito é mais eficiente do que a plasmina para clivar a fibrina e cerca de dez vezes menos sensível à inativação pela  $\alpha_2$ -antiplasmina. A elastase também degrada o TFPI e, conseqüentemente, contribui para a ativação da coagulação mediada pelo FT (WOHNER, 2008).

Independentemente da formação de APN, os neutrófilos podem ligar-se diretamente ao FvW por meio do PSGL-1. Assim, o FvW atua como molécula de adesão, tanto para plaquetas, quanto para leucócitos (WOHNER, 2008).

Wang *et al.* (2001) observaram que neutrófilos expostos a um meio contendo tecido derivado de vilosidades placentárias são continuamente estimulados e aderem às células endoteliais *in vitro*, sugerindo que fatores placentários solúveis podem modular a função dos neutrófilos. Esse fato é mais evidente quando a placenta é oriunda de gestantes com PE.

A investigação do papel dos APN no IAM revelou que, oriundos da placa aterosclerótica, podem associar-se à lesão da microcirculação coronariana, resultando em necrose e disfunção do miocárdio. Isso ressalta a importância da interação entre trombose e inflamação na patogênese do IAM (ARAKAWA *et al.*, 2009). Em pacientes com angina instável foi observado um aumento de APN quando comparados a portadores de angina estável, sugerindo um papel desses agregados na instabilidade da placa aterosclerótica (FREEDMAN & LOSCALZO, 2002).

## **2.4 A nova teoria da coagulação e o papel importante do fator tissular e da superfície plaquetária**

A teoria da coagulação, proposta na década de 1960 por Macfarlane, Davie e Ratnoff, envolvia reações sucessivas de ativação de fatores segregados em uma via intrínseca (iniciada pelo fator XII-FXII) e extrínseca (iniciada pelo complexo fator VII ativado-FVIIa/FT). As duas vias convergiam para uma via comum, a partir da qual ocorreria a ativação do fator X (FX) e formação do complexo protrombinase (fator X ativado/fator V ativado-FXa/FVa) e, posteriormente, a clivagem do fibrinogênio em fibrina, constituinte do coágulo (LORENZI, 2006). Essa teoria embora reprodutível *in*

*vitro* apresentava limitações *in vivo*. O modelo proposto não conseguia explicar porque pacientes com deficiência de um fator exclusivo da via extrínseca (FVII), mas com a via intrínseca funcionando apresentavam sangramento abundante. Da mesma forma, não explicava o motivo de hemofílicos A e B, portadores de deficiência dos fatores VIII (FVIII) e fator IX (FIX) (envolvidos apenas na via intrínseca), respectivamente, também apresentarem hemorragias importantes (HOFFMAN & MONROE, 2007).

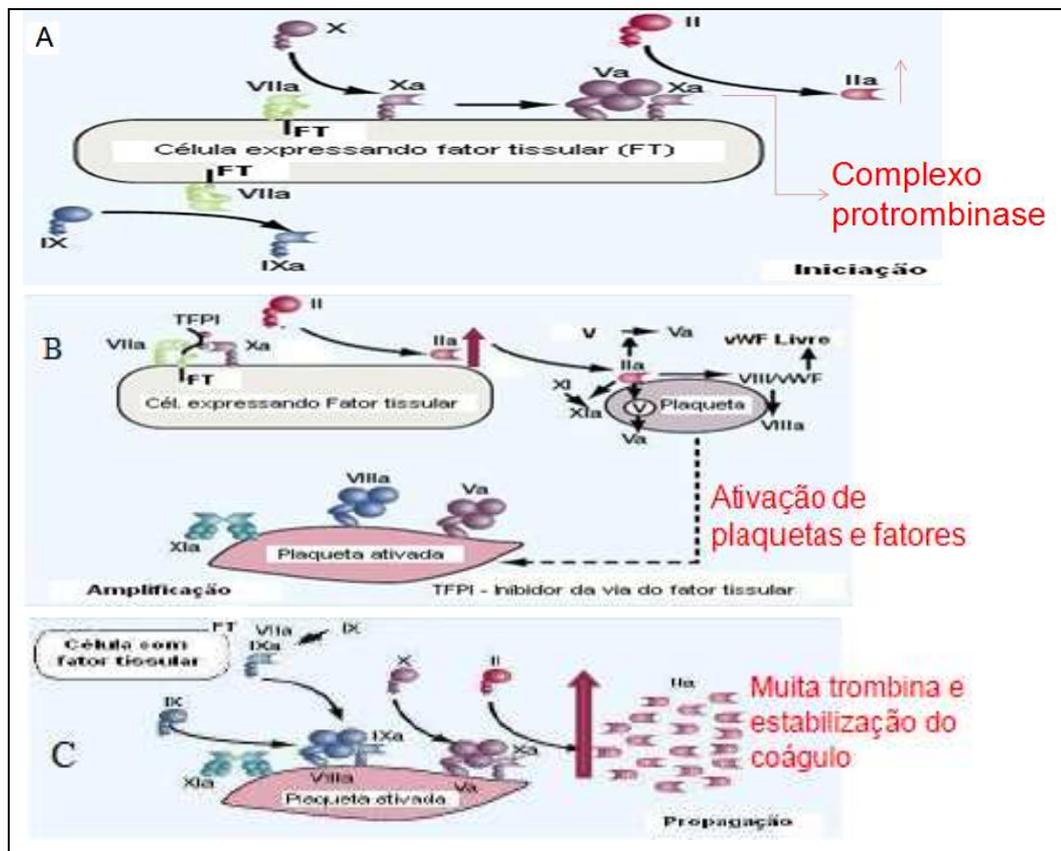
A teoria da coagulação foi recentemente revista e um novo modelo foi proposto por Hoffman & Monroe em 2007. O modelo é composto de três etapas: iniciação, amplificação e propagação e apresenta como grandes protagonistas o FT (expresso em células dos tecidos, monócitos e células endoteliais ativadas) e a superfície plaquetária. As três fases da nova teoria da coagulação serão comentadas a seguir:

a) Iniciação: A fase de iniciação ocorre nas células que expressam o FT. O complexo FT-FVIIa ativa pequenas quantidades de FIX e FX. O FXa associa-se ao FVa na superfície dessas células e está protegido da ação dos inibidores TFPI e antitrombina (AT), presentes no plasma. O fator IX ativado (FIXa) pode deixar a superfície celular e alcançar as plaquetas e outras superfícies celulares via plasma, pois não é inibido pelo TFPI e muito lentamente pela AT. Uma pequena quantidade de trombina é formada na superfície de células que expressam FT, o que é suficiente para ativar plaquetas, embora não resulte na produção de um coágulo estável de fibrina (**Figura 5A**).

b) Amplificação: A trombina formada na fase de iniciação promove também a ativação dos cofatores V e VIII e do fator XI (FXI) capazes de se difundirem no plasma e ativarem outras plaquetas (**Figura 5B**).

c) Propagação: A fase de propagação ocorre na superfície das plaquetas ativadas onde o FIXa, proveniente da fase de iniciação, liga-se ao fator VIII ativado (FVIIIa). Ativação adicional de FIX ocorre pela ligação de FXIa às plaquetas. Uma vez que o FXa não pode se deslocar da superfície das células expressando FT para alcançar as plaquetas (sob risco de ser inativado pelo TFPI e AT plasmáticos), ele deve ser mobilizado diretamente na superfície plaquetária pelo complexo tenase (FIXa-FVIIIa). O FXa rapidamente associa-se ao FVa na superfície plaquetária e produz uma explosão da geração de trombina e, conseqüentemente, a produção de grande quantidade de fibrina.

A plaqueta é provavelmente a única superfície na qual a propagação da coagulação pode ocorrer efetivamente. A superfície plaquetária é especializada para coordenar a ligação dos complexos tenase e protrombinase (FXa-FVa). Quando um vaso sanguíneo é lesado, grande número de plaquetas é recrutado para o local a fim de fornecer superfície suficiente para uma explosão de geração de trombina e formação do coágulo de fibrina efetivo no tamponamento da lesão e na garantia da hemostasia (**Figura 5C**).



**Figura 5 – Etapas da Nova Teoria da Coagulação. (A) Iniciação:** Ativação do FV para produzir uma pequena quantidade de trombina. **(B) Amplificação:** Aumento da resposta pró-coagulante. **(C) Propagação:** Síntese de trombina em grande escala.

### 2.4.1 Fator tissular

O FT ou fator III, anteriormente com papel secundário e restrito à via extrínseca da coagulação, ganhou importância patente com a nova teoria da coagulação (CHU, 2011). O FT encontra-se na forma latente, ativando-se a partir da

sinalização intracelular de quinases e fatores de transcrição, em presença de lesão vascular, inflamação e hipóxia (FURIE & FURIE, 2008). A presença ubíqua do FT confere proteção extra contra injúria em órgãos vitais, como cérebro, placenta, pulmões, coração, rins, intestinos, testículos e útero. Entretanto, é pouco expresso no fígado, timo e baço. O FT circulante provém da expressão em monócitos, macrófagos, granulócitos, plaquetas e micropartículas plaquetárias (MPP) (KEY & MACKMAN, 2010; MACEY *et al.*, 2011).

A forma solúvel do FT também pode ser encontrada após o estímulo de citocinas pró-inflamatórias no plasma. De um modo geral, o FT está presente em uma diversidade de eventos trombóticos e inflamatórios. O FT participa também de fenômenos de reparo tecidual, embriologia, angiogênese, metástase tumoral, adesão/migração celular, imunidade inata e condições patológicas (OSTERUD & BJORKLID, 2006).

A expressão aumentada de FT foi observada em outras situações, como uso de contraceptivo oral e outros medicamentos, estresse, tabagismo, sepse, diabetes, complicações cardiovasculares, desordens autoimunes, obesidade e aborto espontâneo. A associação entre trombose e inflamação tem sido investigada. Talvez o FT seja um dos elos entre essas duas situações (CHU, 2011).

## **2.5 Fundamentos de citometria de fluxo**

A citometria de fluxo (CF) é uma ferramenta que proporciona de maneira rápida e objetiva a determinação das características físicas, biológicas e químicas de células (ou qualquer partícula, incluindo núcleo, microrganismos, preparações cromossômicas e esferas de látex). A CF constitui uma técnica muito eficaz, capaz de avaliar um grande número de células (BROWN & WITTEWER, HU *et al.*, 2000). Na área de hematologia, a CF é empregada na imunofenotipagem de vários espécimes, como sangue periférico, medula óssea, fluidos corporais e tecidos sólidos. A CF pode ser utilizada também na análise do conteúdo de ácido desoxirribonucleico (DNA), fenotipagem de leucemias e linfomas, monitoração de indivíduos infectados pelo HIV, avaliação de propriedades funcionais e estruturais de hemácias, leucócitos e plaquetas (BROWN & WITTEWER, 2000). De modo geral, essa técnica permite a avaliação de todo material biológico que contenha células ou partículas em

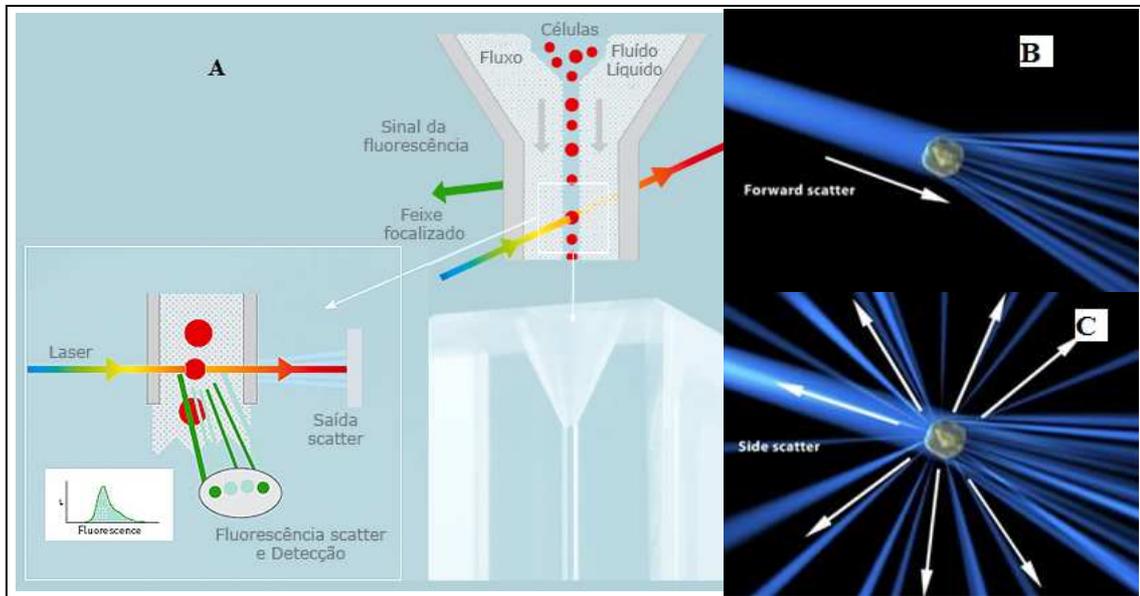
suspensão. Essas passam por uma câmara de fluxo a uma velocidade de 1.000 a 10.000 partículas por minuto, através de um feixe de laser (MICHELSON, 1996).

Os citômetros de fluxo foram introduzidos comercialmente no final da década de 1970. Para o desenvolvimento da CF, alguns marcos são dignos de nota:

- 1930: Caspersson e Thorell iniciaram os trabalhos com automação em citologia;
- 1934: Moldaven propôs a contagem fotoelétrica de células em tubo capilar;
- 1940: Coons conseguiu ligar anticorpos a partículas fluorescentes para marcação de proteínas celulares específicas;
- 1949: Coulter apresentou o princípio Coulter intitulado “O significado da contagem de partículas suspensas em fluido”;
- 1950: Caspersson descreveu a medição microespectrofotométrica de células nas regiões do ultravioleta e visível do espectro. Nesse mesmo ano, Coons e Kaplan reportaram que a fluorescência conjugada na forma de isocianeto melhorava o resultado da coloração e essa foi definida como a ideal;
- 1967: Kamenstsky e Melamed elaboraram o método proposto por Moldaven, que força a célula através de um tubo capilar e desenharam uma separação celular em fluxo (*sorter*);
- 1969: Van Dilla, Fulwyler e colaboradores desenvolveram o primeiro detector de fluorescência que utilizava o princípio do foco hidrodinâmico (alinhamento de células), configuração óptica e uma fonte de excitação com laser de argônio;
- 1972: Herzenberg descreveu uma versão melhorada de um *sorter* de células capaz de detectar células com fluorescência fraca, coradas com anticorpos ligados à fluoresceína;
- 1975: Kohler e Milstein introduziram a tecnologia de anticorpos monoclonais, que são reagentes imunológicos altamente específicos no estudo celular (BACAL & FAULHABER, 2003).

Dentro do citômetro, as partículas em suspensão são atraídas por um fluxo gerado a partir de uma corrente de fluido isotônico que cria um fluxo laminar, permitindo que as células passem, uma a uma, em fila indiana (**Figura 6A**). O feixe de laser (argônio a 488nm ou neon, azul hélio em 633nm ou vermelho) incide sobre a partícula de duas formas: oblíqua (*Forward-scattered light* - FSC) (**Figura 6B**) ou

perpendicular (*Side-scattered light - SSC*) (**Figura 6C**). O FSC é proporcional à área e tamanho da partícula e o SSC à complexidade intracelular (BROWN & WITTEWER, 2000).



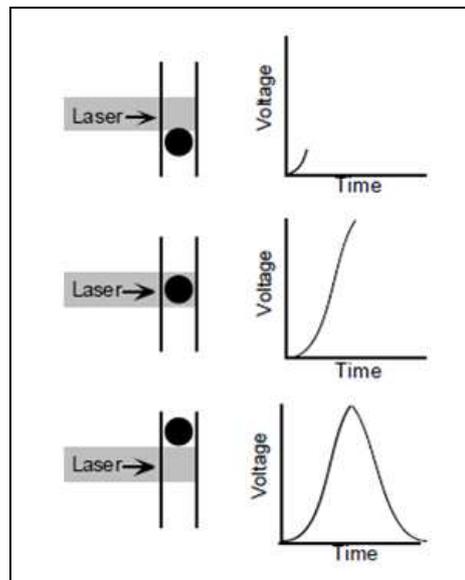
**Figura 6 – Funcionamento do citômetro de fluxo. (A) Partículas em suspensão passam em fila indiana através de um feixe de laser no citômetro de fluxo. (B) Incidência oblíqua do laser. (C) Incidência perpendicular do laser.**

A luz emitida é coletada em um sistema óptico e eletrônico integrados que captam e convertem a informação em número de eventos. Além dos parâmetros de tamanho e complexidade interna, o laser é capaz de excitar um fluorocromo (CASTRO & GOURLEY, 2010).

Diferentes fluorocromos são associados aos anticorpos que se ligam de forma seletiva a antígenos de superfície celular ou se interpõem entre diferentes componentes celulares. Quando as células marcadas passam pelo laser, moléculas fluorescentes são excitadas para um nível maior de energia. Ao retornarem para o nível basal, os fluorocromos emitem energia num comprimento de onda maior e específico (cores) (BROWN & WITTEWER, 2000). Cada fluorocromo possui um padrão espectral distinto de absorção e emissão, de tal maneira que diferentes cores de luz podem ser opticamente separadas pelos filtros seletivos encontrados nos citômetros (BACAL & FAULHABER, 2003). A intensidade do sinal de fluorescência detectado é proporcional ao número de moléculas de fluorocromo na partícula.

Diferenças na magnitude do sinal de emissão gerados a partir de cada célula refletem diferenças biológicas entre elas (CASTRO & GOURLEY, 2010). Atualmente, mais de 20 parâmetros podem ser analisados usando uma combinação de diferentes fluorocromos (ALVAREZ *et al.*, 2010).

A corrente de elétrons gerada quando a partícula passa pelo raio laser e espalha a luz ou fluorescência se dirige ao amplificador e é convertida em um pulso de voltagem, proporcional ao número de fótons recebidos. Esses pulsos são convertidos em sinais digitais e os resultados podem ser analisados separadamente pelo computador acoplado ao aparelho. Quando a partícula deixa o raio laser, o pulso retorna aos níveis basais (JAROSZESKI & RADCLIFF, 1999; BACAL & FAULHABER, 2003) (**Figura 7**).



**Figura 7 – Geração do pulso de voltagem.**

O espectro de emissão de alguns fluorocromos pode se sobrepor consideravelmente, sendo necessários ajustes matemáticos e compensação dos dados. A combinação adequada de anticorpos certamente contribui para minimizar possíveis interferências (de TUTE, 2011).

O *software* coleta os dados e analisa subpopulações de células baseado-se na presença ou ausência de ligação ao anticorpo marcado. Os dados são então apresentados como intensidade média de fluorescência (IMF) ou porcentagem da população positiva para um biomarcador específico (CASTRO & GOURLEY, 2010).

Anteriormente, o uso da CF se restringia aos grandes centros de pesquisa. No entanto, com os avanços tecnológicos foi possível expandí-lo para os laboratórios clínicos. Atualmente, os citômetros são mais compactos, apresentam menor custo, estão adaptados para um volume maior de amostras e são de mais fácil manuseio (BROWN & WITTEWER, 2000).

A CF identifica com precisão mudanças sutis na expressão de biomarcadores numa população de células, o que tem resultado em controvérsias e questionamentos acerca de sua reprodutibilidade. A ausência de métodos padronizados para facilitar a comparação dos dados obtidos pela CF é responsável, em parte, por esses questionamentos (ALVAREZ *et al.*, 2010).

### **2.5.1 Avaliação das plaquetas por citometria de fluxo**

Desde 1881, quando as plaquetas foram primeiramente identificadas, elas têm sido alvos constantes de estudos acerca de sua função. As plaquetas tradicionalmente são avaliadas a partir de testes de funcionalidade, como habilidade de adesão, ativação e agregação. Os únicos testes padronizados e de uso rotineiro nos laboratórios clínicos são o tempo de sangria e a agregação plaquetária, ambos com limitações importantes (MICHELSON, 1996).

Na área acadêmica, outros testes encontram-se em fase de pesquisa, como a determinação plasmática de fator plaquetário 4 (FP-4),  $\beta$ -tromboglobulina, P-selectina, metabólitos do TXA<sub>2</sub>, formação de agregados plaquetários, bem como a utilização de agonistas exógenos (trombina, peptídeo ativado pelo receptor de trombina-TRAP, ADP, colágeno e análogos do TXA<sub>2</sub>) e anticorpos monoclonais dirigidos contra GP de membrana. No entanto, com frequência, o resultado de estudos similares é controverso, uma vez que as técnicas não são comparáveis (MICHELSON, 1996; MICHELSON *et al.*, 2000).

A CF utilizando anticorpos monoclonais é atualmente a técnica mais sensível para detectar o aumento na expressão de moléculas de superfície em plaquetas ativadas (HARLOW *et al.*, 2002). As pesquisas que envolvem a avaliação plaquetária utilizam sangue total, plaquetas lavadas e o plasma rico em plaquetas (PRP). Entretanto, uma grande limitação desses estudos é a ativação *in vitro* que pode ocorrer durante o processamento da amostra. Evidências mostram que a

ativação das plaquetas ocorre de forma mais expressiva se o PRP é utilizado. Embora a fixação (etapa final desse processo) antes ou após a marcação com anticorpo interrompa a ativação. Estudos revelam que não há diferença entre as leituras feitas imediatamente no citômetro, bem como quando a adição do anticorpo é feita antes ou após a fixação. A fixação é uma variável que necessita ser controlada, porque a afinidade da ligação ao anticorpo dependente de ativação pode ser reduzida, quando comparada às plaquetas não fixadas. Um argumento a favor da fixação imediata é que a ativação plaquetária é dependente do tempo *in vitro* para diversos antígenos de superfície plaquetária, como CD42, CD41 e CD62P (MICHELSON, 1996).

A definição da faixa de referência para os marcadores de ativação plaquetária por CF ainda não está estabelecida. Um estudo envolvendo 30 voluntários saudáveis obteve 0,0-4,7% para níveis basais de CD62P, 39,0-75,7% e 60,5-91,2% após estímulo com ADP e TRAP, respectivamente. Para APL, a faixa de referência obtida foi 2,8-23,6%. Para agregados plaquetas-granulócitos foi 5,3-34,2% e para agregados plaquetas-linfócitos, 4,9-21,6%. O ideal é incluir sempre um controle constituído por indivíduos saudáveis para comparar os resultados dos pacientes envolvidos no estudo (KIM & LIM, 2006).

As vantagens da utilização da CF como ferramenta metodológica são inúmeras, incluindo avaliar individualmente a extensão da ativação plaquetária; detectar subpopulações (frequência <1%) de plaquetas; avaliar quantitativamente biomarcadores; minimizar etapas de manipulação da amostra; avaliar estado de ativação e reatividade plaquetários; detectar várias modificações na superfície plaquetária dependentes de ativação; avaliar fluxo de  $Ca^{2+}$ ; utilizar pequeno volume amostral e consistir em uma técnica simples, rápida e automatizada (MICHELSON *et al.*, 2000).

No entanto, algumas desvantagens devem ser ponderadas, como possuir custo elevado para aquisição e manutenção do citômetro; envolver a necessidade de processamento rápido das amostras para evitar ativação plaquetária *ex vivo* e avaliar a função apenas das plaquetas circulantes (MICHELSON, 1996).

Cumprido destacar que a avaliação plaquetária por CF apresenta ampla aplicabilidade clínica, incluído avaliar hiper-reatividade e/ou ativação de plaquetas circulantes; avaliar hiporreatividade plaquetária em neonatos com hemorragia intraventricular; avaliar as MPP em diversas condições clínicas; avaliar os APM

como marcadores sensíveis de ativação plaquetária em síndromes coronarianas; prever de risco da ocorrência de evento isquêmico agudo e subagudo após angioplastia; avaliar a função plaquetária em doenças, como síndrome aguda coronariana, angioplastia e AVC; diagnosticar a doença do *pool* de estoque; determinar a taxa de trombopoiese; diagnosticar trombocitopenia idiopática e púrpura pós-transfusional; diagnosticar doenças devido à deficiência de GP de superfície plaquetária; avaliar as plaquetas reticuladas; determinar o fluxo de  $Ca^{2+}$  plaquetário; diagnosticar a trombocitopenia neonatal aloimune; avaliar a aloimunização em pacientes politransfundidos (cerca de 15% são devido a anticorpos plaquetários); monitorar a farmacoterapia com antagonistas de GPIIb/IIIa; diagnosticar trombocitopenia induzida por heparina e controlar a qualidade do concentrado de plaquetas estocado em bancos de sangue (LAZARUS *et al.*, 1995; MICHELSON, 1996; MICHELSON *et al.*, 2000; BROWN & WITTEWER, 2000; CASTRO & GOURLEY, 2010).

## **2.6 Alterações plaquetárias na gestação**

Durante a gestação normal, ocorrem alterações hemostáticas e inflamatórias significativas nas mulheres, as quais favorecem um estado de hipercoagulabilidade que visa protegê-las de uma potencial hemorragia pós-parto (ROBB *et al.*, 2010). Dessa forma, há um aumento na concentração de vários pró-coagulantes e a redução de anticoagulantes naturais (PERRY & MARTIN, 1992).

A contagem de plaquetas durante a gestação pode manter-se inalterada (AHMED *et al.*, 1993), reduzir devido a um efeito dilucional (SEJENY *et al.*, 1975; CUNNINGHAM & PRITCHARD, 1978; SILL *et al.*, 1985) ou aumentar (MOR *et al.*, 1960). Sabe-se que na gestação o volume sanguíneo aumenta no primeiro trimestre e na 34ª semana, quando atinge o valor máximo, cerca de 40 a 50% acima do observado em mulheres não gestantes (CUNNINGHAM & PRITCHARD, 1978). Esse aumento é causado pela expansão do volume plasmático, provavelmente em decorrência de alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona e eicosanoides, devido ao aumento das concentrações de progesterona e estrógeno (SIBAI & MABIE, 1991). Essas alterações visam intensificar a habilidade dos rins de reabsorver água e sódio (REMUZZI & RUGGENENTI, 1991). A hipervolemia protege

a mãe e o feto dos efeitos prejudiciais da redução do retorno venoso e do débito cardíaco na posição ereta ao longo da gestação, bem como da perda sanguínea durante e após o parto (CUNNINGHAM & PRITCHARD, 1978).

Estudos sugerem que durante a gestação ocorram ativação e consumo das plaquetas, embora seu tempo de vida útil não se altere (AHMED *et al.*, 1993; JANES & GOODALL, 1994; JANES *et al.*, 1995).

A gestação proporciona também modificações significativas na membrana plasmática das plaquetas, como o aumento da atividade da enzima que cataliza a hidrólise do trifosfato de adenosina (ATPase), a diminuição da fluidez da membrana e da concentração de colesterol (RABINI *et al.*, 1995).

Uma hiperativação plaquetária, mediada pela elevação de  $Ca^{2+}$  é observada a partir da 16ª semana de gestação e normaliza após seis semanas do parto. Além disso, a susceptibilidade das plaquetas para a secreção de trifosfato de adenosina (ATP) e grânulos  $\alpha$ , contendo FP-4 e  $\beta$ -tromboglobulina, é progressiva, sugerindo um aumento da ativação e do *turnover* dessas (MORRISON *et al.*, 1985; HOLTHE *et al.*, 2004).

Robb *et al.* (2010) relataram níveis elevados de P-selectina na superfície plaquetária, no plasma e em APM no terceiro trimestre de gestação. Os APL formados liberam citocinas pró-inflamatórias (IL 1 $\beta$  e PAF), causando uma ativação endotelial, seguida de um estado pró-trombótico (KAGEYAMA *et al.*, 2007). No entanto, a concentração do CD40L (presente em células apresentadoras de antígenos) mostrou-se progressivamente reduzida com valores mínimos na metade na gestação, reflexo de um mecanismo imunológico de tolerância fetal (ROBB *et al.*, 2010).

### **2.6.1 Alterações plaquetárias na pré-eclâmpsia**

A pré-eclâmpsia (PE), na forma pura, é caracterizada pelo aparecimento, em gestante normotensa, de hipertensão e proteinúria, após a 20ª semana de gestação. A PE consiste em uma grave complicação da gestação, frequentemente associada à considerável morbidade e mortalidade materno-fetal (ACOG, 2002). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2005), essa doença é a complicação da gravidez mais comum, ocorrendo em 3 a 5% das gestantes em todo o mundo. Nos países em

desenvolvimento, esse percentual sobe para 10%, devido ao atendimento, muitas vezes, inadequado ou ausente, resultando em mais de 60.000 mortes maternas por ano.

A doença não apresenta cura, exceto pela remoção da placenta e pode evoluir para quadros ainda mais graves, como eclâmpsia, na qual se observa um comprometimento neurológico, manifestado por crises convulsivas e coma, podendo ainda ocorrer AVC e hemorragias (GIBSON *et al.*, 1982); síndrome HELLP (*haemolysis, elevated liver enzyme activity, low platelet*); complicações hemostáticas graves (coagulação intravascular disseminada-CIVD) e renais (SIBAI *et al.*, 1993a).

A capacidade de oxigenação sanguínea em áreas de fluxo lento nas gestantes com PE se reduz a 50%, contribuindo para a prematuridade, baixo peso fetal e aumento da mortalidade neonatal (HEILMANN & SIEKMANN, 1989).

A maior incidência da PE ocorre em mulheres nulíparas, que fizeram reprodução assistida, em cuja gestação houve um aumento da massa placentária (gestação múltipla, mola hidatiforme), portadoras de doenças autoimunes, metabólicas, vasculares ou renais (GRILL *et al.*, 2009). Contudo, para múltíparas, mas grávidas de um novo parceiro ou com longo período entre as gestações, o risco aumenta, igualando-se ao das nulíparas. Outros fatores de risco incluem a história de PE na gestação anterior e ocorrência de PE em parentes de primeiro grau (YOUNG *et al.*, 2010). Interessantemente, o tabagismo parece estar associado à redução do risco de ocorrência da doença (LAIN *et al.*, 2005; YOUNG *et al.*, 2010).

Apesar de inúmeros estudos, a etiologia da PE ainda não foi esclarecida e não há uma terapêutica específica para a doença. A conduta clínica restringe-se à administração de anti-hipertensivos e à prevenção da eclâmpsia, pela terapia anticonvulsivante com sulfato de magnésio e à administração de corticosteroides para acelerar a maturação pulmonar do feto (GRILL *et al.*, 2009).

Estudos em andamento avaliam um novo fármaco que atuaria no balanço angiogênico por meio da alteração de receptores placentários, especialmente o receptor do fator de crescimento do endotélio vascular 121 (VEGFR-121). Admite-se que essa terapia contribuiria para moderar manifestações da PE, ao mesmo tempo em que prolongaria a gestação até o desenvolvimento total do feto (LI *et al.*, 2007).

O melhor entendimento do papel das plaquetas na patogênese da PE viabilizaria outras possibilidades terapêuticas, incluindo a utilização de antiagregantes plaquetários (KAZMI *et al.*, 2011). As plaquetas em gestantes com

PE podem liberar uma quantidade excessiva de TXA<sub>2</sub>, exacerbando a doença. A administração de baixas doses de aspirina foi testada em gestantes pré-eclâmpticas, visando reduzir a biossíntese de TXA<sub>2</sub> sem comprometer a produção de PG, admitindo-se a prevenção da vasoconstrição e os problemas hemostáticos característicos da PE (GIBSON *et al.*, 1982).

Sibai *et al.* (1993b) realizaram um grande estudo envolvendo 3.135 gestantes normotensas para verificar se o tratamento com aspirina era efetivo na redução da incidência de PE e da morbidade materno-fetal. Verificaram uma redução significativa da incidência da doença, sendo que essa ocorreu em 69 (4,6%) das gestantes que receberam uma dose diária de 60mg de aspirina e em 94 (6,3%) daquelas que receberam placebo. Não houve diferença na ocorrência de complicações no recém-nascido nos dois grupos, embora houvesse aumento do risco de placenta prévia.

Um estudo multicêntrico envolvendo 9.364 gestantes avaliou a eficácia da aspirina, administrada em condições similares às do estudo anterior. Os autores concluíram que essa terapia não está associada à incidência de crescimento intrauterino restrito ou morte neonatal. No entanto, devido ao risco materno de sangramento perinatal, essa terapia somente se justifica em gestantes que apresentam risco elevado de manifestação precoce da doença (CLASP, 1994).

Posteriormente, Sibai (1998) investigou alternativas para reduzir a incidência e a gravidade da PE a partir da avaliação de estudos randomizados feitos anteriormente utilizando sais de magnésio e zinco, suplementação alimentar com óleo de peixe e Ca<sup>2+</sup> e baixas doses de aspirina. Concluiu que essas alternativas não conferem benefícios ou esses são mínimos, o que foi posteriormente confirmado (NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM WORKING GROUP ON HIGH BLOOD PRESSURE IN PREGNANCY, 2000; ACOG, 2002; SIBAI *et al.*, 2005).

A contagem de plaquetas normalmente decresce na PE, mas somente cerca de 18% das pacientes desenvolvem plaquetopenia (PERRY & MARTIN, 1992; AHMED *et al.*, 1993; JANES *et al.*, 1995). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a plaquetopenia, como a geração de trombina na presença de imunocomplexos circulantes e lesão vascular, a agregação plaquetária e a destruição mediada por mecanismos imunes (PERRY & MARTIN, 1992).

Na PE, a membrana plaquetária apresenta uma composição lipídica anormal, com um aumento da relação colesterol/fosfolípide, aumento da atividade da proteína quinase C no citosol e na membrana das plaquetas, além de uma redução da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. No entanto, a atividade da Ca<sup>2+</sup> ATPase permanece elevada como na gestação normal (COATA *et al.*, 1992; KAZMI *et al.*, 2011).

Dados da literatura revelam que as desordens hipertensivas na gestação cursam com ativação plaquetária, elevação dos níveis de fibrinogênio e moléculas de adesão derivadas do endotélio vascular (MACEY *et al.*, 2010). Com a ativação plaquetária ocorre uma mudança conformacional da GPIIb/IIIa, localizada na superfície das plaquetas, favorecendo a ligação ao fibrinogênio, a agregação plaquetária e liberação do conteúdo dos seus grânulos. A degranulação contribui para alterações vasculares placentárias e sistêmicas, especialmente pela liberação de substâncias vasoativas, mitogênicas e mioproliferativas, como o TXA<sub>2</sub>, fatores de crescimento e de transformação derivados das plaquetas e de β-tromboglobulina (JANES *et al.*, 1995).

Dois estudos avaliaram, por CF, a ativação plaquetária em gestantes com PE (na presença e ausência de proteinúria) e normotensas e em mulheres não gestantes. Concluíram que as gestantes com PE e proteinúria apresentaram evidências de ativação e degranulação plaquetárias, aumento de plaquetas ligadas a fibrinogênio, aumento da expressão de CD63 (marcador de ativação plaquetária) e dos níveis plasmáticos de β-tromboglobulina. Houve uma moderada correlação positiva entre a proporção de plaquetas ligadas ao fibrinogênio e a expressão de CD63 em todos os grupos (JANES & GOODALL, 1994; JANES *et al.*, 1995).

Investigação semelhante conduzida por Harlow *et al.* (2002) revelou que não houve aumento da expressão de CD62P e CD63 no grupo com PE. Esses pesquisadores propuseram que a ativação plaquetária é um fator relevante na fisiopatologia da PE, mas a contagem de plaquetas não é capaz de prever a ocorrência da doença em todas as gestantes. Bagamery *et al.* (2005) também avaliaram os níveis de CD63, entretanto concluíram que há maior ativação plaquetária nas gestantes com PE.

No entanto, a hiperatividade plaquetária *in vitro* na PE é aparentemente contraditória, uma vez que a agregação é reduzida frente a vários agonistas (colágeno, ADP, adrenalina, AA), o que reflete a exaustão das plaquetas resultante da contínua ativação. A secreção reduzida de ATP também corrobora para a

hipótese de hiperestimulação (LOUDEN *et al.*, 1991). Se a hiperfunção plaquetária é causa ou efeito da PE ainda requer novos estudos.

Lok *et al.* (2007) avaliaram a ativação plaquetária a partir da liberação de MPP expressando P-selectina e pela concentração plasmática da sCD62P. Verificaram um aumento da concentração de sCD62P na PE, embora não tenha diferido das gestantes normotensas, apesar do número de MPP expressando P-selectina ser maior na PE.

Em estudos posteriores, Lok *et al.* (2008) investigaram se os níveis de MPP estariam associados à gravidade da PE. Observaram que durante a gestação normal o número de MPP circulantes inicialmente reduz, normalizando posteriormente. Já o número de MPP oriundas de amostras de placenta aumentou gradativamente ao longo da gestação normal e na PE houve redução devido à plaquetopenia. Houve, ainda, aumento do número de micropartículas derivadas de monócitos na PE, o que poderia refletir a ativação dessas células, resultante do estado inflamatório sistêmico. Admitiram que a liberação de mediadores inflamatórios a partir das plaquetas ativadas desencadearia reações inflamatórias nas células endoteliais e nos monócitos circulantes.

Paradoxalmente, Robb *et al.* (2010) avaliaram diversos marcadores de ativação plaquetária na PE e não obtiveram expressão acentuada de PECAM-1 (CD31), CD61, CD42a, CD62P e CD63. Houve um aumento da expressão de APM e de sCD62P tanto ao longo da gestação normal, quanto na PE e posterior redução no período pós-parto. O marcador CD31 foi o que melhor se associou à PE. Concluíram que a ativação plaquetária é crescente durante a gestação, mas não está alterada na PE. No entanto, não excluíram a contribuição das plaquetas para o desenvolvimento da PE, admitindo a ativação aumentada na interface materno-fetal.

Holthe *et al.* (2004) determinaram o estado de ativação plaquetária (a partir dos marcadores CD61, CD42a, CD62P, CD63 e do ligante do receptor de fibrinogênio ativado do tipo 1-PAC-1) em gestantes com PE, normotensas e mulheres não gestantes em nível basal e após ativação *in vitro*. Observaram que na gestação normal ou na PE ocorre maior ativação das plaquetas, e que o aumento da expressão de CD63 é mais significativo na PE.

Em estudos subsequentes, Holthe *et al.* (2005) avaliaram micropartículas, agregados plaqueta-plaqueta, expressão de P-selectina e APL. Observaram que na PE (na presença ou ausência de agonistas) há menor proporção de micropartículas

do que em gestantes normotensas, porque são mais facilmente removidas da circulação. As micropartículas e as plaquetas na PE expressam P-selectina em maior quantidade, o que determina um estado pró-coagulante. Como a P-selectina é um mediador da ligação entre plaquetas, endotélio e leucócitos, sua presença está associada à trombogenicidade (HOLTHE *et al.*, 2005; LOK *et al.*, 2007). Além disso, esses investigadores observaram maior percentagem de APL na gestação quando comparada às mulheres não gestantes, após ativação *in vitro* e um percentual ainda maior na PE. Não houve diferença na formação de APL comparando as gestantes normotensas e mulheres não gestantes (HOLTHE *et al.*, 2005).

Macey *et al.* (2003) avaliaram a ativação plaquetária após estímulo *in vitro* com ADP e observaram aumento da formação de APL na PE em relação à gestação normal, o que não foi confirmado por Robb *et al.* (2010).

Holthe *et al.* (2005) propuseram que a ocorrência de APM é superior à de APN na PE, devido ao papel central dos monócitos nos processos inflamatórios. Além disso, o depósito de APL ou de agregados plaquetários poderia contribuir significativamente para o estresse oxidativo placentário nessa doença.

Acar *et al.* (2007) investigaram a associação entre a PE e a expressão da GPV solúvel, considerada um biomarcador de ativação plaquetária. Não encontraram diferença entre gestantes com PE e normotensas, embora a contagem de plaquetas fosse menor no grupo com PE. Propuseram que provavelmente exista uma subpopulação de gestantes com PE na qual a ativação plaquetária, se ocorre, é um evento secundário. A causa primária do estímulo à hipercoagulabilidade seria a ocorrência de um processo inflamatório, disfunção endotelial e hiperfunção dos leucócitos.

Mellembakken *et al.* (2001) avaliaram as concentrações de CD40L e de citocinas na PE e sugeriram que o aumento da ativação plaquetária nessa doença resulta em maior liberação de mediadores inflamatórios, possivelmente contribuindo para a inflamação, ativação de leucócitos e disfunção endotelial.

Embora admita-se que a PE curse com alterações inflamatórias e da coagulação, acompanhadas de ativação plaquetária, os estudos da literatura são controversos, com alguns mostrando elevação de marcadores dessa ativação, enquanto outros não (HOLTHE *et al.*, 2005; ACAR *et al.*, LOK *et al.*, 2007; ROBB *et al.*, 2010).

As alterações plaquetárias maternas na PE também podem repercutir no neonato. Um estudo realizado em gestantes com PE e gestantes saudáveis, e seus respectivos neonatos, revelou um aumento da expressão de CD62P, CD63, CD41, CD9 e CD36 em gestantes saudáveis e seus neonatos após ativação *in vitro* das plaquetas com trombina. Os neonatos de mulheres com PE, entretanto, apresentaram menor expressão de CD62P, CD63, CD9 e CD36. Além disso, as plaquetas foram menos responsivas à ativação *in vitro*. Esses achados sugerem que a PE influencia a expressão de GP de superfície plaquetária nas gestantes e nos seus neonatos, que podem apresentar a função das plaquetas alterada, contribuindo para um risco adicional de sangramento em neonatos trombocitopênicos (HÜHNE *et al.*, 1996).

# **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Estabelecer inovações metodológicas para avaliar a ativação plaquetária e a formação de agregados plaquetas-leucócitos, por citometria de fluxo, e aplicá-las no estudo da pré-eclâmpsia.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Padronizar as técnicas para avaliar ativação plaquetária e para determinar a percentagem de agregados plaquetas-monócitos e agregados plaquetas-neutrófilos, por citometria de fluxo.
- Avaliar a expressão de glicoproteínas da membrana plaquetária (P-selectina, GPIIb/IIIa, GPIIIa e GPIX), por citometria de fluxo, em amostras de gestantes com pré-eclâmpsia, normotensas e mulheres não gestantes.
- Determinar a percentagem de agregados plaquetas-monócitos e agregados plaquetas-neutrófilos, por citometria de fluxo, em amostras de gestantes com pré-eclâmpsia, normotensas e mulheres não gestantes.
- Determinar a percentagem de monócitos expressando fator tissular, por citometria de fluxo, em amostras de gestantes com pré-eclâmpsia, normotensas e mulheres não gestantes.
- Correlacionar o número de plaquetas circulantes e demais parâmetros obtidos por citometria de fluxo, em amostras de gestantes com pré-eclâmpsia, normotensas e mulheres não gestantes.

# **4 CASUÍSTICA E METODOLOGIA**

## 4.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (**ANEXO A**), pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (**ANEXO B**), pelo Núcleo de Pesquisa da Maternidade Odete Valadares/Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), Belo Horizonte (**ANEXO C**), pela Comissão de Ética em Pesquisa da Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) Guanabara/Betim (**ANEXO D**) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Municipal Odilon Behrens, Belo Horizonte (**ANEXO E**).

O esclarecimento dos objetivos da pesquisa, utilizando-se linguagem clara, foi feito pelos pesquisadores, a todas as mulheres no estudo, e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido em todos os casos (**ANEXO F**). Uma ficha clínica contendo dados importantes para análise dos resultados foi preenchida em todos os casos (**ANEXO G**).

## 4.2 Casuística

Foram avaliadas 97 mulheres distribuídas em três grupos conforme os critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos.

PE (n=35): Gestantes com PE (formas leve n=20 – PEL e grave n=15 – PEG);

GN (n=31): Gestantes normotensas;

CNG (n=31): Mulheres não gestantes.

### 4.2.1 Grupo PE: Gestantes com PE

#### 4.2.1.1 Critérios de inclusão para PE grave (PEG)

a. Pressão sistólica/diastólica igual ou superior a 160 x 110mmHg, aferida em duas medidas com intervalo de, no mínimo, 2 horas e após repouso;

b. Proteinúria superior a 2g em urina de 24 horas ou maior do que (+2) pelo método semi-quantitativo de fita, em amostra isolada de urina;

c. Estar no terceiro trimestre de gestação.

A presença de alguns dos sintomas clínicos e achados clínico-laboratoriais também foram considerados pela equipe obstétrica para definir o diagnóstico de PE grave, como:

a. Dor epigástrica ou no abdome superior;

b. Alterações visuais;

c. Exacerbação dos reflexos tendinosos profundos, sendo aferidos dois reflexos (patelar e de membros superiores);

d. Cefaleia;

e. Alterações comportamentais;

f. Dispneia e sinais de congestão pulmonar;

g. Volume urinário inferior a 500mL em 24 horas ou 100mL em 4 horas (2 medidas);

h. Trombocitopenia (contagem de plaquetas < 100.000/ $\mu$ L);

i. Elevação da atividade das enzimas hepáticas;

j. Presença de esquisócitos no filme sanguíneo;

k. Crescimento intra-uterino restrito (CIUR).

#### **4.2.1.2 Critérios de inclusão para PE leve (PEL)**

a. Pressão sistólica/diastólica igual ou superior a 140 x 90mmHg sem ultrapassar 110mmHg de níveis de pressão arterial diastólica;

b. Proteinúria superior a 300mg e inferior a 2g em urina de 24 horas ou maior ou igual a (+1) pelo método semi-quantitativo de fita, em amostra isolada de urina;

c. Estar no terceiro trimestre de gestação.

#### **4.2.2 Grupo GN: Gestantes normotensas**

##### **4.2.2.1 Critérios de inclusão**

- a. Pressão sistólica/diastólica igual ou inferior a 120 x 80mmHg e sem história pregressa de hipertensão e PE;
- b. Ausência de proteinúria;
- c. Estar no terceiro trimestre de gestação.

#### **4.2.3 Grupo CNG: Mulheres não gestantes**

##### **4.2.3.1 Critérios de inclusão**

- a. Pressão sistólica/diastólica igual ou inferior a 120 x 80mmHg e sem história pregressa de hipertensão e PE;
- b. Ausência de proteinúria;

Os critérios de exclusão comuns aos três grupos foram:

- a. Obesidade;
- b. Presença de doenças intercorrentes, como distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, autoimunes, hepáticas, renais e infectocontagiosas, diabetes, câncer e hipertensão crônica;
- c. Trabalho de parto avançado;
- d. Presença de sangramento de qualquer natureza.

O diagnóstico de PE foi feito pela equipe obstétrica da Maternidade Odete Valadares, da Maternidade Hilda Brandão da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte ou do Hospital Municipal Odilon Behrens. As integrantes dos grupos CNG e GN foram selecionadas no ambulatório do Hospital Municipal Odilon Behrens e na UBSF Guanabara/Betim. As gestantes foram pareadas segundo a idade e idade gestacional. As mulheres dos três grupos pertenciam à mesma classe social.

### 4.3 Amostras biológicas

Para realizar a técnica de CF para o estudo da expressão de marcadores de ativação plaquetária, análise de APL (APM e APN), bem como a expressão de FT em monócitos, foram coletadas amostras de 3,5mL de sangue de todas as mulheres participantes do estudo. O sangue foi colhido em citrato de sódio 3,2%, utilizando-se sistema a vácuo e material descartável. As amostras de sangue foram processadas em até duas horas após a punção venosa e a leitura feita imediatamente.

Para o grupo de gestantes com PE, o resultado do hemograma foi obtido do prontuário médico. Para os grupos GN e CNG, além dos 3,5mL de sangue citratado, foram coletados 4mL de sangue em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para a realização do hemograma. Esse foi realizado utilizando-se o contador eletrônico de células, Cell-Dyn® 3500R (Abbott Diagnósticos), no Laboratório São Paulo/Belo Horizonte.

### 4.4 Método

Neste estudo, foram empregadas técnicas de CF, utilizando amostras de PRP e de sangue total, em protocolos adaptados a partir de estudos prévios descritos por Tomer (2004), Noronha *et al.* (2007) e Assinger *et al.* (2011) para o estudo da ativação plaquetária, Sathler-Avelar *et al.* (2008) para análise de leucócitos circulantes e Vieira *et al.* (2007) para a análise da expressão de FT em monócitos.

#### 4.4.1 Protocolo do estudo da expressão de marcadores de ativação plaquetária

O estudo da expressão de marcadores de ativação plaquetária foi realizado conforme protocolo original definido por Tomer (2004), Noronha *et al.* (2007) e Assinger *et al.* (2011), bem como a partir das instruções do fabricante dos anticorpos monoclonais, com algumas adaptações conforme descrito a seguir:

A amostra de sangue total citratado foi previamente centrifugada, utilizando-se a centrífuga Rotofix 32® (Hettich) a 800rpm durante 10 minutos para obtenção do

PRP. Para fixação das plaquetas, alíquotas de 400µL de PRP foram gotejadas em três tubos de poliestireno 12 x 75mm contendo 1.600µL de solução fixadora (paraformaldeído a 10g/L em cacodilato de sódio a 10,2g/L e cloreto de sódio a 6,63g/L. O pH da solução foi ajustado para 7,2-7,4 utilizando o potenciômetro Digimed DM21<sup>®</sup>) sob agitação em vórtex AP56<sup>®</sup> (Phoenix) e acondicionadas em geladeira (4°C a 8°C) *overnight*.

Após a fixação, as plaquetas foram lavadas com 3mL de solução fosfato tamponada filtrada a 0,22µm (PBS 0,015M, pH=7,2) e centrifugadas a 2.200rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o excesso foi retirado vertendo o tudo sobre papel absorvente. O *pellet* foi ressuscitado suavemente, com 1mL de PBS e a contagem de plaquetas foi feita utilizando o contador hematológico Cell-Dyn<sup>®</sup> 3500R (Abbott Diagnósticos).

A suspensão de plaquetas fixadas foi ajustada para  $5 \times 10^6$  plaquetas/mL. Alíquotas de 100µL dessa suspensão (500.000 plaquetas) foram adicionadas a tubos de poliestireno 12 x 75mm contendo 3 a 5µL de anticorpos monoclonais (Becton Dickinson Pharmingen<sup>®</sup>) dirigidos contra GP plaquetárias, conforme descrito na **Tabela 1**. Os tubos continham um controle interno de auto-fluorescência (branco) no qual a suspensão de plaquetas foi incubada na ausência de anticorpos monoclonais. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e, posteriormente, incubados à temperatura ambiente (TA) e ao abrigo de luz, durante 30 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com 1mL de PBS, homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 2.200rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o excesso retirado vertendo o tubo sobre papel absorvente. O *pellet* foi ressuscitado em 200µL de PBS.

**Tabela 1 – Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise das glicoproteínas plaquetárias.**

Tubo	Reagente/anticorpo	Fluorocromo	Volume	Clone	Fenótipo alvo
1	PBS	-	5µL	-	-
2	Anti-CD41a	PE	4µL	HIP8	GPIIb/IIIa
3	Anti-CD42a	FITC	4µL	ALMA.16	GPIX
4	Anti-CD61	PE	3µL	VI-PL2	GPIIIa
5	Anti-CD42a	FITC	4µL	ALMA.16	GPIX
	Anti-CD62P	PE	5µL	AK-4	P-selectina

FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina.

#### **4.4.1.1 Aquisição e análise dos dados da ativação plaquetária por citometria de fluxo**

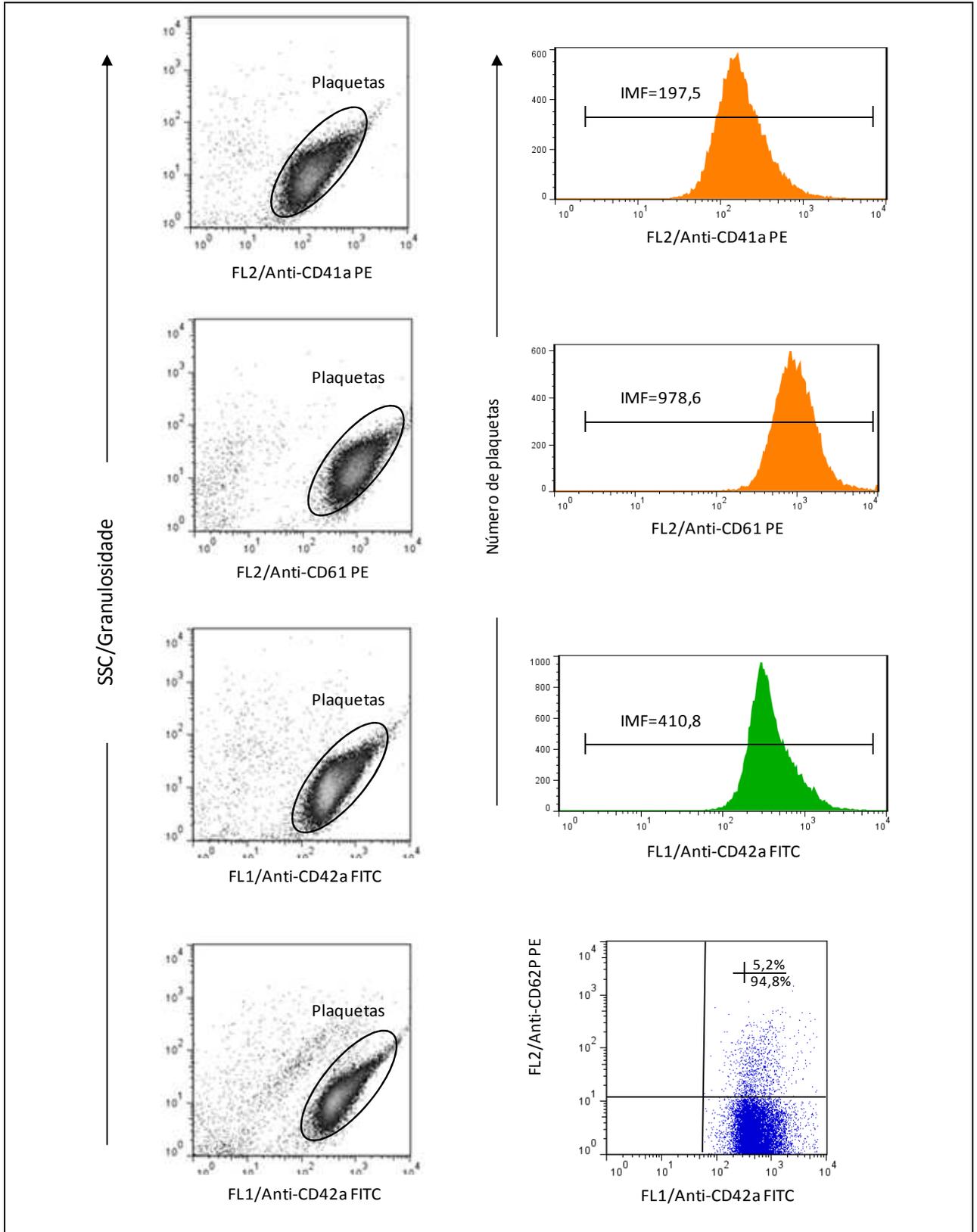
Um total de 100.000 eventos foram adquiridos por tubo, usando o citômetro de fluxo FACScalibur® (Becton Dickinson). Para a aquisição e análise dos dados foi utilizado o *software* CELLQuest®, conforme recomendado pelo fabricante.

As diferentes estratégias utilizadas para análise do perfil de marcadores plaquetários estão representadas na **Figura 8**. A análise seletiva das plaquetas foi estabelecida pela combinação de fluorescência 1 (FL1) ou fluorescência 2 (FL2) *versus* SSC. Após selecionar a população de plaquetas, foram utilizados histogramas unidimensionais de fluorescência para estabelecer a intensidade média de fluorescência (IMF) para o CD41a, CD61 e CD42a. A determinação da IMF para o CD62P foi realizada a partir de cálculo matemático a seguir:

$$\frac{(\% \text{ gate quadrante superior direito} \times \text{fluorescência do CD62P}) + (\% \text{ gate quadrante inferior direito} \times \text{fluorescência do CD62P})}{2}$$

2

A percentagem da população de plaquetas CD62P<sup>+</sup> foi definida a partir da combinação anti-CD42a FITC *versus* anti-CD62P PE. Os resultados foram expressos como percentual de plaquetas CD42a<sup>+</sup>/CD62P<sup>+</sup>, correspondente ao quadrante superior direito-duplo positivo.



**Figura 8 – Estratégias utilizadas para a determinação da intensidade média de fluorescência de marcadores de ativação plaquetária e da percentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup>. Figuras obtidas utilizando-se o software Flow Jo.**

#### **4.4.2 Protocolo do estudo dos agregados plaquetas-monócitos, plaquetas-neutrófilos e expressão de fator tissular em monócitos**

O estudo da percentagem de agregados plaquetas-monócitos, plaquetas-neutrófilos e da expressão de fator tissular por monócitos foi realizado a partir de modificações dos protocolos originalmente definidos por Shoji *et al.* (2005), Vieira *et al.* (2007) e Sathler-Avelar *et al.* (2008), bem como a partir das instruções do fabricante dos anticorpos monoclonais, com algumas adaptações, conforme descrito a seguir:

Uma alíquota de 1mL de sangue total citratado foi reservada antes do processamento do PRP. Alíquotas de 100µL de sangue foram adicionadas a tubos de poliestireno 12 x 75mm contendo 1 a 10µL de anticorpos monoclonais (Becton Dickinson Pharmingen® e American Diagnostica®) dirigidos contra GP plaquetárias (CD51/CD61), monócitos (CD14), neutrófilos (CD16) e FT (anti-FT), conforme descrito na **Tabela 2**. Os tubos continham um controle interno de auto-fluorescência (branco) no qual o sangue foi incubado na ausência de anticorpos monoclonais. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e, posteriormente, incubados à TA e ao abrigo de luz, durante 30 minutos.

Após o período de incubação, as amostras foram submetidas à lise das hemácias, utilizando 2mL de solução de lise comercial (FACS® Lysing Solution-Becton Dickinson) diluída 10 vezes em água destilada. Após nova homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 10 minutos, à TA e ao abrigo de luz. Depois foram centrifugadas a 1.300rpm durante 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o excesso foi retirado vertendo o tudo sobre papel absorvente. O *pellet* foi ressuspensionado em vórtex e os leucócitos foram lavados com 2mL de PBS. As etapas de centrifugação e descarte do sobrenadante foram repetidas. O *pellet* foi então ressuspensionado em 200µL de PBS.

**Tabela 2 – Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de agregados plaquetas-leucócitos e monócitos expressando fator tissular.**

Tubos	Reagente/anticorpo	Fluorocromo	Volume	Clone	Fenótipo alvo
1	PBS	-	3 $\mu$ L	-	-
2 e 3	Anti-CD51/CD61	FITC	2 $\mu$ L	23C6	Integrina heterodimérica $\alpha$ V $\beta$ 3
2 e 4	Anti-CD14	PE	1 $\mu$ L	M $\phi$ P9	Monócitos
3	Anti-CD16	PECy5	10 $\mu$ L (diluído 1:20 em PBS)	3G8	Neutrófilos
4	Anti-FT	FITC	2 $\mu$ L	VD8	Fator tissular

FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PECy5: ficoeritrina-cianina 5

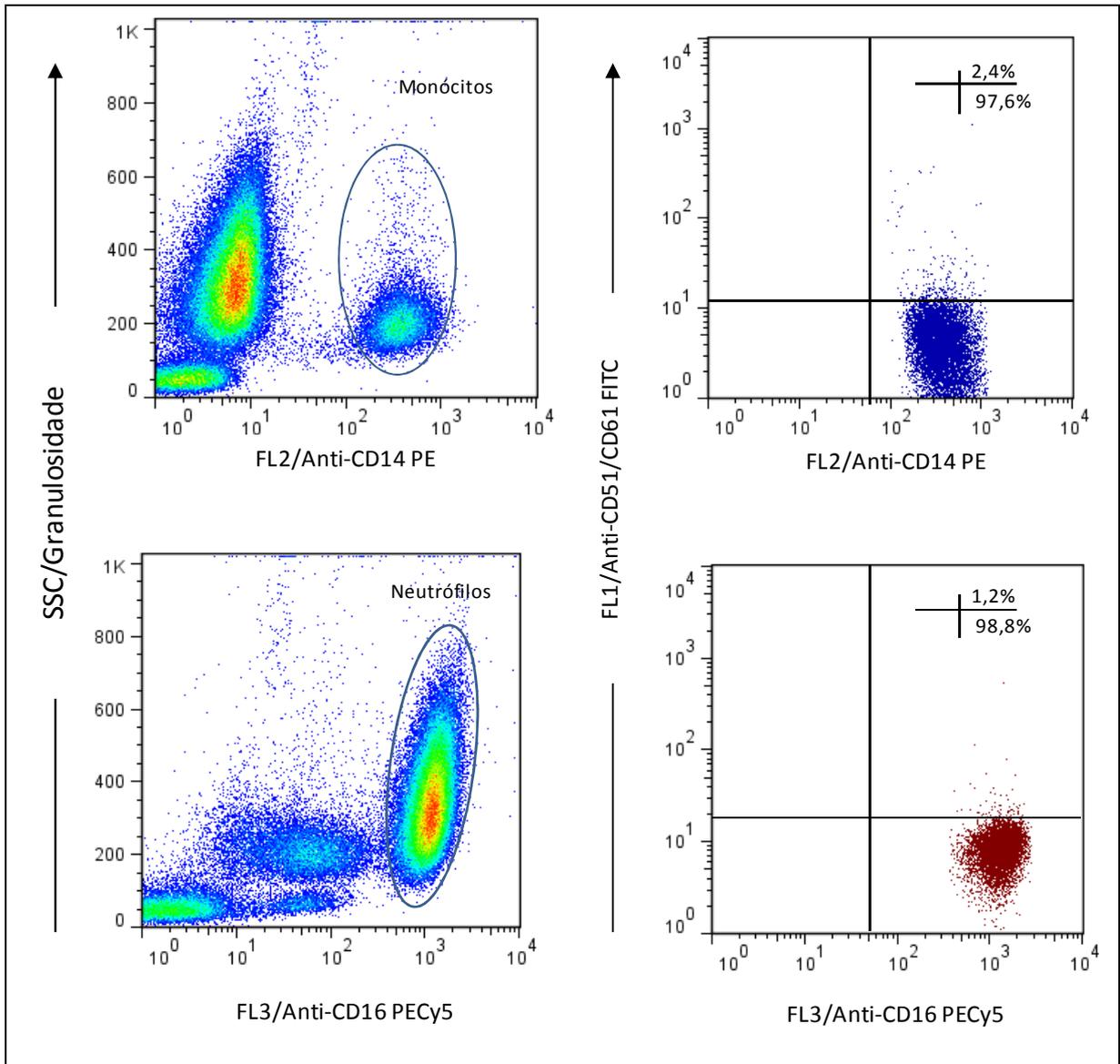
#### **4.4.2.1 Aquisição e análise dos dados para determinação da percentagem de agregados plaquetas-monócitos, plaquetas-neutrófilos e expressão de fator tissular em monócitos**

Um total de 100.000 eventos por tubo foi obtido usando o citômetro de fluxo FACScalibur<sup>®</sup> (Becton Dickinson). Para a aquisição e análise dos dados foi utilizado o *software* CELLQuest<sup>®</sup>, conforme recomendado pelo fabricante.

As diferentes estratégias utilizadas para análise do perfil de APM, APN e da expressão de FT em monócitos estão representadas nas **Figuras 9 e 10**. A análise seletiva dos monócitos foi estabelecida pela combinação de FL2 (anti-CD14 PE) *versus* SSC. Foi realizado um *gate*, selecionando a população de interesse e posteriormente a combinação anti-CD14 PE *versus* anti-CD51/CD61 FITC para definir a percentagem de APM.

A análise seletiva dos neutrófilos foi estabelecida pela combinação de FL3 (anti-CD16 PECy5) *versus* SSC. Foi realizado um *gate*, selecionando a população de interesse e posteriormente a combinação anti-CD16 PECy5 *versus* anti-CD51/CD61 FITC para definir a percentagem de APN.

Os resultados foram expressos como percentual da população CD51/CD61<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> (APM) e CD51/CD61<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> (APN), correspondente ao quadrante superior direito-duplo marcado.

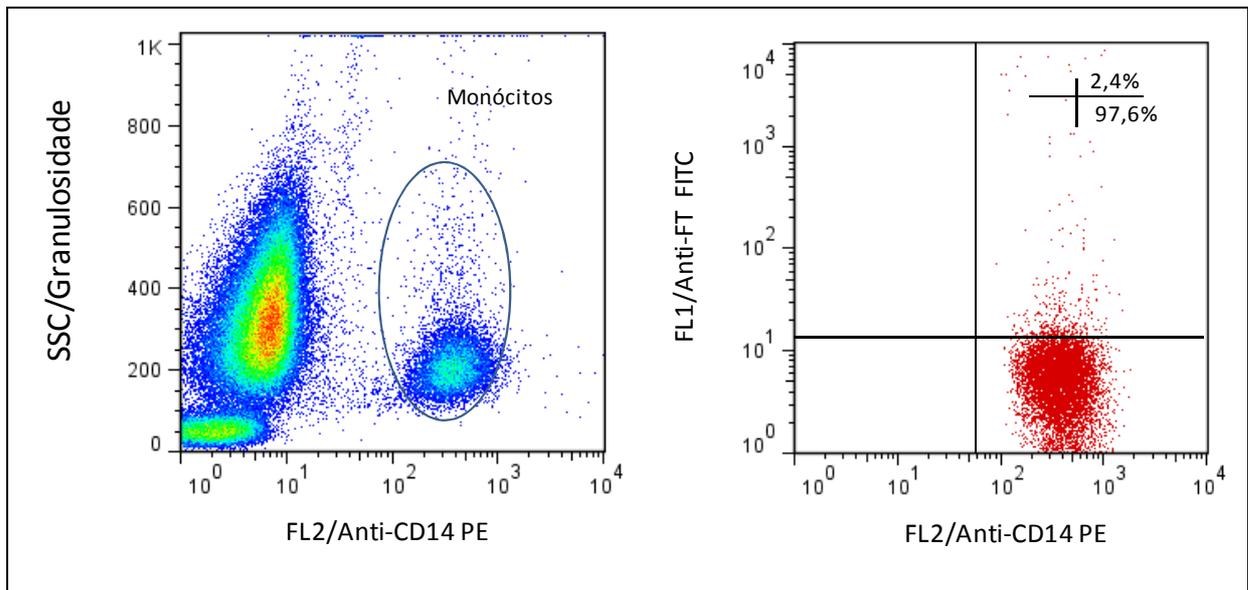


**Figura 9 – Estratégias utilizadas para a determinação da percentagem de agregados plaquetas-monócitos e agregados plaquetas-neutrófilos. Figuras obtidas utilizando-se o software Flow Jo.**

Para avaliar a expressão de FT em monócitos, foi estabelecida inicialmente uma análise seletiva dos monócitos pela combinação de FL2 (anti-CD14 PE) *versus* SSC. Foi realizado um *gate*, selecionando a população de interesse e

posteriormente a combinação anti-CD14 PE *versus* anti-FT FITC para definir a percentagem de monócitos expressando FT (**Figura 10**).

Os resultados foram expressos como percentual da população CD14<sup>+</sup>/FT<sup>+</sup>, correspondente ao quadrante superior direito-duplo marcado.



**Figura 10** – Estratégias utilizadas para a determinação da percentagem de monócitos expressando fator tissular. Figuras obtidas utilizando-se o *software* Flow Jo.

#### 4.4.3 Definição do tipo de amostra de sangue citratado

Após concluir a padronização da técnica para avaliar a expressão de marcadores de ativação plaquetária, expressão de FT em monócitos, bem como o estabelecimento da estratégia de análise, foi verificada a possível ativação plaquetária induzida *in vitro* e a interferência do FT liberado no momento da punção venosa. Dessa forma, foi avaliado se seria necessário desprezar um pequeno volume de sangue (contendo ativadores) antes de coletar a amostra a ser utilizada nos experimentos.

Foram colhidos dois tubos de sangue em citrato de sódio (3,5mL) de quatro mulheres, uma gestante com PE grave, uma com PE leve e duas não gestantes. Os tubos foram numerados como “1” e “2”, de acordo com a ordem de coleta e os protocolos definidos foram feitos para os dois tubos em paralelo. A análise dos

resultados não revelou diferença em nenhum dos parâmetros avaliados ( $p > 0,05$ ) nos tubos “1” e “2”. Dessa forma, optou-se por não desprezar um pequeno volume de sangue antes da coleta em tubo contendo citrato de sódio.

#### 4.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita utilizando o programa SPSS (versão 13.0). A normalidade dos dados foi testada pelo método *Shapiro-Wilk*.

Para definir se a amostra de sangue utilizada seria a do primeiro ou do segundo tubo de coleta, utilizou-se o teste t-pareado, para os dados normais e o teste de *Wilcoxon*, para os dados que não seguiam a normalidade.

Para as variáveis contínuas de distribuição normal, a comparação das médias entre três ou mais grupos foi feita pelo teste ANOVA. Quando foi encontrada diferença significativa na ANOVA, utilizou-se o teste de comparação múltipla dois a dois *Least square difference* (LSD). A comparação dos resultados entre dois grupos foi feita pelo teste *t-Student*.

Para as variáveis contínuas de distribuição não-normal, a comparação das medianas entre três ou mais grupos foi feita pelo teste de *Kruskal-Wallis*. A comparação dos resultados entre dois grupos foi feita pelo teste de *Mann-Whitney*, com a correção de *Bonferroni*. A comparação das variáveis categóricas foi feita pelo teste do Qui-quadrado de *Pearson* exato, pois o valor esperado foi menor do que cinco em mais de 20% das caselas.

Para avaliar a existência de associação entre variáveis clínico-laboratoriais e a prevalência de pré-eclâmpsia, inicialmente, foi realizada uma análise univariada, ajustada ao Modelo linear generalizado de *Poisson*. As variáveis categorizadas foram descritas pela frequência absoluta e relativa (percentagem), as variáveis quantitativas foram descritas pela média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou mediana  $\pm$  intervalo interquartil (IQ). Foram estimadas as razões de prevalências (RP) e o intervalo de confiança (IC) de 95% da RP na análise univariada. Para as variáveis que apresentaram significância ( $p \leq 0,20$ ), foi realizada a análise multivariada utilizando-se o Modelo linear generalizado de *Poisson*. Iniciou-se com o ajuste de todas as variáveis selecionadas passo-a-passo. Posteriormente, foram retiradas as variáveis menos significativas até ajustar um modelo em que todas as variáveis foram

significativas ao nível de 0,05, para esse modelo utilizou-se o Teste *Deviance* para avaliar a qualidade de ajuste do modelo multivariado.

Para avaliar a correlação entre o número de plaquetas e os parâmetros citométricos foi realizada a correlação de *Spearman*.

O poder do número de plaquetas e dos parâmetros citométricos para o diagnóstico/prognóstico da PE foi avaliado por *Receiver operating characteristic curve* (curva ROC) e a área sob a curva (AUC) foi determinada. Foram também estabelecidas a sensibilidade, a especificidade e os valores de *cut off* para todos os parâmetros.

A concordância entre as análises por CF foi avaliada comparando os dados obtidos por dois analisadores distintos, a partir do gráfico de *Bland e Altman*.

As análises da curva ROC e de *Bland e Altman* foram feitas utilizando o programa MedCalc (versão 12.1.4.0).

Foram consideradas como diferenças significativas valores de  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,017$ ,  $p \leq 0,008$  (Correção de *Bonferroni* para os dois últimos).

# 5 RESULTADOS

## 5.1 Características clínicas dos grupos avaliados

As características clínicas das participantes dos três grupos avaliados neste estudo estão apresentadas na **Tabela 3**.

**Tabela 3 – Características clínicas das participantes do estudo.**

	PE (n=35)	GN (n=31)	CNG (n=31)	p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>	p <sup>4</sup>
Idade (anos)†	29 ± 7	26 ± 6	25 ± 6	0,02*	0,06	0,01*	0,35
IEP (meses)	93 ± 69	36 ± 41	-	-	0,16	-	-
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )†	28 ± 6	25 ± 5	24 ± 4	0,01*	0,04*	0,00*	0,38
IG (sem.)†	33 ± 3	34 ± 4	-	-	0,17	-	-
GPG (Kg)	12 ± 8	12 ± 8	-	-	0,71	-	-
PA sist. (mmHg)	160 ± 10	110 ± 20	120 ± 10	0,00*	0,01*	0,00*	0,00*
PA diast. (mmHg)	100 ± 10	70 ± 20	80 ± 10	0,00*	0,00*	0,00*	0,01*

IMC: índice de massa corporal; IEP: intervalo entre partos; IG: idade gestacional; sem.: semanas; GPG: ganho de peso na gestação; PA: pressão arterial; sist.: sistólica; diast.: diastólica; PE: grupo de gestantes com PE; NG: grupo de gestantes normotensas; CNG: grupo de mulheres não gestantes.

\*p≤0,05. †Os dados paramétricos são representados como média±desvio padrão (ANOVA/LSD/Teste *t-Student*). Os dados não-paramétricos são apresentados como mediana±intervalo interquartil (*Kruskal-Wallis/Mann-Whitney/Correção de Bonferroni*).

p<sup>1</sup>: PE x GN x CNG; p<sup>2</sup>: PE x GN; p<sup>3</sup>: PE x CNG; p<sup>4</sup>: GN x CNG.

As características clínicas das participantes dos grupos PE e GN foram obtidas nos prontuários médicos e no cartão de pré-natal. Das 67 gestantes que participaram do estudo, 56 (83,6%) fizeram pelo menos três consultas de pré-natal. Os dados das participantes do grupo CNG foram obtidos durante a entrevista.

A média de idade das integrantes do grupo PE foi superior, em relação às do CNG (p=0,01), bem como a média do índice de massa corporal (IMC), em relação à dos grupos GN (p=0,04) e CNG (p=0,00).

Não houve diferença entre a média da idade gestacional (IG) ( $p=0,17$ ) e as medianas do ganho de peso durante a gestação (GPG) ( $p=0,71$ ) e do intervalo entre partos (IEP) ( $p=0,16$ ), comparando-se as gestantes com PE e as gestantes normotensas.

As medianas dos valores da pressão sistólica ( $p=0,00$ ) e da pressão diastólica ( $p=0,00$ ) foram diferentes comparando-se os três grupos.

Análise semelhante foi realizada após subdivisão do grupo PE em PE grave (PEG) e PE leve (PEL), como mostrado na **Tabela 4**.

**Tabela 4 – Características clínicas das participantes do estudo após subdivisão do grupo PE nas formas grave e leve.**

	PEG (n=15)	PEL (n=20)	p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>	p <sup>4</sup>	p <sup>5</sup>	p <sup>6</sup>
Idade (anos)†	31 ± 6	28 ± 8	0,02*	0,16	0,02*	0,00*	0,36	0,08
IEP (meses)	127 ± 66	54 ± 52	0,02*	0,02	0,012**	-	-	-
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )†	26 ± 5	30 ± 6	0,00*	0,03*	0,86	0,37	0,00*	0,00*
IG (sem.)†	33 ± 3	34 ± 3	0,29	-	-	-	-	-
GPG (Kg)	14 ± 5	11 ± 10	0,64	-	-	-	-	-
PA sist. (mmHg)	160 ± 20	160 ± 10	0,00*	0,01*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*
PA diast. (mmHg)	110 ± 20	100 ± 11	0,00*	0,05*	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*

IMC: índice de massa corporal; IEP: intervalo entre partos; IG: idade gestacional; sem.: semanas; GPG: ganho de peso na gestação; PA: pressão arterial; sist.: sistólica; diast.: diastólica. PEG: grupo de gestantes com PE grave; PEL: grupo com PE leve; NG: grupo de gestantes normotensas; CNG: grupo de mulheres não gestantes.

\* $p \leq 0,05$ . \*\* $p \leq 0,017$  (Correção de Bonferroni). †Os dados paramétricos são representados como média±desvio padrão (ANOVA/LSD/Teste *t-Student*). Os dados não-paramétricos são apresentados como mediana±intervalo interquartil (*Kruskal-Wallis/Mann-Whitney/Correção de Bonferroni*).

p<sup>1</sup>: PEG x PEL x GN x CNG; p<sup>2</sup>: PEG x PEL; p<sup>3</sup>: PEG x GN; p<sup>4</sup>: PEG x CNG; p<sup>5</sup>: PEL x GN; p<sup>6</sup>: PEL x CNG.

A média da idade das integrantes do grupo PEG foi superior à dos grupos GN ( $p=0,02$ ) e CNG ( $p=0,00$ ). A média do IMC das gestantes com PE grave foi inferior à

daquelas com PE leve ( $p=0,03$ ), entretanto, as gestantes com PE leve apresentaram média de IMC inferior em relação à das GN ( $p=0,00$ ) e CNG ( $p=0,00$ ).

Não houve diferença entre as médias da IG ( $p=0,29$ ) e as medianas do GPG ( $p=0,64$ ), comparando-se as gestantes com PE grave ou PE leve e as normotensas.

A mediana do IEP do grupo com PE grave foi maior do que a do grupo GN ( $p=0,012$ ).

As medianas dos valores da pressão sistólica ( $p=0,00$ ) e de pressão diastólica ( $p=0,00$ ) foram diferentes comparando-se os quatro grupos.

Outros parâmetros clínicos foram avaliados e testados quanto à sua associação com a ocorrência de PE (**ANEXO H**). Apenas a variável “número de gestações” foi significativa ( $p=0,00$ ). A análise de resíduos está apresentada na

**Tabela 5.**

**Tabela 5 – Análise de resíduo para a variável “número de gestações” nos grupos PEG, PEL, GN e CNG.**

Grupos	Número de gestações		
	0	1	$\geq 2$
PEG	-1,7	-0,5	1,7
PEL	-2,1*	1,1	0,4
GN	-2,8*	-1,0	2,9*
CNG	5,9*	0,4	-4,5*

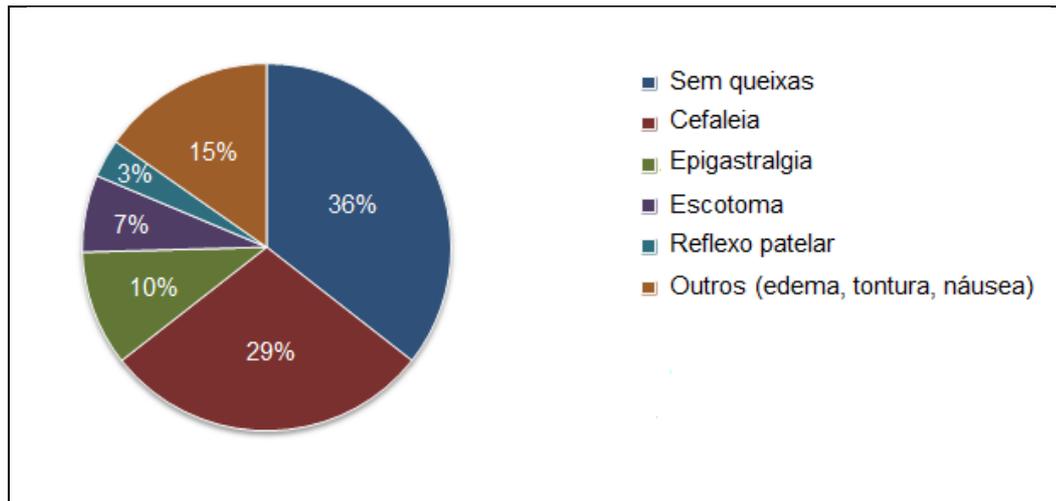
\*Localização da diferença: Resíduo  $\geq 1,96$  e Resíduo  $\geq -1,96$ .

PEG: grupo de gestantes com PE grave; PEL: grupo de gestantes com PE leve; NG: grupo de gestantes normotensas; CNG: grupo de mulheres não gestantes.

Foi observado maior número de mulheres nulíparas no grupo CNG. Em relação à ocorrência de duas ou mais gestações, no grupo GN foi maior e no CNG, menor. Nenhum grupo se destacou na ocorrência de uma gestação.

No que se refere à história pregressa e familiar de PE, 05 gestantes (14%) do grupo PE relataram a ocorrência dessa doença em gestação anterior, 08 (23%) relataram PE em parentes de primeiro grau e 02 (6%) em ambos os casos. Apenas 02 gestantes (6%) fizeram reprodução assistida.

Com relação à sintomatologia clínica, 24 gestantes (64%) com PE relataram sintomas, sendo que 10 (29%) relataram cefaleia, 04 (10%) epigastralgia, 03 (7%) escotoma, 01 (3%) reflexo patelar aumentado e 06 (15%) outros sintomas. O gráfico representativo dos principais sintomas observados no grupo de gestantes com PE encontra-se apresentado na **Figura 11**.



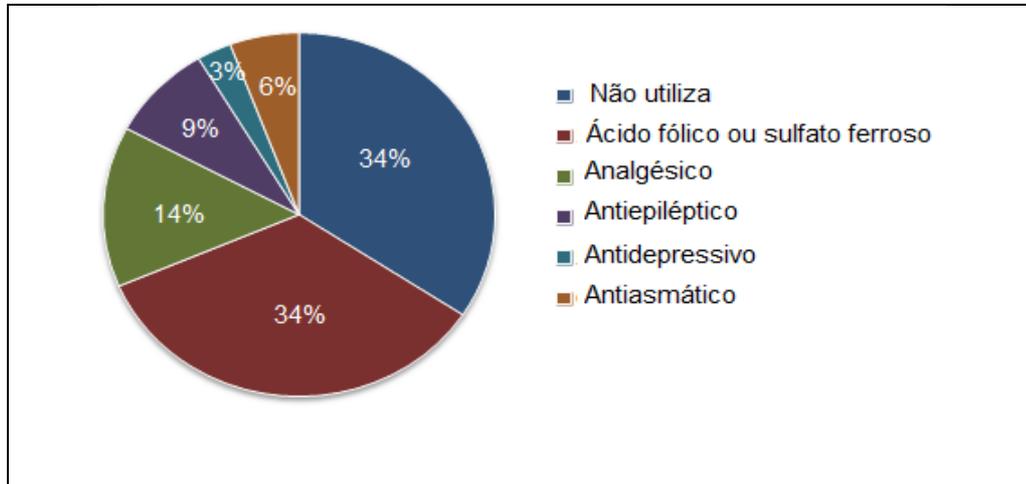
**Figura 11 – Principais sintomas das gestantes com PE.**

A presença de edema foi observada, em graus variados, em 16 gestantes (48%) com PE, sendo +1 em 04 gestantes (12%), +2 em 10 (30%), +3 em 01 (3%) e +4 em 01 (3%). Não foi verificada associação entre a intensidade do edema e a gravidade da PE ( $p=0,25$ ). A gravidez gemelar foi observada em 05 gestantes (14%) com PE. Não foi verificada associação entre a ocorrência de gestação múltipla e a gravidade da PE ( $p=0,06$ ).

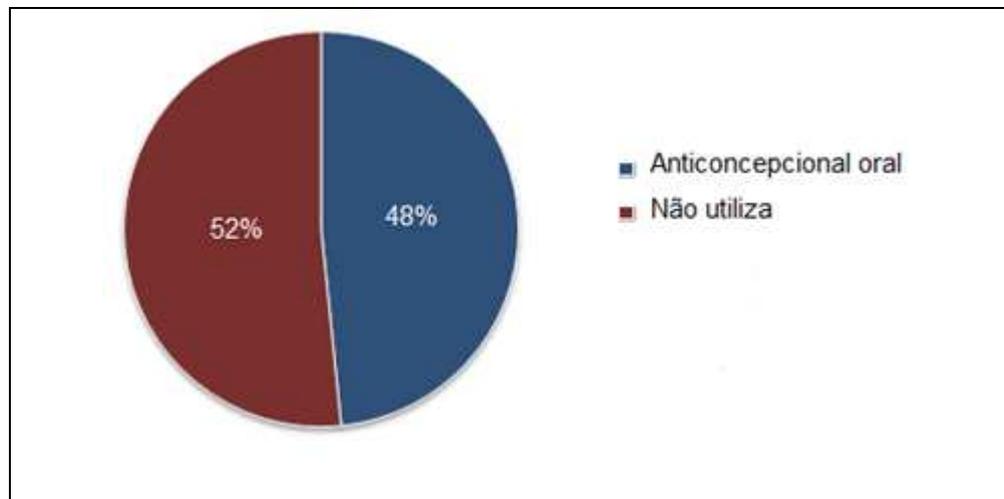
A terapia anti-hipertensiva utilizada em 33 gestantes (94%) com PE incluiu nifedipina em 21 gestantes (59%), metildopa em 09 (26%) e hidralazina em 03 (9%). Para amenizar a epigastralgia foram administrados a 04 gestantes (6%) omeprazol ou ranitidina. Para a prevenção das crises convulsivas foi utilizado sulfato de magnésio em 04 gestantes (6%) e para induzir a maturação pulmonar do feto, visando à interrupção da gestação, foi administrado betametasona ou dexametasona a 18 gestantes (26%). Foi também administrado misoprostol para induzir o parto em 04 gestantes (6%) e hioscina, como antiespasmódico a 06 (9%). Apesar da internação hospitalar e das tentativas terapêuticas de controle da hipertensão, 02

gestantes (5,7%) evoluíram para síndrome HELLP. Não foi verificado nenhum caso de eclâmpsia.

Os medicamentos utilizados pelos grupos GN e CNG estão representados nas **Figuras 12 e 13**, respectivamente.



**Figura 12** – Principais medicamentos utilizados pelo grupo de gestantes normotensas.



**Figura 13** – Principais medicamentos utilizados pelo grupo de mulheres não gestantes.

## 5.2 Avaliação dos parâmetros laboratoriais das gestantes com PE

Os dados laboratoriais das gestantes com PE, obtidos a partir dos prontuários médicos, estão apresentados na **Tabela 6**.

**Tabela 6 – Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE (n=35).**

Parâmetros	Média/Mediana	DP/IQ	Significância
Nº de hemácias x 10 <sup>6</sup> /µL	4,1	5,5	0,54
Hemoglobina (g/dL)	12,0	1,5	0,94
Hematócrito (%)	35,6	4,5	0,99
VCM (fL)	88,2	7,6	0,82
HCM (pg)	29,2	2,9	0,58
CHCM (g/dL)	33,1	1,2	0,27
RDW (%)	14,6	1,9	0,19
Nº plaquetas x 10 <sup>3</sup> /µL	239,0	78,0	0,21
Global de leucócitos x 10 <sup>3</sup> /µL <sup>#</sup>	11,0	4,5	0,43
Neutrófilos bastonetes/µL <sup>#</sup>	0,0	124,5	0,60
Neutrófilos segmentados x 10 <sup>3</sup> /µL	7,9	2,9	0,50
Eosinófilos/µL <sup>#</sup>	80,0	127	0,00*
Basófilos/µL <sup>#</sup>	0,0	0,0	0,64
Linfócitos x 10 <sup>3</sup> /µL	2,0	644,6	0,43
Monócitos/µL	627,9	273,6	0,76
AST (U/L) <sup>#</sup>	21,0	14,0	0,11
ALT (U/L) <sup>#</sup>	21,0	14,0	0,79
LDH (U/L) <sup>#</sup>	278,0	277,5	0,83
Bilirrubina total (mg/dL) <sup>‡</sup>	0,5	0,3	-
Bilirrubina direta (mg/dL) <sup>#‡</sup>	0,1	0,1	-
Bilirrubina indireta (mg/dL) <sup>‡</sup>	0,2	0,1	-
Ácido úrico (mg/dL) <sup>#</sup>	4,6	1,5	0,01*
Creatinina (mg/dL)	0,7	0,2	0,5
Ureia (mg/dL) <sup>#</sup>	24,5	13,3	0,53
Proteinúria (mg/dL) <sup>#</sup>	74,0	278,5	0,03*
Proteinúria (g/24h) <sup>#</sup>	0,8	4,1	0,01*
Proteinúria fita <sup>1</sup>			
Positiva			0,08
+1	6 (85,7%)		
+2	0 (0,0%)		
+3	5 (94,3%)		
+4	1 (14,3%)		

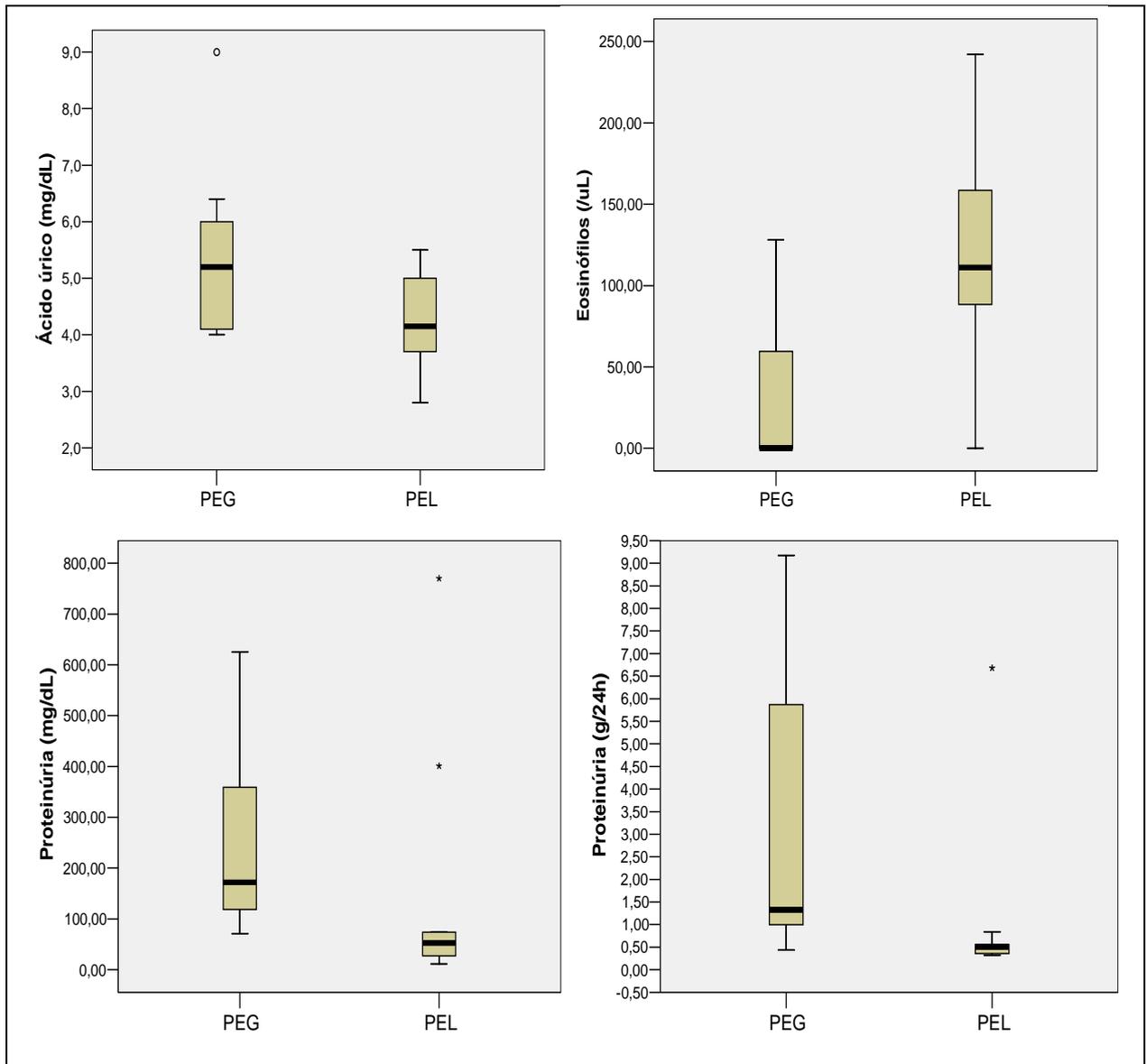
VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: *red cell distribution width*; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; LDH: lactato desidrogenase.

<sup>#</sup>Dados apresentados como mediana±intervalo interquartil (IQ). Para as variáveis que seguem a normalidade, os dados são apresentadas como média±desvio padrão (DP). <sup>‡</sup>Dados obtidos apenas para gestantes com PE leve. <sup>1</sup> Frequência absoluta (relativa). \*p≤0,05, comparando-se PE grave (PEG) e PE leve (PEL).

A análise da **Tabela 6** mostra que a média da contagem de neutrófilos, as medianas da contagem global de leucócitos e da proteinúria estavam acima da faixa de referência (2.900 a 7.200/ $\mu$ L, 5.000 a 10.000/ $\mu$ L e negativa, respectivamente). Outros parâmetros do hemograma, a atividade das enzimas hepáticas, a concentração de bilirrubina, bem como os marcadores de função renal apresentaram média ou mediana dentro do intervalo de referência.

Embora as medianas das atividades das enzimas hepáticas estivessem dentro da faixa de referência, 05 gestantes (14,3%) do grupo PE apresentaram elevação da atividade da alanina aminotransferase (ALT), 04 (11,4%) da aspartato aminotransferase (AST) e 05 (14,3%) da lactato desidrogenase (LDH).

Os parâmetros que apresentaram diferença significativa entre os grupos PEG e PEL estão identificados na **Tabela 6** e representados na **Figura 14**. As medianas da concentração sérica de ácido úrico e da proteinúria em amostras de urina isolada e de 24 horas foram superiores no grupo com PE grave em relação ao grupo com PE leve. Curiosamente, a mediana da contagem de eosinófilos foi inferior no grupo com PE grave em relação ao de PE leve.



**Figura 14 – Mediana e intervalo interquartil dos níveis de ácido úrico, contagem de eosinófilos, proteinúria de amostra isolada e de 24 horas nos grupos de gestantes com PE grave (PEG) e leve (PEL).**

### 5.3 Avaliação de marcadores plaquetários e da expressão de fator tissular em monócitos

Neste estudo foram avaliados o número de plaquetas, bem como a expressão dos biomarcadores de ativação plaquetária (P-selectina, GPIIb/IIIa, GPIIIa e GPIX), a formação de APM, APN e a expressão de FT em monócitos, por CF.

Na **Tabela 7** encontram-se os resultados da contagem de plaquetas e da expressão dos biomarcadores de ativação plaquetária (P-selectina, GPIIb/IIIa, GPIIIa e GPIX) obtidos para as gestantes com PE (PEG e PEL), GN e CNG.

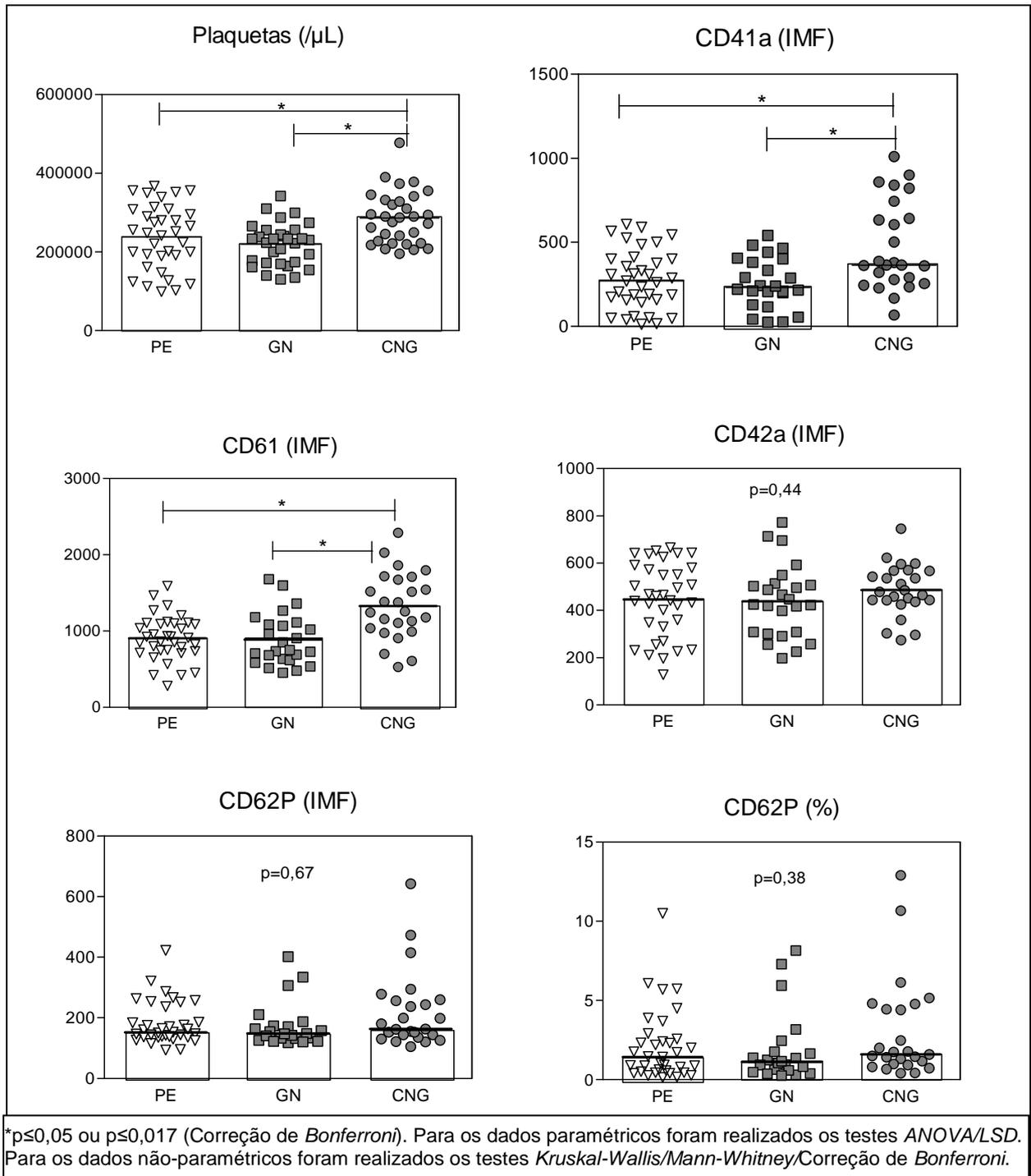
**Tabela 7 – Contagem de plaquetas e marcadores de ativação plaquetária obtidos para os grupos PE (PEG e PEL), GN e CNG.**

Parâmetros	PE (n=35)	PEG (n=15)	PEL (n=20)	GN (n=25) <sup>#</sup>	CNG (n=25) <sup>#</sup>
Nº de plaquetas x 10 <sup>3</sup> /µL†	238,4 (81,7)	223,7 (94,9)	249,4 (70,9)	219,3 (53,6)	286,2 (67,0)
IMF CD41a	278,3 (178,0)	253,0 (182,5)	297,3 (176,8)	239,9 (239,5)	364,9 (426,1)
IMF CD61	903,9 (292,3)	855,7 (323,0)	940,0 (270,8)	888,0 (339,4)	1330,6 (441,1)
IMF CD42a†	446,0 (155,6)	463,3 (170,0)	433,0 (147,1)	439,0 (152,3)	486,2 (108,9)
IMF CD62P	152,2 (99,4)	150,3 (55,9)	157,8 (110,6)	154,1 (126,2)	163,1 (118,3)
CD62P (%)	1,4 (2,1)	1,4 (2,0)	1,2 (2,1)	1,2 (3,9)	1,6 (4,0)

IMF: intensidade média de fluorescência.

<sup>#</sup>Para Nº de plaquetas x 10<sup>3</sup>/µL considerar n=31. †Os dados paramétricos são representados como média (desvio padrão). Os dados não-paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil).

A **Figuras 15 e 16** ilustram os resultados obtidos para a contagem de plaquetas e a expressão dos biomarcadores de ativação plaquetária nos grupos PE, GN e CNG e após a subdivisão do grupo de gestantes com PE em grave e leve.

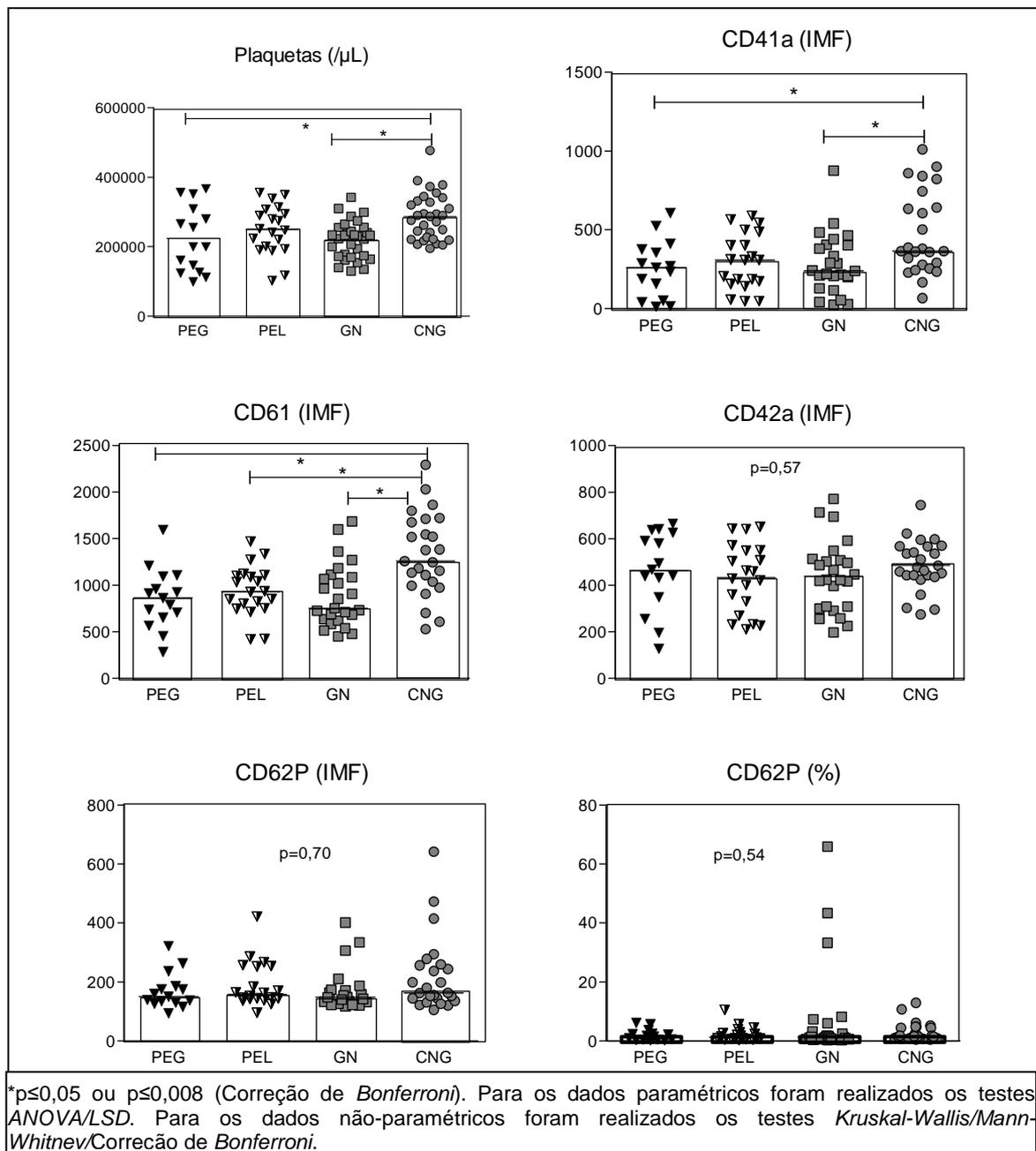


**Figura 15 – Contagem de plaquetas, intensidade média de fluorescência do CD41a, CD61, CD42a, CD62P e percentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup> nos grupos PE, GN e CNG.**

A comparação das médias da contagem de plaquetas revelou um valor menor no grupo de gestantes com PE em relação ao CNG ( $p=0,01$ ) e no grupo GN em relação ao CNG ( $p=0,00$ ). Não houve diferença entre as médias dos grupos PE e GN ( $p=0,26$ ).

Para a mediana da IMF do CD41a e a média de IMF do CD61 foram obtidos valores inferiores no grupo com PE em relação ao CNG ( $p=0,00$  em ambos) e no grupo de GN em relação ao CNG ( $p=0,01$  e  $p=0,00$ , respectivamente). Não houve diferença entre os grupos PE e GN ( $p=0,10$  e  $p=0,87$ , respectivamente).

A comparação estatística das médias de IMF do CD42a e das medianas da IMF do CD62P, bem como da porcentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup>, nos três grupos, não apresentou diferença significativa ( $p=0,44$ ,  $p=0,67$  e  $p=0,38$ , respectivamente).



**Figura 16 – Contagem de plaquetas, intensidade média de fluorescência do CD41a, CD61, CD42a, CD62P e porcentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup> nos grupos PEG, PEL, GN e CNG.**

Foi observada uma redução da média da contagem de plaquetas no grupo PEG em relação ao CNG ( $p=0,01$ ). Não houve diferença entre as médias dos grupos PEG e PEL ( $p=0,28$ ), PEG, PEL e GN ( $p=0,84$  e  $p=0,13$ , respectivamente) e entre os grupos PEL e CNG ( $p=0,66$ ).

Para a mediana da IMF do CD41a foi observada menor expressão no grupo PEG em relação ao CNG ( $p=0,00$ ). A comparação entre os demais grupos: PEG e PEL ( $p=0,48$ ), PEG e GN ( $p=0,69$ ), PEL e GN ( $p=0,73$ ), PEL e CNG ( $p=0,10$ ) não apresentou diferença.

A média da IMF do CD61 foi inferior nos grupos PEG e PEL em relação ao CNG ( $p=0,00$  para ambos). A comparação entre os demais grupos: PEG e PEL ( $p=0,49$ ), PEG e GN ( $p=0,79$ ), PEL e GN ( $p=0,63$ ) não apresentou diferença.

A comparação da média da IMF do CD42a, das medianas do CD62P, bem como da percentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup>, nos quatro grupos, não apresentou diferença ( $p=0,57$ ,  $p=0,70$  e  $p=0,54$ , respectivamente).

Na **Tabela 8** estão representadas as razões entre as IMF dos marcadores de superfície plaquetária obtidas para as gestantes com PE (PEG e PEL), GN e CNG.

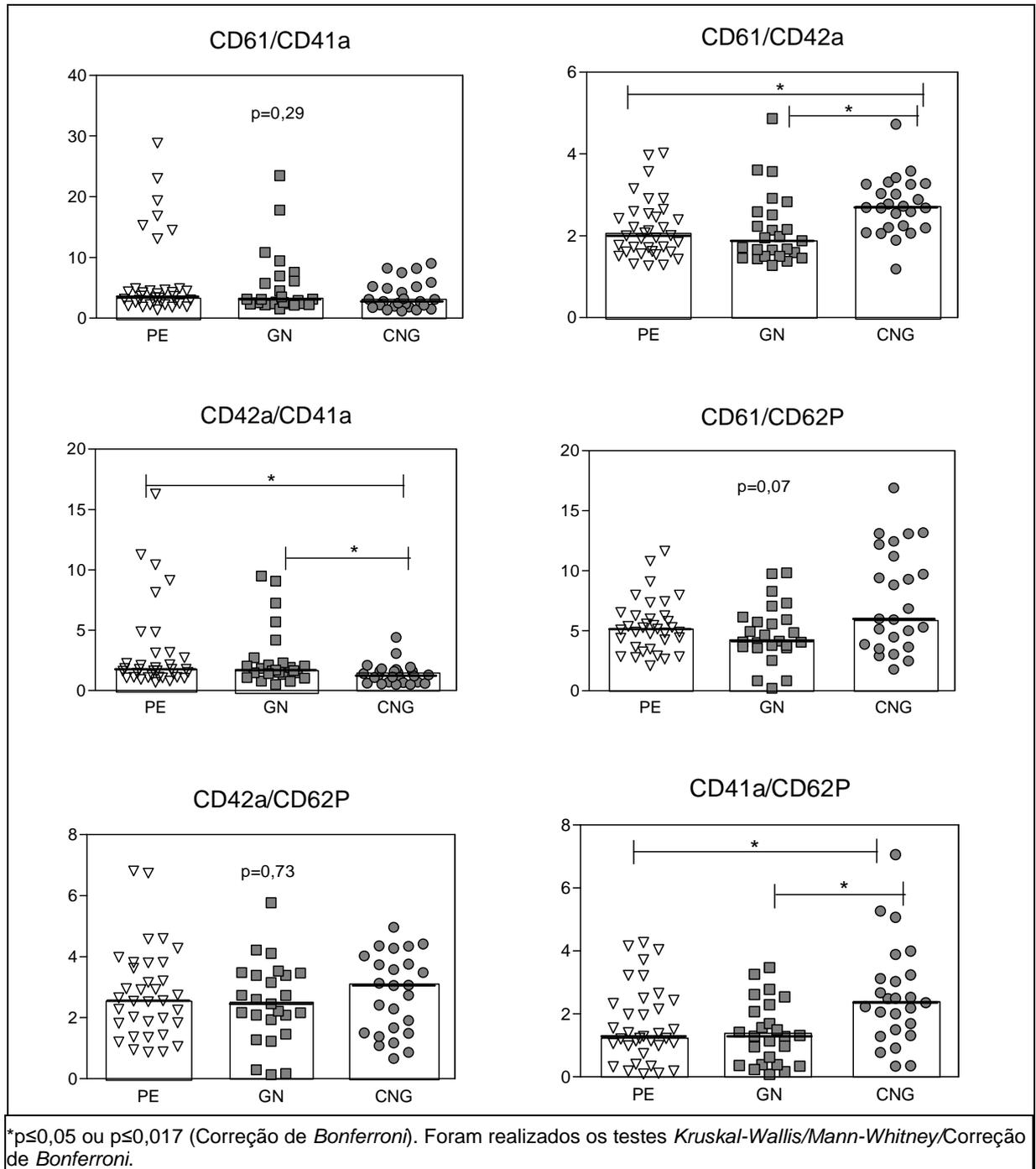
**Tabela 8 – Razões entre as IMF dos marcadores de superfície plaquetária obtidas para os grupos PE (PEG e PEL), GN e CNG.**

Parâmetros	PE (n=35)	PEG (n=15)	PEL (n=20)	GN (n=25)	CNG (n=25)
IMF CD61/CD41a	3,6 (2,3)	4,2 (12,1)	3,3 (1,9)	3,1 (4,2)	2,8 (3,8)
IMF CD61/CD42a	2,0 (0,9)	1,8 (0,70)	2,3 (0,7)	1,9 (1,1)	2,7 (0,7)
IMF CD42a/CD41a	1,7 (2,0)	1,8 (8,0)	1,6 (1,0)	1,7 (1,1)	1,2 (1,0)
IMF CD61/CD62P	5,2 (2,6)	5,4 (2,5)	5,4 (2,1)	4,8 (2,5)	7,6 (4,2)
IMF CD42a/CD62P	2,6 (2,0)	3,0 (1,6)	2,5 (1,6)	2,5 (1,3)	2,8 (1,3)
IMF CD41a/CD62P	1,2 (1,5)	1,6 (1,3)	1,7 (1,2)	1,4 (1,0)	2,6 (1,6)

IMF: intensidade média de fluorescência.

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil).

As **Figuras 17 e 18** ilustram as razões entre as IMF dos marcadores de superfície plaquetária, nos grupos PE, GN e CNG e após a subdivisão do grupo de gestantes com PE (PEG e PEL), respectivamente.

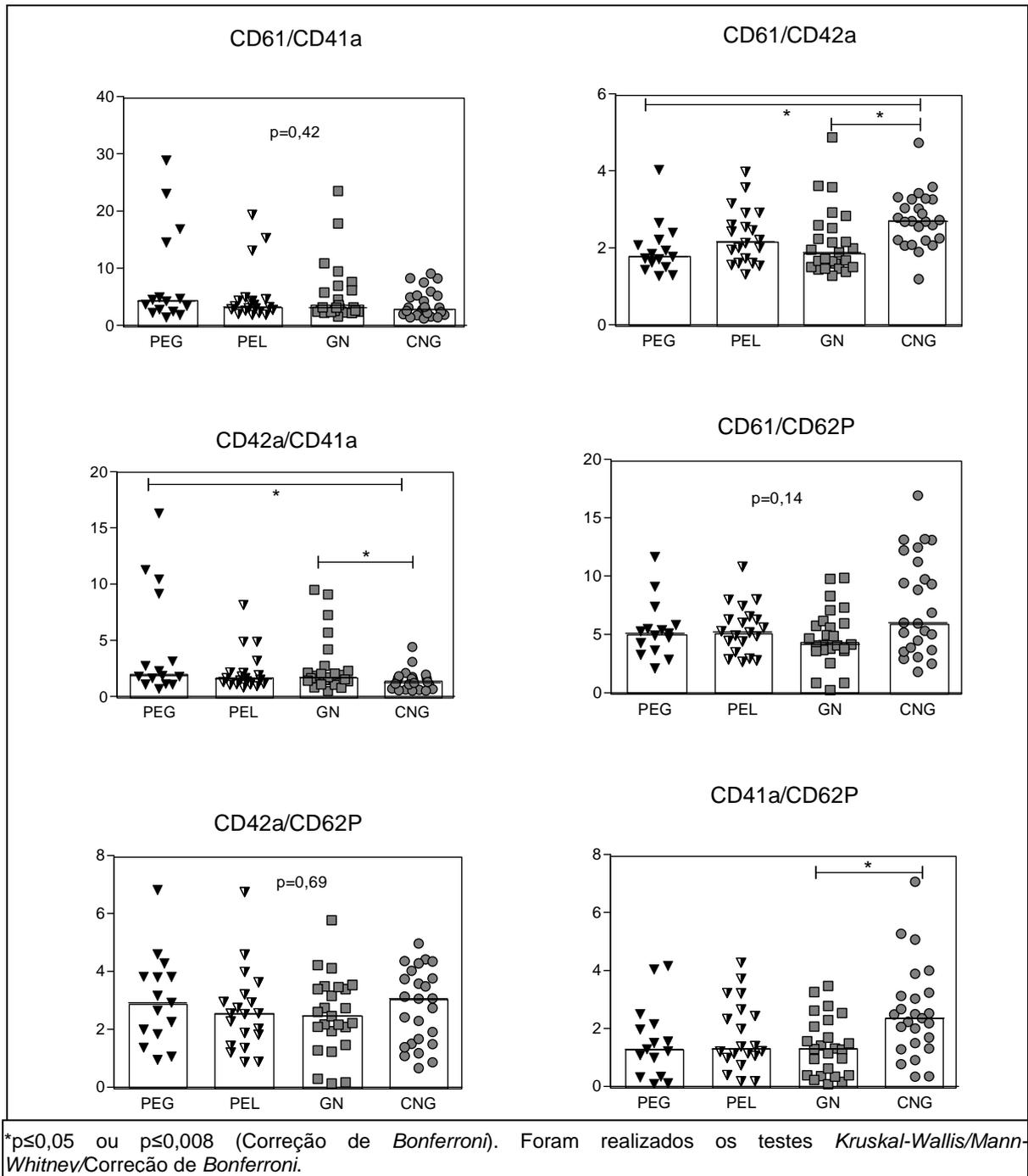


**Figura 17** – Razão entre as intensidades médias de fluorescência de CD61/CD41a, CD61/CD42a, CD42a/CD41a, CD61/CD62P, CD42a/CD62P e CD41a/CD62P nos grupos PE, GN e CNG.

As medianas da razão entre as IMF do CD61/CD42a e CD41a/CD62P foram menores no grupo PE em relação ao CNG ( $p=0,00$  e  $p=0,015$ , respectivamente) e no GN em relação ao CNG ( $p=0,00$  e  $p=0,01$ ). A comparação das medianas entre os grupos PE e GN não apresentou diferença significativa ( $p=0,57$  e  $p=0,56$ , respectivamente).

Para a mediana da razão IMF do CD42a/CD41a foram obtidos valores superiores no grupo PE em relação ao CNG ( $p=0,00$ ) e no grupo GN em relação ao CNG ( $p=0,00$ ). A comparação das medianas entre os grupos PE e GN não apresentou diferença significativa ( $p=0,57$ ).

A comparação das medianas das razões de IMF do CD61/CD41a, do CD61/CD62P e do CD42a/CD62P, nos três grupos, não apresentou diferença significativa ( $p=0,29$ ,  $p=0,07$  e  $p=0,73$ , respectivamente).



**Figura 18** – Razão entre as intensidades médias de fluorescência de CD61/CD41a, CD61/CD42a, CD42a/CD41a, CD61/CD62P, CD42a/CD62P e CD41a/CD62P nos grupos PEG, PEL GN e CNG.

A mediana da razão entre as IMF do CD61/CD42a foi menor no grupo PEG em relação ao CNG ( $p=0,00$ ). A comparação entre os demais grupos: PEG e PEL ( $p=0,10$ ), PEG e GN ( $p=0,67$ ), PEL e GN ( $p=0,23$ ), PEL e CNG ( $p=0,10$ ) não apresentou diferença significativa.

Entretanto, para a mediana da razão entre as IMF do CD42a/CD41a foram obtidos valores superiores no grupo PEG em relação ao CNG ( $p=0,00$ ). A comparação entre os demais grupos: PEG e PEL ( $p=0,10$ ), PEG e GN ( $p=0,67$ ), PEL e GN ( $p=0,23$ ), PEL e CNG ( $p=0,10$ ) não apresentou diferença significativa.

As medianas da razão da IMF do CD41a/CD62P foi maior no grupo CNG em relação ao GN ( $p=0,01$ ) como descrito anteriormente. A comparação entre os demais grupos: PEG e PEL ( $p=0,67$ ), PEG e GN ( $p=0,94$ ), PEG e CNG ( $p=0,10$ ), PEL e GN ( $p=0,41$ ), PEL e CNG ( $p=0,06$ ) não apresentou diferença significativa.

A comparação das medianas das razões de IMF do CD61/CD41a, do CD61/CD62P e do CD42a/CD62P, nos quatro grupos, não apresentou diferença significativa ( $p=0,42$ ,  $p=0,14$  e  $p=0,69$ , respectivamente).

Na **Tabela 9** estão representadas as percentagens de APM, APN e de monócitos FT<sup>+</sup> obtidas para as gestantes com PE (PEG e PEL), GN e CNG.

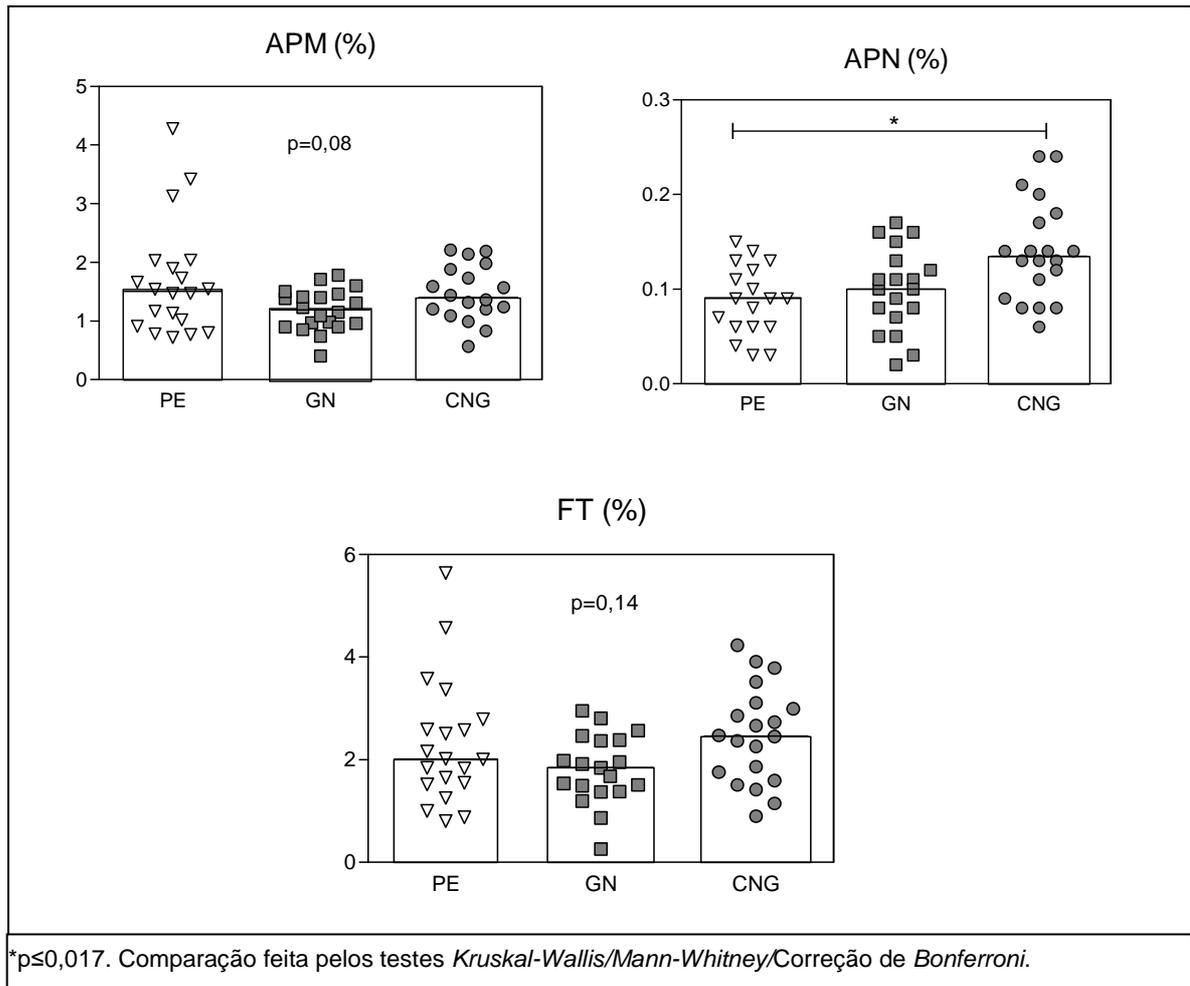
**Tabela 9 – Percentagem de agregados plaquetas-monócitos, plaquetas-neutrófilos e de monócitos expressando fator tissular para os grupos PE (PEG e PEL), GN e CNG.**

Parâmetros	PE (n=20)	PEG (n=8)	PEL (n=12)	GN (n=20)	CNG (n=20)
APM (%)	1,47 (1,12)	1,13 (1,26)	1,51 (0,94)	1,27 (0,50)	1,50 (0,68)
APN (%)	0,09 (0,07)	0,09 (0,05)	0,09 (0,07)	0,11 (0,08)	0,14 (0,09)
CD14 <sup>+</sup> /FT <sup>+</sup> (%)	2,01 (1,27)	1,83 (1,07)	2,09 (1,88)	1,91 (1,03)	2,41 (1,05)

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil).

APM: agregados plaquetas-monócitos; APN: agregados plaquetas-neutrófilos; FT: fator tissular.

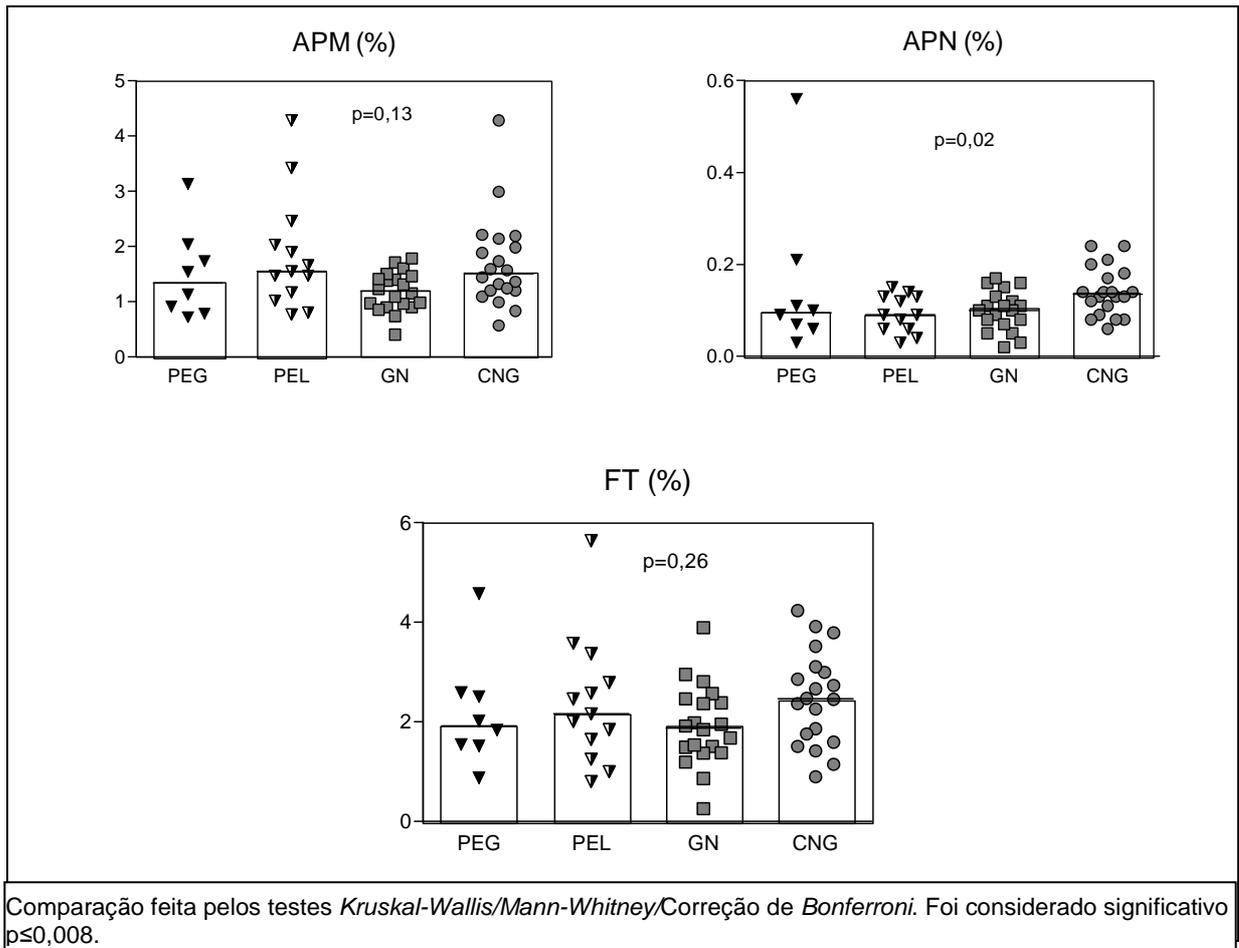
As **Figuras 19** e **20** ilustram as percentagens de APM, APN e de monócitos FT<sup>+</sup> para os grupos PE, GN e CNG e após a subdivisão do grupo de gestantes com PE nas formas grave e leve, respectivamente.



**Figura 19 – Percentagem de APM, APN e de monócitos expressando fator tissular nos grupos PE, GN e CNG.**

A comparação estatística das medianas da percentagem de APM e de monócitos FT<sup>+</sup>, nos três grupos, não apresentou diferença significativa ( $p=0,08$  e  $p=0,14$ , respectivamente).

A mediana da percentagem de APN foi menor no grupo com PE em relação ao CNG ( $p=0,01$ ). A comparação entre os demais grupos: PE e GN ( $p=0,42$ ), GN e CNG ( $p=0,02$ ) não apresentou diferença significativa, uma vez que utilizando a correção de Bonferroni, foram considerados significativos valores de  $p \leq 0,017$ .



**Figura 20 – Percentagem de APM, APN e de monócitos FT<sup>+</sup> nos grupos PEG, PEL, GN e CNG.**

A comparação das medianas da percentagem de APM, APN e de monócitos FT<sup>+</sup>, nos quatro grupos, não apresentou diferenç a significativa ( $p=0,13$ ,  $p=0,02$  e  $p=0,26$ , respectivamente).

#### 5.4 Análise multivariada dos parâmetros clínicos e hemostáticos

Visando avaliar a associação dos parâmetros clínicos e hemostáticos com o desenvolvimento da PE, foi primeiramente realizada uma análise univariada, ajustada ao Modelo linear generalizado de *Poisson*, considerando a presenç a e a ausência de PE como variável dependente. Os parâmetros analisados nesse primeiro momento são apresentados no **ANEXO I**.

Para as variáveis significativas ( $p \leq 0,20$ ), foi realizada a análise multivariada utilizando-se o Modelo linear generalizado de *Poisson*. As candidatas para o modelo

foram: “gravidez múltipla” ( $p=0,00$ ), “IMC” ( $p=0,021$ ), “plaquetas CD62P<sup>+</sup>” ( $p=0,013$ ), “APM” ( $p=0,001$ ) e “monócitos FT<sup>+</sup>” ( $p=0,12$ ). Foi observada a associação independente dessas variáveis com a PE.

A primeira variável a ser retirada foi “monócitos FT<sup>+</sup>” ( $p=0,520$ ) e a segunda foi “plaquetas CD62P<sup>+</sup>” ( $p=0,530$ ), considerando-se significativo  $p \leq 0,05$ . O modelo final foi composto pelas variáveis apresentadas na **Tabela 10**.

**Tabela 10 – Modelo linear generalizado de Poisson, considerando como variável dependente a presença e ausência de PE.**

Parâmetro	p	Razão de prevalência	IC
Gravidez múltipla	0,003	2,28	1,33; 3,91
IMC	0,000	1,08	1,03; 1,13
APM	0,001	1,55	1,20; 2,00

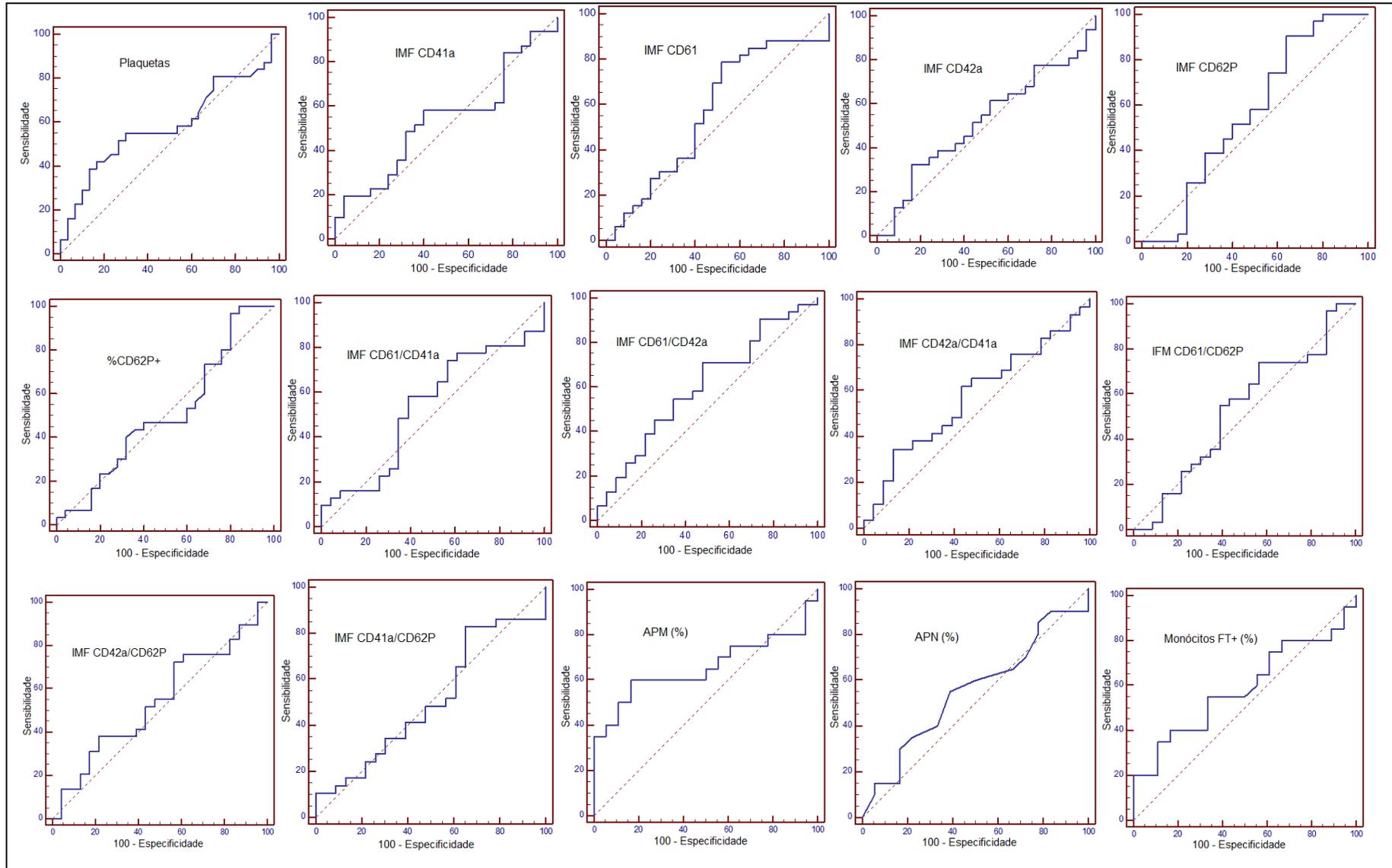
IMC: índice de massa corporal; APM: agregados plaquetas-monócitos; IC: intervalo de confiança  
 $*p \leq 0,05$ . Teste *Deviance* de qualidade de ajuste do modelo ( $p=0,574$ ) considerado adequado ( $p \geq 0,05$ ).

De acordo com a **Tabela 10** pode-se concluir que a presença de gestação múltipla confere uma chance 2,28 vezes maior para o desenvolvimento de PE. Da mesma forma, elevação de uma unidade do IMC (considerando como referência para gestantes normotensas  $IMC=25\text{Kg/m}^2$ ) aumenta em 1,08 vezes a chance de uma gestante desenvolver PE. Para os APM, o aumento de 1% desse parâmetro (considerando como referência o valor obtido para gestantes normotensas, 1,1%) eleva em 1,55 vezes a chance de ocorrência da doença.

## 5.5 Avaliação do poder diagnóstico dos marcadores hemostáticos

Para avaliar o poder dos marcadores de ativação plaquetária, a contagem de plaquetas e a expressão de FT em monócitos, no diagnóstico/prognóstico da PE, foi realizada a curva ROC (**Figura 21**) e foi determinada a AUC, estabelecidas a sensibilidade, a especificidade, bem como os valores de *cut off* para esses parâmetros (**Tabela 11**).

A curva ROC não apresentou, para nenhum dos parâmetros estudados, uma área significativa ( $p \leq 0,05$ ), indicando um poder diagnóstico, para a PE, limitado. Além disso, não foi possível obter um ponto de corte com sensibilidade e especificidade simultaneamente elevadas.



**Figura 21 – Área sob a curva ROC dos parâmetros hemostáticos.**

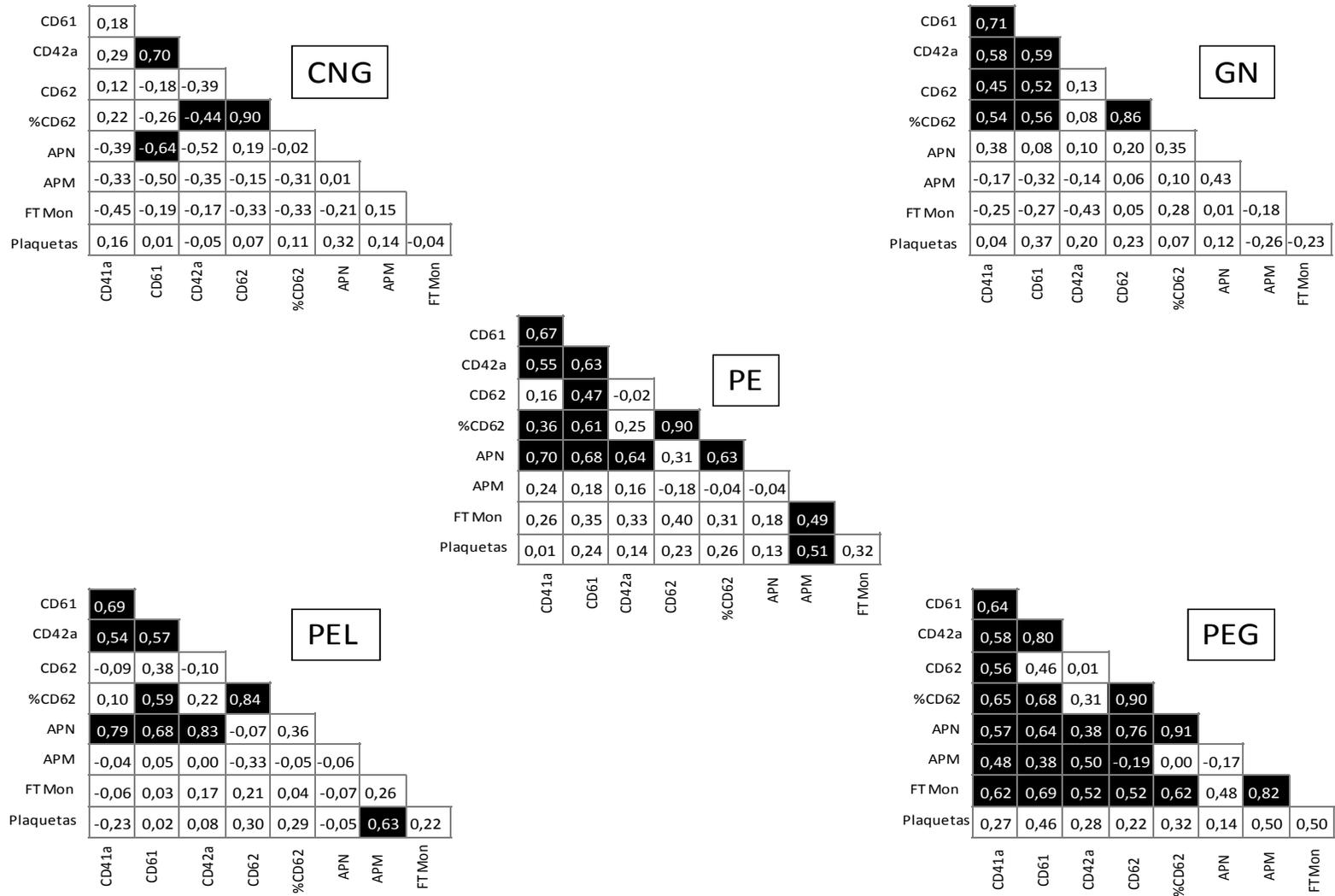
**Tabela 11 – Análise dos parâmetros hemostáticos pela curva ROC.**

Parâmetros	AUC	IC (AUC)	p	Cut off	Sensibilidade	Especificidade
Nº plaquetas x 10 <sup>3</sup> /µL	0,58	0,45; 0,71	0,26	274,0	38,7	86,7
IMF CD41a	0,54	0,40; 0,67	0,65	242,1	58,1	60,0
IMF CD61	0,57	0,43; 0,70	0,40	732,6	78,8	48,0
IMF CD42a	0,52	0,38; 0,65	0,85	548,6	32,3	84,0
IMF CD62P	0,57	0,43; 0,70	0,43	133,8	90,3	36,0
CD62P (%)	0,51	0,37; 0,65	0,91	5,7	96,7	20,0
IMF CD61/CD41a	0,53	0,39; 0,67	0,69	3,2	58,1	60,9
IMF CD61/CD42a	0,60	0,46; 0,73	0,19	1,7	71,0	52,2
IMF CD42a/CD41a	0,57	0,43; 0,71	0,34	1,3	34,5	87,0
IMF CD61/CD62P	0,53	0,39; 0,67	0,73	4,1	74,2	21,7
IMF CD42a/CD62P	0,54	0,40; 0,68	0,60	2,03	37,9	78,3
IMF CD41a/CD62P	0,51	0,36; 0,65	0,93	0,97	82,8	34,8
APM (%)	0,66	0,48; 0,80	0,09	1,46	60,0	83,3
APN (%)	0,55	0,38; 0,71	0,59	0,09	55,0	61,1
Monócitos FT <sup>+</sup> (%)	0,59	0,42; 0,74	0,35	2,57	35,0	88,9

IMF: intensidade média de fluorescência; APM: agregados plaquetas-monócitos; APN: agregados plaquetas-neutrófilos; FT: fator tissular; AUC: área sob a curva ROC; IC: intervalo de confiança.

## 5.6 Correlação entre contagem de plaquetas e parâmetros citométricos

Visando avaliar a correlação entre a contagem de plaquetas e os parâmetros citométricos, foi realizada a Correlação de *Spearman*. Na **Figura 22** estão apresentados os coeficientes de correlação (r) obtidos para todos os parâmetros em cada um dos grupos estudados. No grupo CNG foram observadas quatro correlações significativas, sendo duas fortes e duas moderadas. No grupo GN foram observadas oito correlações significativas, sendo duas fortes e seis moderadas. No grupo de gestantes com PE foram observadas 13 correlações significativas, sendo duas fortes e 11 moderadas. Quando as correlações foram feitas observando a forma clínica da doença, foram verificadas nove correlações significativas, sendo três fortes e seis moderadas dentre as gestantes com PE leve e 22 para aquelas com PE grave, sendo cinco fortes, 16 moderadas e uma fraca.

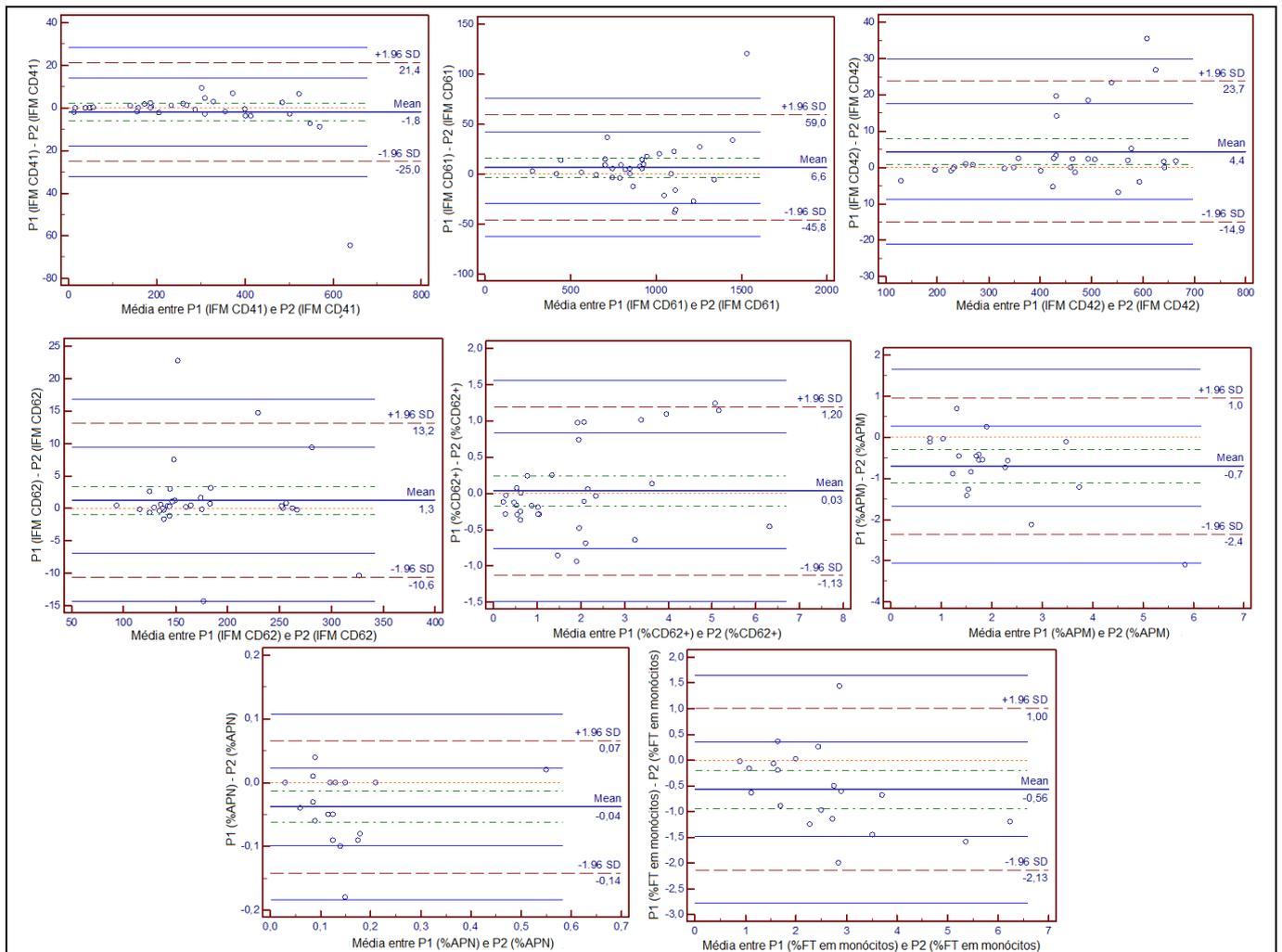


Em preto estão os valores de r que foram significativos ( $p \leq 0,05$ ). CNG: mulheres não gestantes; GN: gestantes normotensas; PE: pré-eclâmpsia; PEL: pré-eclâmpsia leve; PEG: pré-eclâmpsia grave.

**Figura 22 – Coeficientes de correlação (r) para os parâmetros citométricos e para a contagem de plaquetas, por grupo avaliado.**

## 5.7 Avaliação da concordância entre as análises feitas por citometria de fluxo

Para avaliar a concordância entre as análises feitas por CF, foram comparados os dados obtidos por dois avaliadores distintos, a partir do gráfico de *Bland* e *Altman*. Na **Figura 23** estão apresentados os gráficos obtidos para o grupo de gestantes com PE, que foram semelhantes àqueles para GN e CNG.



P1: avaliador 1; P2: avaliador 2; IMF: intensidade média de fluorescência; APM: agregados plaquetas-monócitos; APN: agregados plaquetas-neutrófilos; FT: fator tissular.

**Figura 23** – Gráficos de *Bland* e *Altman* para o grupo de gestantes com PE.

A avaliação dos gráficos de *Bland* e *Altman* para PE, GN e CNG indicou a existência de boa concordância entre as análises feitas por dois avaliadores distintos.

# 6 DISCUSSÃO

## 6.1 Considerações gerais

A PE é uma doença complexa cuja etiologia ainda não é totalmente conhecida. O desenvolvimento dessa doença está associado a uma invasão trofoblástica aberrante no início da gestação, o que pode sustentar a hipótese de que as plaquetas estejam ativadas em um estágio precoce da gravidez. Há evidências de que a ativação plaquetária precede o aparecimento dos sintomas clínicos (FALCONER *et al.*, 1987; VANTROYEN & VANSTRAELEN, 2002).

Embora alguns exames auxiliares façam parte da monitorização da gestante com suspeita de PE, o diagnóstico é feito essencialmente com base nos dados clínicos, medida da pressão arterial e determinação da proteinúria (GRILL *et al.*, 2009). A medida da pressão arterial está, sabidamente, sujeita a alterações posturais e emocionais. A proteinúria é rotineiramente detectada por meio de fita reagente, ou mensurada quantitativamente em amostra de urina isolada ou de 24 horas, testes que também apresentam limitações. Dessa forma, uma grande limitação aos estudos envolvendo a PE é a dificuldade do seu diagnóstico, o que pode acarretar conclusões errôneas e justificar a variabilidade de resultados encontrados na literatura.

Sabe-se que vários fatores estão associados à ocorrência de PE, como a hipertensão crônica, diabetes pré e gestacional, obesidade, doença renal, estados de hipercoagulabilidade, presença de doença vascular, síndrome dos anticorpos antifosfolípidos, doenças autoimunes, metabólicas e inflamatórias (SIBAI *et al.*, 2005; GRILL *et al.*, 2009). Para evitar possíveis interferências na interpretação dos resultados, todos esses fatores fizeram parte dos critérios de exclusão do presente estudo.

O novo entendimento do processo da coagulação destaca a superfície plaquetária e o FT como essenciais para disparar a sequência de reações em cascata que culmina com a formação do coágulo de fibrina. Coata *et al.* (1992) verificaram que a membrana plaquetária de gestantes com PE apresenta uma composição lipídica anormal. Sabe-se que a ativação plaquetária está associada à alteração conformacional da GPIIb/IIIa, localizada na superfície das plaquetas, favorecendo a ligação ao fibrinogênio, a agregação plaquetária e liberação do conteúdo dos seus grânulos. Dessa forma, a ativação plaquetária poderia contribuir para as alterações

vasculares placentárias e sistêmicas observadas na PE, especialmente pela liberação de substâncias vasoativas, mitogênicas e mioproliferativas (JANES *et al.*, 1995).

Nos processos inflamatórios, trombóticos e nas doenças autoimunes tem sido visto que as plaquetas ativadas interagem com os leucócitos formando agregados que estimulam uma sucessão de eventos intracelulares a partir da expressão de FT na superfície dessas células (KAZMI *et al.*, 2011). Os APL fornecem uma superfície de ancoragem para células inflamatórias nas plaquetas ativadas e favorecem o recrutamento de leucócitos para a superfície tanto das plaquetas ativadas quanto das células endoteliais (ASHMAM *et al.*, 2003; THÉORËT *et al.*, 2006).

Uma vez ativados, os leucócitos secretam diferentes proteases que aumentam a adesão plaquetária mediada pelo FvW. Além disso, essas proteases atuam diretamente na fibrinólise, promovendo a digestão da fibrina ou indiretamente, modulando a degradação parcial de plasminogênio (WOHNER, 2008). Tem sido admitido que a presença de APL constitui um importante parâmetro prognóstico em condições clínicas caracterizadas por injúria vascular e microangiopatia. A percentagem de APL formados depende não somente de condições pró-adesivas, mas também da presença de membranas de contato, representadas pela superfície das plaquetas e dos leucócitos (AREFIEVA *et al.*, 2001; HU *et al.*, 2004).

## **6.2 Características clínicas dos grupos avaliados**

No presente estudo foram avaliadas 97 mulheres, sendo 35 gestantes (36,08%) com PE, das quais 15 (42,86%) apresentavam a forma grave da doença e 20 (57,14%) a forma leve, 31 (31,96%) gestantes normotensas e 31 (31,96%) mulheres não gestantes. As mulheres não gestantes pertenciam à mesma classe social das gestantes, uma vez que estudos sugerem que fatores ambientais estão associados à ocorrência de PE (CUNNINGHAM *et al.*, 2000; REZENDE *et al.*, 2005).

As gestantes com PE foram selecionadas na Maternidade Odete Valadares/Belo Horizonte, na Maternidade Hilda Brandão da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte e no Hospital Municipal Odilon Behrens/Belo Horizonte. As integrantes dos grupos de gestantes normotensas e mulheres não gestantes foram selecionadas no ambulatório do Hospital Municipal Odilon

Behrens/Belo Horizonte e na Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) Guanabara/Betim.

Sabe-se que a PE incide preferencialmente nos extremos da faixa etária fértil (GIBSON *et al.*, 1982; HAWFIELD & FREEDMAN, 2009; ZHONG *et al.*, 2010). A análise da idade das integrantes do estudo (**Tabela 3**) revelou que a média de idade do grupo de mulheres não gestantes foi inferior àquela do grupo com PE ( $p=0,01$ ) e do grupo com PE grave ( $p=0,00$ ). A média da idade das gestantes com PE grave foi superior, em relação às gestantes normotensas ( $p=0,02$ ) (**Tabela 4**). Sabendo-se que a função plaquetária não varia na faixa etária das participantes do estudo (mínima: 19 e máxima: 36 anos), pode-se inferir que a diferença de idade observada nos grupos avaliados não interferiu nos resultados obtidos.

A comparação das gestantes com PE (PEG e PEL separadamente) e normotensas revelou que não houve diferença entre as médias da IG ( $p=0,17$  e  $p=0,30$ , respectivamente). Também não foi observada diferença entre as medianas das gestantes com PE e normotensas em relação ao IEP ( $p=0,16$ ). Contudo, as medianas do IEP no grupo de PE grave foram maiores do que nas gestantes normotensas ( $p=0,012$ ), o que, a princípio, sugere que um período entre partos mais longo favorece a ocorrência de PE, sendo mais evidente nos casos graves da doença (YOUNG *et al.*, 2010).

A média do IMC das gestantes com PE foi superior à das gestantes normotensas ( $p=0,04$ ), embora ainda incluídas no grupo de “sobre-peso”. As gestantes com PE também apresentaram valor médio de IMC superior às não gestantes ( $p=0,00$ ), conforme era esperado. A média do IMC das gestantes com PE grave foi inferior àquela das gestantes com PE leve ( $p=0,03$ ). Curiosamente, as gestantes com PE leve apresentaram valor médio de IMC inferior em relação aos grupos GN ( $p=0,00$ ) e CNG ( $p=0,00$ ). Não houve diferença nas medianas do GPG entre os grupos PE ( $p=0,71$ ), PEG e PEL ( $p=0,64$ ) em relação às gestantes normotensas.

A presença de edema foi observada, em graus variados, em 16 gestantes (48%) com PE, sendo +1 em 04 gestantes (12%), +2 em 10 (30%), +3 em 01 (3%) e +4 em 01 (3%). Contudo, não foi verificada associação entre a intensidade do edema e a gravidade da PE ( $p=0,25$ ). O edema já foi considerado um parâmetro para diagnóstico de PE. No entanto, por ser um achado muito frequente na gestação, esse não é mais um critério diagnóstico.

A comparação das medianas dos níveis pressóricos revelou um aumento desses nas gestantes com PE (sendo superior na PE grave em relação à PE leve) em relação às gestantes normotensas e mulheres não gestantes. Esse achado era esperado, uma vez que pressão sistólica/diastólica igual ou superior a 160 x 110mmHg (para o grupo com PE grave) e 140 x 90mmHg (para o grupo com PE leve), aferida em duas medidas com intervalo de, no mínimo, duas horas e após repouso, constituíram um dos critérios de inclusão do grupo com PE.

A comparação entre gestantes normotensas e mulheres não gestantes revelou uma diminuição das medianas da pressão arterial sistólica ( $p=0,00$ ) e diastólica ( $p=0,001$ ) nas primeiras em relação às últimas. Sabe-se que fisiologicamente há aumento do ritmo cardíaco e do volume sanguíneo na gestação, com diminuição sistêmica da resistência vascular e consequente redução da pressão arterial, durante o segundo trimestre e início do terceiro (SIBAI & MABIE, 1991). Assim, a pressão arterial começa a decrescer no final do primeiro trimestre da gestação, chega a um valor mínimo no segundo e retorna aos valores pré-gestacionais próximo ao parto (REMUZZI & RUGGENENTI, 1991). O estímulo para o aumento do volume sanguíneo parece ser a necessidade de um compartimento intravascular maior, devido à demanda crescente de oxigenação. Em algumas gestantes, observa-se um aumento modesto do volume sanguíneo, em outras, principalmente em gestações gemelares, esse volume praticamente dobra. A hipervolemia fisiológica protege a mãe e o feto dos efeitos prejudiciais da redução do retorno venoso e do débito cardíaco na posição supina, além dos efeitos da perda sanguínea aguda durante e após o parto (CUNNINGHAM & PRITCHARD, 1978).

As variáveis tabagismo, consumo de álcool, realização de atividade física, tipo de parto, ocorrência de parto prematuro e de gravidez gemelar, número de abortos e de filhos vivos, mudança de parceiro sexual e o grupo sanguíneo ABO (constantes no **ANEXO H**) não apresentaram associação com a ocorrência de PE. Apenas a variável “número de gestações” foi significativa ( $p=0,00$ ). A análise de resíduos (**Tabela 5**) mostrou maior ocorrência de duas ou mais gestações no grupo de gestantes normotensas e menor nas mulheres não gestantes. Nenhum grupo se destacou na ocorrência de primigestação. No grupo PE apenas 02 (6%) gestantes fizeram reprodução assistida e 05 (14%) apresentaram gestação gemelar. No que se refere à história pregressa e familiar, 05 (14%) gestantes do grupo PE relataram PE

em gestação anterior, 08 (23%) relataram PE em parentes de primeiro grau e 02 (6%) em ambos os casos.

Estudos da literatura revelam maior incidência da PE em primigestas ou nas mulheres que fizeram reprodução assistida, nas gestações gemelares e nas múltiparas, mas grávidas de um novo parceiro sexual. De fato, neste estudo, apenas o grupo PE incluiu gestantes que fizeram reprodução assistida e com gravidez gemelar. No entanto, não houve maior número de primigestas ou de mulheres com novo parceiro sexual no grupo com PE. Outros fatores de risco para PE incluem o histórico da doença em gestações anteriores ou em parentes de primeiro grau. Neste estudo, cinco gestantes do grupo PE tinham histórico de PE e oito relataram ocorrência de PE em parentes de primeiro grau. O relato de que o tabagismo parece estar associado à redução do risco de ocorrência da PE não foi verificado neste estudo (GRILL *et al.*, 2009; YOUNG *et al.*, 2010). A ausência de associação entre grupo sanguíneo ABO e a ocorrência de PE deve ser analisada com cautela, em função do número pequeno de mulheres avaliado neste estudo e da frequência discrepante entre os quatro grupos sanguíneos.

No grupo com PE, 33 gestantes (94%) receberam terapia anti-hipertensiva, incluindo nifedipina em 21 gestantes (59%), metildopa em 09 (26%) e hidralazina em 03 (9%). Para amenizar a epigastria foi administrado omeprazol ou ranitidina a 04 gestantes (6%). Para a prevenção das crises convulsivas foi utilizado sulfato de magnésio em 04 gestantes (6%) e para induzir a maturação pulmonar do feto visando interromper a gestação, prevenir hemorragia intraventricular, infecção e morte neonatal, foi administrado betametasona ou dexametasona a 18 gestantes (26%). Foi também administrado misoprostol para induzir o parto em 04 gestantes (6%) e hioscina em 06 (9%) como antiespasmódico.

Apesar da internação hospitalar e das terapias específicas para controle da hipertensão, 02 gestantes pré-eclâmpticas (5,7%) evoluíram para a síndrome HELLP. Não foi observado nenhum caso de eclâmpsia.

Com relação à sintomatologia clínica, 24 gestantes (64%) relataram sintomas, sendo que 10 (29%) apresentaram cefaleia, 04 (10%) epigastria, 03 (7%) escotoma, 01 (3%) reflexo patelar aumentado e 06 (15%) outros sintomas, como edema, náusea e tontura. Acredita-se que a cefaleia e o escotoma estejam relacionados ao vasoespasm das arteríolas cerebrais e retinianas,

respectivamente. A epigastralgia provavelmente resulta de necrose hepatocelular, edema e isquemia que distende a cápsula de Glisson (CUNNINGHAM *et al.*, 2000).

### 6.3 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

A monitoração das gestantes com PE é usualmente realizada pela avaliação laboratorial do hemograma, da função hepática (pela determinação da atividade das enzimas aspartato aminotransferase-AST, alanina aminotransferase-ALT e lactato desidrogenase-LDH), de bilirrubinas (total, direta e indireta) e da função renal (ácido úrico, creatinina, ureia e proteinúria) (BURTIS *et al.*, 2008). Sabe-se que a PE pode evoluir para quadros graves, como a síndrome HELLP, eclâmpsia e CIVD.

Como a bilirrubina é um produto do metabolismo do grupo heme da molécula de hemoglobina (que ocorre no sistema retículo-endotelial), essa constitui um marcador tanto de hemólise, quanto de lesão hepática (BURTIS *et al.*, 2008).

A enzima LDH catalisa a conversão de lactato a piruvato, está presente em concentração elevada nas hemácias e é um marcador de dano celular. Níveis elevados da atividade dessa enzima são observados na lesão vascular, hemólise, inflamações, traumas e hepatites (BURTIS *et al.*, 2008). Cunningham & Pritchard, (1978) admitem que a hemólise observada na PE está associada ao dano endotelial, especialmente nas arteríolas.

As enzimas ALT e AST, genericamente chamadas de transaminases, catalisam a transferência do grupo amino, a partir da alanina e do aspartato, respectivamente, para formar o glutamato. Estão presentes no fígado e são marcadores de lesão hepática aguda e crônica, respectivamente (BURTIS *et al.*, 2008).

No presente estudo, embora as medianas das atividades das enzimas hepáticas estejam dentro do intervalo de referência, 05 gestantes com PE (14,3%) apresentaram elevação da atividade da ALT, 04 (11,4%) da AST e 05 (14,3%) da LDH. Além disso, 02 gestantes do grupo PE (5,7%) evoluíram para a síndrome HELLP e tiveram os seguintes resultados dos marcadores de hemólise, LDH (583 e 652 U/L); de função hepática, ALT (31 U/L para os dois casos), AST (50 e 23 U/L), e plaquetopenia (99 e 118 x 10<sup>3</sup>/μL). Considerando que o limiar superior de normalidade da LDH é 480U/L, da ALT e da AST é 35 U/L e o limiar inferior de

normalidade da contagem de plaquetas é  $150 \times 10^3/\mu\text{L}$ , esses resultados mostram uma tendência às alterações próprias dessa síndrome.

As alterações hepáticas ocorrem devido às hemorragias periportais, lesões isquêmicas e depósitos de fibrina. O dano hepático pode decorrer de necrose hepatocelular leve, levando ao aumento das atividades das enzimas hepáticas. Normalmente, esse quadro é precedido de dor abdominal, mas existem também casos assintomáticos. O sangramento subcapsular e a ruptura hepática são raros e estão associados à significativa mortalidade materna (ACOG, 2002).

A avaliação do hemograma revelou que a mediana da contagem global de leucócitos e a média da contagem de neutrófilos nas gestantes com PE estavam acima da faixa de referência ( $5.000$  a  $10.000/\mu\text{L}$  e  $2.900$  a  $7.200/\mu\text{L}$ , respectivamente), como mostrado na **Tabela 6**.

Sabe-se que a gestação saudável está associada a um estado inflamatório sistêmico, com alteração de parâmetros laboratoriais (principalmente no final do terceiro trimestre), e que há uma exacerbação do estado inflamatório na PE (EDELSTAM *et al.*, 2001; ROBB *et al.*, 2010). Dessa forma, tem sido admitido que qualquer fator que aumente a resposta inflamatória materna, como infecções e doenças reumáticas poderia predispor à ocorrência da PE (SIBAI *et al.*, 2005). A elevação da contagem global de leucócitos e dos neutrófilos obtida, neste estudo, nas gestantes com PE, é condizente com o aumento da resposta inflamatória nessas mulheres.

Em concordância com os resultados obtidos neste estudo, Järemo *et al.* (2000) observaram leucocitose e neutrofilia na PE. Canzoneri *et al.* (2009) também verificaram um aumento da contagem de leucócitos em gestantes com PE grave ( $10.660 \pm 3.700/\mu\text{L}$ ), comparadas àquelas com a forma leve da doença ( $9.470 \pm 2.590/\mu\text{L}$ ) e às gestantes normotensas ( $8.550 \pm 1.930/\mu\text{L}$ ). Esses pesquisadores justificaram a leucocitose na PE pela ocorrência de neutrofilia ( $8.050 \pm 4.010/\mu\text{L}$  na PE grave e  $6.690 \pm 2.230/\mu\text{L}$  na PE leve), sugerindo a associação do número de leucócitos com a gravidade da doença. No entanto, não definiram se a neutrofilia é uma resposta exacerbada a um processo inflamatório ou se está associada à gravidade da doença em si.

As prováveis justificativas para a leucocitose observada nas gestantes com PE incluem a elevação dos níveis de cortisol e estrogênio plasmáticos e o uso de corticosteroides, frequentemente administrados nessa doença (PITKIN & WITTE,

1979). Além disso, um atraso no processo apoptótico dos neutrófilos devido à resposta inflamatória observada na gestação, poderia contribuir para a leucocitose ou neutrofilia (von DADELSZEN *et al.*, 1999).

Contrariamente ao proposto por Canzoneri *et al.* (2009), no presente estudo a comparação das formas clínicas da PE (grave e leve) não revelou diferença nas medianas das contagens de leucócitos ( $p=0,43$ ) e neutrófilos ( $p=0,60$ ). Curiosamente foi observado um aumento do número de eosinófilos no grupo com PE leve em relação ao de PE grave ( $p=0,00$ ) sem, no entanto, ultrapassar o intervalo de referência. Não foram encontrados estudos na literatura que justifiquem essa observação. Para as contagens de monócitos, linfócitos e basófilos não houve diferença entre as médias ou medianas dos grupos avaliados.

A média da contagem de hemácias, dos valores de hemoglobina e hematócrito das gestantes com PE estava no limiar inferior do intervalo de referência ( $4,08 \times 10^6/\mu\text{L}$ , 12,0g/dL e 36,4%, respectivamente). A suplementação dietética, especialmente de ferro e ácido fólico, é usualmente indicada ao longo da gestação para prevenir a ocorrência de anemia.

Paradoxalmente aos resultados obtidos neste estudo, Ceyhan *et al.* (2006) não obtiveram nenhuma alteração nos parâmetros do hemograma comparando-se gestantes com PE e normotensas.

Admite-se que, em consequência do vasoespasmo frequentemente detectado na PE, possa ocorrer uma redução da taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal, o que acarretaria um aumento da concentração plasmática da creatinina (ACOG, 2002). No entanto, a média dos valores de creatinina, bem como a mediana daqueles de ureia obtidos neste estudo, estavam dentro do intervalo de referência. Para o ácido úrico, foi obtido um aumento da mediana da concentração no grupo de PE grave, em relação ao grupo com PE leve ( $p=0,01$ ), embora se mantivesse dentro do intervalo de referência nos dois grupos.

Vázquez-Rodríguez & Rico-Trejo (2011) propuseram que o ácido úrico, um metabólito terminal da degradação de nucleotídeos, está elevado na PE, devido ao dano e morte de células trofoblásticas observado nessas gestantes, nas quais a taxa de filtração glomerular está reduzida e a reabsorção no túbulo proximal aumentada. Embora a determinação dos níveis plasmáticos de ácido úrico tenha sido proposta como marcador de complicações materno-fetais associadas à PE (REDMAN *et al.*, 1978; PASAOGLU *et al.* 2004), uma revisão sistemática recente, com o objetivo de

avaliar sua acurácia revelou que esse é um preditor fraco (THANGARATINAM *et al.*, 2006). Cumpre ressaltar que o tabagismo e uma dieta rica em proteína podem contribuir para elevar a concentração plasmática de ácido úrico (LAIN *et al.*, 2005). Além disso, os níveis de ácido úrico também se elevam na doença renal e seu aumento isolado é um achado inespecífico (GIBSON *et al.*, 1982)

Em concordância com os dados da literatura, foi obtido um aumento da mediana da proteinúria nas gestantes com PE em relação às gestantes normotensas e às mulheres não gestantes. Os níveis de proteinúria foram maiores nas gestantes com PE grave do que naquelas com a forma leve. Esse resultado está coerente com o critério de inclusão do estudo, que estabelecia proteinúria  $\geq 2\text{g}/24$  horas (ou  $\geq 2+$  em amostra de urina isolada) para o grupo com PE grave e  $\geq 300\text{mg}/24$  horas (ou  $\geq 1+$  em amostra de urina isolada) para o grupo com PE leve. A avaliação da proteinúria obtida pelo método da tira reagente não mostrou associação com a gravidade da doença ( $p=0,08$ ), o que sugere a acurácia reduzida dessa medida.

Uma revisão sistemática conduzida por Waugh *et al.* (2004) revelou que a correspondência entre a proteinúria em amostra de urina isolada, pelo método da tira reagente, e a proteinúria de 24 horas é limitada.

A proteinúria na PE possivelmente decorre do aumento da permeabilidade vascular verificado nessa doença. Na PE ocorrem lesões generalizadas, em nível celular em diversos órgãos, como nos rins, fígado e cérebro, provavelmente devido à liberação de vasopressina placentária. A análise *post mortem* desses órgãos em mulheres que tiveram PE revelou uma hipoperfusão generalizada, resultando em infarto, necrose e hemorragia no parênquima. Nos rins ocorre a “endoteliose glomerular”, caracterizada por alterações na ultraestrutura glomerular, incluindo edema generalizado, vacuolização das células endoteliais, perda da capilaridade e presença de depósitos de fibrina, o que contribui para a perda de proteínas (WANG *et al.*, 2002; YOUNG *et al.*, 2010).

## 6.4 Marcadores plaquetários

### 6.4.1 Cuidados na fase pré-analítica

A avaliação de plaquetas *in vitro* é complexa, considerando que o habitat das plaquetas é o sangue circulante. Tão logo o sangue é coletado, as plaquetas tendem a se tornar ativadas e agregam entre si. A forma ideal de coletar a amostra de sangue para avaliar as plaquetas *in vitro*, de modo a evitar ou minimizar a ativação plaquetária, é discutida. Van Ierssel *et al.* (2010) propõem que o ideal é desprezar os primeiros mililitros de sangue que saem do vaso, objetivando descartar o fator tissular liberado ao puncionar os tecidos e a parede do vaso com a agulha da coleta, o que poderia induzir a ativação plaquetária. Por outro lado, van Berris *et al.* (2009) priorizam o menor tempo de garroteamento, evitando a ativação das plaquetas, a formação de micropartículas e a hemólise na área represada pelo garrote.

No presente estudo, após avaliação criteriosa das interferências do ato da coleta na ativação plaquetária, foi feita a opção de coletar o tubo de citrato de sódio (utilizado para avaliação das plaquetas *in vitro*), por meio de punção certeira, na qual o vaso sanguíneo é alcançado imediatamente e o garrote é liberado tão logo o sangue comece a fluir. Os tubos utilizados apresentavam as paredes internas revestidas com silicone, de modo a evitar a ativação das plaquetas induzida pela carga negativa do vidro. Os tubos foram centrifugados no período máximo de duas horas após a coleta, em velocidade baixa (800rpm) por 10 minutos, de modo a sedimentar as hemácias e leucócitos e manter as plaquetas em suspensão no plasma. Imediatamente após a centrifugação, o PRP foi retirado e adicionado à solução fixadora.

### 6.4.2 Contagem de plaquetas

A alteração do número de plaquetas circulantes ao longo da gestação é controversa. Ahmed *et al.* (1993) revelaram que o número de plaquetas não está alterado na gestação. No entanto, outros estudos mostraram uma redução das plaquetas circulantes devido a um efeito dilucional (SEJENY *et al.*, 1975;

CUNNINGHAM & PRITCHARD, 1978; SILL *et al.*, 1985) e outro mostrou um aumento da contagem das plaquetas (MOR *et al.*, 1960).

No presente estudo, a comparação das médias do número de plaquetas revelou um valor menor nas gestantes com PE em relação ao grupo de mulheres não gestantes ( $p=0,01$ ). A comparação da média do número de plaquetas no grupo de gestantes normotensas em relação às mulheres não gestantes revelou uma redução da contagem das plaquetas nas gestantes normotensas ( $p=0,00$ ). Não houve diferença comparando as médias da contagem de plaquetas das gestantes com PE e normotensas ( $p=0,26$ ) (**Figura 15**). Ao subdividir o grupo de gestantes com PE (formas grave e leve) também foi observada uma redução da média da contagem de plaquetas no grupo com PE grave em relação às mulheres não gestantes ( $p=0,01$ ) (**Figura 16**).

Diversos estudos revelaram uma redução do número de plaquetas circulantes nas gestantes com PE comparada às normotensas (REDMAN *et al.*, 1978; GILES & INGLIS, 1981; NEIGER *et al.*, 1992; FITZGERALD *et al.*, 1996; JÄREMO *et al.*, 2000; EDELSTAM *et al.*, 2001; HOLTHE *et al.*, 2004; HOLTHE *et al.*, 2005; LOK *et al.* 2007). Redman *et al.* (1978) e Holthe *et al.* (2004) admitiram que a constante ativação plaquetária na PE pode resultar em um aumento do consumo de plaquetas, que pode superar a capacidade de produção dessas pela medula óssea, resultando em redução do número de plaquetas circulantes. McCrae (2010) relataram que a trombocitopenia ocorre em 50% dos casos de PE, no entanto, Fitzgerald *et al.* (1996), admitiram que a trombocitopenia é um achado menos comum, ocorrendo entre 11 e 29% das gestantes. Fallahian & Nabaie (2005) verificaram que o número médio de plaquetas está significativamente reduzido 3 a 6 semanas antes do parto em gestantes pré-eclâmpticas, mas ainda dentro do intervalo de referência. No momento do parto há uma redução significativa. Admitiram ainda que uma plaquetopenia leve ou subclínica durante a segunda metade da gestação pode preceder a PE, podendo esse parâmetro ser útil como preditor da doença. No entanto, Laskin *et al.* (2011) admitiram que a contagem de plaquetas apresenta baixa sensibilidade para auxiliar o diagnóstico da PE e não deve ser utilizada isoladamente, embora constitua uma técnica simples, rápida e de baixo custo.

A contagem de plaquetas inferior a  $100 \times 10^3/\mu\text{L}$  é um sinal de doença grave. Se o parto não é realizado, esses níveis continuam decrescendo e há um risco aumentado de hemorragia materna. Ainda não está claro se o recém-nascido pode

também desenvolver plaquetopenia (NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM WORKING GROUP ON HIGH BLOOD PRESSURE IN PREGNANCY, 2000). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a plaquetopenia. Dentre eles, a geração de trombina na presença de imunocomplexos circulantes e lesão vascular; resultado da agregação plaquetária; e decorrente da destruição mediada por mecanismos imunológicos (PERRY & MARTIN, 1992).

No presente estudo não foi obtido redução do número de plaquetas nas gestantes com PE em relação às normotensas. No entanto, 07 gestantes (20%) com PE, sendo 05 (33,3%) com PE grave e 02 (10%) com PE leve, apresentaram valores inferiores ao limite da faixa de referência ( $150 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), sendo que 04 (11,4%) apresentaram valores muito reduzidos (99, 102, 112 e  $118 \times 10^3/\mu\text{L}$ ). Dessas, duas evoluíram para síndrome HELLP.

Em concordância com os resultados obtidos neste estudo Janes & Goodall (1994), Konijnenberg *et al.* (1997a), Makuyana *et al.* (2002) e Santos & Filho (2004), também não observaram diferença no número de plaquetas entre gestantes com PE e gestantes normotensas.

McCrae (2010) relatou que uma possível explicação para a alteração da contagem de plaquetas nos estudos envolvendo gestantes com PE, gestantes normotensas e mulheres não gestantes seria a plaquetopenia por outras causas, como hiperesplenismo, doenças autoimunes e alterações plaquetárias diversas. Contudo, no presente estudo essas variáveis foram consideradas como critérios de exclusão e provavelmente não interferiram na avaliação desse parâmetro.

A comparação das médias do número de plaquetas das gestantes com as formas grave e leve da PE, neste estudo, revelou que não houve diferença ( $p=0,23$ ). Em concordância com esse resultado, Neiger *et al.* (1992) e Ceyhan *et al.* (2006) também relataram que o número de plaquetas não diferiu nesses grupos.

Contrariamente aos resultados do presente estudo, Üstün *et al.* (2007), Canzoneri *et al.* (2009) e McCrae (2010), verificaram uma redução da contagem de plaquetas no grupo com PE grave em relação à forma leve e em gestantes normotensas, sugerindo uma correlação entre o número de plaquetas e a gravidade da PE. McCrae (2010) admitiu que a intensidade da trombocitopenia está diretamente associada à gravidade da doença.

A comparação da contagem de plaquetas das gestantes com PE grave e leve em relação às gestantes normotensas não revelou diferença ( $p=0,84$  e  $p=0,13$ ,

respectivamente). Resultados similares foram obtidos por Ceyhan *et al.* (2006). Contudo, Üstün *et al.* (2007) observaram uma redução do número de plaquetas nas gestantes com PE grave em relação às normotensas ( $p=0,00$ ). Para a forma leve da doença, esses pesquisadores não encontraram diferença e propuseram que a alteração do número de plaquetas, nesse caso, poderia ser subclínica.

A comparação da contagem de plaquetas nas gestantes normotensas e nas mulheres não gestantes, no presente estudo, revelou que essa foi menor nas gestantes normotensas, o que está de acordo com diversos estudos (SEJENY *et al.*, 1975; GIBSON *et al.*, 1982; HOLTHE *et al.*, 2004; HOLTHE *et al.*, 2005; CEYHAN *et al.*, 2006 e MCCRAE, 2010). No entanto, Giles & Inglis (1981) não observaram diferença entre esses grupos.

Uma limitação do presente estudo, relativa à contagem de plaquetas, é que essa, para o grupo com PE, foi obtida em três contadores de células diferentes. Onze gestantes com PE (31,4%) foram selecionadas na Maternidade Odete Valadares, 18 (51,5%) na Maternidade Hilda Brandão da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte e 06 (17,1%) na Maternidade do Hospital Municipal Odilon Behrens. Além disso, a contagem de plaquetas para os grupos controles (GN e CNG) foi realizada em outro contador hematológico, no Laboratório São Paulo. Embora os quatro laboratórios clínicos estejam inseridos em programas de controle de qualidade, não se pode descartar diferenças na precisão da contagem de plaquetas entre os contadores automatizados utilizados.

#### **6.4.3 Expressão de marcadores de ativação plaquetária**

A importância das plaquetas na fisiopatologia da PE decorre do fato de que nessa doença existe uma deficiência na produção de PG e uma biossíntese excessiva de  $TXA_2$ . Há, ainda, ativação e agregação das plaquetas seguidas de um estímulo à cascata da coagulação que resulta na formação de trombos nos vasos placentários e de órgãos maternos vitais (CLASP, 1994; NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM WORKING GROUP ON HIGH BLOOD PRESSURE IN PREGNANCY, 2000; ACOG, 2002; SIBAI *et al.*, 2005; YOUNG *et al.*, 2010; KAZMI *et al.*, 2011).

Dados da literatura sugerem que a PE cursa com ativação plaquetária, elevação dos níveis de fibrinogênio e maior expressão de moléculas de adesão derivadas do endotélio vascular e de glicoproteínas de superfície das plaquetas (MACEY *et al.*, 2010).

#### **6.4.3.1 Marcadores de superfície plaquetária**

Neste estudo, a avaliação de marcadores de superfície plaquetária incluiu 85 mulheres, sendo 35 gestantes (41,18%) com PE, das quais 15 (17,65%) apresentavam a forma grave da doença e 20 (23,53%) a forma leve, 25 (29,41%) gestantes normotensas e 25 (29,41%) mulheres não gestantes.

A CF constitui um método amplamente utilizado para detectar ativação celular. Os dados obtidos podem ser analisados de duas formas distintas; pelo percentual de partículas que expressam antígenos na superfície; ou pela intensidade média de fluorescência (IMF) da população de partículas que expressa esse antígeno. A primeira estratégia é útil quando se sabe que o biomarcador é restrito a uma subpopulação e a segunda, quando se tratam de biomarcadores constitutivos. A IMF permitiria a distinção de valores que estão nos extremos da faixa de linearidade (KONIJNENBERG *et al.*, 1997a,b).

A expressão dos resultados dos marcadores de superfície no presente estudo foi feita em IMF, exceto para a P-selectina, expressa também em percentagem. Apenas dois outros estudos avaliaram a expressão de P-selectina por IMF (STAR *et al.*, KONIJNENBERG *et al.*, 1997). Os marcadores de ativação plaquetária avaliados foram a P-selectina (CD62P), GPIIb/IIIa (CD41a), GPIIIa (CD61) e GPIX (CD42a).

##### *P-selectina (CD62P)*

A P-selectina (CD62P) é uma GP da superfície plaquetária que, quando exposta, media interações entre endotélio, plaquetas e leucócitos, bem como estabiliza inicialmente a interação GPIIb/IIIa-fibrinogênio até a formação do tampão plaquetário (MICHELSON, 1996; MICHELSON *et al.*, 2000; GURNEY *et al.*, 2002; THÉORËT *et al.*, 2006). A P-selectina apresenta ainda um papel relevante como elemento conectivo entre inflamação e trombose (MASOPUST *et al.*, 2011).

A comparação estatística das medianas da IMF do CD62P e da percentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup>, nos três grupos de mulheres avaliados neste estudo, não apresentou diferença significativa ( $p=0,67$  e  $p=0,38$ , respectivamente) (**Figura 15**). Após a subdivisão do grupo de gestantes com PE nas formas grave e leve também não foi obtida diferença comparando-se os quatro grupos ( $p=0,70$  para IMF do CD62P e  $p=0,54$  para plaquetas CD62P<sup>+</sup>) (**Figura 16**).

Experimentos *in vitro* sugerem que a expressão máxima de P-selectina requer estimulação com agonistas, como a trombina (JANES & GOODALL, 1994). Cumpre ressaltar que no presente estudo, a expressão de P-selectina foi investigada sem a ativação prévia das plaquetas *in vitro*. Essa decisão foi tomada partindo-se da premissa de que as plaquetas já estariam ativadas *in vivo* na PE, conforme sugerido pela literatura (CLASP, 1994; NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM WORKING GROUP ON HIGH BLOOD PRESSURE IN PREGNANCY, 2000; YONEYAMA *et al.*, 2001; ACOG, 2002; SIBAI *et al.*, 2005; MACEY *et al.* e YOUNG *et al.*, 2010; KAZMI *et al.*, 2011).

Star *et al.* (1997) avaliaram a expressão de P-selectina em gestantes normotensas e mulheres não gestantes, antes e após a ativação das plaquetas com trombina e análogos do TXA<sub>2</sub>. Na ausência do agonista, não foi observada diferença entre os dois grupos avaliados, como no presente estudo. Na presença do agonista, a ativação das plaquetas foi menor nas gestantes normotensas em relação às mulheres não gestantes.

Em concordância com os resultados obtidos no presente estudo, Gatti *et al.* (1994), Harlow *et al.* (2002) e Macey *et al.* (2010) não observaram diferença na expressão de P-selectina entre gestantes normotensas e mulheres não gestantes. Harlow *et al.* (2002) observaram que, em média,  $0,61 \pm 1,15\%$  das plaquetas nas gestantes normotensas são CD62P<sup>+</sup>, ao contrário das mulheres não gestantes ( $0,43 \pm 1,13\%$ ), mas essa diferença não foi significativa. Esses pesquisadores também não encontraram associação entre a intensidade de ativação das plaquetas e a gravidade da PE.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os observados por Robb *et al.* (2010). Esses pesquisadores não relataram diferença na percentagem de plaquetas expressando P-selectina entre gestantes com PE e gestantes normotensas. Concluíram que a ativação plaquetária aumenta na gestação, mas não é afetada pela doença.

Contrariamente aos resultados do presente estudo, Janes & Goodall (1994), Konijnenberg *et al.* (1997a), Harlow *et al.* (2002), Holthe *et al.* (2004) e Macey *et al.* (2010) verificaram um aumento da ativação plaquetária em gestantes com PE em relação às gestantes normotensas e às mulheres não gestantes. Yoneyama *et al.* (2001) e Tomer (2004) também obtiveram resultados discordantes, ao avaliarem gestantes com PE e gestantes normotensas.

Janes & Goodall (1994) avaliaram as plaquetas antes e após estímulo *in vitro* com ADP e adrenalina, mas o marcador empregado foi o CD63. No estado basal, esses pesquisadores observaram uma expressão significativamente reduzida de CD63 (cerca de 0,25% das plaquetas) nas mulheres não gestantes em relação às gestantes normotensas (0,53%). Relataram ainda que as gestantes com PE apresentaram níveis mais elevados dessa GP (0,65%) em relação às normotensas.

Konijnenberg *et al.* (1997a) observaram uma maior percentagem de plaquetas expressando P-selectina no grupo das gestantes com PE (4,0%; 1,0 a 20,2) em relação ao das gestantes normotensas (0%; -1,0 a 5,8). Isso ocorreu em 04 gestantes (40%) normotensas e em maior extensão, 10 (100%), nas gestantes pré-eclâmpticas. No entanto, uma análise crítica desse estudo revela que os resultados não mostraram distribuição uniforme nos dois grupos avaliados, apresentando valores extremos. A expressão da P-selectina apresentou grande variação inclusive entre os controles saudáveis. Dessa forma, pode-se questionar a definição da percentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup> considerada como indicativo da presença de ativação plaquetária aumentada numa determinada população. Esses pesquisadores concluíram que as plaquetas estão mais ativadas na gestação, e essa ativação é mais evidente na PE. Entretanto, admitiram que somente uma subpopulação de plaquetas parece estar ativada. Admitiram, ainda, que é possível que um maior número de plaquetas esteja ativado na PE, mas essas são rapidamente eliminadas da circulação. Ressaltaram também que essa subpopulação de plaquetas é ativada (mesmo que de forma modesta) somente se as GP de membrana forem previamente ativadas pela trombina, *in vitro*.

Paralelamente à análise percentual, Konijnenberg *et al.* (1997a), investigaram a expressão de P-selectina em IMF. Relataram que a média da IMF para P-selectina foi de 10,3, variando de 7,5 a 11,5, em gestantes normotensas e de 11,3, variando de 8,0 a 15,3, em gestantes com PE. Houve uma grande variabilidade dos dados nos grupos, mas não foi encontrada diferença significativa entre eles. Concluíram

que esse parâmetro é limitado para indicar a presença de ativação plaquetária na gestação normal e na PE. Finalmente, admitiram que outros mecanismos, diferentes da ativação das plaquetas também podem estar envolvidos na fisiopatologia da PE. Cumpre ressaltar que esses pesquisadores apresentam os resultados apenas após estímulo com agonistas.

Harlow *et al.* (2002), compararam a expressão de P-selectina em gestantes normotensas e pré-eclâmpticas e concluíram que essa foi maior nas pré-eclâmpticas ( $1,35\pm 1,22\%$  versus  $0,61\pm 1,15\%$ ;  $p=0,02$ ). Entretanto, o aumento da expressão desse marcador foi observado em 53% das gestantes com PE e em 25% das gestantes normotensas, o que evidencia que a ativação plaquetária não é exclusiva nem ocorre em todas as gestantes com PE. Janes *et al.* (1995) utilizando o CD63 obtiveram resultados semelhantes aos relatados por Harlow *et al.* (2002). Esses pesquisadores concluíram que é pouco provável que a ativação plaquetária seja um evento constante na PE e sua avaliação *in vitro* como preditor da doença tem valor limitado.

Macey *et al.* (2010) obtiveram uma porcentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup> maior em gestantes com PE ( $0,8\pm 2,6\%$ ) em relação às gestantes normotensas ( $0,3\pm 0,5\%$ ), evidenciando que as plaquetas estão ativadas nessa doença. Entretanto, a extensão com que as plaquetas encontram-se ativadas na gestação normal e na PE permanece incerta.

Yoneyama *et al.* (2001) obtiveram um aumento da porcentagem de plaquetas CD62P<sup>+</sup> nas gestantes com PE ( $7,8\pm 1,2\%$ ) em relação às gestantes normotensas ( $4,7\pm 0,7\%$ ), diferindo dos resultados obtidos no presente estudo.

Janes & Goodall (1994) e Holthe *et al.* (2004) relataram que os níveis basais de CD62P, após o estímulo com ADP, encontram-se elevados em gestantes saudáveis quando comparadas às mulheres não gestantes. Robb *et al.* (2011) também observaram esse aumento, mesmo no estado basal.

Cumpre ressaltar que grande parte dos estudos encontrados na literatura utiliza amostras de sangue total com a justificativa de que as plaquetas seriam facilmente ativadas nas etapas de centrifugação, separação e fixação. A centrifugação também resultaria em perda de plaquetas, a qual poderia ser ainda mais significativa para aquelas de tamanho maior e mais ativadas (JANES *et al.*, 1995). No presente trabalho, optou-se por utilizar o PRP fixado em paraformaldeído e cacodilato de sódio visando minimizar possíveis interferências das hemácias na

análise por CF. A possível ativação durante a manipulação da amostra foi minimizada pela fixação rápida das plaquetas após a separação do PRP.

Cumpra ainda destacar que a P-selectina é instável e desprende-se da superfície plaquetária rapidamente, embora permaneça no plasma, na forma solúvel e funcional, mas não detectável pela CF. Sabe-se que as plaquetas que perderam a P-selectina podem permanecer ainda ativadas na circulação, embora não expressem mais essa GP (MICHELSON, 1996; KONIJNENBERG *et al.*, 1997; MICHELSON *et al.*, 2000).

### *GPIIb/IIIa (CD41a)*

A GPIIb/IIIa (CD41a) é ativada após um sinal intra-plaquetas iniciado com a formação do complexo FvW-GPIb, tornando-as capazes de ligar ao fibrinogênio, fibronectina, FvW, vibronectina, trombospondina e, principalmente, formar agregados plaqueta-plaqueta (MICHELSON, 1996; GURNEY *et al.*, 2002; DELGADO *et al.*, 2003). Tomer (2004) propuseram que o aumento dos níveis plasmáticos de GPIIb/IIIa seria útil para demonstrar a atividade pró-trombótica em várias condições clínicas.

No presente estudo, foram obtidos valores inferiores da mediana da IMF do CD41a, nas gestantes com PE em relação às mulheres não gestantes ( $p=0,00$ ) e nas gestantes normotensas em relação às mulheres não gestantes ( $p=0,01$ ) (**Figura 15**). Fazendo-se a subdivisão do grupo de gestantes com PE, foi observada uma redução da mediana da IMF do CD41a nas gestantes com PE grave em relação às mulheres não gestantes ( $p=0,00$ ). Não houve diferença entre as medianas dos grupos PE e gestantes normotensas ( $p=0,10$ ), PE grave e PE leve ( $p=0,48$ ), PE grave e gestantes normotensas ( $p=0,69$ ), PE leve e gestantes normotensas ( $p=0,73$ ), PE leve e mulheres não gestantes ( $p=0,10$ ) (**Figura 16**).

Admite-se que as plaquetas circulantes estejam em diferentes estágios de ativação. As plaquetas podem ser ativadas em decorrência de lesões vasculares com liberação de FT e o processo de ativação pode ser reversível ou com tal intensidade que culmina com a agregação plaquetária no sítio lesado. Obviamente, apenas as plaquetas que ainda circulam podem ser avaliadas *in vitro* em amostras de sangue periférico, por CF. Konijnenberg *et al.* (1997b) propuseram que é

compreensível que a maioria das plaquetas identificadas na PE estejam ainda no estado nativo, ou seja, não ativadas, uma vez que as ativadas já estariam aprisionadas no agregado plaquetário e não mais na circulação.

Os resultados do presente estudo, onde foi obtida menor IMF do CD41a nos grupos PE e PE grave poderiam ser justificados pela premissa de Konijnenberg *et al.* (1997b), anteriormente citada.

Apenas três outros estudos que avaliaram a GPIIb/IIIa na gestação foram encontrados na literatura. Contrariamente aos resultados do presente trabalho, Star *et al.* (1997) e Sheu *et al.* (2002) não observaram diferença na expressão da GPIIb/IIIa quando compararam gestantes normotensas e mulheres não gestantes. Kühne *et al.* (1996) por sua vez, também não encontraram diferença na expressão dessa GP em gestantes com PE em relação às gestantes normotensas.

Cumprе ressaltar que a interação anticorpo-GPIIb/IIIa pode ser afetada *in vitro* pela manipulação da amostra ou, mais comumente, pelo uso de fixadores e inibidores plaquetários, os quais podem camuflar os níveis de ativação plaquetária esperados (JANES *et al.*, 1994). Divergências na etapa pré-analítica poderiam justificar a discrepância entre os resultados deste estudo e aqueles encontrados na literatura.

### *GPIIIa (CD61)*

A GPIIIa é uma glicoproteína transmembrana, integrina  $\beta_3$ , expressa em plaquetas, megacariócitos, osteoclastos e endotélio. Essa GP associa-se à GPIIb para formar o complexo GPIIb/IIIa, o qual media a agregação entre as plaquetas ativadas, e ao CD51 para formar o complexo CD51/CD61, um receptor de vitronectina. Além disso, a GPIIIa liga-se ao fibrinogênio, fibronectina, FvW, e trombospondina para mediar o processo de adesão (di MINNO *et al.*, 2009).

No presente estudo, a média de IMF do CD61 foi inferior nas gestantes com PE em relação às mulheres não gestantes, e nas gestantes normotensas em relação às mulheres não gestantes ( $p=0,00$  para ambos) (**Figura 15**). A média da IMF do CD61 foi inferior nos grupos com PE grave e PE leve em relação às mulheres não gestantes ( $p=0,00$  para ambos). A comparação entre os demais grupos: PE grave e PE leve ( $p=0,49$ ), PE grave e gestantes normotensas ( $p=0,79$ ), PE leve e gestantes

normotensas ( $p=0,63$ ) não apresentou diferença significativa (**Figura 16**). Esses resultados foram similares aos obtidos para o CD41a (GPIIb/IIIa) isso era esperado, uma vez que ambos reconhecem o mesmo complexo glicoprotéico, o que confirma que esses dois biomarcadores são equivalentes. A hipótese de que as plaquetas identificadas na CF sejam as menos ativas, uma vez que as ativadas já estariam aprisionadas no agregado plaquetário e não mais na circulação, também pode ser utilizada para explicar esses achados.

Paradoxalmente aos resultados obtidos no presente estudo, Holthe *et al.* (2004) observaram que a densidade do CD61 na superfície plaquetária em níveis basais e após estímulo com agonista foi maior na PE, comparada às gestantes normotensas e às mulheres não gestantes. Não foi encontrada diferença entre gestantes normotensas e mulheres não gestantes. Esses pesquisadores propuseram que as plaquetas se ativam na gestação e mais intensamente na PE, ressaltando a importância das plaquetas na patogênese dessa doença.

#### *GPIX (CD42a)*

A GPIX (CD42a) forma o complexo GPIb/IX/V, um receptor do FvW, essencial para o processo de adesão das plaquetas ao subendotélio vascular quando ocorre lesão (MICHELSON,1996).

No presente estudo, a comparação das médias de IMF do CD42a nos três grupos (**Figura 15**) e após a subdivisão do grupo PE, não mostrou diferença ( $p=0,44$  e  $p=0,57$ , respectivamente) (**Figura 16**).

Em concordância com os resultados deste estudo, Star *et al.* (1997) e Holthe *et al.* (2004), também não observaram diferença na expressão de CD42a entre gestantes normotensas e não gestantes, mesmo após ativação com agonista. Contrariamente, Holthe *et al.* (2004) obtiveram maior expressão de GPIX em gestantes com PE em relação às gestantes normotensas.

A fixação é uma variável que necessita ser controlada porque a afinidade da ligação ao anticorpo dependente de ativação pode ser reduzida, quando comparada às plaquetas não fixadas. Um argumento a favor da fixação imediata é que a ativação plaquetária é dependente do tempo *in vitro* para diversos antígenos de superfície plaquetária, como CD42, CD41 e CD62P (MICHELSON, 1996).

Infelizmente, para a maioria dos marcadores de exocitose, as reações são reversíveis e sofrem interferências do manuseio da amostra, uso de fixadores e inibidores, os quais podem mascarar os níveis elevados de ativação plaquetária esperados (JANES & GOODALL, 1994). Possivelmente, esse pode ser um dos motivos da discordância entre os estudos.

#### *Razão entre biomarcadores de superfície plaquetária*

As GP de superfície plaquetária apresentam funções relevantes no processo de hemostasia e coagulação, principalmente no que se refere à interação entre plaquetas, leucócitos, células endoteliais, colágeno e fibrinogênio (LÖWENBERG *et al.*, 2010).

Como a maioria dos marcadores de ativação plaquetária neste estudo é constitutiva, optou-se por avaliar a existência do predomínio de determinada GP a partir da razão entre essas nos grupos de gestantes com PE, gestantes normotensas e mulheres não gestantes.

As medianas da razão entre as IMF CD61/CD42a (GPIIIa e GPIX) e CD41a/CD62P (GPIIb/IIIa e P-selectina) revelou valor significativamente menor no grupo de gestantes normotensas em relação ao de mulheres não gestantes ( $p=0,00$  e  $p=0,01$ ). A comparação das medianas entre os grupos PE e gestantes normotensas não apresentou diferença significativa ( $p=0,57$  e  $p=0,56$ , respectivamente) (**Figura 17**). Para a razão CD61/CD42a, observou-se uma mediana inferior no grupo de PE e PE grave em relação ao de mulheres não gestantes ( $p=0,00$  para ambos) (**Figura 18**).

A análise desses resultados sugere que nas gestantes, tanto normotensas quanto pré-eclâmpticas provavelmente há menos plaquetas expressando GPIIIa e, conseqüentemente, menor quantidade de complexo GPIIb/IIIa na circulação. Esse resultado permite ainda inferir que na gestação as plaquetas encontram-se majoritariamente agregadas e, provavelmente, aderidas em sítios vasculares.

Sabe-se que os níveis de fibrinogênio estão elevados na gestação normal, integrando uma série de alterações hemostáticas que resultam em um estado de hipercoagulabilidade fisiológico nessa condição clínica. A hipercoagulabilidade é crescente ao longo da gestação e tem por finalidade preparar o organismo da

mulher para o grande desafio hemostático associado à expulsão da placenta e ruptura simultânea de inúmeros vasos sanguíneos. A formação de coágulos nas extremidades lesadas da rede vascular da parede uterina é prontamente iniciada, prevenindo um sangramento exagerado após o parto (STIRLING *et al.*, 1984; WANG *et al.*, 2002).

Uma hipótese para justificar a ativação da GPIIb/IIIa e, conseqüentemente, a agregação entre as plaquetas, seria o aumento plasmático de fibrinogênio na gestação (BONNAR *et al.*, 1970). Os níveis de trombina também estão significativamente elevados, alterando as interações das células endoteliais e aumentando a permeabilidade do endotélio. A trombina formada ativa plaquetas, leucócitos e células endoteliais (WANG *et al.*, 2002). Hoffman & Monroe (2007) admitiram que os agregados plaquetários ficam retidos nos vasos de pequeno calibre ou determinam a ativação das proteínas da coagulação e a formação do coágulo de fibrina. Fisiologicamente, uma discreta deposição de fibrina nos pequenos capilares placentários é admitida como forma de prevenir a ruptura dos mesmos e garantir a integridade da vascularização da placenta (FLETCHER *et al.*, 1979; CARON *et al.*, 1990).

A avaliação da mediana da razão IMF do CD42a/CD41a (GPIX e GPIIb/IIIa) resultou em valores superiores no grupo PE e PE grave em relação ao grupo de mulheres não gestantes e no grupo de gestantes normotensas em relação ao de mulheres não gestantes ( $p=0,00$  para ambos) (**Figuras 17 e 18**).

O raciocínio para a interpretação desse resultado é semelhante àquele feito para CD61/CD42a e CD41a/CD62P. No entanto, a GPIIb/IIIa encontra-se agora no denominador, resultando em uma razão numericamente maior. O predomínio da GPIIb/IIIa é compreensível, uma vez que consiste na primeira glicoproteína plaquetária a ser expressa e está em maior quantidade. Essa glicoproteína se liga a uma infinidade de moléculas adesivas, sendo fundamental no processo de agregação plaquetária (LÖWENBERG *et al.*, 2010).

A comparação estatística das medianas das razões de IMF do CD61/CD41a (GPIIIa e GPIIb/IIIa), do CD61/CD62P (GPIIIa e P-selectina) e do CD42a/CD62P (GPIX e P-selectina), antes ( $p=0,29$ ,  $p=0,07$  e  $p=0,73$ , respectivamente) e após ( $p=0,42$ ,  $p=0,14$  e  $p=0,69$ , respectivamente) a subdivisão do grupo PE, não apresentou diferença entre os grupos avaliados (**Figuras 17 e 18**). Não foram

encontrados estudos na literatura que compararam as razões entre essas glicoproteínas.

#### **6.4.3.2 Agregados plaquetas-leucócitos (APL)**

Neste estudo, a avaliação de agregados plaquetas-leucócitos incluiu 60 mulheres, sendo 20 gestantes (33,33%) com PE, das quais 08 (13,33%) apresentavam PE grave e 12 (20%) PE leve, 20 (33,33%) eram gestantes normotensas e 20 mulheres (33,33%) não gestantes.

A interação entre plaquetas e leucócitos é observada em muitos processos inflamatórios e trombóticos e nas doenças autoimunes. Admite-se que tal interação visa a formação de agregados plaquetas-leucócitos que constituem uma superfície de ancoragem para células inflamatórias, além de secretar diferentes proteases que aumentam a adesão plaquetária dependente do FvW (ASHMAM *et al.*, 2003; PANASLUK *et al.*, 2005; WOHNER, 2008).

As plaquetas ativadas na PE podem estar envolvidas na patogênese dessa doença, não somente por promoverem a coagulação, mas também por contribuir para o aumento do inibidor do ativador do plasminogênio-1 e, conseqüentemente, reduzir a fibrinólise (GILABERT *et al.*, 1990). As plaquetas ativadas também podem interagir com os leucócitos, formando agregados, e liberar quimiocinas (CD40L, RANTES e GRO- $\alpha$ ) capazes de ativar os leucócitos, contribuindo para desencadear um processo inflamatório (MELLEMBAKKEN *et al.*, 2001).

#### ***Agregados plaquetas-monócitos (APM)***

Após a ativação plaquetária, a P-selectina rapidamente se transloca para a superfície e interage principalmente com o receptor PSGL-1 dos monócitos, formando agregados, embora possa interagir, em menor extensão, também com os neutrófilos (GKALIAGKOUSI *et al.*, 2009). Os APM não são simplesmente um reflexo da ativação plaquetária, mas têm um papel relevante na indução da ativação de outras plaquetas e monócitos, a partir da expressão e secreção de citocinas (van GILS *et al.*, 2009).

A comparação estatística das medianas da percentagem de APM nos três grupos (**Figura 20**), e após a subdivisão do grupo PE em PE grave e leve, não apresentou diferença significativa ( $p=0,08$  e  $p=0,13$ , respectivamente) (**Figura 21**).

Resultados similares foram obtidos por Holthe *et al.* (2005). Esses pesquisadores não observaram diferença na percentagem de APM ao avaliar plaquetas no estado basal entre os grupos de gestantes com PE, normotensas e mulheres não gestantes. No entanto, após ativação das plaquetas com agonista, foi observado maior número de APM no grupo das gestantes (com PE ou normotensas) em relação ao grupo de mulheres não gestantes.

Macey *et al.* (2010) também não observaram diferença entre as médias de APM nas gestantes normotensas e mulheres não gestantes. Da mesma forma, Robb *et al.* (2010) não observaram diferença na percentagem de APM comparando-se gestantes pré-eclâmpticas e normotensas. Esses pesquisadores concluíram que a gestação cursa com ativação plaquetária e que essa não é afetada pelo estabelecimento da PE.

Contudo, o presente estudo difere dos resultados obtidos por Macey *et al.* (2010), que observaram aumento da expressão de APM na PE em relação às gestantes normotensas. Difere também dos resultados encontrados por Robb *et al.* (2010), nos quais houve uma maior percentagem de APM nas gestantes normotensas em relação às mulheres não gestantes.

Uma das hipóteses para justificar a discordância de resultados é que a formação de APM é dependente de  $Ca^{2+}$  e pode ser inibida por anticoagulantes sequestradores desse cátion, como o citrato (ROBB *et al.* 2010). Cumpre ressaltar que o citrato foi o anticoagulante utilizado no presente estudo.

Não foram encontrados na literatura estudos que compararam a formação de APM na PE grave e leve.

#### *Agregados plaquetas-neutrófilos (APN)*

As plaquetas ligam-se aos neutrófilos, embora em menor extensão do que aos monócitos, determinam a secreção de ativadores do endotélio e facilitam a estagnação dos neutrófilos nos pequenos vasos (PANASLUK *et al.*, 2005). Independentemente da formação de APN, os neutrófilos podem ligar-se diretamente

ao FvW por meio do PSGL-1. Assim, o FvW atua como molécula de adesão, tanto para plaquetas, quanto para leucócitos (WOHNER, 2008).

Neste estudo, a mediana da percentagem de APN foi menor nas gestantes com PE em relação às mulheres não gestantes ( $p=0,01$ ). A comparação entre os demais grupos: PE e GN ( $p=0,42$ ), GN e CNG ( $p=0,02$ ) não apresentou diferença significativa (**Figura 19**). A comparação dos grupos com as formas grave e leve da PE também não revelou diferença ( $p=0,02$ ), como mostrado na **Figura 20**.

Diferentemente destes resultados, Holthe *et al.* (2005) e Macey *et al.* (2010) não observaram diferença na formação de APN avaliando gestantes com PE e mulheres não gestantes. Entretanto, esses pesquisadores também não verificaram diferença na formação de APN comparando gestantes com PE e normotensas. Holthe *et al.* (2005) avaliaram ainda as plaquetas após ativação com agonista e observaram maior número de APN no grupo das gestantes (com PE ou normotensas) em relação ao grupo de mulheres não gestantes. Uma hipótese para a redução de APN na PE seria a rápida depuração dos mesmos da circulação sanguínea, não sendo detectados pela CF.

Cumprе ressaltar que a técnica para a determinação da percentagem de APL ainda é bastante variável (HARDING *et al.*, 2007). Os estudos anteriormente referidos utilizaram como anticoagulante uma mistura de citrato de sódio e paraformaldeído (HOLTHER *et al.*, 2005); citrato (MACEY *et al.*, 2010) e EDTA (MACEY *et al.*, ROBB *et al.*, 2010). Os marcadores para a identificação dos APL ou leucócitos ativados também variaram; anti-CD61/anti-CD45, anti-CD41/anti-CD45 (HOLTHER *et al.*, 2005), anti-CD42a/anti-CD45 (MACEY *et al.*, 2003), anti-CD42a/anti-CD14 (MACEY *et al.*, ROBB *et al.*, 2010), anti-CD11/anti-CD19 (SACKS *et al.*, 1998; GERVASI *et al.*, 2001). Além disso, essa avaliação foi feita tanto antes, quanto após a ativação plaquetária *in vitro*.

Em uma revisão da literatura não foram encontrados estudos que compararam a formação de APN na PE grave e leve.

#### **6.4.4 Expressão de fator tissular em monócitos**

Neste estudo, a avaliação da expressão de fator tissular em monócitos incluiu 60 mulheres, sendo 20 gestantes (33,33%) com PE, das quais 08 (13,33%)

apresentavam PE grave e 12 (20%) PE leve, 20 (33,33%) eram gestantes normotensas e 20 mulheres (33,33%) não gestantes.

O recrutamento de monócitos a partir da formação dos APM pode amplificar a produção de pró-coagulantes, em especial o FT (ASHMAN *et al.*, 2003). A expressão de FT em monócitos é regulada por citocinas pró-inflamatórias e pela P-selectina. Além de ativar a cascata da coagulação, o FT interage com a P-selectina acelerando a formação e o depósito de fibrina no sítio lesado (FREEDMAN & LOSCALZO, 2002).

No presente estudo, a comparação estatística das medianas da percentagem de monócitos expressando FT não diferiu entre os três grupos avaliados ( $p=0,14$ ) (**Figura 19**), bem como após a subdivisão do grupo PE em PE grave e leve ( $p=0,26$ ) (**Figura 20**).

Contraditoriamente, a ativação de monócitos e o aumento na expressão de FT na PE têm sido relatados na literatura (SACKS *et al.*, 1998; GERVASI *et al.*, 2001; HOLTHE *et al.*, 2004). Macey *et al.* (2010) obtiveram maior expressão de marcadores de geração de trombina na PE em relação às gestantes normotensas e nas gestantes normotensas em relação às mulheres não gestantes.

Não foram encontrados na literatura estudos que compararam a expressão de FT em monócitos na PE grave e leve.

Uma hipótese para justificar a não obtenção de maior percentagem de monócitos expressando FT na PE seria a presença de FT de outras fontes. Sabe-se que as plaquetas ativadas presentes nos APM também induzem a ruptura da membrana plasmática gerando MPP que expressam FT. No entanto, van Wijk *et al.* (2002) não observaram diferença na expressão de FT nas MPP nesses mesmos grupos avaliados.

Sabe-se que a liberação de FT pelos monócitos resulta na ativação do FVII e iniciação da cascata da coagulação. Dessa forma, seria esperado um aumento da expressão de FT pelos monócitos na PE, uma vez que essa doença está associada a um estado pró-trombótico. No entanto, é importante ressaltar que a penúltima etapa da cascata da coagulação inclui a ativação da protrombina em trombina, uma enzima ávida por quebrar a molécula do fibrinogênio em monômeros de fibrina, formando o coágulo. Se o mecanismo para bloquear a ação da trombina sobre o fibrinogênio (mediado principalmente pela AT e proteínas C e S) for efetivo, mesmo que tenha sido liberada grande quantidade de FT na circulação, a formação do

coágulo não ocorrerá. Como um método eficiente para avaliar a ação da trombina sobre o fibrinogênio na circulação ainda não foi definido, não é possível estimar a contribuição do FT no estado pró-trombótico observado na PE. Além disso, cumpre lembrar que o FT é expresso em diversas outras células do organismo (CHU, 2011).

#### **6.4.5 Análise multivariada dos parâmetros clínicos e hemostáticos**

Visando avaliar a associação dos parâmetros clínicos e hemostáticos e o desenvolvimento da PE, foi realizada uma análise multivariada, ajustada ao Modelo linear generalizado de *Poisson*, considerando a presença e a ausência de PE como variável dependente (**Tabela 10**). Essa análise revelou que a presença de gestação múltipla confere uma chance 2,28 vezes maior para o desenvolvimento de PE. Da mesma forma, a elevação de uma unidade do IMC (considerando como referência para gestantes normotensas  $IMC=25\text{Kg/m}^2$ ) aumenta em 1,08 vezes a chance de uma gestante desenvolver PE. Para os APM, o aumento de 1% desse parâmetro (considerando como referência para gestantes normotensas  $APM=1,1\%$ ) eleva em 1,55 vezes a chance de ocorrência da doença.

Esses resultados estão de acordo com vários estudos no que se refere à presença de gestação múltipla e ao aumento do IMC (ACOG, 2002; SIBAI *et al.*, 2005; YOUNG *et al.*, 2010; UZAN *et al.*, 2011).

Com relação à formação de APM, embora não tenha sido observada diferença comparando os grupos de gestantes com PE, normotensas e de mulheres não gestantes, a análise multivariada não excluiu a importância dos APM na monitorização de gestantes e na ocorrência da PE.

Estudos recentes avaliaram diferentes parâmetros clínicos com o objetivo de identificar fatores de risco para a ocorrência de PE. Kashanian *et al.* (2011) em um estudo avaliando gestantes iranianas concluíram que somente a ocorrência de PE em gestação anterior pode ser considerada como fator de risco relevante ( $RP=9,4$ ). Além disso, a paridade superior a um mostrou-se como parâmetro protetor ( $RP=0,4$ ).

Trogstad *et al.* (2011) admitiram que a PE, por ser uma doença multifatorial, está sujeita a efeitos especulativos. Relataram que a mudança de parceiro sexual em uma segunda gestação está associada ao aumento do risco de ocorrência da PE, mas essa associação desaparece quando a correção é feita para o intervalo

entre partos. Esses pesquisadores admitiram também que a história prévia de PE constitui provavelmente o fator de maior impacto para a recorrência da doença.

A discrepância entre o que revela a análise multivariada no presente estudo e os dois estudos citados anteriormente pode ser devida à população amostral reduzida em todos os três estudos. Sabe-se que a análise epidemiológica requer metodologia específica, no entanto, esse não era objetivo do presente estudo.

### **6.5 Avaliação do poder diagnóstico da contagem de plaquetas e parâmetros citométricos pela Curva ROC**

A curva ROC constitui um método gráfico para avaliação, organização e seleção de sistemas de diagnóstico e/ou predição (MARTINEZ *et al.*, 2003).

No presente estudo, a curva ROC não apresentou para nenhum dos parâmetros estudados uma AUC significativa ( $p \leq 0,05$ ), indicando que esses possuem um poder limitado para o diagnóstico e prognóstico da PE (**Figura 21 e Tabela 11**). Além disso, não foi possível obter para nenhum parâmetro um ponto de corte com sensibilidade e especificidade simultaneamente elevadas.

Konijnenberg *et al.* (1997b) fizeram análise semelhante para os marcadores de ativação plaquetária CD62P, CD63 e CD31. Somente para o CD63 foi obtida uma AUC da curva ROC significativa. O mesmo marcador apresentou sensibilidade de 47% e especificidade de 76%. Esses pesquisadores mostraram que a acurácia do parâmetro é melhorada quando esse é associado à medida da pressão arterial. Concluíram que o aumento da expressão de CD63 no primeiro trimestre pode ser útil para identificar subpopulações de gestantes com risco elevado para o desenvolvimento da PE, especialmente quando combinado à aferição da pressão arterial no primeiro trimestre de gestação.

Uma das hipóteses para justificar a não observação de significância dos parâmetros plaquetários e do FT, avaliados pela curva ROC, no presente estudo, seria a grande variabilidade na expressão desses parâmetros, dificultando uma segregação confiável entre casos e controles.

## 6.6 Análise da correlação da contagem de plaquetas e parâmetros citométricos

No presente estudo foi avaliada a correlação existente entre os parâmetros de ativação plaquetária e a contagem de plaquetas nos grupos de gestantes com PE e normotensas e nas mulheres não gestantes, como mostra o esquema apresentado na **Figura 22**. Esse achado é interessante e evidencia que há um número crescente de parâmetros que se correlacionam (04 para mulheres não gestantes, 08 para gestantes normotensas, 13 para PE, 09 na PE leve e 22 para PE grave). Isso permite inferir que ocorre ativação plaquetária na gestação, a qual é mais intensa na PE, especialmente na forma grave da doença.

Em concordância com estes resultados, Joseph *et al.* (2001) também relataram a existência de correlação entre a contagem de plaquetas e a formação de APL. No entanto, Harlow *et al.* (2002) não encontraram correlação significativa entre a expressão de marcadores de ativação plaquetária na PE e a contagem de plaquetas. Esses pesquisadores ressaltaram que esse achado foi intrigante, uma vez que a ativação plaquetária deveria ser estimulada pela exaustão e consumo das plaquetas, o que poderia sugerir que a produção de plaquetas seria intensificada nas fases iniciais da PE. A diminuição do número de plaquetas apenas estaria presente quando a ativação dessas ultrapassasse sua síntese. Ressaltaram também que a presença de um grande número de macroplaquetas, que são imaturas, na PE confirmaria essa hipótese. Konijnenberg *et al.* (1997a) também não observaram uma correlação clara entre a gravidade da PE e a existência de ativação plaquetária.

## 6.7 Avaliação da concordância entre análises feitas por citometria de fluxo

Visando avaliar a concordância da análise por CF feita por dois analisadores diferentes foi utilizado o método de *Bland e Altman*. Esse método foi proposto para verificar a concordância entre duas variáveis (X e Y) e inclui a avaliação a partir de um gráfico de dispersão entre a diferença das duas variáveis (X - Y) e da sua média  $(X + Y)/2$ . Nesse gráfico é possível visualizar o viés (o quanto as diferenças se afastam do valor zero), o erro (a dispersão dos pontos das diferenças ao redor da média), além de *outliers* e tendências (HIRAKATA & CAMEY, 2009).

Para a maioria dos parâmetros avaliados nos grupos de gestantes com PE e normotensas e de mulheres não gestantes, foi observada uma boa concordância dos resultados obtidos pelos dois analisadores. Os pontos obtidos mantiveram-se próximos do zero e da média, indicando diferença e erro mínimos entre as duas análises, o que conferiu credibilidade aos resultados obtidos no presente estudo (**Figura 23**).

## 6.8 Considerações finais

Os resultados obtidos no presente estudo não demonstraram um aumento da expressão dos marcadores de ativação plaquetária na PE. No entanto, não se pode descartar um papel dessa ativação na fisiopatologia da doença, uma vez que é possível admitir a exacerbação da ativação plaquetária na interface materno-fetal.

Embora os estudos envolvendo a circulação uterina não sejam muito frequentes, devido à dificuldade de obtenção de amostras para a avaliação laboratorial, tem sido relatada uma pronunciada ativação da coagulação nesse local (HIGGINS *et al.*, 1998).

Cumprе ressaltar que as discordâncias dos resultados dos estudos da literatura referentes à expressão de marcadores de ativação plaquetária podem resultar de divergências metodológicas. Embora a avaliação de marcadores de ativação plaquetária seja crescente no estudo da PE, ainda não há consenso quanto ao método ideal para avaliar esses parâmetros, incluindo a definição do anticoagulante a ser utilizado na coleta da amostra sanguínea, o tipo de amostra (sangue total ou PRP), a especificação dos anticorpos e o uso ou não de fixador no processamento da amostra. Outro aspecto importante refere-se à grande variabilidade, na população em geral, da expressão dos marcadores de ativação plaquetária, o que dificulta o estabelecimento do *cut-off* para esses parâmetros. Certamente, o avanço na pesquisa desses marcadores por CF e a padronização das fases pré-analítica e analítica dos métodos irão contribuir para o maior entendimento da ativação plaquetária na fisiopatologia da PE.

É oportuno lembrar a complexidade do diagnóstico da PE, estabelecido com base nos níveis pressóricos e de proteinúria. Até o presente, nenhum marcador laboratorial que apresente a relação custo-efetividade favorável foi proposto para o

diagnóstico dessa doença (MEADS *et al.*, 2008). Isso, indubitavelmente, dificulta a composição confiável dos grupos de mulheres a serem avaliados, comprometendo a confiabilidade dos resultados obtidos. Lindhemeir (1975) relatou a presença de doenças renais em 20 a 40% dos casos diagnosticados com PE, o que pode resultar em conclusões errôneas em pesquisas sobre essa doença, bem como na inapropriada assistência médica durante a gestação e após o parto.

# 7 CONCLUSÕES

Os dados analisados em conjunto permitem concluir que:

- ✓ O estudo possibilitou o desenvolvimento de inovações metodológicas em Hematologia Clínica para avaliar a ativação plaquetária.
- ✓ A padronização da técnica por citometria de fluxo para avaliar a ativação plaquetária e formação de agregados plaquetas-leucócitos foi estabelecida, com as seguintes vantagens:
  1. Rápida execução;
  2. Necessidade de um pequeno volume de sangue;
  3. Boa concordância entre diferentes analistas;
  4. Aplicável em outros estudos para avaliar a ativação plaquetária.
- ✓ A gestação é acompanhada por alterações na expressão de CD41a e CD61 na superfície plaquetária, além da redução na contagem de plaquetas.
- ✓ A pré-eclâmpsia é acompanhada de menor percentagem de agregados plaquetas-neutrófilos em relação às mulheres não gestantes.
- ✓ A pré-eclâmpsia grave está associada a um maior número de correlações entre os biomarcadores de ativação plaquetária, sugerindo que o processo é multifatorial.

### **7.1 Perspectivas de estudos**

- ✓ Avaliar marcadores de ativação plaquetária, em níveis basais e após ativação com agonistas, em gestantes normotensas e com PE.
- ✓ Avaliar marcadores de ativação plaquetária ao longo da gestação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAR, K.; SUCAK, A.; BEYAZIT, Y.; GENÇ, G.; HAZNEDAROĞLU, I. C.; AKSU, S.; DANISMAN, N. Lack of platelet activation reflected by circulating soluble glycoprotein V in pre-eclampsia. **Journal of International Medical Research**, v. 35, n. 5, p. 704-708, Sep.-Oct. 2007.

ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. American College of Obstetricians and Gynecologists. Number 33, January 2002. ACOG Committee on Obstetric Practice. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**. v. 77, n. 1, p. 67-75, Apr 2002.

AHMED, Y.; van IDDEKINGE, B.; PAUL, C.; SULLIVAN, H.F.; ELDER, M. G. Retrospective analysis of platelet numbers and volumes in normal pregnancy and in pre-eclampsia. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**. v. 100, n. 3, p. 216-220, Mar. 1993.

ALVAREZ, D. F.; HELM, K.; DEGREGORI, J.; ROEDERER, M.; MAJKA, S. Publishing flow cytometry data. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**. v. 298, n.2, p. L127-130, Feb. 2010.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. Practice bulletin: clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. **Obstetrics and Gynecology**. n. 33, Jan. 2002.

ARAKAWA, K.; YASUDA, S.; HAO, H.; KATAOKA, Y.; MORII, I.; KASAHARA, Y.; KAWAMURA, A.; ISHIBASHI-UEDA, H.; MIYAZAKI, S. Significant association between neutrophil aggregation in aspirated thrombus and myocardial damage in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. **Circulation Journal**. v. 73, p. 139-144, 2009.

AREFIEVA, T. I.; PROVATOROV, S. I.; SAMKO, A. N.; KRASNIKOVA, T. I.; RESINK T. J.; ERNE, P.; TKACHUK, V. A.; CHAZOV, E. I. Monocyte integrin expression and monocyte-platelet complex formation in human with coronary restenosis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v. 28, n. 10, p. 804-808, Oct. 2001.

ASHMAN, N.; MACEY, G. M.; FAN, L. S.; AZAM, U.; YAQOUB, M. M. Increased platelet-monocyte aggregates and cardiovascular disease in end-stage renal failure patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, p. 2088-2096, 2003.

ASSINGER, A; BUCHBERGER, E; LAKY, M; ESFANDEYARI, A; BROSTJAN, C; VOLF I. Periodontopathogens induce soluble P-selectin release by endothelial cells and platelets. **Thrombosis Research**. v. 127, p. 20-26, 2011.

BACAL, N. S.; FAULHABER, M. H. W. Aplicação prática em citometria de fluxo. 1. ed. São Paulo: Ateneu, 2003.

BAGAMERY, K.; KVELL, K.; GRAHAM, J. Different platelet activation levels in non-pregnant, normotensive pregnant, pregnancy-induced hypertensive and pre-eclamptic women. A pilot study of flow cytometric analysis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 121, p. 117-123, 2005.

BLANN, A. D.; DRAPER, Z. Platelet activation as a marker of heart attack. **Clinical Chimica Acta**. v. 412, n. 11-12, p. 841-842, May 2011.

BONNAR, J.; MCNICOL, G. P.; DOUGLAS, A. S. Coagulation and fibrinolytic mechanisms during and after normal childbirth. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5703, p. 200-203, 1970.

BREMME, K.; BLOMBÄCK, M. Hemostatic abnormalities may predict chronic hypertension after preeclampsia. **Gynecology and Obstetric Investigation**. v. 41, n. 1, p. 20-26, 1996.

BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. **Clinical Chemistry**. v. 46, n. 8 Pt 2, p. 1221–1229, 2000.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz fundamentos de química clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

CANZONERI, B. J.; LEWIS, D. F.; GROOME, L.; WANG, Y. Increased neutrophil numbers account for leukocytosis in women with preeclampsia. *American Journal of Perinatology*. v. 26, n. 10, p. 729-732. Nov. 2009.

CARON, C.; GOUDEMAM, J.; MAREY, A.; BEAGUE, D.; DUCROUX, G.; DROUVIN, F. Are haemostatic and fibrinolytic parameters predictors of preeclampsia in pregnancy-associated hypertension? **Thrombosis and Haemostasis**. v. 66, n. 4, p.410-414, 1991.

CASTRO, C.; GOURLEY, M. Diagnostic Testing and Interpretation of Tests for Autoimmunity. **Journal of Allergy Clinical Immunology**. v. 125, n. 2, p. S238–S247, Feb. 2010.

CEYHAN, T.; BEYAN, C.; BAŞER, İ.; KAPTAN, K.; GÜNGÖR, S.; IFRAN, A. The effect of pre-eclampsia on complete blood count, platelet count and mean platelet volume. **Annals of Hematology**, v. 85, p. 320-322, 2006.

CHAPPELL, L. C; SHENNAN, A. H. Assessment of proteinuria in pregnancy: urinary spot protein:creatinine ratio can reliably rule out proteinuria in pregnancy. **British Medical Journal**. v. 336, n. 7651, p. 968-969, May 2008.

CHU, S. G.; BECKER, R. C.; BERGER, P. B.; BHATT, D. L.; EIKELBOOM, J. W.; KONKLE, B.; MOHLER, E. R.; BERGER, J. S. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a meta-analysis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 8, n. 1, p. 148-156, Jan. 2010.

CHU, A. J. Tissue factor, blood coagulation, and beyond: an overview. **International Journal of Inflammation**. v. 2011, p. 1-30, 2011.

CLASP (Collaborative Low-dose Aspirin Study in Pregnancy) Collaborative Group. CLASP: a randomised trial of low-dose aspirin for the prevention and treatment of pre-eclampsia among 9364 pregnant women. **The Lancet**. v. 343, p. 619-629, Mar. 1994.

COATA, G.; FRUSCA, T.; BARANZELLI, D.; COSMI, E. V.; Di RENZO, G. C.; ANCeschi, M. M. Abnormal platelet lipid membrane composition in pregnancy induced hypertension. **Journal of Perinatal Medicine**. v. 20, n. 2, p. 123-127, 1992.

CUNNINGHAM, F. G.; PRITCHARD, J. A. Hematologic considerations of pregnancy-induced hypertension. **Seminars in Perinatology**. v. 2, n. 1, p. 29-38, Jan. 1978.

CUNNINGHAM, F. G. **Williams obstetricia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

da COSTA MARTINS, P.; van DEN BERK, N.; ULFMAN, L. H.; KOENDERMAN, L.; HORDIJK, P. L.; ZWAGINGA, J.J. Platelet-monocyte complexes support monocyte adhesion to endothelium by enhancing secondary tethering and cluster formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 24, p. 193-199, 2004.

DELGADO, A. V.; ALEXANDER, S. L.; MCMANUS, A. T.; PUSATERI, A. E. Antibodies against human cell receptors, CD36, CD41a, and CD62P crossreact with porcine platelets. **Cytometry B Clinical Cytometry**. v. 56, n. 1, p. 62-67, Nov. 2003.

de TUTE, R. M. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. **Histopathology**. v. 58, n. 1, p. 90-105, Jan. 2011.

di MINNO, G.; COPPOLA, A.; di MINNO, A. N. D.; POON, M. C. Glanzmann's thrombasthenia (defective platelet integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ): proposals for management between evidence and open issues. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 102, n. 6, p. 1157-1164, Dec. 2009.

DUNDAR, O.; YORUK, P.; TUTUNCU, L.; ERIKCI, A. A.; MUHCU, M.; ERGUR, A. R.; ATAY, V.; MUNGUN, E. Longitudinal study of platelet size changes in gestation and predictive power of elevated MPV in development of pre-eclampsia. **Prenatal Diagnosis**. v. 28, p. 1052-1056, Sep. 2008.

EDELSTAM, G.; LOWBEER, C.; KRAL, G.; GUSTAFSSON, S. A.; VENGE, P. New reference values for routine blood samples and human neutrophilic lipocalin during thirdtrimester pregnancy. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**. v. 61, p. 583-592, 2001.

ENDLER, G.; KLIMESCH, A.; SUNDER-PLASSMANN, H.; SCHILLINGER, M.; EXNER, M.; MANNHALTER, C.; JORDANOVA, N.; CHRIST, G.; THALHAMMER, R.; HUBER, K.; SUNDER-PLASSMANN, R. Mean platelet volume is an independent risk factor for myocardial infarction but not for coronary artery disease. **British Journal of Haematology**. v. 117, n. 2, p. 399-404, May 2002.

FALCONER, J.; PINEO, G.; BLAHEY, W.; BROWEN, T.; DOCKSTEADER, B.; JADUSINGH, I. Essential thrombocythemia associated with recurrent abortions and fetal growth retardation. **American Journal of Hematology**. v. 25, n. 3, p. 345-347, 1987.

FALLAHIAN, M.; NABAIE, F. Subclinical thrombocytopenia and preeclampsia. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**. v. 89, p. 47-48, 2005.

FARIAS, M. G.; BÓ, S.D.; Determinação do intervalo de referência para o volume plaquetário médio (VPM) utilizando o analisador hematológico Pentra 120 ABX; **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 40, n. 1, p. 39-41, 2008.

FENG, R.; SHIMAZAKI, C.; INABA, T.; TAKAHASHI, R.; HIRAI, H.; KIKUTA, T.; SUMIKUMA, T.; YAMAGATA, N.; ASHIHARA, E.; FUJITA, N.; NAKAGAWA, M. CD34<sup>+</sup>/CD41a<sup>+</sup> cells best predict platelet recovery after autologous peripheral blood stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**. v. 21, n. 12, p. 1217-1222, 1998.

FITZGERALD, M. P.; FLORO, C.; SIEGEL, J.; HERNANDEZ, E. Laboratory findings in hypertensive disorder of pregnancy. **Journal of The National Medical Association**. v. 88, n. 12, 1996.

FLETCHER, A. P.; ALKJAERSIG, N. K.; BURSTEIN, R. The influence of pregnancy upon blood coagulation and plasma fibrinolytic enzyme function. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 134, p. 743-751, 1979.

FREEDMAN, J.; E.; LOSCALZO, J. Platelet-monocyte aggregates bridging thrombosis and inflammation. **Circulation**. v. 105, p. 2130-2132, 2002.

FURIE, B.; FURIE, B. C. Mechanisms of thrombus formation. **The New England Journal of Medicine**. V. 359, n. 9, p. 938-949, 2008.

GATTI, L.; TENCONI, P. M.; GUAMERI, D.; BERTULESSI, C.; OSSOLA, M. W.; BOSCO, P.; GIANOTTI, G. A. Hemostatic parameters and platelet activation by flow-cytometry in normal pregnancy: a longitudinal study. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**. v. 24, n. 4, p. 217-219, 1994.

GERVASI, M. T.; CHALWORAPONGSA, T.; PACORA, P.; NACCASHA, N.; YOON, B. H.; MAYMON, E.; ROMERO, R. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 185, n. 4, p. 792-797, Oct. 2001.

GIBSON, B.; HUNTER, D.; NEAME, P. B.; KELTON, J. G. Thrombocytopenia in preeclampsia and eclampsia. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v. 8, n. 3, p. 234-247, Jul. 1982.

GILABERT, J.; ESTELLÉS, A.; AZNAR, J.; ESPAÑA, F.; ANDRÉS, C.; SANTOS, T.; VALLÉS, J. Contribution of platelets to increased plasminogen activator inhibitor type 1 in severe preeclampsia. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 63, n. 3, p. 361-366, 1990.

GILES, C. The platelet count and mean platelet volume. **British Journal of Haematology**. v. 48, n. 1, p. 31-37, May 1981.

GILES, C.; INGLIS, T. C. M. Thrombocytopenia and macrothrombocytosis in gestacional hypertension. **British Journal of Haematology**. v. 88, p. 1115-1119, Nov. 1981.

GKALIAGKOUSI, E.; CORRIGALL, V.; BECKER, S.; WINTER, P.; SHAH, A.; ZAMBOULIS, C.; RITTER, J.; FERRO, A. Decreased platelet nitric oxide contributes to increased circulating monocyte-platelet aggregates in hypertension. **European Heart Journal**. v.30, p. 3048-3054, 2009.

GRILL, S.; RUSTERHOLZ, C.; ZANETTI-DÄLLENBACH, R.; TERCANLI, S.; HOLZGREVE, W.; HAHN, S.; LAPAIRE, O. Potential markers of preeclampsia: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 7, n. 70, Jul. 2009.

GURNEY, D.; LIP, G. Y.; BLANN, A. D. A reliable plasma marker of platelet activation: does it exist? **American Journal of Hematology**. v. 70, n. 2, p. 139-144, Jun. 2002.

HARDING S. A.; DIN, J. N.; SARMA, J.; JESSOP, A.; WEATHERALL, M.; FOX, K. A. A. NEWBY, D. E. Flow cytometric analysis of circulating platelet-monocyte aggregates in whole blood: Methodological considerations. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 98, p. 451-456, 2007.

HARLOW, F. H.; BROWN, M. A.; BRIGHTON, T. A.; SMITH, S. L.; TRICKETT, A. E.; KWAN, Y-L; DAVIS, G. K.. Platelet activation in the hypertensive disorders of pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 187, n. 3, p. 688-695, Sep. 2002.

HARTWIG, J. H.; ITALIANO-JR, J. E. Life of the blood platelet. In HANDIN R. I.; LUX S. E.; STOSSEL T. P. **Blood: principles, practice of hematology**. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1995. Cap. 33, p. 959-1080.

HAUKKMAA, L.; SALMINEN, M. S.; LAIVUORI H *et al.* Risk for subsequent coronary artery disease after preeclampsia. **American Journal of Cardiology**. v. 93, p. 805-808, 2004.

HAWFIELD, A.; FREEDMAN, B. I. Pre-eclampsia: the pivotal role of the placenta in its pathophysiology and markers for early detection. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**. v. 3, n. 1, p. 65-73, Feb. 2009.

HEILMANN, L.; SIEKMANN, U. Hemodynamic and hemorheological profiles in women with proteinuric hypertension of pregnancy and in pregnant controls. **Archives of Gynecology and Obstetrics**. v. 246, n. 3. p. 159-168, 1989.

HESS, K.; GRANT, P. J. Inflammation and thrombosis in diabetes. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 105, sup 1, p. S43-54, May 2011.

HIGGINS, J. R.; WALSH, J. J.; DARLING, M. R. N.; NORRIS, L.; BONNAR, J. Hemostasis in the uteroplacental and peripheral circulations in normotensive and preeclamptic pregnancies. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 179, p. 520-526, 1998.

HIRAFUJI, M.; SHINODA, H. Platelet-leukocyte interaction in adhesion to endothelial cells induced by platelet-activating factor *in vitro*. **British Journal of Pharmacology**, v. 103, p. 1333-1338, 1991.

HIRAKATA, V. N.; CAMEY, S. A. Análise de concordância entre métodos de Bland-Altman. **Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre**. v. 29, n. 3, p. 261-268, 2009.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. **Hematology Oncology Clinics of North America**. v. 21, n. 1, p. 1-11, Feb. 2007.

HOLTHE, M. R.; STAFF, A. C.; BERGE L. N.; LYBERG T. Different levels of platelet activation in preeclamptic, normotensive pregnant, and nonpregnant women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 190, p. 1128-1134, 2004.

HOLTHE, M. R.; LYBERG, T.; STAFF, A. C.; BERGE, L. N. Leukocyte-platelet interaction in pregnancies complicated with preeclampsia. **Platelets**. v. 16, n. 2, p. 91-97, Mar. 2005.

HOWARTH, S.; MARSHALL, L. R.; BARR, A. L.; EVANS, S.; PONTRE, M.; RYAN, N. Platelet indices during normal pregnancy and pre-eclampsia. **British Journal of Biomedical Science**. v. 56, n. 1, p. 20-22, 1999.

HU, H.; LI N., YNGEN, M.; OSTENSON, C. G.; WALLEN, N. H.; HJEMDAHL, P. Enhanced leukocyte-platelet cross-talk in type 1 diabetes mellitus: Relationship to microangiopathy. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 2, n.1, p. 58-64, Jan. 2004.

JANES, S. L.; GOODALL, A. H. Flow cytometric detection of circulating activated platelets and platelet hyper-responsiveness in pre-eclampsia and pregnancy. **Clinical Science**. v. 86, n. 6, p. 731-739, Jun. 1994.

JANES, S. L.; KYLE, P. M.; REDMAN, C.; GOODALL, A. H. Flow cytometric detection of activated platelets in pregnant women prior to the development of pre-eclampsia. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 74, n. 4, p. 1059-1063, Oct. 1995.

JÄREMO, P.; LINDAHL, T. L.; LENNMARKEN, C.; FORSGREN, H. The use of platelet ensity and volume measurements to estimate the severity of pre-eclampsia. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 30, n. 12, p. 1113-1118, 2000.

JAROSZESKI, M. J.; RADCLIFF, G. Fundamentals of flow cytometry. **Molecular Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 37-53, 1999.

JIN, A. Y.; TUOR, U. I.; RUSHFORTH, D.; KAUR, J.; MULLER, R. N.; PETTERSON, J. L.; BOUTRY, S.; BARBER, P. A. Reduced blood brain barrier breakdown in P-selectin deficient mice following transient ischemic stroke: a future therapeutic target for treatment of stroke. **BioMed Center Neuroscience**, v. 11, n. 12, 2010.

JOSEPH, J. E.; HARRISON, P.; MACKIE, I. J.; ISENBERG, D. A.; MACHIN, S. J. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **British Journal of Haematology**. v. 115, p. 451-459, 2001.

JURK, K.; KEHREL, B. E. Platelets: physiology and biochemistry. **Seminars of Thrombosis and Hemostasis**. v. 31, n. 4, p. 381-392, 2005.

KAGEYAMA, K.; NAKAJIMA, Y.; SHIBASAKI, M.; HASHIMOTO, S.; MIZOBE, T. Increased platelet, leukocyte, and endothelial cell activity are associated with increased coagulability in patients after total knee arthroplasty. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 5, n. 4, p. 738-745, 2007.

KAITO, K.; OTSUBO, H.; USUI, N.; YOSHIDA, M.; TANNO, E. K.; MATSUMOTO, K.; HIRATA, R.; DOMITSU, K.; KOBAYASHI, M. 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**, n. 128, p. 698-702, 2005.

KASHANIAN, M.; BARADARAN, H. R.; BAHASADRI, S.; ALIMOHAMMADI, R. Risk Factors for Pre-Eclampsia: A Study in Tehran, Iran. **Archives of Iranian Medicine**. v. 14, n. 6, p. 412-415, Nov. 2011.

KAZMI, R. S.; COOPER, A. J.; LWALEED, B. A. Platelet function in pre-eclampsia. **Seminars of Thrombosis and Hemostasis**. v. 37, n. 2, p. 131-136, Mar 2011.

KEY, N. S.; MACKMAN, N. Tissue factor and its measurement in whole blood, plasma, and microparticles. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v. 36, n. 8, p. 865-875, 2010.

KHALID, S. K.; WOJDYLA, D.; SAY, L.; GÜLMEZOĞLU, A. M.; van LOOK, P. F. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic. **Lancet**. v. 367, n. 9516, p. 1066–1074, Apr. 2006.

KIM, S. W.; LIM, Y. A. Establishment of reference values for platelet activation markers by flow cytometry. **The Korean Journal of Laboratory Medicine**. v. 26, n. 5, p. 323-328, Oct. 2006.

KONIJNENBERG, A.; STOKKERS, E. W.; van der POST, J. A.; SCHAAP, M. C.; BOER K.; BLEKER O. P.; STURK A. Extensive platelet activation in preeclampsia compared with normal pregnancy: enhanced expression of cell adhesion molecules. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 176, n. 2, p.461-469, Feb. 1997a.

KONIJNENBERG, A.; van der POST, J. A.; MOL, B. W.; SCHAAP, M. C.; LAZAROV, R.; BLEKER, O. P.; BOER, K.; STURK, A. Can flow cytometric detection of platelet activation early in pregnancy predict the occurrence of preeclampsia? A prospective study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 177, n. 2, p.434-442, Aug. 1997b.

KÜHNE, T.; RYAN, G.; BLANCHETTE, V.; SEMPLE, J. W.; HORNSTEIN, A.; MODY, M.; CHANG, W.; McWHIRTER, L.; FREEDMAN, J. Platelet-Surface Glycoproteins in Healthy and Preeclamptic Mothers and Their Newborn Infants. **Pediatric Research**. v. 40, n. 6, p. 876-880, Dec. 1996.

LAIN, K. Y.; MARKOVIC, N.; NESS, R. B.; ROBERTS, J. M. Effect of smoking on uric acid and other metabolic markers throughout normal pregnancy. **The Journal of Endocrinology & Metabolism**. v. 90, p. 5743-5746, 2005.

LASKIN, S.; PAYNE, B.; HUTCHEON, J. A.; QU, Z.; DOUGLAS, M. J.; FORD, J.; LEE, T.; MAGEE, L. A.; von DADELSZEN, P. The role of platelet counts in the assessment of inpatient women with preeclampsia. **Journal of Obstetrics and Gynecology of Canada**. v. 33, n. 9, p. 900-908, 2011.

LAZARUS, A. H.; WRIGHT, J. F.; BLANCHETTE, V.; FREEDMAN, J. Analysis of platelets by flow cytometry. **Transfusion Science**. v. 16, n. 4, p. 353-361, Dec. 1995.

LINDHEIMER, M. D.; SPARGO, B.H.; KATZ, A. Renal biopsy in pregnancy hypertension. **Journal of Reproductive Medicine**. v.15, p.189-194, 1975.

LI, Z.; ZHANG, Y.; YING, M. A. J.; KAPOUN, A. M.; SHAO, Q.; KERR, I.; LAM, A.; O'YOUNG, G.; SANNAJUST, F.; STATHIS, P.; SCHREINER, G.; KARUMANCHI, S. A.; PROTTER, A. A.; POLLITT, N. S. Recombinant vascular endothelial growth factor 121 attenuates hypertension and improves kidney damage in a rat model of preeclampsia. **Hypertension**.v. 50, p. 686–692, 2007.

LOK, C. A.; NIEUWLAND, R.; STURK, A.; HAU, C. M.; BOER, K.; VANBAVEL, E.; VANDERPOST, J. A. Microparticle-associated P-selectin reflects platelet activation in preeclampsia. **Platelets**. v. 18, n. 1, p. 68-72, Feb. 2007.

LOK, C. A.; van DER POST, J. A.; SARGENT, I. L.; HAU, C. M.; STURK, A.; BOER, K.; NIEUWLAND, R. Changes in microparticle numbers and cellular origin during pregnancy and preeclampsia. **Hypertension and pregnancy**. v. 27, n. 4, p. 344-360, 2008.

LORENZI, T. F. Fisiologia das células do sangue e hemostasia. In: LORENZI, T. F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 2, p. 152-194.

LOUDEN, K. A.; BROUGHTON, P. F.; HEPTINSTALL, S.; FOX, S. C.; MITCHELL, J. R.; SYMONDS, E. M. Platelet reactivity and serum thromboxane B2 production in whole blood in gestational hypertension and pre-eclampsia. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**. v. 98, n. 12, p. 1239-1244, Dec. 1991.

LÖWENBERG, E. C.; MEIJERS, J. C. M.; LEVI, M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 68, n. 6, Jun. 2010.

MACEY, M.; MCCARTHY, D.; AZAM, U.; MILNE, T.; GOLLEDGE, P.; NEWLAND, A. Ethylenediaminetetraacetic acid plus citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole (EDTA-CTAD): a novel anticoagulant for the flow cytometric assessment of platelet and neutrophil activation *ex vivo* in whole blood. **Cytometry B Clinical Cytometry**. v. 52, n.1 p. 30-40, Jan. 2003.

MACEY, M. G.; BEVAN, S.; ALAM, S.; VERGHESE, L.; AGRAWAL, S.; BESKI, S.; THURASINGHAM, R.; MACCALLUM, P. K.; Platelet activation and endogenous thrombin potential in pre-eclampsia. **Thrombosis Research**, v. 125, p. 76-81, 2010.

MACEY, M. G.; ENNIKS, N.; BEVAN, S. Flow cytometric analysis of microparticle phenotype and their role in thrombin generation. **Cytometry B Clinical Cytometry**. v. 80, n.1, p. 57–63, Jan. 2011.

MAKUYANA, D.; MAHOMED, K.; SHUKUSHO, F. D.; MAJOKO, F. Liver and kidney function tests in normal and pre-eclamptic gestation: a comparison with non-gestational reference values. **Central African Journal of Medicine**. v. 48, p. 55–59, 2002.

MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos Saúde Coletiva**. v. 11, n. 1, p. 7-31, 2003.

MARQUARDT, L.; RUF, A.; MANSMANN, U.; WINTER, R.; SCHULER, M.; BUGGLE, F.; MAYER, H.; GRAU, A. J. Course of platelet activation markers after ischemic stroke. **Stroke**. v. 33, n. 11, p. 2570-2574, Nov. 2002.

MASOPUST, J.; MALÝ, R.; ANDRÝS, C.; VALIŠ, M.; BAŽANT, J.; HOSÁK, L. Markers of thrombogenesis are activated in unmedicated patients with acute psychosis: a matched case control study. **BMC Psychiatry**. v. 11, n. 2, Jan. 2011.

MCCRAE, K. R. Thrombocytopenia in pregnancy. **Hematology/The Education Program of the American Society of Hematology**. v. 2010; p. 397-402, 2010.

MEADS, C. A.; CNOSSEN, J. S.; MEHER, S.; JUAREZ-GARCIA, A.; ter RIET, G.; DULEY, L.; ROBERTS, T. E.; MOL, B. W.; van der POST, J. A.; LEEFLANG, M. M.; BARTON, P. M.; HYDE, C. J.; GUPTA, J. K.; KAN, K. S. Methods of prediction and prevention of pre-eclampsia: systematic reviews of accuracy and effectiveness literature with economic modeling. **Health Technology Assessment**. v. 12, n. 6, p. 1-270, Mar. 2008.

MELLEMBAKKEN, J. R.; SOLUM, N. O.; UELAND, T.; VIDEM, V.; AUKRUST, P. Increased concentrations of soluble CD40 ligand, RANTES and GRO-alpha in preeclampsia--possible role of platelet activation. **Thrombosis Haemostasis**. v. 86, n. 5, p. 1272-1276, Nov. 2001.

MICHELSON, A. D. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. **Blood**. v. 87, n.12, p. 4925-4936, Jun. 1996.

MICHELSON, A. D.; BARNARD, M. R.; KRUEGER, L. A.; FRELINGER, A. L.; MARK, I. Furman evaluation of platelet function by flow cytometry. **Methods**. v. 21, n. 3, p. 259-270, Jul. 2000.

MORRISON, R.; CRAWFORD, J.; MACPHESON, M.; HEPTINSTALL, S. Platelet behavior in normal pregnancy, pregnancy complicated by essential hypertension and pregnancy-induced hypertension. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 54, n. 3, p. 607-611, 1985.

MOR, A.; YANG, W.; SCHWARZ, A.; JONES, W. C. Platelet counts in pregnancy and labor. **Obstetrics and Gynecology**. v. 16, p. 338-342, 1960.

NEIGER, R.; CONTAG, S. A.; COUSTAN, D. R. Preeclampsia effect on platelet count. **American Journal of Perinatology**. v. 9, p.378–380, 1992.

NORONHA, J. F.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T.; LORAND-METZE, I. G.; GROTTTO, H. Z. Evaluation of reticulated platelets in patients with sickle cell diseases. **Thrombosis Research**. v. 121, n. 2, p. 259-267, May 2007.

OSTERUD, B.; BJORKLID, E. Sources of tissue factor. **Seminars of thrombosis and hemostasis**. v. 32, n. 1, p. 11-23, 2006.

PANASLUK, A.; ZAK, J.; KASPRZCKA, E.; JANICKA, K.; PROKOPOWICZ, D. Blood platelet and monocyte activations and relation to stages of liver cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology**. v. 11, n. 18, p. 2754-2758, 2005.

PASAOGLU, H.; BULDUK, G.; OGUS, E.; PASAOGLU, A.; ONALAN, G. Nitric oxide, lipid peroxides, and uric acid levels in pré-eclampsia and eclampsia. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**. v. 202, p. 87-92, 2004.

PERRY, K. G. Jr.; MARTIN, J. N. Jr. Abnormal hemostasis and coagulopathy in preeclampsia and eclampsia. **Clinical Obstetrics and Gynecology**. V. 35, n. 2, p. 338-350, Jun. 1992.

PITKIN, R. M.; WITTE, D. L. Platelet and leukocyte counts in pregnancy. **Journal of the American Medical Association**. v. 242, n. 24, p. 2696-2698, Dec. 1979.

RABINI, R. A.; SALVOLINI, E.; STAFFOLANI, R. PUGNALONI, A.; SIMONELLI, L.; BIAGINI, G.; CESTER, N.; GARZETTI, G. G.; MAZZANTI, L. Biochemical-morphological modifications of platelet membranes during pregnancy-induced hypertension. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 63, n. 3, p. 175-185, 1995.

RAMSAY, J. E.; STEWART, F.; GREEN, I. A.; SATTAR, N. Microvascular dysfunction: a link between pre-eclampsia and maternal coronary heart disease. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**. v. 110, p. 1029-1031, 2003.

REDMAN, C. W. G.; BONNAR, J.; BEILIN, L. Early platelet consumption in pre-eclampsia. **British Medical Journal**. v. 25, p. 467-469, Feb. 1978.

REMUZZI, G.; RUGGENENTI, P. Prevention and treatment of pregnancy-associated hypertension: what have we learned in the last 10 years? **American Journal of Kidney Disease**. v. 18, n. 3, p. 285-305, Sep. 1991.

Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 183, n. 1, p. S1-22, Jul. 2000.

REZENDE, J. D. **Obstetrícia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

ROBB, A. O.; DIN, J. N.; MILLS, N. L.; SMITH, I. B.; BLOMBERG, A.; ZIKRY, M. N.; RAFTIS, J. B.; NEWBY, D. E.; DENISON, F. C. The influence of the menstrual cycle, normal pregnancy and pre-eclampsia on platelet activation. **The Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 103, n. 2, p. 372-378, Feb. 2010.

ROBERTS, J. M.; TAYLOR, R. N.; MUSCI, T. J.; ROGGERS, G. M.; HUBEL, C. A.; MCLAUGHLIN, M. K. Pré-eclâmpsia: an endothelial cell disorder. **American Journal of Obstetric and Gynecology**. v. 161, n. 5, p. 1200-1204, Nov. 1989.

ROBERTS, J. M.; REDMAN, C. W. G. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. **Lancet**. v. 341, n. 8858, p. 1447-1454, Jun. 1993.

SACKS, G. P.; STUDENA, K.; SARGENT, K.; REDMAN, C. W. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. **American Journal of Obstetric and Gynecology**. v. 179, n. 1, p. 80-88, Jul. 1998).

SANTOS, E. V.; FILHO, J. M. Plaquetograma em gestantes normais e com pré-eclâmpsia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 26, n. 3, p. 201-206, 2004.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; MASSARA, R. L.; de LANA, M.; PINTO DIAS, J. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ELÓI-SANTOS, S. M.; MARTINS-FILHO, O. A. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. **Microbes and Infection**. v. 10, n. 2, p. 103-113, Feb. 2008.

SBRANA, S.; BUFFA, M.; BEVILACQUA, S.; SPILLER, D.; PARRI, M. S.; GIANETTI, J.; De FILIPPIS, R.; CLERICO, A. Granulocyte and monocyte platelet adhesion index in coronary and peripheral blood after extracorporeal circulation and reperfusion. **Cytometry B Clinical Cytometry**. v. 72, n. 3, p. 215-222, May 2007.

SEJENY, S. A.; EASTHAM, R. D.; BAKER, S. R. Platelet counts during normal pregnancy. **Journal of Clinical Pathology**. v. 28, n. 10, p. 812-813, 1975.

SHEU, J. R.; HSIAO, G.; SHEN, M. Y.; LIN, W. Y.; TZENG, C. R. The hyperaggregability of platelets from normal pregnancy is mediated through thromboxane A2 and cyclic AMP pathways. **Clinical Laboratory and Haematology**. v. 24, p. 121-129, 2002.

SHEREMATA, W. A.; WENCHE, J. Y.; HORSTMAN, L. L.; AHN, Y. S.; ALEXANDER, S.; MINAGAR, A. Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, n. 27, 2008.

SHOJI, T.; KOYAMA, H.; FUKUMOTO, S.; MAENO, T.; YOKOYAMA, H.; SHINOHARA, K.; EMOTO, M.; SHOJI, T.; INABA, M.; NISHIZAWA, Y. Platelet-monocyte aggregates are independently associated with occurrence of carotid plaques in type 2 diabetic patients. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**. v. 12, n. 6, p. 344-352, 2005.

SIBAI, B. M.; MABIE, W. C. Hemodynamics of preeclampsia. **Clinics in Perinatology**. v. 18, n. 4, p. 727-747, Dec. 1991.

SIBAI, B. M.; RAMADAN, N. K.; USTA, I. Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets HELLP syndrome. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 169, n. 4, p.1000-1006, Oct 1993a.

SIBAI, B. M.; CARITIS, S. N.; THOM, E.; KLEBANOFF, M.; MCNELLIS, D.; ROCCO, L.; PAUL, R. H.; ROMERO, R.; WITTER, F.; ROSEN, M. *et al.* Prevention of

preeclampsia with low-dose aspirin in healthy, nulliparous pregnant women. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. **The New England Journal of Medicine**. v. 329, n. 17, p. 1213-1218, Oct. 1993b.

SIBAI, B.; DEKKER, G.; KUPFERMINC, M. Pre-eclampsia. **Lancet**. v. 365, p. 785-799, 2005.

SIBAI, B. M. Prevention of preeclampsia: a big disappointment. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 179, n. 5, 1998.

SILJANDER, P. R. Platelet-derived microparticles – an updated perspective. **Thrombosis Research**. v. 127 Suppl. 2, p. S30–33, Jan. 2011.

SILL, P. R.; LIND, T.; WALKER, W. Platelet values during normal pregnancy. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**. v. 92, n. 5, p. 480-483, 1985.

SLOAND, J. A.; SLOAND, E. M. Studies on platelet membrane glycoproteins and platelet function during hemodialysis. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 8, n. 5, p. 799-803, May 1997.

STAR, J.; ROSENE, K.; FERLAND, J.; DILEONE, G.; HOGAN, J.; KESTIN, A. Flow cytometric analysis of platelet activation throughout normal gestation. **Obstetrics and Gynecology**. v. 90, n. 4 Pt 1, p. 562-568, Oct. 1997.

STIRLING, Y.; WOOLF, L.; NORTH, W. R.; SEGHETCHIAN, M. J.; MEADE, T. W. Haemostasis in normal pregnancy. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 52, n. 2, p. 176-182, 1984.

THANGARATINAM, S.; ISMAIL, K. M. K.; COOMARASAMY, A.; KHAN, K. S. Accuracy of serum uric acid in predicting complications of pré-eclampsia: a systematic review. **A International Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 113, n. 4, p. 369-378, Apr. 2006.

THÉORÊT, J. F.; CHAHROUR, W.; YACOUB, D.; MERHI, Y. Recombinant P-selectin glycoprotein-ligand-1 delays thrombin-induced platelet aggregation: a new role for P-selectin early aggregation. **British Journal of Pharmacology**. v. 148, n. 3, p. 299-305, 2006.

TOMER, A. Platelet activation as a marker for in vivo prothrombotic activity: detection by flow cytometry. **Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents**. v. 18, n. 2, p.172-177, Apr.- Jun. 2004.

TROGSTAD, L.; MAGNUS, P.; STOLTENBERG, C. Pre-eclampsia: Risk factors and causal models. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology**. v. 25, n. 3, p. 329-342, Jun. 2011.

TURGUT, B.; TURGUT, N.; YAHYA, Ç.; TEKGÜNDÜZ, E.; PAMUK, E. G.; MUZAFFER, D. Differences in platelet-leukocyte aggregates among subtypes of acute cerebral ischemia. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 305, n. 1-2, p. 126-130, Jun. 2001.

ÜSTÜN, Y. E.; DOGAN, K.; TÜRKÇÜOĞLU, I.; ÜSTÜN, Y.; MEYDANLI, M. M.; KAFKASLI, A. Evaluation of hemoglobin and platelet levels in mild, moderate and severe preeclampsia. **Perinatal Journal**. V. 15, n. 3, p. 93-98, Dec, 2007.

UZAN, J.; CARBONNEL, M.; PICONNE, O.; ASMAR, R.; AYOUBI, J. M. Preeclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. **Journal of Vascular Health and Risk Management**. v. 7, p. 467-474, 2011.

van BEERS, E. J.; SCHAAP, M. C.; BERCKMANS, R. J. *et al.* Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. **Haematologica**. v. 94, p. 1513–1519, 2009.

van BLADEL, E. R.; ROEST, M.; de GROOT, P. G.; SCHUTGENS, R. E. Up-regulation of platelet activation in hemophilia A. **Haematologica**. v. 96, n. 6, p. 888-895, Mar. 2011.

van GILS, J. M.; ZWAGINGA, J. J.; HORDIJK, P. L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, n. 2, p. 195-204, Feb. 2009.

van IERSSEL, S. H.; van CRAENENBROECK, E. M.; CONRAADS, V. M.; *et al.* Flow cytometric detection of endothelial microparticles (EMP): effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied. **Thrombosis Research**. v. 125, p. 332–339, 2010.

VANTROYEN, B.; VANSTRAELEN, D. Management of essential thrombocytemia during pregnancy with aspirin, interferon alpha-2a and no treatment. A comparative analysis of the literature. **Acta Haematologica**. v. 107, n. 3, p. 158-169, 2002.

van WIJK, M. J.; BOER, K.; BERCKMANS, R. J.; MEIJERS, C. M.; van der POST, J. A. M.; STURK, A.; van BRAVEL, E.; NIEUWLAND, R. Enhanced coagulation activation in preeclampsia: the role of APC resistance, microparticles and other plasma constituents. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 88, p. 415-420, 2002.

VÁZQUEZ-RODRIGUEZ, J. G.; RICO-TREJO, E. I. Role of uric acid in preeclampsia-eclampsia. **Ginecología y Obstetricia de México**. v. 79, n. 5, p. 292-297, May 2011.

VIEIRA, L. M.; DUSSE, L. M. S.; FERNANDES, A. P.; MARTINS-FILHO, O. M.; BASTOS, M.; FERREIRA, M. F. R.; COOPER, A. J.; LWALEED, B. A.; CARVALHO, M. G. Monocytes and plasma tissue factor levels in normal individuals and patients with deep venous thrombosis of the lower limbs: Potential diagnostic tools? **Thrombosis Research**. v. 119, n. 2, p. 157-165, 2007.

von DADELSZEN, P.; WATSON, R. W.; NOORWALE, F.; MARSHALL, J. C.; PARODO, J.; FARINE, D.; LYE, S. J.; RITCHIE, J. W.; ROTSTEIN, O. D. Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 181, n. 2, p. 408-414, Aug, 1999.

WALSH, M. T.; RYAN, M.; HILLMANN, A.; CONDREN, R.; KENNY, D.; DINAN, T.; THAKORE, J. H. Elevated expression of integrin alpha(IIb) beta(IIIa) in drug-naïve, first-episode schizophrenic patients. **Biological Psychiatry**. v. 52, p. 874-879, 2002.

WANG, Y.; GU, Y.; LUCAS, M. J. Expression of thrombin receptors in endothelial cells and neutrophils from normal preeclamptic pregnancies. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 87, n. 8, p. 3728-3734, 2002.

WANG, Y.; GU, Y.; PHILIBERTA, L.; LUCAS, M. J. Neutrophil activation induced by placental factors in normal and pre-eclamptic pregnancies *in vitro*. **Placenta**. v. 22, n. 6, p. 560-565, Jul. 2001.

WAUGH, J. J.; CLARK, T. J.; KHAN, K. S.; KILBY, M. D. Accuracy of urinalysis dipstick techniques in predicting significant proteinuria in pregnancy. **Obstetrics & Gynecology**. v. 103, n. 4, p. 769-777, Apr. 2004.

WILSON, B. J.; WATSON, M. S.; PRESCOTT, G. J, *et al.* **British Medical Journal**. v.326, p. 1-7, 2003.

WOHNER, N. Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. **Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal Chemistry**. v. 6, n.3, p. 224-228, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health report: Make every mother and child count**. Geneva: World Health Organization, 2005.

YANG, H.; LANG, S.; ZHAI, Z.; LI, L.; KAHR, W. H.; CHEN, P.; BRKIÉ, J.; SPRING, C. M.; FLICK, M. J.; DEGEN, J. L.; FREEDMAN, J.; NI, H. Fibrinogen is required for maintenance of platelet intracellular and cell-surface P-selectin expression. **Blood**, v. 114, n. 2, Jul. 2009.

YONEYAMA, Y.; SUZUKI, S.; SAWA, R.; KIYOKAWA, Y.; POWER, G. G.; ARAKI, T. Plasma adenosine levels and P-selectin expression on platelets in preeclampsia. **Obstetrics and Gynecology**. v. 97, n. 3, p. 366-370, Mar, 2001.

YOUNG, B. C.; LEVINE, R. J.; KARUMANCHI, S. Ananth. Pathogenesis of preeclampsia. **Annual Review of Pathology**. v. 5, p. 173-192, 2010.

ZHONG, Y.; TUULI, M.; ODIBO, A. O. First-trimester assessment of placenta function and the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction. **Prenatal Diagnosis**. v. 30, p. 293-308, Feb. 2010.

**ANEXO A**

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

**Parecer nº. ETIC 0243.0.203.000-10**

**Interessado(a): Profa. Luci Maria Sant'Ana Dusse  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de agosto de 2010, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação de plaquetas imaturas por citometria de fluxo na pré-eclâmpsia, e no transplante medular**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

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

**ANEXO B**

**Registro CEP: 035/2009** (Este número deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Belo Horizonte, 27 de abril de 2009.

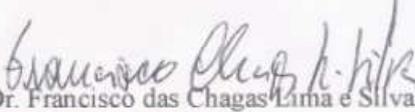
Interessada: Valeria Cristina Sandrim

Parecer:

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, em reunião do dia 24 de abril de 2009 analisou e **APROVOU** o protocolo de pesquisa **“Estudo haplotípico de novos variantes da eNOS em gestantes brancas e negras com pré-eclâmpsia: impacto sobre resposta terapêutica anti-hipertensiva.”**, registrado neste CEP sob número 035/2009, no qual V. Sa. figura como pesquisadora responsável.

OBS.:

Após o início da pesquisa, o pesquisador responsável deverá enviar ao CEP relatórios semestrais e final (para o primeiro semestre o prazo é de 30 de junho; para o segundo semestre é 31 de dezembro).

  
Dr. Francisco das Chagas Lima e Silva  
Coordenador do CEP

## ANEXO C

**FHEMIG**  
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO  
ESTADO DE MINAS GERAIS

01011751710 217102101010	
RUBRICA:	DATA:
Procurtine	21/06/2010
ORGÃO / ENTIDADE:	
FHEMIG - Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais	

**FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**Solicitação de Emenda**

O CEP-FHEMIG recebeu, em 23 de Junho de 2010, solicitações de emenda ao Projeto: "Pré-eclâmpsia e polimorfismos nos genes do fator VII e do receptor de estrogênio", enviados pela Pesquisadora Karina Braga Gomes Borges.

**EMENDAS SOLICITADAS:**

- Metodologia: inclusão de exames para a identificação de novos marcadores biológicos, importantes no diagnóstico e prognóstico da pré-eclâmpsia.
- Impacto ao sujeito da pesquisa: obtenção de coleta de 10 mL de sangue além do já utilizado.
- Alterações nos TCLE: (1) Para os grupos de gestantes com pré-eclâmpsia, (2) Para os grupos de gestantes controles, (3) Para o grupo de mulheres não gestantes.

**CONSIDERAÇÕES:**

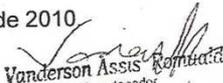
- O projeto já foi apresentado e aprovado neste CEP em 2008.
- As alterações metodológicas são pertinentes e ampliam a qualidade do trabalho.
- O impacto aos participantes da pesquisa é mínimo e está devidamente previsto no TCLE.
- Os pesquisadores garantem o cumprimento da Resolução 196/96 do CNS/MS.

**PARECER:**

**- A FAVOR DA EMENDA SOLICITADA.**

- Os pesquisadores deverão citar quando solicitados o parecer de aprovação do CEP-FHEMIG 077/2008.

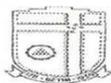
Belo Horizonte, 24 de Junho de 2010.

  
Vanderilson Assis Romualdo  
Coordenador

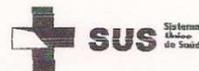
**Vanderilson Assis Romualdo**  
**COORDENADOR DO CEP-FHEMIG**

Alameda Vereador Álvaro Celso, 100 - Santa Efigênia - Belo Horizonte/MG  
CEP: 30150-260 - Fone: 0(xx)31 3239-9500 - Fax: 0(xx)31 3239-9579  
Site: <http://www.fhemig.mg.gov.br/> E-mail: [fhemig@fhemig.mg.gov.br](mailto:fhemig@fhemig.mg.gov.br)

## ANEXO D



Prefeitura Municipal de Betim  
Secretaria Municipal de Saúde  
Unidade Básica de Saúde da Família Guanabara  
UBSF Guanabara



## Declaração

Declaro, para os devidos fins, que estou de acordo com o desenvolvimento do projeto intitulado "Avaliação de plaquetas imaturas por citometria de fluxo na pré-eclâmpsia, na anemia falciforme e no transplante medular" da Faculdade de Farmácia da UFMG, no posto de saúde UBSF Guanabara.

Betim, 16 de abril de 2010

  
Wilson Ribeiro de Meireles  
Enfermeiro  
COREN/MG 185143  
Wilson Meireles  
Gerente UBSF Guanabara

## ANEXO E



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

#### Avaliação de Projeto de Pesquisa

FR: 418196

Número do Parecer: 0681.0.000.216-11

**Título do Projeto:** "Pré-Eclâmpsia: inter-relação dos sistemas hemostático e inflamatório"

**Pesquisador Responsável:** Melina de Barros Pinheiro

**PARECER DO CEP/ HOB:** o projeto em apreço foi avaliado pelo CEP-HOB e aprovado.

Data da reunião: 12 de maio de 2011

Atenciosamente,

  
**Ricardo Melo Marinho**  
Coordenador do CEP/HOB

## ANEXO F



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Para o grupo de gestantes com pré-eclâmpsia)

**PROJETO DE PESQUISA: “Inovações metodológicas em hematologia clínica: Uso da citometria de fluxo no estudo da ativação plaquetária na pré-eclâmpsia”**

Prezada Sra,

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa que tem por objetivo investigar as alterações da coagulação que ocorrem na pré-eclâmpsia e, dessa forma, contribuir para o maior entendimento desta doença.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 20 mL do seu sangue para realização dos exames e armazenamento em um banco de amostras biológicas para estudos genéticos futuros. Esclarecemos que este banco de amostras está aprovado e registrado no Comitê de Ética em Pesquisa/FHEMIG sob o nº 77/08.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo.

Esclarecemos que caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum comprometimento ao seu atendimento e tratamento.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Responsáveis:

Luci Maria Sant’Ana Dusse – telefone: 3409-6880

Maria das Graças Carvalho – telefone: 3409-6881

Olindo Assis Martins Filho – telefone: 3349-7764

Letícia Gonçalves Freitas – telefone: 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP: Alameda Vereador Álvaro Celso, nº. 100 – Santa Efigênia – Belo Horizonte – Minas Gerais. CEP 30150-260. Telefone: 3239-9500.

NOME: \_\_\_\_\_

Carteira de identidade: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Agradecemos sua valiosa participação!



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Para o grupo de gestantes controle)

PROJETO DE PESQUISA: “Inovações metodológicas em hematologia clínica: Uso da citometria de fluxo no estudo da ativação plaquetária na pré-eclâmpsia”

Prezada Sra,

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa que tem por objetivo investigar as alterações da coagulação que ocorrem na pré-eclâmpsia e, dessa forma, contribuir para o maior entendimento desta doença. Você será incluída no grupo de gestantes controle, ou seja, que não apresentam a doença.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 20 mL do seu sangue para realização dos exames e armazenamento em um banco de amostras biológicas para estudos genéticos futuros. Esclarecemos que este banco de amostras está aprovado e registrado no Comitê de Ética em Pesquisa/FHEMIG sob o nº 77/08.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo.

Esclarecemos que caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum comprometimento ao seu atendimento e tratamento.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Responsáveis:

Luci Maria Sant’Ana Dusse – telefone: 3409-6880

Maria das Graças Carvalho – telefone: 3409-6881

Olindo Assis Martins Filho – telefone: 3349-7764

Letícia Gonçalves Freitas – telefone: 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP: Alameda Vereador Álvaro Celso, nº. 100 – Santa Efigênia – Belo Horizonte – Minas Gerais. CEP 30150-260. Telefone: 3239-9500.

NOME: \_\_\_\_\_

Carteira de identidade: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Agradecemos sua valiosa participação!



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Para o grupo de mulheres não gestantes)

PROJETO DE PESQUISA: “Inovações metodológicas em hematologia clínica: Uso da citometria de fluxo no estudo da ativação plaquetária na pré-eclâmpsia”

Prezada Sra,

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa que tem por objetivo investigar as alterações da coagulação que ocorrem na pré-eclâmpsia e, dessa forma, contribuir para o maior entendimento desta doença. Você será incluída no grupo-controle, ou seja, de mulheres não gestantes.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 20 mL do seu sangue para realização dos exames e armazenamento em um banco de amostras biológicas para estudos genéticos futuros. Esclarecemos que este banco de amostras está aprovado e registrado no Comitê de Ética em Pesquisa/FHEMIG sob o nº 77/08.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo.

Esclarecemos que caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum problema.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Responsáveis:

Luci Maria Sant’Ana Dusse – telefone: 3409-6880

Maria das Graças Carvalho – telefone: 3409-6881

Olindo Assis Martins Filho – telefone: 3349-7764

Letícia Gonçalves Freitas – telefone: 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP: Alameda Vereador Álvaro Celso, nº. 100 – Santa Efigênia – Belo Horizonte – Minas Gerais. CEP 30150-260. Telefone: 3239-9500.

NOME: \_\_\_\_\_

Carteira de identidade: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Agradecemos sua valiosa participação!

## ANEXO G

FICHA CLÍNICA			
Projeto: "Inovações metodológicas em hematologia clínica: uso da citometria de fluxo no estudo da ativação plaquetária na pré-eclâmpsia"			
<b>Data:</b>			
<b>Grupo: Pré-eclâmpsia</b>		<b>Participante nº:</b>	
Diagnóstico de pré-eclâmpsia dado em: ____/____/____			
Médico responsável:			
<b>1. Identificação</b>			
Nome:			
Prontuário número:			
Nacionalidade:		Naturalidade:	
Data de nascimento:		Idade:	
Estado civil:		Escolaridade:	
Endereço:			
Rua/Avenida:			
Número:		Complemento:	
Bairro:		Cidade:	
CEP:		Estado:	
Telefone: ( )			
<b>2. Anamnese</b>			
Presença de doenças intercorrentes? (distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças autoimunes, doenças hepáticas, diabetes, câncer, sangramento, pré-eclâmpsia na família, complicações em gravidez anterior)			
Fumante? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Consumo de álcool? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		Quantidade:	
Pratica exercício físico? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Frequência:		Modalidade:	
<b>3. Informações sobre a(s) gestação(ões)</b>			
Idade gestacional: ____ semanas			
Pré-natal? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Gravidez múltipla? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
GPA (Gravidez Parto Aborto): ____/____/____			
Mesmo pai?			
Partos vaginal (PN) ou cirúrgico (PC)?			



FICHA CLÍNICA			
Projeto: "Inovações metodológicas em hematologia clínica: uso da citometria de fluxo no estudo da ativação plaquetária na pré-eclâmpsia"			
<b>Data:</b>			
<b>Grupo: Gestantes normotensas</b>		<b>Participante nº:</b>	
<b>1. Identificação</b>			
<u>Nome:</u>			
<u>Prontuário número:</u>			
<u>Nacionalidade:</u>		<u>Naturalidade:</u>	
<u>Data de nascimento:</u>		<u>Idade:</u>	
<u>Estado civil:</u>		<u>Escolaridade:</u>	
<u>Endereço:</u>			
<u>Rua/Avenida:</u>			
<u>Número:</u>		<u>Complemento:</u>	
<u>Bairro:</u>		<u>Cidade:</u>	
<u>CEP:</u>		<u>Estado:</u>	
<u>Telefone:</u> ( )			
<b>2. Anamnese</b>			
<u>Presença de doenças intercorrentes?</u> (distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças autoimunes, doenças hepáticas, diabetes, câncer, sangramento, pré-eclâmpsia na família, complicações em gravidez anterior)			
<u>Fumante?</u> <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
<u>Consumo de álcool?</u> <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		<u>Quantidade:</u>	
<u>Pratica exercício físico?</u> <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
<u>Freqüência:</u>		<u>Modalidade:</u>	
<b>3. Informações sobre a(s) gestação(ões)</b>			
<u>Idade gestacional:</u> _____ semanas			
<u>Pré-natal?</u> <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
<u>Gravidez múltipla?</u> <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
<u>GPA (Gravidez Parto Aborto):</u> ____/____/____			
<u>Mesmo pai?</u>			
<u>Partos vaginal (PN) ou cirúrgico (PC)?</u>			
<u>Intervalo interpartal (meses):</u>			
<u>Parto prematuro?</u>			
<u>Filhos vivos:</u>			

<b>4. Uso de medicamentos?</b> <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
SE SIM. Quais medicamentos?
<b>5. Informações clínicas</b>
Altura: _____ cm
Peso: _____ Kg
Ganho de peso na gravidez:
Pressão arterial: _____/_____ mmHg

FICHA CLÍNICA			
Projeto: "Inovações metodológicas em hematologia clínica: uso da citometria de fluxo no estudo da ativação plaquetária na pré-eclâmpsia"			
<b>Data:</b>			
<b>Grupo: Mulheres não gestantes</b>		<b>Participante nº:</b>	
<b>1. Identificação</b>			
<u>Nome:</u>			
<u>Nacionalidade:</u>		<u>Naturalidade:</u>	
<u>Data de nascimento:</u>		<u>Idade:</u>	
<u>Estado civil:</u>		<u>Escolaridade:</u>	
<u>Endereço:</u>			
<u>Rua/Avenida:</u>			
<u>Número:</u>		<u>Complemento:</u>	
<u>Bairro:</u>		<u>Cidade:</u>	
<u>CEP:</u>		<u>Estado:</u>	
<u>Telefone: ( )</u>			
<b>2. Anamnese</b>			
<u>Presença de doenças intercorrentes?</u> (distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças autoimunes, doenças hepáticas, diabetes, câncer, sangramento, história familiar)			
<u>Fumante?</u> <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
<u>Consumo de álcool?</u> <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		<u>Quantidade:</u>	
<u>Pratica exercício físico?</u> <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
<u>Freqüência:</u>		<u>Modalidade:</u>	
<u>Uso de medicamentos?</u> <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
SE SIM. Quais medicamentos?			
<u>Gestações?</u> <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Se SIM. Quantas?			
<u>Intercorrências durante a gestação?</u> (hipertensão, pré-eclâmpsia, aborto, parto prematuro)			
<b>3. Exame físico</b>			
<u>Altura:</u> _____ cm			
<u>Peso:</u> _____ Kg			
<u>IMC:</u>			
<u>Pressão arterial:</u> _____/_____ mmHg			

## ANEXO H

Variável	Sim	Não	Significância
<b>Fumante</b>			
PE	8 (50%)	26 (32,5%)	p= 0,17
PEG	2 (12,5%)	12 (15%)	
PEL	6 (37,5%)	14 (17,5%)	
GN	6 (37,5%)	25 (31,3%)	
CNG	2 (12,5%)	29 (36,3%)	
<b>Consumo de álcool</b>			
PE	6 (26,1%)	28 (38,4%)	p= 0,74
PEG	2 (8,7%)	12 (16,4%)	
PEL	4 (17,4%)	16 (21,9%)	
GN	9 (39,1%)	22 (30,1%)	
CNG	8 (34,8%)	23 (31,5%)	
<b>Atividade física</b>			
PE	4 (26,7%)	29 (36,3%)	p= 0,63
PEG	2 (13,3%)	11 (13,8%)	
PEL	2 (13,3%)	18 (22,5%)	
GN	4 (26,7%)	27 (33,8%)	
CNG	7 (46,7%)	24 (30%)	
<b>Mesmo pai</b>			
PE	15 (48,4%)	4 (66,7%)	p= 0,38
PEG	6 (19,4%)	3 (50%)	
PEL	9 (29%)	1 (16,7%)	
GN	16 (51,6%)	2 (33,3%)	
<b>Parto natural</b>			
PE	8 (42,1%)	10 (76,9%)	p= 0,16
PEG	4 (21,1%)	6 (46,2%)	
PEL	4 (21,1%)	4 (30,8%)	
GN	11 (57,9%)	3 (23,1%)	
<b>Parto prematuro</b>			
PE	7 (77,8%)	12 (57,1%)	p= 0,48
PEG	3 (33,3%)	7 (33,3%)	
PEL	4 (44,4%)	5 (23,8%)	
GN	2 (22,2%)	9 (42,9%)	
<b>Gravidez gemelar</b>			
PE	5 (100%)	30 (49,2%)	p= 0,06
PEG	3 (60%)	12 (19,7%)	
PEL	2 (40%)	18 (29,5%)	
GN	0 (0,0%)	31 (50,8%)	

<b>Número de gestações</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>≥2</b>	<b>Significância</b>
PE	0 (0,0%)	15 (39,5%)	20 (44,4%)	p=0,00*
PEG	0 (0,0%)	5 (13,2%)	10 (22,2%)	
PEL	0 (0,0%)	10 (26,3%)	10 (22,2%)	
GN	0 (0,0%)	10 (26,3%)	21(46,7%)	
CNG	14 (100%)	13 (34,2%)	4 (8,9%)	
<b>Número de partos</b>				
PE	17 (53,1%)	9 (50%)	9 (56,3%)	p= 0,51
PEG	5 (15,6%)	6 (33,3%)	4 (25%)	
PEL	12 (37,5%)	3 (16,7%)	5 (31,3%)	
GN	15 (46,9%)	9 (50%)	7 (43,8%)	
<b>Número de abortos</b>				
PE	27 (55,1%)	4 (33,3%)	4 (80%)	p= 0,32
PEG	13 (26,5%)	1 (8,3%)	1 (20%)	
PEL	14 (28,6%)	3 (25%)	3 (60%)	
GN	22 (44,9%)	8 (66,7%)	1 (20%)	
<b>Número de filhos vivos</b>				
PE	15 (45,5%)	9 (60%)	9 (60%)	p= 0,29
PEG	4 (28,6%)	6 (42,9%)	4 (28,6%)	
PEL	11 (57,9%)	3 (15,8%)	5 (26,6%)	
GN	18 (60%)	6 (20%)	6 (20%)	

\*p≤0,05. Dados apresentados como valor absoluto (percentagem) (Qui-quadrado/Exato de *Pearson*).

<b>Grupo sanguíneo</b>	<b>O</b>	<b>Não O</b>	<b>Significância</b>
PE	10 (43,5%)	11 (45,8%)	p=0,53
PEG	5 (62,5%)	3 (37,5%)	
PEL	5 (38,5%)	8 (61,5%)	
GN	10 (45,5%)	12 (54,5%)	
CNG	3 (75%)	1 (25%)	

Dados apresentados como valor absoluto (percentagem) (Qui-quadrado/Exato de *Pearson*).

## ANEXO I

Parâmetro	Razão de prevalência	Intervalo de confiança	p
Fumo	1,12	0,66; 1,90	0,67
Consumo de álcool	0,71	0,37; 1,39	0,32
Atividade física	0,97	0,46; 2,02	0,93
Gravidez múltipla	2,03	1,58; 2,62	0,00*
Número de gestações	0,81	0,52; 1,27	0,37
Número de abortos	0,61	0,26; 1,40	0,24
Mesmo pai	1,38	0,70; 2,70	0,35
Parto prematuro	1,36	0,82; 2,27	0,24
IMC	1,04	1,01; 1,08	0,021*
GPG	1,01	0,97; 1,04	0,70
Grupo sanguíneo O e não O	1,05	0,57; 1,93	0,89
Número de plaquetas x 10 <sup>4</sup> /μL	1,02	0,99; 1,05	0,23
IMF do CD41a	1,00	0,99; 1,00	0,95
IMF do CD61	1,00	0,99; 1,00	0,85
IMF do CD42a	1,00	0,99; 1,00	0,86
CD62P (%)	0,95	0,92; 0,99	0,013*
IMF CD61/CD41a	1,01	0,98; 1,04	0,49
IMFCD61/CD42a	1,01	0,76; 1,35	0,93
IMF CD42a/CD41a	1,02	0,97; 1,07	0,49
APM (%)	1,41	1,15; 1,72	0,001*
APN (%)	1,77	0,15; 21,47	0,66
CD14 <sup>+</sup> /FT <sup>+</sup> (%)	1,18	0,96; 1,44	0,12*

IMC: índice de massa corporal; GPG: ganho de peso na gestação; IMF: intensidade média de fluorescência; APM: agregados plaquetas-monócitos; APN: agregados plaquetas-neutrófilos; FT: fator tissular. \*p ≤ 0,20.