

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Karla Nunes Pereira

**AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO DE PLAQUETAS IMATURAS PARA O
DIAGNÓSTICO DA TROMBOCITOPENIA IMUNE E SUA RELAÇÃO
COM A GRAVIDADE DA COVID-19**

Santa Maria, RS
2022

Karla Nunes Pereira

**AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO DE PLAQUETAS IMATURAS PARA O DIAGNÓSTICO
DA TROMBOCITOPENIA IMUNE E SUA RELAÇÃO COM A GRAVIDADE DA
COVID-19**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

Coorientador: Prof. Dr. José Antonio Mainardi de Carvalho

Santa Maria, RS
2022

Pereira, Karla Nunes
PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS NO DIAGNÓSTICO DA
TROMBOCITOPENIA IMUNE E NAS ALTERAÇÕES HEMOSTÁTICAS
PRESENTES NA FISIOPATOLOGIA DA COVID-19 / Karla Nunes
Pereira.- 2022.
92 p.; 30 cm

Orientador: José Edson Paz da Silva
Coorientador: José Antonio Mainardi de Carvalho
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2022

1. Plaquetas 2. Plaquetas imaturas 3. PTI 4. COVID-19
5. IPF I. Paz da Silva, José Edson II. Mainardi de
Carvalho, José Antonio III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, KARLA NUNES PEREIRA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Karla Nunes Pereira

AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO DE PLAQUETAS IMATURAS PARA O DIAGNÓSTICO DA TROMBOCITOPENIA IMUNE E SUA RELAÇÃO COM A GRAVIDADE DA COVID-19

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovada em 25 de novembro de 2022.

José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

José Antonio Mainardi de Carvalho, Dr (UFSM)
(Coorientador)

Michel Mansur Machado, Dr (Unipampa)

Guilherme Vargas Bochi, Dr (UFSM)

Magnun Nueldo Nunes dos Santos, Phd (UNICAMP)

Diogo André Pilger, Dr (UFRGS)

Santa Maria, RS
2022

*Ao meu filho amado, Bernardo, razão da minha vida.
Ao Fernando, meu amor.
À minha mãe, Cisse, e ao meu pai Ivan (in memoriam), amo vocês.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade em realizar o curso e desenvolver este trabalho.

Ao meu orientador, Prof Dr. José Edson Paz da Silva, referência em hematologia para mim desde a graduação. Obrigada, pelas oportunidades na minha trajetória e por sempre entender que a vida é feita de fases, e que algumas vezes é necessário alterarmos os planos.

Ao meu coorientador Prof Dr. José Mainardi, Zé, saiba que nunca conseguirei expressar toda minha gratidão. Sem teu auxílio, eu não estaria aqui hoje.

Ao Prof Dr. Clóvis Paniz, sorte a minha ter uma pessoa como tu no meu caminho. Foste parte essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof Dr. Rafael Moresco, pela disponibilidade em sempre contribuir com nossos trabalhos.

À Farmacêutica Maria do Carmo Araújo e Valusia Scapin, que me auxiliaram na seleção dos pacientes no início desse trabalho.

À Sysmex do Brasil, pela Dra Helena Grotto, pela doação dos reagentes necessários para realização desse trabalho.

À toda equipe do LAC/HUSM, pelo suporte e ajuda na realização desse trabalho.

À equipe de coleta do Hemocentro de Santa Maria, pelo auxílio na coleta dos doadores.

À minha amiga e colega de setor Pâmela, obrigada pelos auxílios nas logísticas com as amostras quando necessário.

Aos colegas do nosso laboratório de pesquisa, em especial a Nati, obrigada pelas trocas de conhecimento e de ânseios.

Às minhas queridas amigas Renata, Sabrina e Vera, obrigada pelas conversas e apoio emocional diário.

À minha mãe, Cisse, e ao meu pai Ivan (in memorian), com quem aprendi desde cedo o valor conhecimento. Pai, sei que de onde estiver, estás orgulhoso da minha conquista! Se cheguei aqui, foi porque aprendi esse caminho com vocês. A Ivanise minha irmã, por nos momentos de dúvidas sempre dizer, toca ficha...

Ao Eduardo, meu cunhado, obrigada por nos ajudar nas logísticas com o Bê sempre que necessário.

Aos meus sogros, Bete e João, obrigada pelo suporte de sempre.

Ao meu esposo Fernando, se tive coragem de encarar doutorado, junto com trabalho e maternidade, foi porque sei que somos uma equipe. Obrigada pelo incentivo, apoio emocional e técnico, e principalmente pela parceria de vida.

Ao Bernardo, meu filho amado, meu maior incentivo para continuar melhorando sempre. Te amo mais que tudo!

A todos que de alguma forma contriubiram e me incentivaram para realização desse trabalho, obrigada!

“Não haverá borboletas se a
vida não passar por longas e
silenciosas metamorfoses”.

(Rubem Alves)

RESUMO

AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO DE PLAQUETAS IMATURAS NO DIAGNÓSTICO DA TROMBOCITOPENIA IMUNE E SUA RELAÇÃO COM A GRAVIDADE DA COVID-19

AUTORA: Karla Nunes Pereira

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

COORIENTADOR: Prof. Dr. José Antonio Mainardi de Carvalho

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos, células presentes na medula óssea, as quais são peças-chave na hemostasia. A adequada cinética plaquetária, com equilíbrio entre produção, ativação e apoptose é fundamental para manutenção da estabilidade desse processo. O desequilíbrio da hemostasia por diferentes causas, resulta em prejuízo na quantidade e/ou função das plaquetas. Na trombocitopenia imune (PTI) esse desequilíbrio leva a uma redução no número de plaquetas, enquanto na COVID-19 ocorre uma hiperativação plaquetária com consequente desregulação imunotrombótica. Atualmente, em adição a avaliação do número de plaquetas, os equipamentos automatizados permitem também realizar a análise de outros parâmetros plaquetários, entre eles o volume plaquetário médio (VPM), a fração de plaquetas imaturas (IPF), o número absoluto de plaquetas imaturas (AIPC), o plaquetócrito (PCT), a razão de grandes plaquetas (P-LCR), e a amplitude de distribuição das plaquetas (PDW). O objetivo deste estudo foi avaliar IPF, AIPC e o VPM no diagnóstico da PTI e nas alterações plaquetárias presentes na fisiopatologia da COVID-19. Foram analisadas amostras de sangue total com EDTA proveniente de pacientes diagnosticados com PTI (41 indivíduos) e de pacientes diagnosticados com COVID-19 (152 indivíduos), para a determinação destes marcadores no equipamento XE5000 da Sysmex. Como grupo controle saudável foram utilizadas amostras de doadores de sangue. Nossos resultados mostraram que um ponto de corte de 6,4% para o IPF pode ser utilizado como marcador laboratorial para diagnóstico de PTI. No caso da COVID-19, nossos resultados mostraram que pacientes com COVID-19 que necessitaram de tratamento intensivo apresentaram uma mediana de 6,20% (4,70-8,53) e $14,98 \times 10^9/L$ (11,15-21,25) para IPF e AIPC, respectivamente. Para os pacientes com COVID-19 sem necessidade de tratamento intensivo os valores obtidos foram de 5,30 % (3,20–6,80) e $13,39 \times 10^9/L$ (8,64-18,93). Já para o grupo controle, sem COVID-19, os valores foram de 3,40% (2,55 – 4,85) e $7,78 \times 10^9/L$ (5,58-9,97). Os valores de VPM foram de 10,40 fL (9,90 – 11,10), 9,80 fL (9,30-10,40) e 10,10 fL (9,65 – 11,00), para grupo controle, pacientes com COVID-19 sem e com necessidade de tratamento intensivo, respectivamente. Esses resultados sugerem que esses marcadores possam ser utilizados como auxiliares na avaliação da gravidade da COVID-19. Nossos resultados mostram que esses parâmetros plaquetários, uma vez padronizados e com valores de referência definidos, possam ser úteis na prática clínica com finalidade diagnóstica confirmatória no caso da PTI ou para avaliação da gravidade e acompanhamento da COVID-19.

Palavras-chave: Índices Plaquetários. Trombocitopenia Imune. COVID-19. Plaquetas. Fração de plaquetas imaturas.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE FRACTION IMMATURE PLATELETS IN THE DIAGNOSIS OF IMMUNE TROMBOCYTOPENIA AND AND ITS RELATIONSHIP WITH THE SEVERITY OF COVID-19

AUTHOR: Karla Nunes Pereira

ADVISOR: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

CO-ADVISOR: Prof. Dr. José Antonio Mainardi de Carvalho

Platelets are cytoplasmic fragments of megakaryocytes, cells present in the bone marrow, which are key players in hemostasis. Adequate platelet kinetics, with a balance between production, activation, and apoptosis, is essential to maintain the stability of this process. Hemostasis imbalance due to different causes results in changes in the number and/or function of platelets. In immune thrombocytopenia (ITP), this imbalance leads to a reduction in the number of platelets. In COVID-19, the imbalance results in platelet hyperactivation with consequent immunothrombotic dysregulation. Recently, in addition to counting the number of platelets, the analysis of other platelet parameters, including mean platelet volume (MPV), immature platelet fraction (IPF), absolute number of platelets, immature platelets (AIPC), platelet cell count (PCT), large platelet ratio (P-LCR), and PDW (platelet distribution amplitude) are performed using more advanced automated equipment. The aim of this study was to evaluate IPF (%), AIPC ($\times 10^9/L$), and MPV (fL) in ITP diagnosis and platelet changes present in the pathophysiology of COVID-19. EDTA-containing whole blood samples from patients diagnosed with ITP (41 patients) and from patients diagnosed with COVID-19 (152 patients) were analyzed for the determination of these markers in the XE5000 analyzer. Samples from blood donors were used as the healthy control group. Results showed that a cutoff of 6.4% for IPF can be used as a laboratory marker for the diagnosis of ITP. In the case of COVID-19, results showed that patients requiring intensive care had a median of 6.20% (4.70–8.53) and $14.98 \times 10^9/L$ (11.15–21.25) for IPF and AIPC, respectively. For patients with COVID-19 without intensive treatment, the values obtained were 5.30% (3.20–6.80) and $13.39 \times 10^9/L$ (8.64–18.93). For the control group without COVID-19, the values were 3.40% (2.55–4.85) and $7.78 \times 10^9/L$ (5.58–9.97). The MPV values were 10.4 fL (9.90–11.10), 9.80 fL (9.30–10.40), and 10.1 fL (9.65–11.00) for the control group, patients with COVID-19 without intensive treatment, and those in need of intensive treatment, respectively. The results suggest that these markers can be used to assess the severity of COVID-19. Our results show that once platelet parameters are standardized with defined reference values, they can be useful in clinical practice for confirmatory diagnostic purposes in the case of ITP or for the assessment of the severity and follow-up of the disease in the case of COVID-19.

Keywords: Platelet Indices. Immune Thrombocytopenia. COVID-19. Platelets. Immature platelets fraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Componentes e organização estrutural das plaquetas	23
Figura 2 – Principais receptores presentes na membrana plaquetária	24
Figura 3 – Visão geral da ativação plaquetária	28
Figura 4 – Formação do tampão hemostático	31
Figura 5 – Gráficos de dispersão dos ensaios automatizados de plaquetas imaturas	35
Figura 6 – Fluxograma para diagnóstico de PTI.....	41
Figura 7 – Estrutura do SARS-CoV-2.....	45
Figura 8 – Interação entre monócitos-plaquetas-células T em pacientes com COVID- 19	48
Figura 9 – Linhagens de SARS-COV2 circulantes no Rio Grande do Sul	49

ARTIGO CIENTÍFICO I

Figure 1 – ROC curve of immature platelet fraction (IPF) in the assessment of imune thrombocytopenia.....	58
--	----

MANUSCRITO CIENTÍFICO I

Figure 1 – (A) Fraction of immature platelets (IPF) in healthy donors and hospitalized patients with COVID-19. (B) Absolute value of immature platelets (AIPC) in healthy donors and hospitalized patients with COVID-19.....	69
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais agonistas, receptores e ligantes envolvidos na função plaquetária	25
---	----

ARTIGO CIENTÍFICO I

Table 1 – Baseline characteristics and hematological variables.....	57
---	----

MANUSCRITO CIENTÍFICO I

Table 1 – Clinical, epidemiological and laboratorial data of healthy donors and hospitalized patients with <i>Covid-19</i>	68
--	----

LISTA DE SIGLAS

AC	Adenilil ciclase
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANO6	Anoctamina 6
AIPC	Contagem absoluta de plaquetas imaturas
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano DR
AST	Aspartato aminotransferase
BREGS	Células B reguladoras
Célula NK	Célula natural killer
CEVS	Centro Estadual de Vigilância em Saúde
CK	Creatina quinase
CLEC2	Receptor semelhante a lecitina tipo C – 2
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standarts Institute</i>
COX-1	Ciclooxigenase 1
DAG	1,2-diacil-glicerol
DIC	Cogulação intravascular disseminada
EC	Célula endotelial
FV	Fator V
FXIII	Fator VIII
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GP	Glicoproteína
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
IFCC	Federação Internacional de Química Clínica
HCoV	Coronavírus humano
IL-2	Interleucina 2
IL-7	Interleucina 7
IL-10	Interleucina 10
IP3	Trifosfato de inositol
IPF	Fração de plaquetas imaturas
IP-10	Interferon induzido pela proteína 10
IR	Intervalo de referência

IVIG	Imunoglobulina humana intravenosa
KGD	Lisina-glicina-ácido aspártico
LAT	Ligante para ativação de células T
LDH	Lactato desidrogenase
Mac-1	Antígeno do macrófago 1
MCP1	Proteínas quimioatraente de monócitos
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Fosfatidilserina
PAR	Receptores ativados por protease
PCR	Proteína C Reativa
PDW	Amplitude de variação tamanho plaquetário
PLC γ	Fosfolipase C γ
PI3K	Fosfatidilinositol- 3-quinases
PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase
PLT	Plaqueta
PR	Plaquetas reticuladas
PSGL-1/CD62P	Ligante da glicoproteína p-selectina/P-selectina
PCT	Plaquetócrito
PLT-F	Plaquetas fluorescentes
PLC-R	Razão de células grandes
PTI	Trombocitopenia imune
PR	Plaquetas reticuladas
RGD	Arginina-glicina-ácido aspártico
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
ROCK	Proteína quinase associada a Rho
SESRS	Secretaria Estadual de Saúde do RS
SFK	Quinases da família SRC
SGR	Regulador de proteína G
SLP-76	Proteína citosólica linfocitária 2
TF	Fator tecidual
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
TP	Receptor de tromboxano
TREGS	Células T reguladoras

TXA2	Tromboxano A2
TXAS	Tromboxano-A sintase
VGD	Valina-glicinaácido aspártico
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VOC	Variante de preocupação
VOI	Variante de interesse
VPM	Volume plaquetário médio
FvW	Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	17
2	INTRODUÇÃO	18
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL.....	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
4.1	PLAQUETAS.....	21
4.2	HEMOSTASIA.....	25
4.2.1	Hemostasia primária	25
4.2.1.1	Adesão plaquetária.....	26
4.2.1.2	Ativação plaquetária	27
4.2.1.3	Agregação plaquetária	28
4.2.2	Hemostasia secundária	29
4.2.3	Plaquetas e inflamação.....	31
4.3	PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS.....	32
4.3.1	Valores de referência	32
4.3.2	Fração de plaquetas imaturas (IPF).....	33
4.3.3	Volume plaquetário médio (VPM).....	36
4.3.4	Razão de plaquetas grandes (P- LCR), plaquetócrito (PCT) e amplitude de variação do tamanho das plaquetas (PDW).....	37
4.4	TROMBOCITOPENIA IMUNE (PTI)	38
4.4.1	Marcadores laboratoriais na PTI	43
4.5	COVID-19.....	44
4.5.1	Variantes	48
4.5.2	Marcadores laboratoriais na COVID-19	50
5	PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS.....	52
5.1	ARTIGO CIENTÍFICO I.....	52
5.2	MANUSCRITO CIENTÍFICO I.....	63
6	DISCUSSÃO	74
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
	REFERÊNCIAS.....	79

APÊNDICE A – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO I AO PERIÓDICO	
JOURNAL OF INVESTIGATIVE MEDICINE	91

1 APRESENTAÇÃO

O presente trabalho está dividido nas seções MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÕES, as quais encontram-se descritas no ARTIGO CIENTÍFICO I e MANUSCRITO I. Estes foram redigidos conforme as normas dos periódicos aos quais foram ou serão submetidos e apresentam a íntegra desse estudo.

Os itens DISCUSSÃO e CONCLUSÃO apresentam um apanhado geral das discussões e conclusões do ARTIGO CIENTÍFICO I e do MANUSCRITO CIENTÍFICO I.

As REFERÊNCIAS citadas ao final do trabalho correspondem aos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E DISCUSSÃO.

2 INTRODUÇÃO

As plaquetas são pequenas estruturas anucleadas, formadas a partir de megacariócitos na medula óssea, as quais são peças-chave na hemostasia (BRASS; DIAMOND; STALKER, 2016). Uma visão mais integrada está surgindo recentemente em que a plaqueta é vista como uma célula imune funcional, ativa em rede com outras células intravasculares e dos sistemas em cascata do sangue (SPETH et al., 2015). Desde a sua produção na medula óssea, até a apoptose, as plaquetas desempenham funções específicas no organismo, seja no processo de hemostasia e trombose, seja durante o processo inflamatório. A adequada cinética plaquetária, com equilíbrio entre produção, ativação e apoptose é fundamental para manutenção do equilíbrio desses processos (BARROS, 2014).

A presença de doenças que alterem esse equilíbrio hemostático, resulta em desequilíbrio dessa cinética, levando ao aumento na liberação na corrente sanguínea de plaquetas jovens e da ativação e/ou na apoptose plaquetária, culminado com prejuízo na quantidade e/ou função desempenhada pelas plaquetas (BARROS, 2014).

As duas doenças, trombocitopenia imune (PTI) e *coronavirus disease 2019* (COVID-19), que fazem parte deste estudo, possuem a característica comum de causar um desequilíbrio na cinética plaquetária, devido a produção de autoanticorpos e devido ao processo inflamatório exacerbado, respectivamente. Dessa forma, ainda que por causas distintas, a PTI e a COVID-19, levam a alteração no perfil plaquetário, tornando necessária a avaliação não somente do número de plaquetas desses pacientes, mas também de outros marcadores plaquetários. Além disso, com a descoberta contínua de novas associações entre as plaquetas e as doenças inflamatórias, vai se tornando mais bem compreendida a função das plaquetas como agentes imunes. O número de plaquetas, a diversidade de mediadores inflamatórios derivados de plaquetas, e o potencial para múltiplas interações com outras células, direta e indiretamente, aumentam o impacto das plaquetas nas condições inflamatórias. É importante salientar que, em alguns contextos, as funções imunes das plaquetas são protetivas, em outros, no entanto, as plaquetas contribuem para reações inflamatórias exacerbadas (MORRELL et al., 2014).

A avaliação de novos marcadores plaquetários, como a fração de plaquetas imaturas (IPF), o número absoluto de plaquetas imaturas (AIPC), o volume plaquetário

médio (VPM), o plaquetócrito (PCT), a razão de grandes plaquetas (P-LCR) e a amplitude de variação de tamanho das plaquetas (PDW) podem ser auxiliares no diagnóstico da PTI e na avaliação das alterações plaquetárias presentes na fisiopatologia da COVID-19.

Dessa forma, a determinação de marcadores plaquetários que permitam estabelecer o diagnóstico e que sirvam para auxiliar no entendimento da fisiopatologia de diferentes doenças são cruciais para tratamento rápido e adequado, o que poderá resultar em potencial diminuição dos custos de cuidados de saúde, na melhoria na qualidade de vida dos pacientes e na escolha adequada da abordagem terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros plaquetários no diagnóstico da PTI e sua relação com a gravidade da COVID-19.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar um ponto de corte para o IPF para diagnóstico da PTI;
- Avaliar a capacidade diagnóstica do IPF na PTI;
- Avaliar se o diagnóstico laboratorial utilizando o IPF corresponde ao atual diagnóstico clínico de exclusão da PTI;
- Avaliar a presença de alterações dos parâmetros, número de plaquetas, IPF, AIPC e VPM em pacientes diagnosticados com COVID-19, com e sem necessidade de tratamento intensivo.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 PLAQUETAS

As plaquetas são pequenas estruturas anucleadas geradas a partir de megacariócitos, seus precursores na medula óssea. Tem uma vida útil média de 8 a 10 dias, e em seu estado não ativado tem formato discoide (KAUSHANSKY, 1999; JUNT et al., 2007).

Sua formação se dá através da fragmentação de pseudópodes da membrana citoplasmática de megacariócitos na medula óssea. Os megacariócitos são células grandes ($>60\mu\text{m}$), de linhagem mieloide, com um núcleo poliploide e diferem de outras células por permanecerem na medula após sua maturação. Essas células possuem mecanismos especializados em produzir e liberar as plaquetas na circulação sanguínea através da formação de extensões citoplasmáticas, denominadas pró-plaquetas. Por meio de brotamento dessas extensões citoplasmáticas ocorre a formação das plaquetas que são posteriormente levadas pela corrente sanguínea (ALBERTS et al., 2002). Além da produção na medula óssea, sabe-se que os pulmões têm papel importante na produção e armazenamento de plaquetas (LEFRANÇAIS et al., 2017).

A trombopoietina, uma glicoproteína produzida no fígado, desempenha um papel crucial neste processo, pois é capaz de influenciar a produção de plaquetas através da regulação por *feedback* negativo. Os receptores de trombopoietina estão presentes na superfície dos megacariócitos e plaquetas. A ligação da trombopoietina ao receptor do megacariócito leva à maturação dessas células, enquanto a degradação da trombopoietina depende de sua ligação ao receptor da plaqueta. Assim, as contagens de plaquetas e megacariócitos regulam a ação da trombopoietina (KUTER, 2013).

As plaquetas são únicas em sua composição estrutural e, embora anucleadas, contêm uma grande variedade de organelas celulares, grânulos e mitocôndrias. O citoplasma das plaquetas possui dois tipos de grânulos essenciais para as funções plaquetárias: os grânulos α , maiores e mais abundantes no citoplasma e os grânulos densos. Proteínas e receptores interiorizados nestes grânulos são expressos na membrana externa da plaqueta no momento de sua ativação. O conteúdo dos

grânulos plaquetários pode ganhar acesso ao exterior quando os grânulos se fundem com a membrana plasmática ou com qualquer região do sistema canalicular aberto. Da mesma forma, as glicoproteínas contidas nas membranas granulares podem se juntar à membrana plasmática após a fusão dos grânulos com a membrana plasmática ou com o sistema canalicular aberto (LICHTMAN et al., 2005). Estudo de Burkhart et al., identificou, utilizando espectrometria de massas, quase 4.000 tipos de proteínas na estrutura das plaquetas (BURKHART et al., 2012).

A membrana plaquetária consiste em uma bicamada de fosfolípidios, os quais atuam em múltiplos estágios do processo de coagulação sanguínea. Além disso, em sua superfície há expressão de receptores de glicoproteínas (GP), representadas principalmente pelo grupo das integrinas e das glicoproteínas ricas em leucina, que repelem a aderência ao endotélio normal. Por outro lado, esses receptores, quando ativados, são responsáveis pela mudança de conformação das plaquetas, favorecem a aderência das plaquetas às áreas lesionadas da parede vascular, especialmente às células endoteliais e ao colágeno exposto, e favorecem a agregação a outras plaquetas (KAMIGUTI, 2005). Sua nomenclatura é determinada pelo peso molecular em ordem decrescente de tamanho, variando de GPI até GPIX. Quando essas GP apresentam peso molecular semelhante, elas recebem uma nomenclatura adicional com letras minúsculas, como GPIa e GPIb. As GP são agrupadas em complexos: integrina $\alpha 2\beta 1$ (GPIa-IIa), integrina $\alpha 2\beta 3$ (GPIIb-IIIa) e complexo GPIb- IX-V (CURTIS; MCFARLAND, 2014).

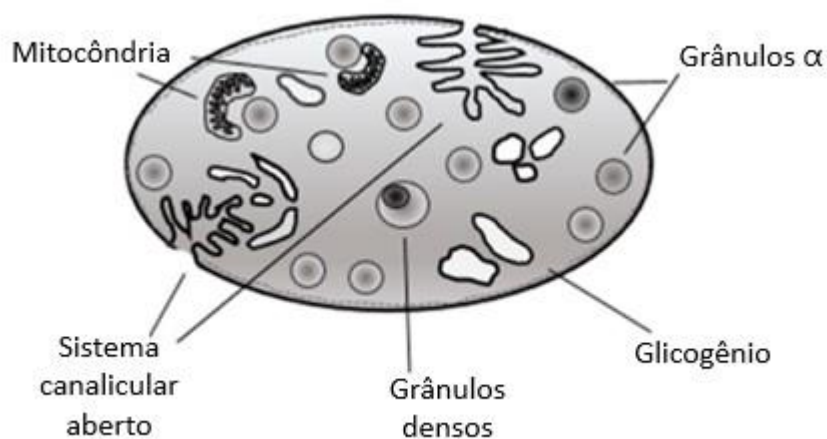
Existem cinco tipos de subunidades α ($\alpha 2$, $\alpha 11b$, αV , $\alpha 5$, $\alpha 6$) e dois tipos de subunidades β ($\beta 1$ e $\beta 3$) que formam as integrinas plaquetárias $\alpha 2\beta 3$ (receptor de fibrinogênio), dominante na superfície das plaquetas, $\alpha V\beta 3$ (receptor de vitronectina), $\alpha 2\beta 1$ (receptor de colágeno), $\alpha 5\beta 1$ (receptor de fibronectina) e $\alpha 6\beta 1$ (receptor de laminina). As integrinas interagem principalmente com a região RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) das moléculas ligantes, podendo interagir também com regiões KGD (lisina-glicina-ácido aspártico), VGD (valina-glicina-ácido aspártico), entre outras (BENNETT et al., 2009).

O complexo glicoprotéico GPIb-IX-V ou CD42 é composto por quatro componentes transmembranares. A GPIb α (CD42b) e a GPIb β (CD42c) estão covalentemente ligadas por uma ponte dissulfeto e não covalentemente associadas com GPIX (CD42) e GPV (CD42). A ligação de GPIb-IX-V com o fator von Willebrand

(FvW) promove a adesão plaquetária e desempenha um papel importante na manutenção da hemostasia na lesão vascular (LI; EMSLEY, 2013). A Tabela 1 ilustra os principais receptores e agonistas presentes nas plaquetas.

O citoesqueleto das plaquetas é composto por microtúbulos, actomiosina e espectrina e é responsável por manter a forma da plaqueta quiescente e ativada (LEE et al., 2013). Os componentes e a organização estrutural de uma plaqueta estão ilustrados nas Figuras 1 e 2.

Figura 1 – Componentes e organização estrutural das plaquetas



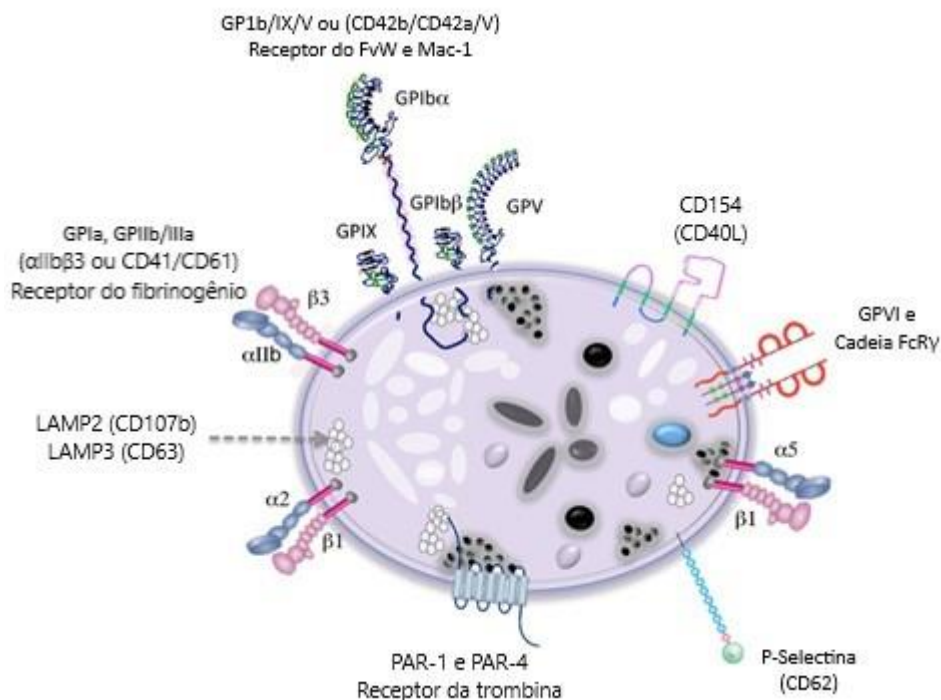
Fonte: (Adaptado de CORTESE, CHRISTOPHERSON, PELAGALLIA, 2020).

Os valores considerados normais em adultos para quantidade de plaquetas são de 150 a 400 mil plaquetas/ μ L de sangue (HOFFBRAND; MOSS, 2013). Do total das plaquetas presentes no organismo animal, 70% estão presentes na circulação e 30% no baço (CASTRO et al., 2006).

Quando a quantidade de plaquetas está abaixo do normal têm-se a condição chamada de trombocitopenia. A situação contrária, onde o número de plaquetas está elevado é denominada trombocitose. Estados trombocitopênicos são frequentemente associados ao sangramento mucocutâneo, já estados de trombocitose podem ser associados ao risco trombótico aumentado (PEERSCHKE, 2002).

As trombocitopenias podem ser classificadas quanto as causas em: diminuição na produção; aumento na destruição; e outras causas de plaquetopenia (LEE et al., 2013). O conhecimento da classificação do tipo de trombocitopenia é de extrema importância para o sucesso do diagnóstico e implantação do tratamento adequado.

Figura 2 – Principais receptores presentes na membrana plaquetária



Fonte: (Adaptado de ZAPATA; COX D, SALVATO, 2014). GPIa: glicoproteína Ia, GPIIb/IIIa: glicoproteína IIb/IIIa, GP 1b/IX/V: glicoproteína do complexo 1b/IX/V, LAMP 2: proteínas de membrana associadas aos lisossomos, LAMP 3: proteínas de membrana associadas aos lisossomos 3, PAR 1: receptor ativado por protease 1, PAR4: receptor ativado por protease 4, CD4L: ligante do CD40, GPVI: glicoproteína VI, FcR δ : receptor, GPIX: glicoproteína IX, GPIb β : glicoproteína Ib β , GPV: glicoproteína V, FvW: fator de von Willebrand, receptor Mac-1: receptor para macrófagos 1.

Tabela 1 – Principais agonistas, receptores e ligantes envolvidos na função plaquetária

Função plaquetária	Agonistas, ligantes	Receptores
Adesão plaquetária	FvW	GPIb/V/IX
	Trombospondina I	GPIb/V/IX, CD36
	Colágeno	$\alpha_2\beta_1$, GPVI, CD36
	Fibrinogênio	$\alpha_2\beta_3$
	Fibronectina	$\alpha_5\beta_1$
	Vitronectina	$\alpha_v\beta_3$
	Laminina	$\alpha_6\beta_1$
	Alta tensão de cisalhamento	GPIb/V/IX
Ativação e ampliação	Trombina	PAR1, PAR4, GPIb/V/IX
	ADP	P2Y ₁ , P2Y ₁₂
	Tromboxano A2	TP α , TP β
	Epinefrina	α_{2A}
	Serotonina	5-HT2A
Agregação e estabilização	Fibrina	$\alpha_{11b}\beta_3$ ativado
	FvW	$\alpha_{11b}\beta_3$ ativado, GPIb/V/IX
	Trombospondina I	$\alpha_{11b}\beta_3$ ativado, CD36
	Fibronectina	$\alpha_{11b}\beta_3$ ativado

Fonte: (Adaptado de JURK; KEHREL, 2005). FvW: fator de Von Willebrand, ADP: adenosina monofosfato, TP α : receptor de prostanoide α , TP β : receptor de prostanoide β , PAR 1: receptor ativado por protease 1, PAR 4: receptor ativado por protease 4, 5-HT2A: receptor de serotonina.

4.2 HEMOSTASIA

O sistema sanguíneo dos mamíferos depende de um circuito vascular de alta pressão, fechado, para cumprir suas múltiplas funções biológicas, incluindo fornecimento de oxigênio e defesa do hospedeiro contra invasores de patógenos. Nos mamíferos, desenvolveu-se uma sofisticada via de vigilância hemostática que, em caso de lesão, quase cega instantaneamente a parede danificada dos vasos, a fim de prevenir a perda excessiva de sangue e manter a integridade do sistema (ENGELMANN; MASSBERG, 2013).

4.2.1 Hemostasia primária

A hemostasia primária é o processo fisiológico que permite a formação de um tampão plaquetário em resposta a uma lesão tecidual (RAUCH; PARIS, 2018). As

plaquetas têm papel imprescindível na hemostasia primária e, além de estar em número adequado na corrente sanguínea, para exercer de maneira apropriada seu papel, é necessária a integridade de três componentes da função plaquetária: adesão, ativação e agregação.

4.2.1.1 Adesão plaquetária

A adesão plaquetária à parede do vaso danificado é a primeira etapa da hemostasia que envolve a participação da plaqueta e ocorre em torno de 1 a 3 segundos após a lesão vascular. Quando a integridade do sistema vascular é rompida, as plaquetas interagem com os componentes da matriz extracelular expostos na parede do vaso sanguíneo. A plaqueta apresenta diversos receptores de adesão, entre eles o complexo glicoprotéico Ib (GPIb α , GPIb β , GPIX e GPV), que se liga ao FvW. A ligação entre o complexo glicoprotéico Ib e o FvW possibilita a adesão de outras plaquetas circulantes na superfície vascular. Assim será formada uma monocamada de células que cobrirá o tecido exposto. Esses mecanismos são considerados responsáveis pela regulação primária da adesão plaquetária. O FvW é um multímero produzido normalmente pelas células do endotélio e age produzindo uma espécie de 'gancho' entre a plaqueta e o colágeno subendotelial. Se o FvW não existisse, a força da corrente sanguínea não permitiria a adesão plaquetária por um período suficiente para dar a continuidade ao processo de hemostasia primária (KICKLER, 2006).

O colágeno ligado ao FvW interage com as plaquetas através do complexo GPIb-IX-V e a integrina GPIIb/IIIa (α 2 β 1), porém, isso ocorre de diferentes formas dependendo da tensão de cisalhamento. Em alta tensão de cisalhamento ocorre a interação ao colágeno - FvW através do complexo GPIb-IX-V e, posteriormente, é ativado pela ligação ao GPVI sob fluxo. Por outro lado, em condições de baixo cisalhamento a ligação ocorre pela integrina GPIIb/IIIa (α 2 β 1) seguida pela ligação ao receptor GPVI, e ativação. GPIV e GPIb-IX-V podem se ligar ao colágeno sem prévia ativação, enquanto GP IIb/IIIa (α 2 β 3) e GPIIb/IIIa (α 2 β 1) requerem algum nível de ativação antes de expor os sítios de ligação ao FvW e ao colágeno (SURIN; BARTHWAL; DIKSHIT, 2008).

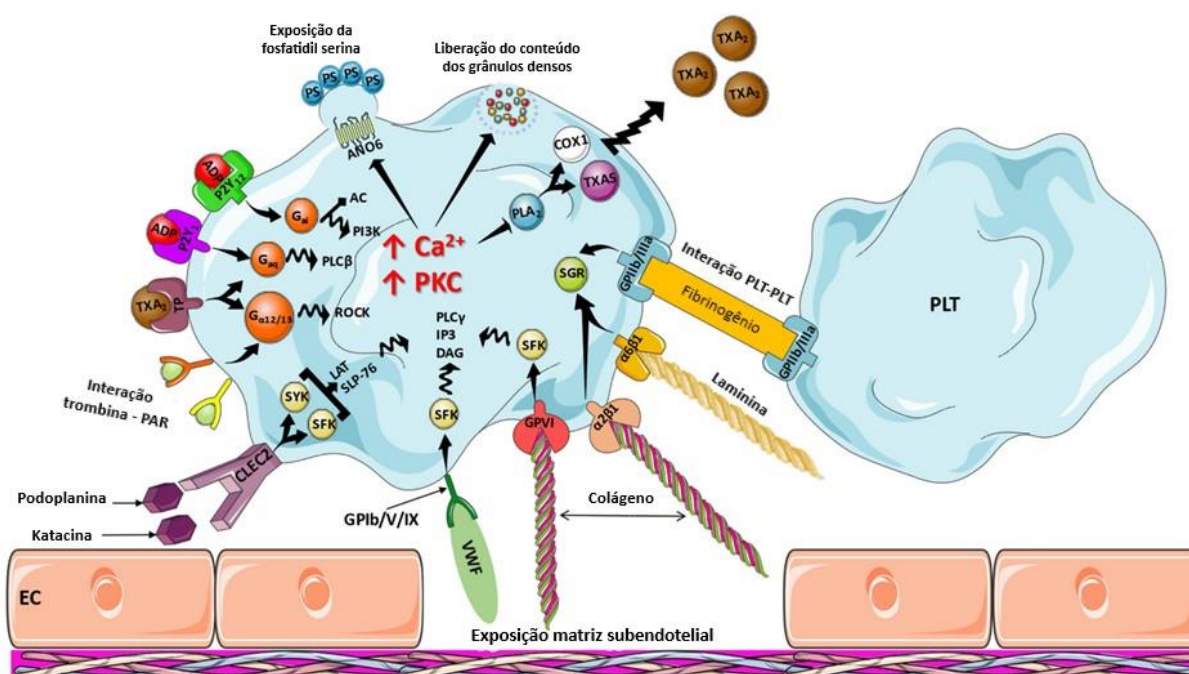
4.2.1.2 Ativação plaquetária

O processo de ativação plaquetária é multietapas, envolvendo inúmeros fatores (Figura 3). No caso de lesão vascular, receptores de adesão na superfície plaquetária, como as integrinas $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ (GPIIb/IIIa), GPIIb/IIIa ($\alpha 11\beta 3$) e o complexo GPIb/V/IX se ligam à laminina, colágeno, fibrinogênio e FvW, respectivamente, na presença de pequenos reguladores de proteína G (SGRs), quinases da família SRC (SFKs) e serina/treonina-proteína quinases (STKs) (LOUWETTE; VAN GEET; FRESO, 2012; MAKHOUL et al., 2020). Como resultado, ocorre uma mudança na forma das plaquetas. O receptor semelhante a lecitina tipo C – 2 (CLEC2) também pode ser ativado através de seu ligante endógeno podoplanina, bem como pela katalina, aglomerando-se na superfície das plaquetas e induzindo as vias da proteína tirosina quinase (envolvendo principalmente SYK, mas também SFK) e proteínas adaptadoras (ligante para ativação das células T e proteína citosólica linfocitária 2) (MORAN et al., 2022).

Subsequentemente, ocorre a ativação da fosfolipase $C\gamma$ (PLC γ), IP3, levando a liberação de 1,2-diacil-glicerol (DAG) e Ca^{2+} no citoplasma (BADOLIA et al., 2017). GPVI, o ativador plaquetário mais potente durante a adesão através da exposição ao colágeno, atua através de uma via semelhante, mas envolve apenas SFKs (NAVARRO-NUNEZ et al., 2013). Além disso, a liberação de agonistas plaquetários como o difosfato de adenosina (ADP) e o tromboxano A2 ativam o P2Y12, P2Y1 e o receptor de tromboxano (KROUPENOVA; RAVID, 2018). Esses eventos são particularmente importantes desde o P2Y12, através da ação da proteína G $G_{\alpha i}$ que inibe a adenilil ciclase, enzima responsável pela conversão do trifosfato de adenosina no antiagregante adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e estimula fosfoinositídeo 3-quinases (PI3Ks), enquanto o P2Y1 e o receptor de tromboxano sinalizam via proteínas $G_{\alpha q}$, estimulando a fosfolipase $C\beta$, induzindo também liberação de cálcio no citoplasma e ativação da proteína quinase C (VAN KOLEN; SLEGGERS, 2006). A ação do receptor de tromboxano se estende à estimulação das proteínas $G_{\alpha 12/13}$, que são responsáveis para desencadear a ativação da proteína quinase associada a Rho (ROCK) (JIN et al., 2009). A ativação ROCK é também vista com receptores ativados por protease mediados por trombina (PAR) 1 e 4, que são também receptores acoplados à proteína G (KAHN et al., 1999). Consequentemente, o Ca^{2+} promove a

ativação da fosfolipase A2, que cliva o ácido araquidônico. O ácido araquidônico liberado é substrato para ciclooxygenase-1 e a próxima tromboxano sintase, levando finalmente à formação de tromboxano A2. Além disso, através do aumento de Ca^{2+} e DAG, ocorre a secreção do conteúdo dos grânulos, contendo ADP e FvW, entre outros (FLAUMENHAFT, 2003; DE JONG; DEKKER, 2010). Em resposta a altas concentrações de cálcio, ocorre exposição da fosfatidilserina, levando ao aumento da capacidade pró-coagulante e degradação de proteínas (FERNANDEZ; KUIJPERS; HEEMSKERK, 2021).

Figura 3 – Visão geral da ativação plaquetária



Fonte: (Adaptado de THEOFILIS et al, 2022). Mecanismos de ativação plaquetária. PLT: plaquetas, PKC: proteína quinase, AC: adenilil ciclase, ADP: difosfato de adenosina, ANO6: anoctamina 6, CLEC2: receptor semelhante a lecitina tipo C – 2, COX1: ciclooxygenase 1, DAG: 1,2-diacil-glicerol, EC: célula endotelial, GP: glicoproteína, LAT: ligante para ativação de células T, PAR: receptor ativador de protease, PI3K: fosfoinositídeo 3-quinases, PLA2: fosfolipase A2, PLC: fosfolipase, PLT: plaqueta, PS: fosfatidilserina, ROCK: proteína quinase associada a Rho, SFK: SRC-família quinase, SGR: regulador de proteína G, SLP-76: proteína citosólica linfocitária 2, TP: receptor de tromboxano, TXA2: tromboxano, TXAS: tromboxano-A sintase, FvW: fator de von Willebrand.

4.2.1.3 Agregação plaquetária

A agregação plaquetária envolve a ativação de PAR1 e PAR4 e suas vias de sinalização (COUGHLIN, 2005). A formação de agregados de plaquetas ocorre devido à ativação estimulada pelo agonista da principal integrina plaquetária GP IIb/IIIa

($\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$), que na sua forma ativa se liga a moléculas de fibrinogênio e, desse modo, forma “pontes” entre plaquetas. Através das pontes $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -fibrinogênio- $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, as plaquetas formam agregados (LING et al., 2017).

Ela também ocorre devido ao metabolismo do ácido araquidônico, sendo o mesmo liberado a partir da membrana fosfolipídica das plaquetas pela ativação da enzima fosfolipase A2 e, subsequentemente, a enzima cicloxigenase (COX-1) converte o ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos. Estes são então convertidos pela tromboxano sintetase à tromboxano A2 (TXA2), funcionando como um potente agonista que induz a agregação (ASHBY; DANIEL; SMITH, 1990).

4.2.2 Hemostasia secundária

A hemostasia secundária, também denominada via da coagulação, é uma série de modificações de um conjunto de proteínas do plasma que tem por objetivo final formar um coágulo de fibrina estável no local da lesão vascular. Essas proteínas, denominadas fatores de coagulação, circulam no sangue sob a forma inativa (exceto o fator IV que é o mineral cálcio) e são numeradas de I a XIII, na ordem pelo qual foram descobertas (VIEIRA, 2014).

O modelo celular de coagulação, que substituiu o modelo tradicional da cascata, sugere que a coagulação ocorre em etapas distintas sobrepostas: iniciação, amplificação e propagação. O processo de coagulação requer a articulação e a participação de 2 tipos de células: uma célula portadora de TF e plaquetas. O processo de coagulação é impedido, pelo menos em parte, mantendo os 2 tipos de células separados até que a presença de uma lesão faça a ativação do sistema de coagulação. Na ocasião e dentro da região limitada da lesão, essas células intra e extravasculares podem entrar em contato. As plaquetas desempenham um papel importante no suporte de reações pró-coagulantes, enquanto as células endoteliais vasculares desempenham um papel fundamental na manutenção das propriedades anticoagulantes da vasculatura (HOFFMAN; MONROE, 2001).

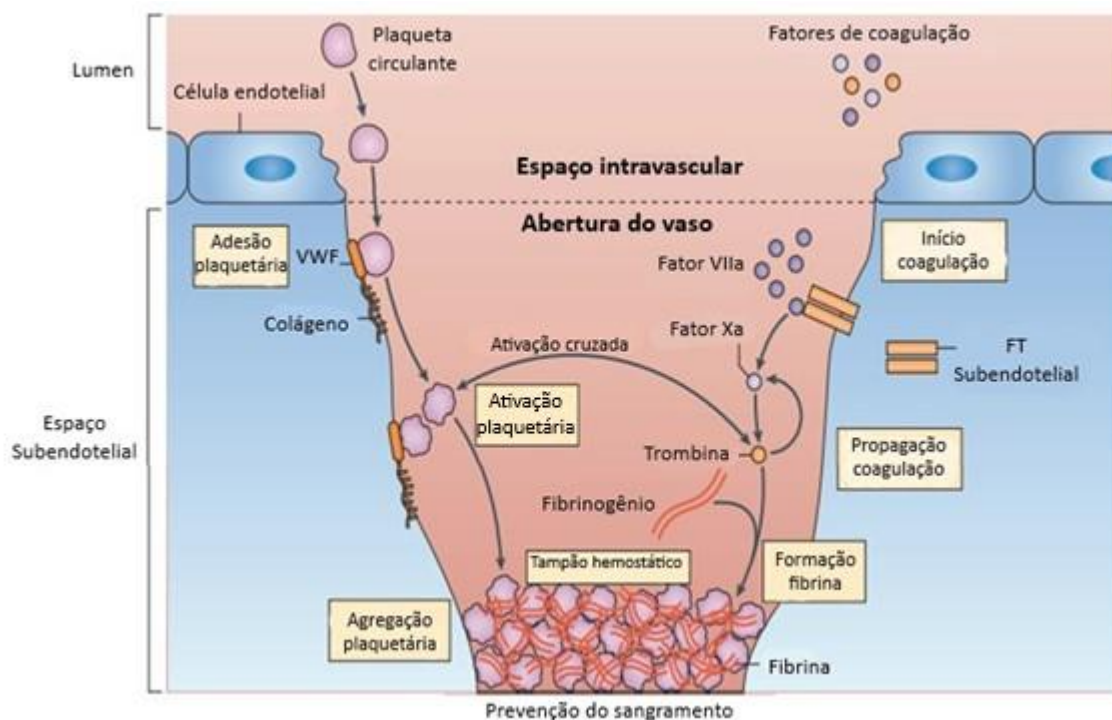
O processo de iniciação acontece com a exposição de células que expressam o fator tecidual ao fluxo sanguíneo. Uma vez combinado com o FT, o fator VII é ativado (FVIIa). O complexo FT/FVIIa ativado ativa o fator X e fator IX, tornando-os fator Xa e fator IXa. O fator Xa pode ativar o fator V. Se o fator Xa dissociar-se da superfície

celular, ele é inativado pela antitrombina III e pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI). O fator Xa, permanecendo na superfície celular juntamente com o fator V convertem uma pequena quantidade de protrombina em trombina, que participa fundamentalmente da fase de ampliação (MONROE; HOFFMAN; ROBERTS, 1996).

A adesão de plaquetas no colágeno subendotelial é mediada pelo receptor de específico, a glicoproteína Ia/IIa ($\alpha_2\beta_1$) e FvW, os quais formam ligações entre plaquetas e fibras de colágeno para ativar as plaquetas. A pequena quantidade de trombina gerada na fase de iniciação amplifica o processo da coagulação proporcionando ativação de mais plaquetas, aumentando a adesão das plaquetas e ativando os fatores V, VIII e XI. Plaquetas ativadas liberam fator V na sua forma parcialmente ativada que é então completamente ativada pela trombina ou fator Xa. O FvW é partido pela trombina para liberar o fator VIIIa. Plaquetas ativadas têm agora fatores ativados Va, VIIIa e IXa em sua superfície (OLIVER et al., 1999).

A fase de propagação é caracterizada pela produção de complexos tenases e protombinases que são agrupados na superfície das plaquetas ativadas. O complexo tenase é formado quando o fator IXa é ativado. O complexo fator VIIIa/IXa ativa fator X que juntamente com o fator Va formam o complexo protrombinase. Este, intensifica em muito a produção de trombina, que converte o fibrinogênio solúvel em fibrina e ativa o fator estabilizador da fibrina, para formar o coágulo de fibrina hemostático (FERREIRA et al., 2010). A Figura 4 ilustra o processo de hemostasia primária e secundária, resultando num tampão hemostático.

Figura 4 – Formação do tampão hemostático



Fonte: (Adaptado de ENGELMANN; MASSBERG, 2013). FvW: fator de Von Willebrand. FT: Fator tecidual

4.2.3 Plaquetas e inflamação

Além do papel já bem conhecido das plaquetas na hemostasia e na trombose, estudos têm comprovado que as plaquetas também desempenham papel na resposta imune. Tem sido sugerido que as plaquetas respondem a patógenos infecciosos introduzidos acidentalmente na corrente sanguínea e no local das feridas. Para atingir ambos os objetivos (hemostasia/reparação vascular e detecção de patógenos), as plaquetas usam tanto produtos ligados à membrana quanto produtos secretados que interagem com outros tipos de células, incluindo leucócitos (COGNASSE et al., 2019). A interação das plaquetas com os leucócitos pode facilitar a ativação de respostas imunes adaptativas. Os mecanismos pelos quais as plaquetas participam da resposta imune ainda não estão completamente elucidados. É sugerido que plaquetas podem promover maturação celular de células NK e as respostas dos monócitos/macrófagos, que por sua vez afetam as respostas específicas das células T e B. Além disso, as plaquetas podem afetar diretamente a mudança de isotipo das células B e a proliferação de células T CD8+. O CD40L derivado de plaquetas pode induzir a

maturação de células dendríticas imaturas, células apresentadoras de antígenos, através da regulação positiva de moléculas coestimuladoras e produção de IL-12/p40. As plaquetas desencadeiam a maturação das células dendríticas independentemente de metabólitos de ácido araquidônico derivados de cicloxigenase por mecanismos envolvendo CD40L (KANEIDER et al., 2003; CZAPIGA; KIRK; LEKSTROM-HIMES, 2004; LI, 2008).

4.3 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS

Com a introdução da citometria de fluxo nos contadores hematológicos, além das contagens de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, já tradicionalmente exploradas na prática clínica, os analisadores passaram a fornecer outros parâmetros como determinação de IPF, AIPC, PCT, P-LCR, VPM.

Muitos desses parâmetros não estão sendo utilizados na prática clínica devido à ausência de valores de referência para cada população avaliada. Já está bem estabelecido que diferenças significativas podem ocorrer de acordo com diferentes regiões geográficas. Além disso, a realização de controle de qualidade externo nem sempre é possível, e, por vezes, até mesmo o controle de qualidade interno está indisponível (LECOMPTE; BERNIMOULIN, 2015; MALUF; BARRETO; VIDIGAL, 2015).

Inicialmente abordaremos o conceito de valor de referência, o qual tem importância no desenvolvimento de laboratoriais, e a seguir trataremos dos marcadores plaquetários.

4.3.1 Valores de referência

A assistência à saúde deve ser baseada em evidências científicas, incluindo parâmetros adequados para os exames laboratoriais (ADELI et al., 2015).

O valor de referência é um dos elementos mais importantes de um exame laboratorial, visto que auxilia os profissionais de saúde na interpretação dos resultados, no atendimento, cuidado, diagnóstico e tratamento de doenças (KATAYEV; BALCIZA; SECCOMBE, 2010).

Ao ser incorporado ao rol de exames disponibilizados o teste deve ter sido suficientemente avaliado em diferentes populações e o intervalo de referência ou, mais genericamente, os intervalos de significância devem ter sido estabelecidos, com a segurança possível. A partir desses intervalos a interpretação dos resultados se tornará possível e útil (FERREIRA; ANDRIOLO, 2008).

O intervalo de referência (IR) é definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), pela Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) e pelo Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI) como um valor ou resultado obtido pela observação ou determinação quantitativa de um analito em uma população selecionada, com base em critérios bem definidos (CLSI, 2010; FERREIRA; ANDRIOLO, 2008).

Na maioria dos testes laboratoriais, o IR é definido pelo intervalo entre o limite superior e o inferior, entre os quais se enquadram os resultados de 95% da população de estudo, composta por indivíduos aparentemente hígidos (ARRUDA; ASSIS, 2022).

O grupo de trabalho do CLSI recomenda que cada laboratório determine seus próprios valores de referência. A recomendação do grupo é que sejam coletadas amostras de 120 indivíduos por média não paramétrica para cada partição (por exemplo sexo, faixa etária) (CLSI, 2010). Por outro lado, uma alternativa é a validação de IRs especificados na bula dos kits reagentes em conjunto com uma avaliação criteriosa da literatura é uma opção economicamente mais viável, visto que exige a testagem de vinte indivíduos aparentemente hígidos definidos (CLSI, 2010).

A validação dos IRs é fundamental para a garantia da qualidade dos testes laboratoriais, além de ser preconizada pelas normas de acreditação laboratorial. Ainda de acordo com o CLSI, o laboratório deve elaborar um documento que descreva em detalhes o estudo dos IRs e propor atualizações sempre que modificações da dinâmica laboratorial afetarem os IRs em uso definidos (CLSI, 2010).

4.3.2 Fração de plaquetas imaturas (IPF)

Em termos plaquetários, pode-se avaliar a produção de plaquetas através da fração de plaquetas imaturas ou reticuladas. As plaquetas reticuladas são ricas em ácidos nucléicos, especialmente RNA, e sua determinação pode ser usada como fator preditivo para recuperação de plaquetas em situações de consumo plaquetário

imunomediado ou em mielossupressão pós-quimioterapia (PARCO; VASCOTTO, 2012).

A imaturidade plaquetária é determinada por duas características principais: o grande tamanho das plaquetas e sua alta intensidade de fluorescência. A primeira geração de analisadores totalmente automatizados possui um canal de reticulócitos/plaquetas que mede por citometria de fluxo a fração de plaquetas imaturas em relação ao número total de plaquetas. A segunda geração dos analisadores utiliza um canal específico para plaquetas; este canal (PLT-F) dá resultados mais sensíveis e específicos. Muitos fluorocromos foram testados, mas os instrumentos mais recentes usam oxadine. A intensidade das plaquetas imaturas deve-se à interação entre os ácidos nucleicos de RNA e o corante. Essa interação necessita da perfuração da plaqueta por reagentes, permitindo assim a coloração por oxadine (BRIGGS et al., 2004; BRIGGS et al., 2012; KIENAST; SCHMITZ, 1990; WATANABE et al., 1995; ABE, et al., 2006).

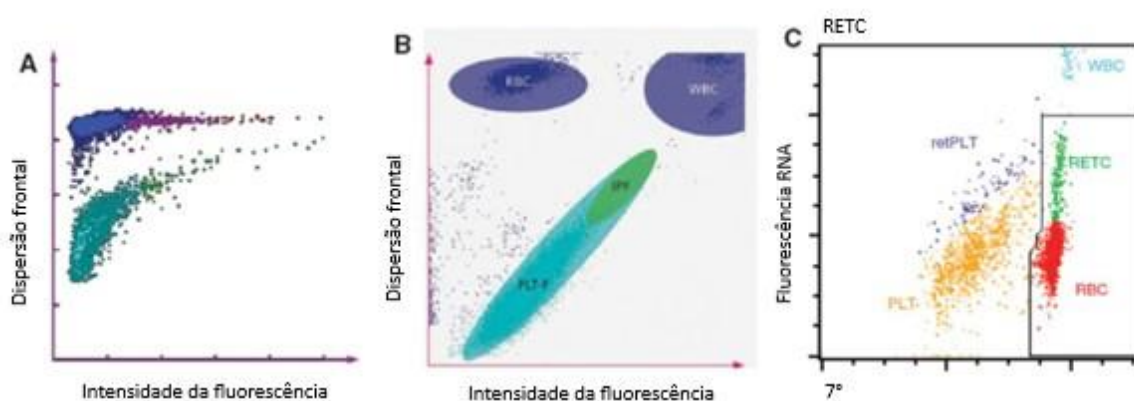
O primeiro método totalmente automatizado disponível para medir plaquetas reticuladas foi o R-3000, um analisador de reticulócitos dedicado desenvolvido pela Toa Medical (mais tarde Sysmex). O método utilizava auramina O como corante fluorescente de RNA e um laser de argônio de 488 nm. Ao plotar a dispersão de luz direta (representando o tamanho da célula) contra a fluorescência (conteúdo de RNA), as plaquetas reticuladas podem ser distinguidas das plaquetas maduras (WATANABE; KAWAI; TAKEUCHI, 1995).

A medição automatizada foi posteriormente integrada aos analisadores hematológicos Sysmex XE-2100 e XE-5000, como parte da determinação de reticulócitos. Isso possibilitou a quantificação automatizada do que a partir de então foi chamado de fração de plaquetas imaturas (IPF). Como esses instrumentos empregam um laser de diodo de 633 nm como fonte de luz, outros corantes foram necessários e uma mistura de polimetina e oxazina foi selecionada. Da mesma forma que as automações anteriores, um gráfico de dispersão direta versus dispersão de fluorescência correlaciona plaquetas com a maior intensidade de fluorescência como plaquetas imaturas, conforme ilustrado na Figura 5 (A). Com a introdução dos analisadores de hematologia da série XN, a Sysmex mudou o método IPF. Agora faz parte do ensaio de plaquetas fluorescentes, que usa um corante patenteado à base de oxazina para coloração de RNA. Ainda assim, o IPF é derivado do gráfico de de

dispersão direta (tamanho da célula) versus fluorescência lateral (conteúdo de RNA), conforme mostrado na Figura 5 (B). A correlação moderada em IPF entre XE-2100 e XN é explicada, pelo menos parcialmente, pela interferência reduzida no sistema XN. Dados preliminares sugerem que os valores de referência XN de IPF são comparáveis com o método XE-2100 (BRIGGS et al., 2012; SCHOORL et al., 2013).

Além do método Sysmex discutido acima, o Abbott CELL-DYN Sapphire é atualmente o único analisador hematológico capaz de medir plaquetas reticuladas. O ensaio é parte integrante do ensaio de reticulócitos, que é baseado no uso do corante fluorescente CD4K530. Três ângulos de luz espalhada e a fluorescência são registrados, o que permite a separação multidimensional de plaquetas e glóbulos vermelhos (Figura 5 C) (HOFFMANN; VAN DEN BROEK; CURVERS, 2013).

Figura 5 – Gráficos de dispersão dos ensaios automatizados de plaquetas imaturas



Fonte: (Adaptado de HOFFMANN; JOHANNES, 2014).

O IPF representa a taxa de produção das plaquetas. Pode ser expresso como porcentagem, IPF (%) das contagens de plaquetas ou como número absoluto, AIPC ($\times 10^9/L$). Além disso, pode ser usado para distinguir entre o aumento e diminuição da produção de plaquetas (BRIGGS et al., 2004). Estudo recente, realizado com 637 pacientes mostrou que o IPF tem grande potencial em avaliar a etiologia da trombocitopenia (destruição ou falta de produção) (ALI GRAHAM; DEMPSEY-HIBBERT, 2019). Além disso, alguns estudos têm sugerido que a avaliação do IPF possa ser um marcador precoce de desenvolvimento de PTI crônica (ADLY et al., 2015). Em trabalho desenvolvido por Abd El-Ghil e Assar (2015), que avaliou o IPF em diferentes fases da PTI, demonstrou-se que o número de plaquetas imaturas estava

mais elevado em pacientes com PTI recém diagnosticada, e, que, desta forma, a determinação desse parâmetro em pacientes com PTI pode fornecer informações importantes a respeito da trombocitopoiese (ABD EL-GLI; ASSAR, 2015).

Além de informações sobre a etiologia e evolução da trombocitopenia, o IPF também é sugerido como um marcador útil com relação ao risco de sangramento. O aumento nos valores de IPF está associado ao maior risco de sangramento dos pacientes com PTI (FRELINGER et al., 2015).

Somado a utilização em pacientes com trombocitopenia, em pacientes com COVID-19 também tem sido observado o envolvimento e a importância da determinação das plaquetas imaturas. Tem sido sugerido que um aumento na quantidade de plaquetas mais jovens pode estar relacionado com uma maior probabilidade de eventos trombóticos em pacientes com COVID-19 que necessitam de tratamento intensivo (RANUCCI et al., 2020). Dessa forma valores mais elevados de IPF na circulação pode estar associada a maior gravidade da COVID-19 (COHEN et al., 2021).

Da mesma forma que o IPF, o AIPC avalia a quantidade de plaquetas jovens na circulação, porém o valor é dado em número absoluto de plaquetas reticuladas. O valor da contagem absoluta de plaquetas imaturas (AIPC) é obtido pela multiplicação do IPF pela contagem de plaquetas e representa o número absoluto de plaquetas reticuladas (JEON et al., 2020).

4.3.3 Volume plaquetário médio (VPM)

O VPM é o índice que corresponde à média do volume das plaquetas no sangue periférico. Trata-se de uma medida indireta da reatividade plaquetária, podendo refletir mudanças no nível de estimulação ou na taxa de produção das plaquetas (WENDLAND; FARIAS; MANFROI, 2009). Numerosos estudos relacionam o VPM com diversas condições clínicas, porém, apesar de ser um marcador disponível há mais tempo nos equipamentos automatizados, a falta de padronização e a definição de valores de referência mais personalizados fazem com que esse parâmetro seja ainda pouco útil na prática clínica (NORIS; MELAZZINI; BALDUINI, 2016). Da mesma forma que o IPF, o aumento no VPM está associado ao maior risco de sangramento em pacientes com PTI (FRELINGER et al., 2015). Na COVID-19, não há consenso

sobre a relação da gravidade da doença com aumento do VPM. Os estudos que avaliaram esse índice, tiveram resultados diversos. Observou-se relação da gravidade com da COVID-19 com aumento do VPM, mas também foi observado aumento do VPM em casos assintomáticos (HE et al., 2020; GUMUS; DEMIR; YUKKALDIRAN, 2021).

4.3.4 Razão de plaquetas grandes (P- LCR), plaquetócrito (PCT) e amplitude de variação do tamanho das plaquetas (PDW)

O P-LCR representa o percentual de plaquetas grandes, e é calculado a partir do histograma de distribuição do tamanho plaquetário. Seu valor de referência varia entre 15,8 e 41,6 % (MONTEIRO, 2017). O P-LCR de plaquetas quando analisada em conjunto com outros par plaquetários auxilia no diagnóstico das doenças relacionadas a trombocitose (KABUTOMORI; KANAKURA; IWATANI, 2007).

O PCT corresponde ao produto do número absoluto das plaquetas multiplicado pelo VPM e fornece mais informações a respeito da massa plaquetária total. Estudos têm relacionado o PCT com o prognóstico de diversos tipos de neoplasias, como por exemplo câncer de pulmão (WANG J et al., 2019).

Foram demonstrados menores valores de PCT em pacientes com PTI quando comparados aos valores em indivíduos saudáveis. Além disso, sugere-se que o PCT possa ser um marcador adicional a ser utilizado no diagnóstico diferencial em doenças hematológicas, uma vez que foi observado que o valor médio do PCT é menor em pacientes com de linfoma de Hodgkin e com síndrome mielodisplásica (SALTO et al., 2012).

O PDW indica a heterogeneidade dos volumes plaquetários, sendo que um PDW elevado indica plaquetas com tamanhos variados e um PDW baixo sugere uma população homogênea de plaquetas (COMAR; SILVA, 2009). Avaliação do PDW em pacientes com COVID-19 mostrou aumento desse marcador plaquetário em pacientes com a forma mais severa da doença (AYDINYILMAZ et al., 2021).

Nosso estudo aborda alguns desses parâmetros plaquetários em duas situações distintas nas quais é evidenciado alteração plaquetária, a PTI e a COVID-19.

4.4 TROMBOCITOPENIA IMUNE (PTI)

A PTI, anteriormente conhecida como púrpura trombocitopênica imune, é uma doença imunomediada adquirida que acomete adultos e crianças, caracterizada pela diminuição transitória ou persistente do número de plaquetas, e, dependendo do grau de trombocitopenia pelo aumento do risco de sangramento (COOPER; BUSSEL, 2006; THOTA et al., 2012).

Segundo o Consenso Internacional (Conferência de Consenso de Vicenza) reunido na Itália em 2007, a terminologia púrpura trombocitopênica idiopática, em uso corrente até a data, foi alterada para “trombocitopenia imune primária” - (PTI). Este consenso recomendou a utilização do termo “imune”, ao invés de “idiopática”, realçando o papel dos mecanismos imunológicos subjacentes; foi proposto o abandono do termo “púrpura” devido ao fato de nem todos os doentes manifestarem sinais de hemorragia na forma de púrpura. O limiar inferior estabelecido para diagnóstico foi de $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ plaquetas, e, pode ser encontrada isoladamente (primária) ou associada a outras doenças (secundária) (RODEGHIERO et al., 2009).

Dados de estudos epidemiológicos internacionais em adultos fornecem uma estimativa de incidência de 1,6 a 2,7 casos por 100.000 pessoas/ano e uma prevalência de 9,5 a 23,6 casos por 100.000 pessoas, com predominância no sexo feminino (ABRAHAMSON et al., 2009). De acordo com o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas do Ministério da Saúde (2019) não há dados oficiais a respeito de sua incidência e prevalência na população brasileira (BRASIL, 2019).

A principal característica da doença é a destruição autoimune das plaquetas. Adicionalmente, alguns estudos demonstram que há uma certa supressão na produção de plaquetas na medula óssea que também pode estar envolvida na patogênese da PTI (ABADI; YARCHOVSKY-DOLBERG; ELLIS, 2015).

Apesar da etiologia desconhecida, reconhecem-se autoanticorpos, geralmente da classe IgG, mais raramente IgM ou IgA, direcionados a antígenos da membrana plaquetária. Uma vez que a plaqueta apresenta um anticorpo aderido à sua membrana, é reconhecida por macrófagos localizados no baço e em outras áreas do sistema reticuloendotelial, onde são destruídas, levando a um menor tempo de vida médio e, conseqüentemente, a menores contagens de plaquetas circulantes (COOPER; BUSSEL, 2006). Os principais alvos antigênicos das plaquetas são as

glicoproteínas do complexo GP IIb-IIIa ($\alpha 2\beta 3$), que são receptores do fibrinogênio, e a glicoproteína GPIb-IX-V, receptor do fator de von Willebrand (WOODS et al., 1984a; WOODS et al., 1984b), enquanto uma proporção inferior de autoanticorpos reage as proteínas GP Ia-IIa ($\alpha 2\beta 1$) e GP IV, receptores do colágeno (HE et al., 1994).

No entanto, apesar de conhecido envolvimento de autoanticorpos, em 30% a 40% dos pacientes nenhum anticorpo detectável é encontrado. Essa não detecção de anticorpos pode ser devido a falta de robustez dos testes de anticorpos usados ou talvez devido a um mecanismo mediado por células T (CINES et al., 2009; AL-SAMKARI et al., 2020).

A alteração nas funções de 2 subtipos de linfócitos, B e T reguladores, tem sido relacionada ao desenvolvimento da PTI:

1- As células Bregs, que são uma subpopulação de linfócitos B reguladores ($CD19^+$, $CD41^{hi}$, $CD38^{hi}$), cuja função é reduzir a ativação de células T $CD4^+$ e desencadear o recrutamento de células T reguladoras (Tregs), e que estariam com sua função prejudicada na PTI (ZUFFEREY; KAPUR; SEMPLÉ, 2017).

2- As células Tregs, que são linfócitos T ($CD4^+$, $CD25^+$, $FoxP3^+$). Sabe-se que as respostas imunes celulares de pacientes com PTI têm as marcas características de quebra em seu mecanismo de tolerância. As células T auxiliares (Th) e as citocinas que elas produzem desempenham um papel fundamental na patogênese da doença (CINES et al., 2009; CULIĆ et al., 2006).

A subpopulação de linfócitos Treg, tem papel central nos mecanismos adicionais de tolerância periférica. Tregs representam 5–10% da população normal de células T $CD4^+$ (WING; SAKAGUCHI, 2010). Elas produzem citocinas que possuem papel crucial na indução e manutenção da tolerância periférica e prevenção da autoimunidade. As células Treg inibem a produção e proliferação de citocinas nos linfócitos T, a produção de anticorpos pelos linfócitos B, a atividade citotóxica das células NK e a manutenção das células dendríticas, resultando na indução da tolerância (TAN; PEEVA; ZANDMAN-GODDARD, 2014). A quebra nesse mecanismo de controle desenvolvido pelas células Treg pode estar envolvido na patogênese da PTI. Somado as questões celulares, o perfil de citocinas de pacientes com PTI também está desequilibrado, por exemplo, concentrações séricas mais elevadas de interleucina (IL) -2, interferon (IFN) - γ e IL-17 (TALAAT et al., 2014).

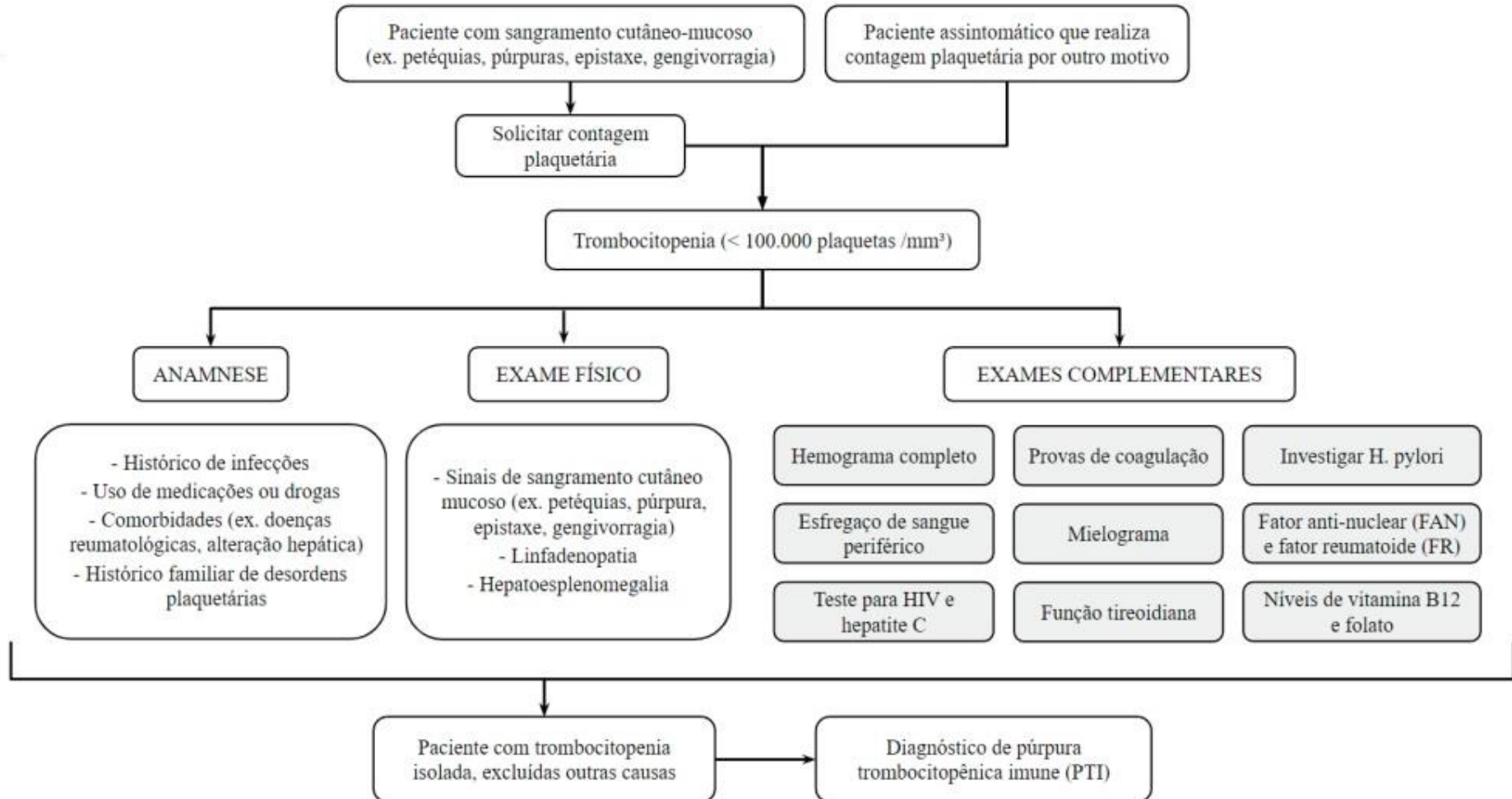
A nível medular, foi demonstrado que mesmo os megacariócitos estando em número aumentado na medula óssea de alguns pacientes com PTI, muitos apresentam sinais de anormalidades morfológicas, como apoptose aumentada, verificada pelo aumento na atividade da caspase 3 (HOUWERZIJL et al., 2006).

Quanto a duração da doença, a PTI é estratificada em: recém-diagnosticada (até 3 meses de duração), persistente (3-12 meses de duração) e crônica (mais que 12 meses de duração) (RODEGHIERO et al., 2009). A forma crônica da PTI acomete cerca de dois terços dos pacientes adultos e 20% das crianças diagnosticadas e, frequentemente, é refratária ao tratamento (MICHEL et al., 2011; MOULIS et al., 2014). Entretanto, diante de um diagnóstico de PTI é difícil prever se a trombocitopenia será revertida espontaneamente ou evoluirá para doença crônica (ABD EL-GLIL; ASSAR, 2015).

Além disso, de acordo com estudo de Grimaldi-Bensouda et al. (2016), 50,4% dos pacientes adultos avaliados durante um ano apresentaram progressão para PTI crônica, enquanto 37,4% foram curados e o fizeram espontaneamente (isto é, sem tratamento) e 12,2% foram curados com tratamento, usando rituximabe, isoladamente ou rituximabe mais esplenectomia. Este estudo mostra ainda que os fatores de risco para cronicidade foram explorados principalmente em crianças, sendo que em adultos existem poucos estudos (GRIMALDI-BENSOUDA et al., 2016; BRASIL, 2019).

Um diagnóstico presuntivo de PTI é feito quando a anamnese, exame físico, hemograma completo e exame do esfregaço de sangue periférico não sugerem outras etiologias para a trombocitopenia (PROVAN et al., 2010). A Figura 6 ilustra um fluxograma para diagnóstico de PTI.

Figura 6 – Fluxograma para diagnóstico de PTI



Fonte: (Adaptado de: ROSA et al., 2022).

O padrão ouro para confirmação da PTI é a realização de mielograma, porém, por ser um exame bastante invasivo ainda não há consenso sobre a realização desta análise. Faltam grandes estudos randomizados sobre o gerenciamento de PTI, resultando em controvérsia significativa e variação na prática. Os consensos disponíveis resumem evidências e recomendações disponíveis sobre gestão de primeira e segunda linha de adultos e crianças com PTI (NEUNERT et al., 2019). Assim, devido à falta de parâmetros clínicos e laboratoriais precisos o diagnóstico permanece sendo feito por exclusão (PROVAN et al., 2010).

O tratamento da PTI é definido de acordo com vários aspectos, como a idade do paciente, o número de plaquetas e a presença ou não de sangramento mucocutâneo. Para adultos, a primeira linha de tratamento recomendada em recém-diagnosticados, com plaquetas abaixo de $30 \times 10^3/\mu\text{L}$ e com risco de sangramento, são corticosteroides (prednisona ou dexametasona). Pacientes que não respondem aos corticosteroides devem ser tratados com agonistas de receptores da trombopoetina (eltrombopag). A segunda linha de tratamento para PTI consiste na administração de fármacos imunossupressores e esplenectomia (NEUNERT et al., 2019).

O tratamento da PTI em crianças e adolescentes com quadro agudo de PTI é ainda motivo de debate, já que não há evidências definitivas da superioridade do tratamento medicamentoso sobre a observação criteriosa (TARANTINO; BUCHANAN, 2004). A primeira linha de tratamento para crianças (considerando contagem de plaquetas abaixo de $20 \text{ mil}/\mu\text{L}$ e a existência ou não de sangramentos nas mucosas) é composta por corticosteroides, imunoglobulina humana intravenosa (IVIG) e a imunoglobulina anti-D. Assim como nos adultos, a segunda linha de tratamento para PTI consiste na utilização de fármacos imunossupressores e realização de esplenectomia (NEUNERT et al., 2019).

Além de prever o curso da doença, se ocorrerá regressão ou evolução para cronicidade, outro importante aspecto no contexto da PTI é a estimativa do risco de sangramento. Essa estimativa é baseada, principalmente, no número de plaquetas, porém, a avaliação da função plaquetária também exerce papel essencial em pacientes com baixa contagem de plaquetas (MIDDELBURG et al., 2016).

Desta forma, o desenvolvimento de parâmetros diagnósticos e prognósticos que possam auxiliar no diagnóstico precoce e na avaliação do curso e da fisiopatologia

da doença são de extrema importância para evitar tratamentos, muitas vezes invasivos e custosos.

4.4.1 Marcadores laboratoriais na PTI

A PTI é uma doença que pode afetar profundamente a qualidade de vida do paciente e da família. Existe uma lacuna de marcadores laboratoriais que possam auxiliar no diagnóstico e no prognóstico da PTI. Principalmente no caso da PTI em crianças, estudos tentaram definir escores para avaliação da progressão da doença, porém, esses escores são baseados quase em unanimidade em aspectos clínicos e, em se tratando de marcador laboratorial, somente na contagem de plaquetas (ROŞU et al., 2022).

Muitas tentativas foram feitas para caracterizar a gravidade do sangramento, bem como a predição de cronicidade. Nenhuma ferramenta ou pontuação clínica única provou ser um poder absoluto no manejo da PTI. Os escores iniciais consideravam apenas sangramento de pele e mucosas sem relação com a contagem de plaquetas (escore de Buchanan) e, posteriormente, escores mais complexos foram criados e validados, acrescentando outras características clínicas. Os escores que avaliam a gravidade do sangramento podem ser úteis na decisão da conduta do paciente: observação ou tratamento farmacológico, enquanto os escores preditivos têm maior implicação no aconselhamento das famílias e na sua preparação para a eventualidade de lidar com uma doença crônica. Sabe-se que é essencial que os pacientes que parecem ter uma evolução para a cronicidade sejam melhor acompanhados por hematologistas mais experientes de centros especializados (ROŞU et al., 2022).

Os diferentes estudos usaram parâmetros semelhantes para desenvolver escores preditivos. Assim, o escore nórdico (NOPHO) incluiu idade <10 anos, sexo masculino, contagem de plaquetas $<5 \times 10^3/\mu\text{L}$, história de infecção, início abrupto, púrpura úmida e predição demonstrada para PTI de curta duração. Versões modificadas desse escore foram usadas por Donato et al., Schmidt et al., (escore de recuperação PTI na infância) e Revel-Vilk et al. Donato modificou o limiar plaquetário de $<5 \times 10^3/\mu\text{L}$ do escore nórdico para $<10 \times 10^3/\mu\text{L}$ e realizou predição separada em três faixas etárias, demonstrando assim uma predição mais precisa do desenvolvimento de PTI aguda em pacientes com mais de um ano. Revel-Vilk et al.

produziram uma versão simplificada do escore nórdico, utilizando apenas idade e duração do sangramento (início abrupto) como preditores, demonstrando maior insensibilidade para predição de PTI um ano após o diagnóstico do que o escore nórdico. A conclusão foi que o uso de apenas 2 dos 6 critérios do escore nórdico teve valor preditivo significativo (DONATO et al., 2009; SCHMIDT et al., 2021; REVEL-VILK et al., 2013).

O escore de recuperação da PTI na infância, demonstrou sua precisão de pontuação a partir da inclusão de duas variáveis contínuas (idade e nível de trombocitopenia), que poderiam prever corretamente PTI transitória versus persistente. Neste escore, a ausência de um início sutil é o mais forte preditor de PTI transitória (SCHMIDT et al., 2021).

Amostras maiores, com acompanhamento mais longo, bem como uma combinação com biomarcadores genéticos e biomarcadores laboratoriais podem melhorar a previsibilidade dos resultados da PTI no futuro. Esta doença é a ilustração do conceito de uma abordagem individualizada e a tomada de decisão centrada no paciente. Provavelmente é unanimemente reconhecido que o objetivo terapêutico é usar o mínimo de medicação para obter os melhores resultados (ROȘU et al., 2022).

A seguir, será abordada a outra doença que faz parte do estudo, por também apresentar alterações plaquetárias, a COVID-19.

4.5 COVID-19

O vírus causador da síndrome respiratória aguda grave, o coronavírus 2 (SARS-CoV-2) surgiu em Wuhan e se espalhou rapidamente para outras partes da China e depois para outros locais. De tal forma que, em 11 de março de 2020 uma pandemia por SARS-CoV-2 foi declarada pela Organização Mundial da Saúde. Até 25 de outubro de 2022, o SARS-CoV-2 infectou mais de 628 milhões e matou mais de 6,58 milhões de pessoas em todo o mundo (TAY et al., 2020; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022).

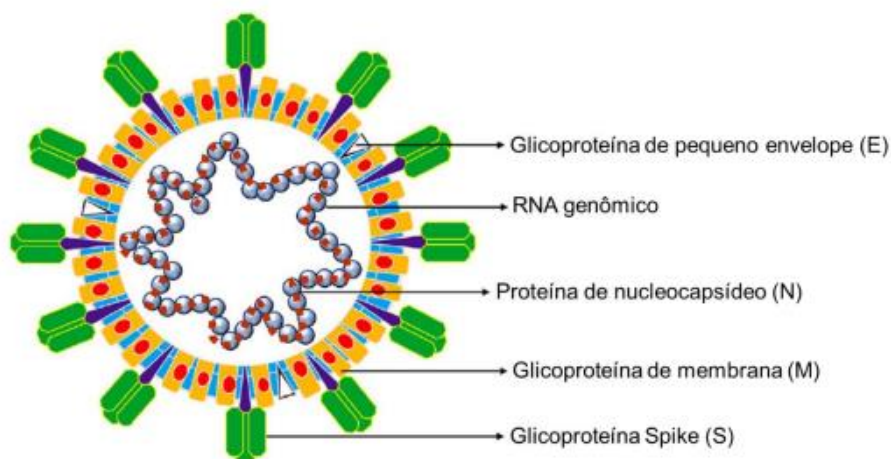
Os coronavírus são um grupo de vírus que possui envelope, genoma de RNA fita simples positivo e foram isolados de várias espécies, sendo pertencentes a família *Coronaviridae*. Eram conhecidos por causar apenas diarreia ou resfriados comuns em humanos (CHEN; LIU; GUO, 2020; XU et al., 2020). Os gêneros aos quais eles foram

classificados são: α -coronavírus, β -coronavírus, γ -coronavírus e δ -coronavírus, de acordo com as espécies as quais podem infectar, sendo α e β capazes de infectar mamíferos, γ espécies aviárias e δ mamíferos e aves (NAQVI et al., 2020).

O SARS-CoV-2 pertence ao gênero dos β -coronavírus. Apresenta em sua estrutura quatro proteínas principais: a glicoproteína de superfície (do inglês spike) (S), a proteína do envelope (E), a proteína da matriz (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (JIANG et al., 2020).

A morfologia de coronavírus é predominantemente esférica, com aproximadamente 100 a 160 nm de diâmetro, todavia são bastante pleomórficos devido à presença de envelope, que é constituído por dupla camada de lipídeos e proteínas estruturais. A denominação da família Coronaviridae tem origem na presença de projeções, ou espículas, que emergem do envelope e dão à partícula viral um aspecto sugestivo de coroa (latim: *corona* = coroa) (Figura 7). As principais propriedades ligadas à infectividade, virulência e variabilidade estão associadas às proteínas de envelope (WEIS; NAVAS-MARTIN, 2005).

Figura 7 – Estrutura do SARS-CoV-2



Fonte: (Adaptado de KIRTIPAL, BHARADWAJ E KANG, 2020).

Os sintomas mais comuns relatados por pacientes diagnosticados com COVID-19 são febre, tosse, produção de escarro, dispneia, mialgia ou fadiga (HUANG, et al., 2020). A maioria dos pacientes apresenta sintomas leves, mas alguns casos podem progredir a sintomas graves (especialmente os idosos e/ou pacientes com comorbidade) (CHEN et al., 2020). Pacientes graves desenvolvem rapidamente

insuficiência respiratória aguda, desconforto respiratório agudo, choque séptico, acidose metabólica e distúrbios de coagulação (HUANG et al., 2020).

A fisiopatologia da infecção por SARS-CoV-2 assemelha-se muito à infecção por SARS-CoV, com respostas inflamatórias agressivas fortemente implicadas no dano resultante às vias aéreas (WONG et al., 2004). Essas respostas inflamatórias agressivas sugerem que a gravidade da doença não está relacionada somente com a infecção, mas também com a resposta do paciente ao vírus (TAY et al., 2020). Células inflamatórias como macrófagos são recrutadas em quase todas as infecções virais e liberam citocinas citotóxicas, mediadores lipídicos, metaloproteinases e espécies reativas de oxigênio que induzem dano (ROUSE; SEHRAWAT, 2010).

A contagem de plaquetas é um indicador de gravidade da doença e de prognóstico e pode refletir as alterações fisiopatológicas em pacientes com COVID-19 nos estágios iniciais (ZHAO et al., 2020). É sugerido que o SARS-CoV-2 pode reduzir a produção de plaquetas, aumentar a destruição das mesmas, ou ainda mais provavelmente, que a ativação e a trombose em pacientes com COVID-19 podem aumentar consumo de plaquetas (XU; ZHOU; XU, 2020).

Tanto a inflamação quanto a trombose são manifestações clínicas observadas durante a infecção por SARS-CoV-2 as quais podem ser letais. As plaquetas podem interagir com o vírus e podem participar tanto na inflamação quanto na trombose da COVID-19 (ZAID et al., 2020).

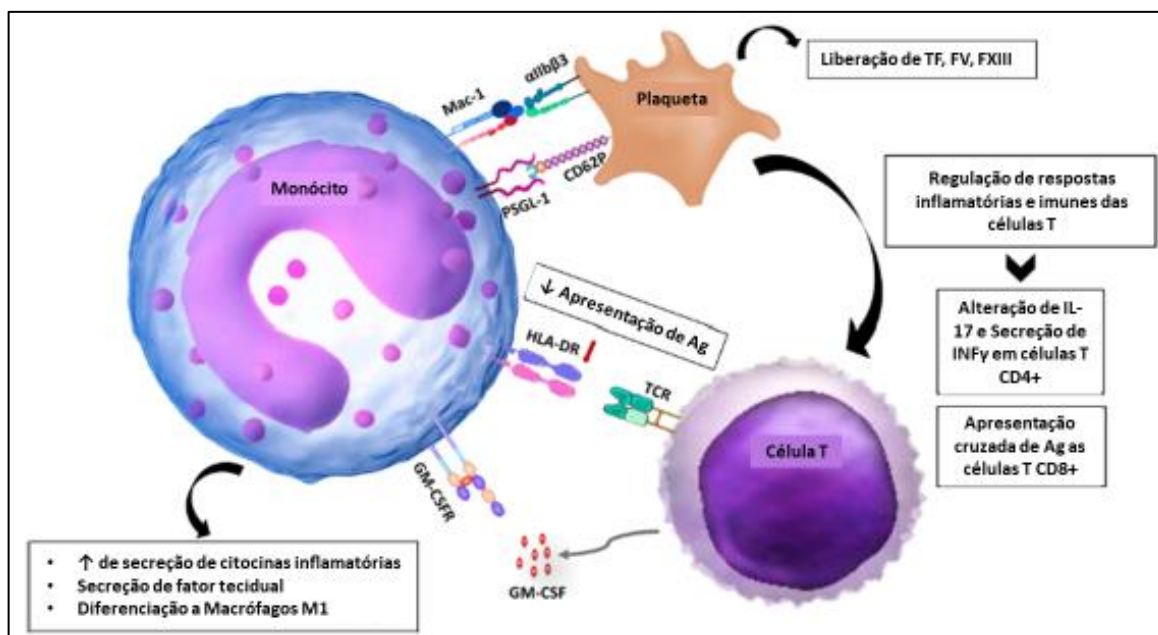
Os megacariócitos presentes nos pulmões têm um perfil imunológico distinto dos megacariócitos encontrados na medula óssea (LEFRANÇAIS et al., 2017). Os megacariócitos nos pulmões, diferente em outras infecções por vírus respiratórios, podem ser suscetíveis a infecção pelo SARS-CoV-2, que pode transferir RNA viral ou partículas virais quando as proplaquetas são produzidas. Assim, as plaquetas produzidas por megacariócitos, e por megacariócitos no ambiente de inflamação, podem apresentar um transcriptoma diferente, que pode explicar sua potência na produção de citocinas inflamatórias, como IL-1, quando ativado por α -trombina (ZAID et al., 2020).

Na maioria dos indivíduos, as células recrutadas eliminam a infecção no pulmão, a resposta imune diminui e os pacientes se recuperaram. No entanto, em alguns pacientes, uma disfunção da resposta imune ocorre, o que desencadeia uma tempestade de citocinas que medeia a inflamação pulmonar generalizada. Observou-

se que pacientes com COVID-19 grave, necessitando de cuidados intensivos em hospitais, apresentaram níveis maiores no plasma sanguíneo de IL-2, IL-7, IL-10, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), interferon gama induzido por proteína 10 (IP-10), proteína quimioatrente para monócitos (MCP1), proteína inflamatória de macrófagos 1 α (MIP1 α) e fator de necrose tumoral α (TNF α) (Figura 7) (HUANG et al., 2020).

A relação entre plaquetas, monócitos e células T exacerba a tempestade de citocinas, aumenta as coagulopatias e diminui a resposta antiviral dos linfócitos T, em pacientes com COVID-19. Como ilustrado na Figura 8, a interação monócito-plaqueta através de Mac-1/ α IIb β 3 e PSGL-1/CD62P leva à liberação de TF, FV e FXIII das plaquetas. Por outro lado, as plaquetas ativadas podem afetar as respostas das células T alterando algumas funções de células T CD4+ e apresentação de antígenos para células T CD8+. Além disso, a secreção excessiva de GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) pelas células T exacerba a liberação de citocinas e produção de TF por monócitos e os diferencia em macrófagos pró-inflamatórios M1. Uma diminuição na expressão de HLA-DR em monócitos resulta em maior atenuação da resposta das células T devido a uma diminuição na apresentação de antígenos.

Figura 8 – Interação entre monócitos-plaquetas-células T em pacientes com COVID-19



Fonte: (Adaptado de AHMADI et al., 2022). Mac 1: receptor de macrófagos 1, TF: fator tecidual FV: fator V, FXIII: fator VIII, IL 17:interleucina 17, INFδ: interferon δ, Ag: antígeno, PSGL-1: ligante 1 p-selectina, CD 62P: p-selectina, HLA-DR: antígeno leucocitário humano DR, TCR: receptor linfócito T, GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos.

Apesar do conhecimento do papel importante das alterações inflamatórias e hemostáticas que acontecem na COVID-19, ainda faltam informações sobre diferentes aspectos para maior entendimento da doença. Dessa forma, faz-se necessário mais estudos da fisiopatologia da doença e do efeito do vírus nas células do sistema imunológico e de outras células sanguíneas, o que, além de aprimorar nosso conhecimento sobre a doença, também pode ajudar a escolher estratégias de tratamento eficazes (TAY et al., 2020; AHMADI et al., 2022).

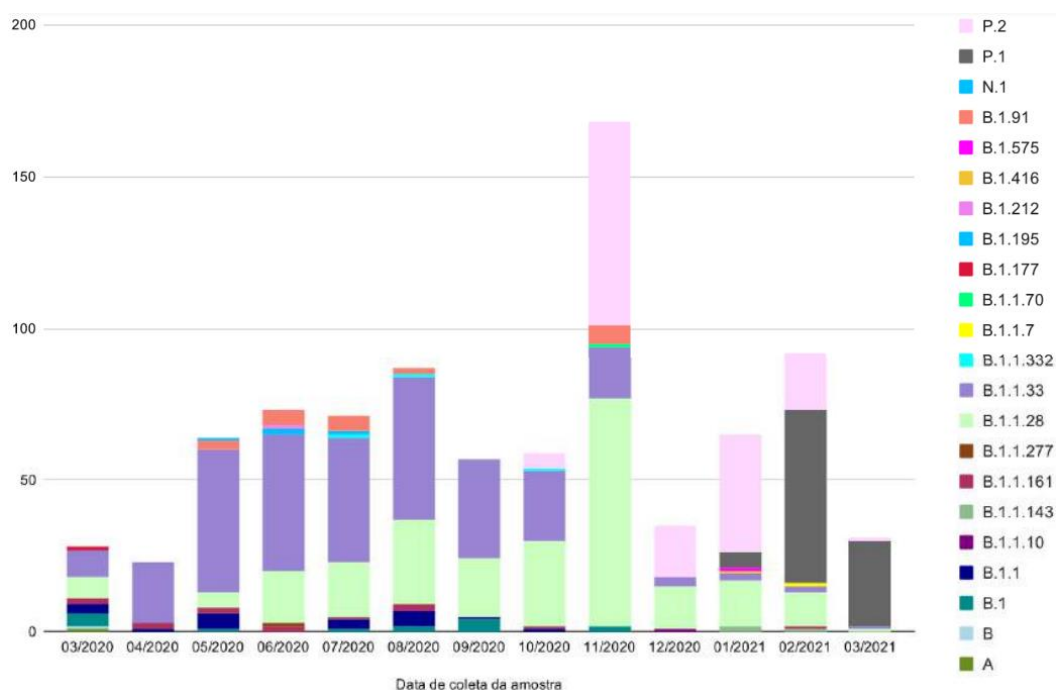
4.5.1 Variantes

No Brasil, no período de janeiro de 2020 a maio de 2021 (período de realização do nosso estudo), foram registradas mudanças na frequência das linhagens dominantes, segundo dados da Rede Genômica Fiocruz. Inicialmente a epidemia foi impulsionada principalmente pelas linhagens B.1.1.28 e B.1.1.33, que foram as mais prevalentes até outubro de 2020. Após esse período, destaca-se a circulação de duas variantes de origem nacional, P.1 e P.2, originadas da linhagem B.1.1.28 (RESENDE

et al., 2021). As duas variantes brasileiras juntas, em apenas quatro meses após sua emergência, corresponderam a 75% dos sequenciamentos no território nacional. No que tange a notificação das variantes de preocupação e de interesse em saúde pública, foram registradas no Brasil, até julho de 2021, as quatro variantes classificadas como VOC e duas (Zeta e Lambda) das sete variantes classificadas como VOI pela OMS (CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, SESRS, 2021).

No Rio Grande do Sul, até julho de 2021, dos 542 genomas completos sequenciados foram identificadas 20 linhagens diferentes do SARS-CoV-2 no estado ao longo do tempo. Os resultados preliminares sugerem que o número de linhagens circulantes mudou com o tempo, com prevalência das linhagens P.1 e P.2 respectivamente como demonstra a Figura 9. Janeiro e fevereiro de 2021 foram os meses os quais mais linhagens diferentes circularam no estado, sendo 9 e 7 linhagens, respectivamente. Entretanto, nos meses de março e abril pode-se notar o predomínio da cepa P.1 na população (93%), e a presença das cepas P.2 (5,9%) e B.1.1.28 (0,9%) dentre as amostras analisadas (CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, SESRS, 2021).

Figura 9 – Linhagens de SARS-COV2 circulantes no Rio Grande do Sul



Fonte: (CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, SESRS, 2021).

4.5.2 Marcadores laboratoriais na COVID-19

O método padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial de COVID-19 é a qPCR-RT (*Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*), que amplifica sequências de RNA do vírus, possibilitando sua identificação. As amostras utilizadas incluem aspirados e lavados broncoalveolares, expectoração, saliva e amostras de tecido pulmonar (BRASIL, 2020).

Testes de detecção de antígeno, como imunoenaios cromatográficos e de imunofluorescência, utilizando amostras da nasofaringe e saliva, também estão disponíveis, e têm como vantagem em relação a qPCR-RT, a possibilidade de resultados em 15-30 minutos e mais facilidade na realização, porém geralmente são menos sensíveis e por isso a OMS recomenda o uso deles onde os testes de amplificação de ácido nucleico (como a qPCR-RT) não estejam disponíveis ou a demora de resultado impeça a utilidade clínica (LAI; LAM, 2021).

Além dos métodos laboratoriais para diagnóstico de SARS-CoV-2, estudos demonstraram que alterações hematológicas, bioquímicas e químicas do sangue em pacientes com COVID-19 podem ser possíveis marcadores de progressão da doença e saúde do paciente (ZHOU et al., 2020).

Os níveis desses marcadores variam de acordo com o curso clínico da doença, e uma vez que podem ser avaliados por exames de sangue de rotina, esses testes podem ser solicitados com base na evolução clínica dos pacientes. Pacientes com doença mais grave, geralmente têm leucocitose ou leucopenia, linfopenia, trombocitopenia, diminuição dos níveis de albumina, níveis aumentados de lactato desidrogenase (LDH), PC-R, bilirrubina e creatinina quinase (CK), velocidade de hemossedimentação (VHS), alanina hepática aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), PC-R e ferritina (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2020; BHIMRAJ et al., 2020; MALIK et al., 2021).

Além disso, descobriu-se que biomarcadores de inflamação, cardíaca e lesão muscular, disfunção hepática e renal e coagulação medidas também foram significativamente elevadas em pacientes com doença grave e fatal (HENRY et al., 2020). Níveis séricos elevados biomarcadores IL-6, IL-10, ferritina, PCR e troponina cardíaca atuaram como fortes discriminadores para a gravidade da doença e foram associados a um risco aumentado de morte (YOUNG et al., 2021). Além disso,

estudos tem obtido resultados promissores com a utilização do IPF para acompanhamento da gravidade da COVID-19 (COHEN et al., 2021; LEE et al., 2021; WELDER et al., 2021).

O Ministério da Saúde, através das diretrizes para diagnóstico e tratamento da COVID-19, de maio de 2020, recomenda solicitar os seguintes exames laboratoriais dos pacientes graves: gasometria arterial; teste rápido para a influenza; RT-PCR para SARS-CoV-2 ou teste imunológico; glicemia; ureia; bilirrubina total e frações; D-dímero; hemograma completo; coagulograma (tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada); marcadores inflamatórios (procalcitonina sérica e/ou PCR, dependendo da disponibilidade); troponina sérica; e lactato desidrogenase sérica (BRASIL, 2020).

5 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO I


Diagnostic characteristics of **immature platelet fraction** for the assessment of immune thrombocytopenia

Karla Nunes Pereira^{a,b}, Jose Antonio Mainardi de Carvalho^{b,c*}, Clóvis Paniz^c, Rafael Noal Moresco^{a,c}, José Edson Paz da Silva^{a,c}

Publicado no periódico: Thrombosis Research.

Thromb Res 2021 Jun;202:125-127. doi: 10.1016/j.thromres.2021.03.023. Epub 2021 Mar 29.

Thrombosis Research 202 (2021) 125–127




ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)


Thrombosis Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/thromres



Letter to the Editors-in-Chief

Diagnostic characteristics of immature platelet fraction for the assessment of immune thrombocytopenia



ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Keywords</i></p> <p>Immature platelet fraction Reticulated platelets Immune thrombocytopenia Diagnostic</p>	<p>The diagnosis of immune thrombocytopenia (ITP) remains an exclusion, as a specific biomarker is missing. We aimed to investigate the diagnostic characteristics, establish a cut-off point for reticulated platelets, and compare it with the clinical exclusion diagnosis used in the assessment of ITP. Forty-one patients with ITP and 187 healthy individuals were enrolled in Santa Maria, Brazil. Sysmex XE-5000 was used to measure IPF. We obtained an IPF cut-off point of 6.3% with a sensitivity of 92.7% (95% CI: 80.1–98.5) and a specificity of 92.5% (95% CI: 87.8–95.8). The area under the curve was 0.97. The kappa coefficient was 0.85 (95% CI: 0.75–0.95), which shows high agreement between methods. The positive (PPV) and negative predictive values (NPV) were 81.25% and 96.42%, respectively. From the cut-off point, kappa index, PPV, and NPV obtained, it is possible to conclude that IPF can be an efficient laboratory marker for diagnosing ITP.</p>

Diagnostic characteristics of **immature platelet fraction** for the assessment of immune thrombocytopenia

Karla Nunes Pereira^{a,b} , Jose Antonio Mainardi de Carvalho^{b,c,*}, Clóvis Paniz^c, Rafael Noal Moresco^{a,c}, José Edson Paz da Silva^{a,c}

^aPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^bUniversity Hospital, Santa Maria, RS, Brazil

^cDepartment of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

* Correspondence: José Antônio Mainardi de Carvalho, Ph.D., Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, 97105- 900 Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 32208941, email: jose.mainardi@ufsm.br

Abstract

The diagnosis of immune thrombocytopenia (ITP) remains an exclusion, as a specific biomarker is missing. We aimed to investigate the diagnostic characteristics, establish a cut-off point for reticulated platelets, and compare it with the clinical exclusion diagnosis used in the assessment of ITP. Forty-one patients with ITP and 187 healthy individuals were enrolled in Santa Maria, Brazil. Sysmex XE-5000 was used to measure IPF. We obtained an IPF cut-off point of 6.3% with a sensitivity of 92.7% (95% CI: 80.1–98.5) and a specificity of 92.5% (95% CI: 87.8–95.8). The area under the curve was 0.97. The kappa coefficient was 0.85 (95% CI: 0.75–0.95), which shows high agreement between methods. The positive (PPV) and negative predictive values (NPV) were 81.25% and 96.42%, respectively. From the cut-off point, kappa index, PPV, and NPV obtained, it is possible to conclude that IPF can be an efficient laboratory marker for diagnosing ITP.

Keywords: Immature platelet fraction. Reticulated platelets. Immune thrombocytopenia. Diagnostic.

Introduction

Immune thrombocytopenia (ITP) is an acquired, immune-mediated disease that affects adults and children, characterized by a transient or persistent decrease in the number of platelets and, depending on the degree of thrombocytopenia, by the increased risk of bleeding¹. The diagnosis of ITP remains an exclusion, as a specific biomarker is missing². According to the international consensus (Vicenza Consensus Conference, 2007), ITP should be classified according to its duration as newly diagnosed (up to 3 months), persistent (3–12 months), and chronic (more than 12 months)³.

The heterogeneity in size and age of the circulating platelet population has been acknowledged for decades. This population includes young platelets, recently released from the bone marrow by megakaryocytes, which are termed reticulated platelets. These platelets contain small amounts of RNA within the cytoplasm and has been suggested that are more reactive than mature platelets⁴. The determination of the reticulated platelets in most of modern automatic analyzers is called the immature platelet fraction (IPF). Determination of IPF is a low-cost, reproducible, and accurate technology for reticulated platelet assessment and has enabled screening and differentiation of thrombocytopenia from different causes⁵. Therefore, this study aims to investigate the diagnostic capacity and establish a cut-off point for IPF as a marker in ITP assessment.

Methods

Two hundred twenty-eight individuals were investigated, including 41 patients with ITP and 187 healthy individuals, enrolled in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The ITP participants included in this study were patients from the University Hospital of Santa Maria (HUSM). The diagnosis of patients with ITP was performed by the hematology/oncology medical team of HUSM, following the criteria from the International Working Group.

According to these criteria, primary ITP diagnosis remains one of the exclusions, and bone marrow examination is not necessary for patients presenting with typical ITP. The clinical diagnosis of ITP was thus defined based on the clinical manifestations and laboratory results — peripheral blood platelet counts lower than $100 \times 10^9/L$ in the absence of other causes or disorders that may be associated with thrombocytopenia^{3,6}.

The control group was composed of 187 healthy individuals who voluntarily donated blood at the Regional Blood Center of Santa Maria from February to March 2017. All participants were routinely screened for hepatitis B and C, HIV (human immunodeficiency virus), Chagas disease, syphilis, and human T-cell lymphotropic virus (HTLV). The Institutional Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria approved this study (CAAE 12303113.0.0000.5346), and a written informed consent was obtained from all participants prior to inclusion. The whole blood samples were collected in K3-EDTA tubes according to the standardized conditions and, the analysis was performed in a maximum of 2 hours after the collection. The analyzes were carried by flow cytometry available on a Sysmex XE-5000 (Sysmex®, Japan) instrument. According to the equipment manufacturer's instructions, IPF could range until 25% (0.95 C.I.) when platelet count is $\geq 50 \times 10^9/L$ and the IPF is $\geq 3\%$; and until 20% , when platelet count range from 10 to $50 \times 10^9/L$ and IPF is $\geq 10\%$.

The absolute immature platelet count (AIPC) value was obtained by multiplying the IPF (%) by the platelet count and represent the absolute number of reticulated platelets ($\times 10^9/L$)⁷. Continuous data were summarized as mean and standard deviation (SD) or median and interquartile ranges (IQR). Categorical data were summarized as percentages, and comparisons between groups were performed using the Chi-square test. The distribution of variables was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Once data did not present normal distribution, Mann-Whitney test was used to verify the statistical difference between the groups. A receiver operating characteristic (ROC) curve was generated to quantify the overall ability of IPF in

diagnosing ITP. The kappa coefficient was calculated to investigate the agreement between IPF and the clinical exclusion criteria. Statistical significance was assumed at $p < 0.05$. Data were analyzed using MedCalc version 13.0.6.0 (Ostend, Belgium) and SPSS software version 22.0 (IBM, USA).

Results

The baseline characteristics and hematological variables of the study participants are described in Table 1. The ITP group presented higher age as well as lower frequency of female individuals in comparison to the control group.

Table 1. Baseline characteristics and hematological variables

	Control	ITP	P value
Age (years)	34 (23-45)	53 (34-62)	0.001*
Female	60.4%	29.3%	
Platelets ($\times 10^9/L$)	222 (194-264)	58 (46-77)	0.001*
IPF (%)	3.00 (2.30-4.40)	13.80 (9.35-18.20)	0.001*
AIPC ($\times 10^9/L$)	7.12 (5.44- 9.78)	7.30 (5.70-10.3)	0.400
WBC ($\times 10^9/L$)	7.01 (6.08-8.15)	7.91 (5.92-10.42)	0.043*
Hb (g/dL)	14.30 (13.20-15.20)	13.90 (12.85-14.60)	0.015*

WBC: white blood cells. Hb: hemoglobin. Datas are expressed in medians and interquartile range (IQR). * $P < 0.05$

Patients with ITP had a lower platelet count and higher IPF value compared to that of the control group. The IPF values for the ITP and control groups were 13.80% (9.35–18.20)

and 3.00% (2.30–4.40), respectively. The AIPC values were $7.3 \times 10^9/L$ ($5.70 \times 10^9/L - 10.3 \times 10^9/L$) for the ITP group and $7.12 \times 10^9/L$ ($5.44 \times 10^9/L - 9.78 \times 10^9/L$) for the control group, and no differences were observed between the groups. Leukocyte count was higher, while hemoglobin levels were lower in the ITP group than in the control group (Table 1).

IPF has enabled accurate discrimination of ITP patients, as demonstrated in Figure 1. The IPF cut-off value with the highest sensitivity and specificity was 6.3%, and the area under the curve was 0.973. This value showed a sensitivity of 92.7% (95% CI: 80.1–98.5) and a specificity of 92.5 % (95% CI: 87.8–95.8). The kappa coefficient was 0.85 (95% CI: 0.75–0.95), which shows an almost perfect agreement between the methods ^{8,9}. The positive and negative predictive values were 81.25% and 96.42%, respectively.

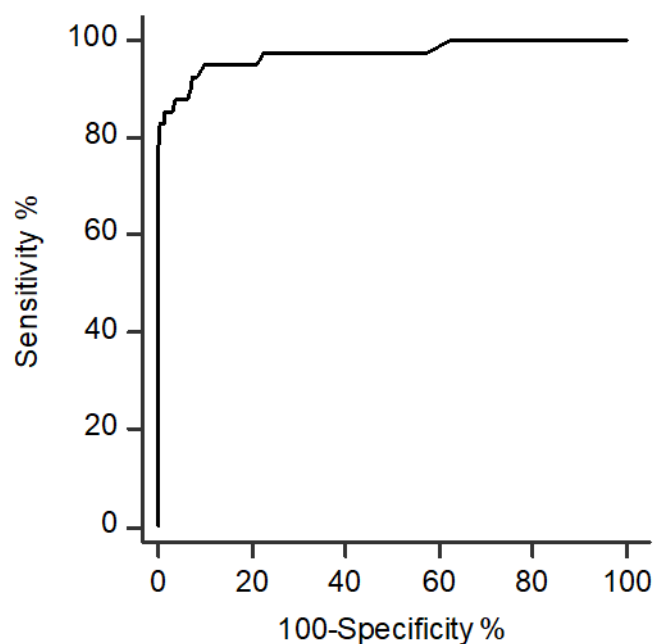


Figure 1. ROC curve of immature platelet fraction (IPF) in the assessment of immune thrombocytopenia. Area under the curve for IPF were 0.97 (95% CI 0.94 to 0.99, $p < 0.001$). The IPF cut-off value was 6.3% (sensitivity of 92.7% and specificity of 92.5 %).

Discussion

This study indicated that IPF has the potential to be used as a supporting biomarker for the diagnostic of ITP, which is based on the high sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values achieved for the cut-off point defined in our study. Moreover, strong agreement has been reported between the IPF and the clinical diagnosis of exclusion based on well-defined criteria, using the kappa index of 0.85 (95% CI: 0.75–0.95), obtained. The kappa index is a standard coefficient for assessing the agreement between methods or analyzers⁸. The diagnostic characteristics of IPF were also established, including cut-off values, sensitivity, specificity, positive predictive values, and negative predictive values. Although there is previous evidence associated with thrombocytopenia diagnosis using IPF, to our knowledge, this is the first study to show statistically that the determination of IPF strongly corresponds with the clinical diagnosis of exclusion currently used in clinical routine.

Previous evidence supports the use of IPF in the investigation of the etiology of thrombocytopenia, demonstrating its ability to identify thrombocytopenia for platelet consumption¹⁰. Jeon et al.⁷ and Serramando et al.¹¹ obtained an IPF cut-off value of 2.3%, with 95.5% (95% CI: 83.3–99.9) sensitivity and 73.5% (95% CI: 58.8–89.3) specificity, and IPF cut-off 11.7%, with a sensitivity of 88.2% and specificity of 91.5% in their studies, respectively^{7, 11}. These studies suggest that IPF has the discriminatory power for identifying the causes of thrombocytopenia, and demonstrated the IPF's ability to assess platelet recovery in patients with thrombocytopenia. In our study, in addition to defining a cutoff point for diagnosing ITP, we evaluated the correspondence of the use of this cutoff point with the clinical diagnosis of exclusion, used in the medical routine.

However, unlike the study of Jeon et al⁷, no differences between groups for the values of AIPC were observed in this study. The AIPC value is obtained by multiplying the IPF value by the total number of platelets. The lack of difference observed between the two groups may

be explained by 1) high values of IPF were multiplied by low platelet count values from the ITP group or 2) low values of IPF were multiplied by high platelet count values in the control group, resulting in no difference in AIPC values. The results of this study do not support the hypothesis of using AIPC as an approach for diagnosing ITP.

Among the limitations of this study is the lack of evaluation of the diagnostic use of IPF in view of other causes of thrombocytopenia and a limited number of patients in ITP group.

Conclusion

Our study demonstrated that IPF may be particularly useful clinically to identify patients with ITP, once its present high sensitivity and specificity. Based on the value of the kappa index of 0.85 obtained in our study, we can infer that the determination of IPF is consistent as a supportive tool to exclusion diagnosis used in the routine. Therefore, the determination of the IPF can be a laboratory marker that helps to confirm the clinical diagnosis. Thus, this study expands the perspective of the routine diagnosis of ITP, currently given by only clinical exclusion. We suggest that IPF determination (a simple and low-cost test) is a parameter that can be used as an auxiliary biomarker in the diagnosis of ITP, provided there is adequate standardization and cut-off value determination, along with clinical criteria.

References

1. Cooper N, Bussel J. The pathogenesis of immune thrombocytopaenic purpura. *Br J Haematol* 2006; 133:364-374.
2. Al-Samkari H, Rosovsky RP, Karp Leaf RS, Smith DB, Goodarzi K, Fogerty AE, Sykes, DB, Kuter DJ. A modern reassessment of glycoprotein-specific direct platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia. *Blood Adv* 2020; 4:9-18.

3. Neunert C, Terrel DR, Arnold DM, Buchanan G, Cines D B, Cooper N, Cuker A, Despotovic JM, George JN, Grace RF, et al. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. *Blood Adv* 2019; 3: 3829-3866.
4. Bernlochner I, Goedel A, Plischke C, Schu S, Haller B, Schulz C, Mayer K, Morath T, Braun S, Schunkert H, Siess W, Kastrati A, and Laugwitz K. Impact of immature platelets on platelet response to ticagrelor and prasugrel in patients with acute coronary syndrome. *European Heart Journal*. 2015; 36: 3202–3210.
5. Benlachgar N, Doghmi K, Masrar A, Mahtat E M, Harmouche H, Tazi Mezalek Z. Immature platelets: a review of the available evidence. *Tromb Res* 2020; 195:43-50.
6. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Cines DB, Chong BH, Cooper N, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009; 113:2386-2393.
7. Jeon K, Kim M, Lee J, Lee J-S, Kim H-S, Kang H J, Lee YK. Immature platelet fraction: A useful marker for identifying the cause of thrombocytopenia and predicting platelet recovery. *Medicine* 2020; 99:e19096.
8. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med* 2012; 22:276-282.
9. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33:159-174
10. Ali I, Graham C, Dempsey-Hibbert NC. Immature platelet fraction as a useful marker in the etiological determination of thrombocytopenia. *Exp Hematol* 2019; 78:56–61.

11. Serrando M, Marull A, Ruiz M, D. Perez del Campo, I. Puig-Pey J. M. Munoz, Tejerina P, Morales-Indiano C. Clinical significance of IPF% measurement in diagnosing thrombocytopenic disorders: distinguishing primary immune thrombocytopenia from other disorders. *Int J Lab Hematol* 2016; 38:e65-e68.

5.2 MANUSCRITO CIENTÍFICO I

Immature platelets and Covid-19 severity

Karla Nunes Pereira^{a,b} , Jose Antonio Mainardi de Carvalho^{b,c*}, Clóvis Paniz^c, Natieli Fernandes^a, Mônica Grellmann^c, Sabrina Fontana de Andrade^b , Vera Jesse Dorneles^b, Rafael Noal Moresco^{a,c}, José Edson Paz da Silva^{a,c}

Manuscrito foi submetido ao periódico: Journal of Investigative Medicine

Immature platelets and Covid-19 severity

Karla Nunes Pereira^{a,b} , Jose Antonio Mainardi de Carvalho^{b,c*}, Clóvis Paniz^c, Natieli Fernandes^a, Mônica Grellmann^c, Sabrina Fontana de Andrade^b , Vera Jesse Dorneles^b, Rafael Noal Moresco^{a,c}, José Edson Paz da Silva^{a,c}

^aPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^bUniversity Hospital, Santa Maria, RS, Brazil

^cDepartment of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

* Correspondence: José Antonio Mainardi de Carvalho, Ph.D., Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Predio 26, Sala 1401, 97105- 900 Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 32208941, email: jose.mainardi@ufsm.br

Abstract:

COVID-19 is an infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus. The complex relationship between SARS-CoV-2 infection and hemostatic imbalance observed in patients with COVID-19 is not fully understood, since the procoagulant activity of platelets might be relevant. Determination of the immature platelet fraction and absolute immature platelet count is a low-cost, reproducible, and accurate technology for reticulated platelet assessment, and has enabled the screening and differentiation of thrombocytopenia from different causes. The aim of this study was to verify the involvement of immature platelets through the determination of platelet indices in patients with COVID-19 that need intensive care. One hundred fifty-two patients with COVID-19 were enrolled in the present study, among which 102 needed intensive care (ICU), while 50 did not (non-ICU). All the patients were recruited at the University Hospital of Santa Maria between November 2020 and May 2021. The control group was composed of 100 healthy individuals who voluntarily donated blood to the Regional Blood Center of Santa Maria. IPF was determined using a fluorescent flow cytometry available in the Sysmex XE 5000 instrument. ICU showed higher IPF and VPM compared to non-ICU patients, while both COVID-19 groups presented higher IPF and AIPC when compared to control group. Our study showed that the number of immature platelets (fraction or absolute value) is increased in patients with COVID-19, especially in those requiring intensive care.

Introduction

Coronavirus disease (COVID-19) is an infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus¹. The complex relationship between SARS-CoV-2 infection and hemostatic imbalance observed in patients with COVID-19 is not fully understood, since the procoagulant activity of platelets might be relevant. In addition to their role in primary hemostasis, platelets are profoundly involved in secondary hemostasis, providing not only the surface for the assembly of coagulation factors but also the tissue factors, which are the key proteins required to initiate thrombin generation². SARS-CoV-2 have been suggested to reduce platelet production or increase platelet destruction; presumably, platelet activation and thrombosis in patients may increase platelet consumption³.

Although thrombotic complications are common during SARS-CoV-2 infection, the pathological drivers of thrombosis in patients with COVID-19 remain unclear⁴. Reticulated platelets are immature platelets (IPF) with high dense granules, a residual amount of megakaryocyte-derived messenger ribonucleic acid, and an increased mean volume compared with older circulating platelets. Determination of the immature platelet fraction and absolute immature platelet count is a low-cost, reproducible, and accurate technology for reticulated platelet assessment, and has enabled the screening and differentiation of thrombocytopenia from different causes⁵. Since these platelet-related variables can be easily obtained through automated systems, coupled with the potential role of platelets in the pathophysiology of COVID-19, the aim of this study was to verify the involvement of immature platelets through the determination of platelet indices in patients with COVID-19 that need intensive care.

Material and methods

One hundred fifty-two patients with COVID-19 were enrolled in the present study, among which 102 needed intensive care, while 50 did not. All the patients were recruited at the

University Hospital of Santa Maria between November 2020 and May 2021. Patients with COVID-19 were diagnosed using at least one positive real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay with respiratory symptoms and radiological findings. Patients with hematological and oncological diseases were excluded from the study.

The control group was composed of 100 healthy individuals who voluntarily donated blood to the Regional Blood Center of Santa Maria in 2017; this group was a convenience control group from a previous study. All participants were routinely screened for hepatitis B and C, HIV, Chagas disease, syphilis, and HTLV. The Institutional Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria approved this study, and written informed consent was obtained from all participants prior to inclusion.

Whole blood was collected in K3-EDTA tubes and used to measure the IPF, platelet count, mean platelet volume, white blood cell count, red blood cells count, and hematocrit using a Sysmex XE-5000 instrument. IPF was determined using a fluorescent flow cytometry available in the equipment used. The absolute immature platelet count (AIPC) was calculated by multiplying the IPF by the total platelet count. RBC and PLT were counted using the hydrodynamic focus and impedance methods. Clinical and epidemiological data for the study groups were obtained from the electronic medical records of the hospital.

Continuous data are presented as mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range (IQR). Statistical differences between groups were evaluated using the Student's t-test, Mann-Whitney test, ANOVA, or Kruskal-Wallis test. Categorical variables were analyzed using the chi-squared test. All statistical analyses were performed using the SPSS software version 25 (IBM, USA). P value <0.05 was considered significant.

Results

Clinical, epidemiological and laboratorial data for the studied groups are demonstrated in Table 1.

Table 1. Clinical, epidemiological, and laboratorial data of healthy donors and hospitalized patients with COVID-19.

	Healthy donors	COVID-19 patients		p
	n=100	Non ICU n=50	ICU n=92	
Age (years)	35 (18-65)	50 (49-59)	59 (50-68)	0.494
Female	50.0 (50%)	25 (50.0%)	40 (44.0%)	0.167
Diabetes	-	26.0	34.0	0.300
Hipertension	-	50.0	52.0	1.000
Obesity	-	22.0	25.0	1.000
Respiratory diseases	-	18.0	17.0	1.000
Platelets (x10 ⁹ /L)	215 (193 - 260) ^a	258 (212 - 385) ^b	240 (200 - 314) ^{a,b}	0.003
VPM (fL)	10.4 (9.90 - 11.1) ^a	9.80 (9.30-10.40) ^b	10.1 (9.65 - 11.0) ^a	0.001
WBC (x10 ⁹ /L)	6.9 (6.0-7.9) ^a	8.8 (6.1-10.7) ^b	9.7 (7.7-13.8) ^c	0.025
Hb (g/dL)	14.1 (12.9-15.1) ^a	11.8 (10.1-13.0) ^b	12.1 (10.8-13.4) ^b	<0.001
HCT (%)	41.7 (38.7-43.9) ^a	34.5 (31.7- 39.5) ^b	37.6 (33.8-40.6) ^b	<0.001

ICU: intensive care unit. WBC: white blood cells. Hb: hemoglobin. HCT: hematocrit. VPM: mean platelet volume. Continuous variables are shown as median and interquartile ranges values (in parentheses). The groups were compared by Kruskal-Wallis test and when significant Dunns' test was performed. Categorical variables are shown as number of patients and percentage (in parentheses). The groups were compared by Chi-square test. In each line different lowercase letters indicate significant differences (p<0.05).

No differences in the epidemiological variables were observed between the groups (p>0.05). ICU patients showed higher IPF and VPM than non-ICU patients, whereas both groups with COVID-19 presented higher IPF and AIPC than the control group. Furthermore,

when both groups with COVID-19 was compared, ICU patients presented higher IPF values than non-ICU patients, as demonstrated in Figure 1.

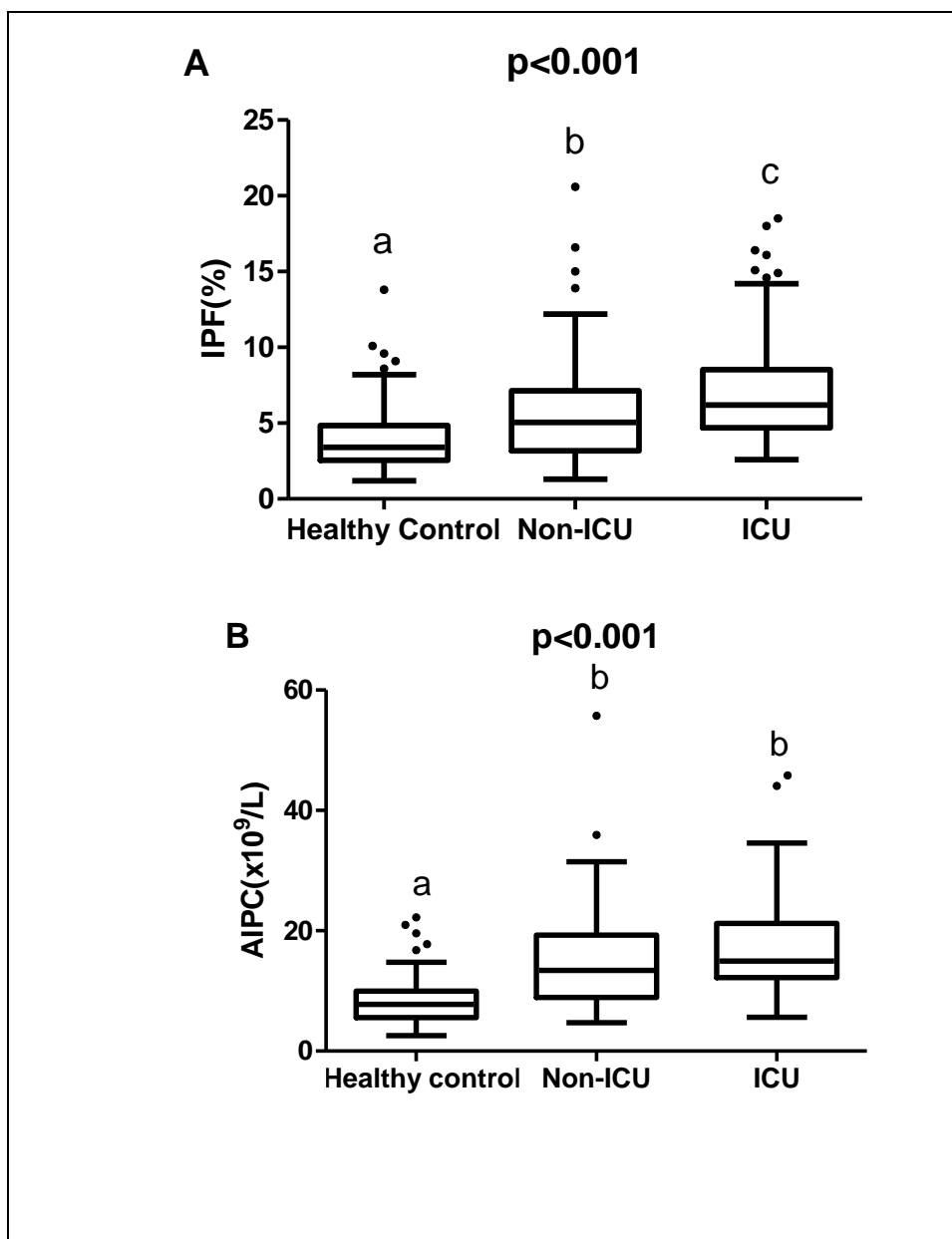


Figure 1: (A) Fraction of immature platelets (IPF) in healthy donors and hospitalized patients with COVID-19. (B) Absolute value of immature platelets (AIPC) in healthy donors and hospitalized patients with COVID-19

Kruskal-Wallis test was used; when significant, Tukey's test with Dunn test was performed. Columns with different lowercase letters indicate significant differences, $P < 0.05$.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to compare the levels of immature platelets (fraction and absolute count) among patients with COVID-19 requiring intensive care, those that do not require intensive care, and healthy controls without COVID-19. In this cross-sectional study, we found that immature platelet indices were higher in ICU patients. These findings indicate that immature platelets may play a role in the progression and severity of COVID-19.

Furthermore, we observed that the IPF level was significantly higher in patients with COVID-19, wherein ICU patients had the highest IPF. In addition to having increased numbers of immature platelets, patients with COVID-19 may have increased levels of circulating activated platelets. Activated platelets normally comprise only a small proportion of the total circulating population⁶. The increase in the number of immature platelets may be related to the increase in clotting events in patients requiring intensive care⁷. Data from Cohen et al. showed that the median IPF and AIPC were higher in patients with severe COVID-19 than in those with mild or moderate disease⁸. These results corroborate those of the present study, showing that patients with COVID-19 have a greater number of immature platelets in the bloodstream. Our findings demonstrate that patients with COVID-19 who require intensive care have higher values of IPF and AIPC than patients with COVID-19 who do not require intensive care, which, in turn, have higher values of IPF and AIPC than the healthy control group.

In addition to their central importance in coagulation, platelets play an important role in inflammatory signaling and in the invasion of the infectious response, combining the functions of thrombotic and immunological recruitment against microbial agents⁹. COVID-19 infection leads to unique patterns of hypercoagulability, and platelet activation plays an important role in initiating the clotting cascade. Thromboinflammation (coordinated activation of inflammatory and thrombotic responses) is a major cause of morbidity and mortality in

patients with COVID-19⁹. Patients with COVID-19 appear to have increased platelet turnover and reactivity, thrombocytopenia, and increased thrombotic risk. Several parameters such as percentage or absolute number of immature platelets can provide information on increased platelet consumption and bone marrow function to compensate for this loss¹⁰. In summary, our results corroborate with those in previous studies that suggest that turnover and hyperactivation of platelets might have been involved in the induction of thrombotic events, especially in critically-ill patients with COVID-19.

The cause of thrombosis in patients with COVID-19 is the focus of intense investigation, and coagulation abnormalities (coagulopathy), complement activation and cytokine release (inflammation), platelet hyperactivity and apoptosis (thrombocytopenia), and endothelial dysfunction (endotheliopathy) are emerging as potential major contributors to the pathogenesis of thrombosis. The process is likely to be very complex because inflammation, coagulopathy, thrombocytopenia, and endotheliopathy are distinct and yet intricately related processes¹⁰.

Our study showed that the number of immature platelets (fraction or absolute value) is increased in patients with COVID-19, especially in those requiring intensive care. Thus, analysis of this parameter can provide more information on platelet profile, which may be involved in the thromboinflammation present in patients with more severe forms of disease.

Disclosure statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, et al. (2020) A novel coronavirus from patients with pneumonia in China. *N Engl J Med.* 3828: 727–733. [10.1056/NEJMoa2001017](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017).
2. Brambilla M, Facchinetti L, Canzano P, Rossetti L, Ferri N, Balduini A, Abbonante V, Boselli D, De Marco L et al. (2015) Human megakaryocytes confer tissue factor to a subset of shed platelets to stimulate thrombin generation. *Thromb Haemost.* 1149: 579–592. [10.1160/TH14-10-0830](https://doi.org/10.1160/TH14-10-0830).
3. Xu P, Zhou Q, Xu J (2020) Mechanism of thrombocytopenia in COVID-19 patients. *Ann Hematol.*99:1205–1208. doi: [10.1007/s00277-020-04019-0](https://doi.org/10.1007/s00277-020-04019-0).
4. Manne BK, Denorme F, Middleton EA, Portier I, Rowley JW, Stubben C, Petrey AC, Tolley ND, Guo L, Cody M, Weyrich AS, Yost CC, Rondina MT, Campbell RA (2020) Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood.*136(11):1317-1329. doi: [10.1182/blood.2020007214](https://doi.org/10.1182/blood.2020007214). PMID: 32573711; PMCID: PMC7483430.
5. Benlachgar N, Doghmi K, Masrar A, Mahtat EM, Harmouche H, Tazi Mezalek Z.(2020) Immature platelets: a review of the available evidence. *Tromb Res* ; 195:43-50.
6. Wool GD, Miller JL (2021) The Impact of COVID-19 Disease on Platelets and Coagulation. *Pathobiology*;88(1):15-27. doi: [10.1159/000512007](https://doi.org/10.1159/000512007). Epub 2020 Oct 13. PMID: 33049751; PMCID: PMC7649697.
7. Ranucci M, Ballotta A, Di Dedda U, Baryshnikova E, Dei Poli M, Resta M, Falco M, Albano G, Menicanti L (2020) The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *J Thromb Haemost*;18(7):1747-1751. doi: [10.1111/jth.14854](https://doi.org/10.1111/jth.14854). Epub 2020 May 6. PMID: 32302448.
8. Cohen A, Harari E, Yahud E, et al (2021) Immature platelets in patients with COVID-19: association with disease severity [published online ahead of print, 2021 Sep 14]. *J Thromb Thrombolysis*;1-7. doi:[10.1007/s11239-021-02560-x](https://doi.org/10.1007/s11239-021-02560-x).4.
9. Taha M, Sano D, Hanoudi S, Esber Z, Elahi M, Gabali A, Chopra T, Draghici S, Samavati L (2020) Platelets and renal failure in the SARS-CoV-2 syndrome. *Platelets.* 2021 Jan 2;32(1):130-137. doi: [10.1080/09537104.2020.1817361](https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1817361). PMID: 32892687; PMCID: PMC7855044.
10. Gu SX, Tyagi T, Jain K, Gu VW, Lee SH, Hwa JM, Kwan JM, Krause DS, Lee AI, Halene S, Martin KA, Chun HJ, Hwa J (2020) Thrombocytopeny and endotheliopathy: crucial

contributors to COVID-19 thromboinflammation. *Nat Rev Cardiol.* 2021 Mar;18(3):194-209.
doi: 10.1038/s41569-020-00469-1. PMID: 33214651; PMCID: PMC767539

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo abordamos a utilização de índices plaquetários em duas situações distintas. Nosso foco principal foi demonstrar que, tecnologias de custo relativamente acessível, disponíveis em laboratórios clínicos podem ser mais bem utilizadas em diversas situações em que há alteração no estado do perfil plaquetário, fornecendo informações tanto de diagnóstico, quanto de prognóstico e fisiopatologia. Evidentemente, é fundamental que estas análises sejam padronizadas e os valores de referência sejam estabelecidos para a população atendida.

Analisando o parâmetro das plaquetas imaturas sob perspectivas diferentes, seja pela finalidade diagnóstica na PTI ou pelo envolvimento nas complicações que podem ocorrer na COVID-19, nossos resultados corroboram estudos anteriores, que mostraram que em ambas as doenças, a determinação de marcadores plaquetários pode ser de grande utilidade na clínica (JEON et al., 2020; SERRANDO et al., 2016; COHEN et al., 2021).

Na PTI, a determinação das plaquetas imaturas pode ser útil na definição do diagnóstico, o que contribui de maneira significativa na avaliação do paciente, uma vez que, atualmente é dado por exclusão clínica (SERRANDO et al., 2016; JEON et al., 2020; GOEL et al., 2021). Nos pacientes com PTI, uma forte correlação tem sido detectada entre a contagem de plaquetas e o IPF, sem diferença com relação a idade e sexo (BENLACHGAR et al., 2020).

O diagnóstico diferencial de PTI com outras trombocitopenias é essencial para tratamento adequado, uma vez que outras causas de trombocitopenia podem mimetizar a PTI e levar a um manejo inadequado e consequente aumento na mortalidade (MILTADOUS; HOU; BUSSEL, 2020). Porém, não existem marcadores biológicos utilizados na rotina laboratorial, acessíveis e de baixo custo, que possam ser usados para essa diferenciação. Por esse motivo, ferramentas de triagem são necessárias para que o diagnóstico seja realizado corretamente e rapidamente (LEVINE; BROOKS, 2019; BONNARD et al., 2021).

O diagnóstico errôneo de pacientes com PTI afeta 1 em cada 7 pacientes. Cerca de 12% dos pacientes que são inicialmente diagnosticados com PTI primária, não tem o diagnóstico confirmado posteriormente. Por outro lado, 3% dos pacientes que não foram inicialmente diagnosticados com PTI primária, acabam tendo o

diagnóstico confirmado tardiamente. O diagnóstico errado tem implicações importantes na exposição de pacientes a danos de tratamentos (ARNOLD et al., 2017).

Sabe-se que um único megacariócito pode gerar até 5.000 plaquetas. Em condições normais, a taxa de produção de plaquetas visa manter a massa total de plaquetas circulantes (número de plaquetas x volume médio de plaquetas) constante. Em condições de estresse as plaquetas são liberadas dos megacariócitos em estágio mais precoce, o que resulta em plaquetas de maior tamanho e mais reativas (KUTER, 1996a; KUTER, 1996b). Durante seu tempo na circulação, as plaquetas têm uma redução em seu conteúdo de RNA e perdem resíduos de ácido siálico de glicoproteínas da membrana celular, com a última alteração promovendo a depuração hepática das plaquetas. A ativação da via pró-apoptótica BAX-BAK em plaquetas mais velhas resulta em exposição de superfície dependente de caspase de fosfatidilserina, que serve como um sinal de reconhecimento para células fagocitárias para captação de plaquetas. Em termos de funcionalidade, plaquetas senescentes têm respostas de adesão e agregação prejudicadas (VAN DER MEIJDEN; HEEMSKERK, 2019). Por essas razões, sugere-se que a liberação de plaquetas mais jovens na circulação, refletida num aumento do IPF, ocorre na tentativa de aumentar tanto o número quanto a funcionalidade das plaquetas em casos de trombocitopenia por destruição periférica, como acontece na PTI.

No caso da COVID-19, há uma necessidade crítica de biomarcadores prognósticos para prever a gravidade da doença afim de permitir uma alocação de recursos mais eficiente (LEE et al., 2021). Poucos estudos têm analisado os marcadores plaquetários na COVID-19. Os dados disponíveis mostram (e os nossos resultados corroboram esses achados) que os marcadores que avaliam a quantidade de plaquetas imaturas (IPF e AIPC) demonstraram ter relação com a gravidade da doença. Mesmo em pacientes já vacinados as plaquetas imaturas podem ser úteis e fornecer informações importantes sobre a doença (COHEN et al., 2021; LEE et al., 2021; WELDER et al., 2021).

Sugere-se que o mecanismo central da alteração plaquetária na COVID-19 está na hiperativação plaquetária, a qual foi demonstrada em pacientes com evolução mais grave de COVID-19, enquanto não foi observada em pacientes assintomáticos ou em pacientes com COVID-19 autolimitada. Nosso estudo sustenta esses achados, uma

vez que o valores IPF e de AIPC em pacientes com necessidade de tratamento intensivo foram superiores ao de pacientes com COVID-19 sem a necessidade de tratamento intensivo. Esses resultados podem inferir um papel da ativação plaquetária na patogênese COVID-19 (ZAID et al., 2020), de tal forma que a maior ativação plaquetária resulte em maior liberação de plaquetas jovens na circulação, refletida no aumento do IPF e do AIPC.

Além das plaquetas imaturas, um aumento no VPM está diretamente relacionado à gravidade da doença COVID-19 e a taxa de ativação plaquetária e de liberação de plaquetas jovens em resposta à destruição plaquetária após infecção. A liberação de mediadores inflamatórios, principalmente as citocinas pró-inflamatórias, podem aumentar o risco de trombose por ativação plaquetária, uma vez que as plaquetas possuem receptores para interleucinas que são estimulados em situações de inflamação. Nesse sentido, receptores de IL-1, IL-6 e IL-8 plaquetárias têm sido estudados (BEAULIEU et al., 2014; MARTA et al., 2005; REGNAULT et al., 2003). Recentemente, foi proposto que o TNF- α pode ser a citocina mais proeminente induzindo hiper-reatividade plaquetária, mesmo ao nível da medula óssea, aumentando os precursores de megacariócitos e o status de ploidia de megacariócitos (DAVIZON-CASTILLO et al., 2019).

Com relação ao VPM, um estudo relatou que a relação VPM/contagem de plaquetas (MPR) teve uma correlação com a gravidade da COVID-19, pois os pacientes com MPR elevado eram mais propensos a pneumonia e estavam em alto risco de morte (CHEN et al., 2020; BOMMENAHALLI et al., 2021; ZHONG; PENG, 2021).

A “imunotrombose” é cada vez mais reconhecida como uma linha independente de defesa do hospedeiro que é suportada por mecanismos moleculares específicos. Ela medeia o reconhecimento de patógenos e células danificadas, e inibe a disseminação e sobrevivência de patógenos. A imunotrombose pode, portanto, ser considerada como um elemento crucial da imunidade intravascular, que faz parte do sistema imunológico (HICKEY; KUBES, 2009).

Durante infecções sistêmicas, a ativação concomitante da coagulação sanguínea e inflamação tem sido sugerido para representar um “ciclo vicioso” patológico, com consequências deletérias para os tecidos do hospedeiro através da ativação excessiva de células imunes e formação de trombos. Da mesma forma, as

plaquetas liberam numerosos mediadores que apoiam o recrutamento e promovem as atividades microbidas dos leucócitos (COUGHLIN, 2005; NIESSEN et al., 2008).

Na COVID-19 a infecção produz um efeito pró-trombótico manifestando-se em um estado de microtrombose. Esse processo tem relação com a imunotrombose, na qual as plaquetas possuem papel crucial (GUPTA et al., 2020). Essa desregulação pode levar as complicações trombóticas observadas na doença. A presença na COVID-19 de quantidade aumentada de plaquetas jovens e de hiperativação plaquetária, pode estar relacionada com a desregulação da imunotrombose que acontece na COVID-19, e que resulta na tromboinflamação observada em alguns casos, e que pode resultar em quadros graves, levando a necessidade de tratamento intensivo de alguns pacientes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os índices plaquetários disponíveis em equipamentos hematológicos mais modernos, como IPF e AIPC, podem de maneira rápida e com baixo custo, ser utilizados para diagnóstico laboratorial da PTI;
- O ponto de corte de 6,3% estabelecido para o IPF em nosso estudo pode ser utilizado como marcador laboratorial para auxiliar no diagnóstico da PTI;
- O diagnóstico laboratorial da PTI utilizando o IPF possui correspondência com o método de diagnóstico clínico por exclusão utilizado atualmente;
- A quantidade de plaquetas imaturas (IPF e AIPC) é maior em pacientes diagnosticados com COVID-19 e que necessitam de tratamento intensivo;
- Pacientes diagnosticados com COVID-19, com ou sem necessidade de tratamento intensivo, tem maior quantidade de plaquetas imaturas (IPF e AIPC) quando comparado a pacientes saudáveis, o que sugere, que mesmo sem trombocitopenia, as plaquetas têm envolvimento na fisiopatologia da COVID-19;
- O VPM de pacientes com COVID-19 com necessidade de tratamento intensivo é maior que de pacientes sem necessidade de tratamento intensivo, o que pode, a partir de mais estudos, sugerir que a avaliação do VPM traga informações sobre a gravidade da COVID-19;
- Por fim, nosso estudo sugere que a utilização de marcadores plaquetários (IPF, AIPC, VPM) disponíveis em equipamentos automatizados de hematologia mais recentes, podem, de forma rápida e com baixo custo, serem utilizados como ferramentas de diagnóstico na PTI e na compreensão dos mecanismos envolvidos na coagulopatia observada nas formas graves de COVID-19.

REFERÊNCIAS

- ABADI, U.; YARCHOVSKY-DOLBERG, O.; ELLIS, M. H. Immune Thrombocytopenia: Recent Progress in Pathophysiology and Treatment. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 21, n. 5, p. 397-404, 2015.
- ABD EL-GLIL, R. R.; ASSAR, E. H. Level of IL-16 and Reticulated Platelets Percentage during the Clinical Course of Immune Thrombocytopenic Purpura in Children. **Egypt J Immunol**, v. 22, n. 1, p. 29-40, 2015.
- ABE, Y. *et al.* A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF), **Thromb Res**, v. 118, n. 4, p. 463-469, 2006.
- ABRAHAMSON, P. E. *et al.* The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura among adults: a population-based study and literature review. **Eur J Haematol**, v. 83, n. 2, p. 83-92, 2009.
- ADELI, K. *et al.* Biochemical marker reference values across pediatric, adult, and geriatric ages: establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the Canadian Health Measures Survey. **Clin Chem**, v. 61, n. 8, p. 1049-1062, 2015.
- ADLY, A. A. *et al.* Evaluation of the immature platelet fraction in the diagnosis and prognosis of childhood immune thrombocytopenia. **Platelets**, v. 26, n. 7, p. 645-650, 2015.
- AHMADI, E. *et al.* Pathological effects of SARS-CoV-2 on hematological and immunological cells: Alterations in count, morphology, and function. **Pathol Res Pract**, v. 231, n. 153782, 2022.
- AL-SAMKARI, H. *et al.* A modern reassessment of glycoprotein-specific direct platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia. **Blood Adv**, v. 4, n. 1, p. 9-18, 2020.
- ALBERTS, B. *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. Nova York: Garland Science, 2002, 1616 p.
- ALI, I.; GRAHAM, C.; DEMPSEY-HIBBERT, N. C. Immature Platelet Fraction as a useful marker in the a etiological determination of Thrombocytopenia. **Exp Hematol**, n. 78, p. 56-61, 2019.
- ARNOLD, D. M. *et al.* Misdiagnosis of primary immune thrombocytopenia and frequency of bleeding: lessons from the McMaster ITP Registry. **Blood Adv**, v. 1, n. 25, p. 2414-2420, 2017.
- ARRUDA, L. P. D.; ASSIS, A. S. F. Validação de intervalos de referência de exames bioquímicos. **HU Ver**, v. 48, p. 1-10, 2022.

ASHBY, B.; DANIEL, J. L.; SMITH, J. B. Mechanisms of platelet activation and inhibition. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 4, n. 1, p. 1-26, 1990.

AYDINYILMAZ, F. *et al.* Significance of MPV, RDW and PDW with the Severity and Mortality of COVID-19 and Effects of Acetylsalicylic Acid Use. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 27, 10760296211048808, 2021.

BADOLIA, R. *et al.* Gq pathway regulates proximal C-type lectin-like receptor-2 (CLEC-2) signaling in platelets. **J Biol Chem**, v. 292, n. 35, p. 14516-14531, 2017.

BARROS, F. E. V. **Avaliação da relação entre produção plaquetária, expressão de proteínas do sistema apoptótico plaquetário em diferentes graus de trombocitopenia imune (PTI)**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Médicas Programa de Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5167/tde-31032015-163547/publico/FranciscoErivaldoVidalBarros.pdf>. Acesso em: 01 de out. 2020.

BEAULIEU, L. M. *et al.* Interleukin 1 receptor 1 and interleukin 1beta regulate megakaryocyte maturation, platelet activation, and transcript profile during inflammation in mice and humans. **Arter Thromb Vasc Biol**, v. 34, n. 3, p. 552-564, 2014.

BENLACHGAR, N. *et al.* Immature platelets: a review of the available evidence. **Thromb Res**, v. 195, p. 43-50, 2020.

BENNETT, J. S.; BERGER, B. W.; BILLINGS, P. C. The structure and function of platelet integrins. **J Thromb Haemost**, v. 7, n. Suppl. 1, p. 200-205, 2009.

BHIMRAJ, A. *et al.* Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Treatment and Management of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Clin Infect Dis**, n. ciaa478, 2020.

BOMMENAHALLI, G. S. *et al.* Prognosis of COVID-19: red cell distribution width, platelet distribution width, and C-reactive protein. **Cureus**, v. 13, n. 2, e13078, 2021.

BONNARD, G. *et al.* Platelet features allow to differentiate immune thrombocytopenia from inherited thrombocytopenia. **Ann Hematol**, v. 100, n. 11, p. 2677-2682.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Púrpura Trombocitopênica Idiopática**. Brasília, 2019. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/publicacoes_ms/pcdt_prpura-trombocitopnica-idiopatica_isbn_19-08-2020.pdf. Acesso em 01 de outubro de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes para o diagnóstico e tratamento da COVID-19**. Brasília, 2020. Disponível em: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/202004/14140600-2-ms-diretrizes-covid-v2-9-4.pdf> Acesso em: 30 de setembro de 2022.

BRASS, L. F.; DIAMOND, S. L.; STALKER, T. J. Platelets and hemostasis: a new perspective on an old subject. **Blood Adv**, v. 1, n. 1, p. 5-9, 2016

BRIGGS, C. *et al.* Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. **Br J Haematol**, v. 126, n. 1, p. 93-99, 2004.

BRIGGS, C. *et al.* Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. **J Clin Pathol**, v. 65, n. 11, p. 1024-1030, 2012.

BURKHART, J. M. *et al.* The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. **Blood**, v. 120, n. 15, p. e73-82, 2012.

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

CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO RS. **Boletim genômico número 05**. Disponível em: <https://coronavirus.rs.gov.br/upload/arquivos/202207/11161453-bg5.pdf>. Acesso em 26 de outubro de 2022.

CHEN, Y.; LIU, Q.; GUO, D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. **J Med Virol**, v. 92, n. 4, p. 418-423, 2020.

CHEN, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507-513, 2020.

CHEN, J. *et al.* High Mean Platelet Volume Associates with In-Hospital Mortality in Severe Pneumonia Patients. **Mediators Inflamm**, 8720535, 2020.

CINES, D. B. *et al.* The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. **Blood**, v. 113, n. 26, p. 6511-6521, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline**, v. 28, n. 30, 2010.

COGNASSE, F. *et al.* Platelet Inflammatory Response to Stress. **Front Immunol**, v. 10, n. 1478, 2019.

COHEN, A. *et al.* Immature platelets in patients with COVID-19: association with disease severity. **J Thromb Thrombolysis**, v. 52, n. 3, p. 1-7, 2021.

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

COOPER, N.; BUSSEL, J. The pathogenesis of immune thrombocytopaenic purpura. **Br J Haematol**, v. 133, n. 4, p. 364-374, 2006.

CORTESE, L.; CHRISTOPHERSON, P. W.; PELAGALLI, A. Platelet Function and Therapeutic Applications in Dogs: Current Status and Future Prospects. **Animals**, v.10, n. 2, p. 201, 2020.

COUGHLIN, S. R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. **J Thromb Haemost**, v. 3, n. 8, p. 1800-1814, 2005.

CULIĆ, S. *et al.* Correlations among age, cytokines, lymphocyte subtypes, and platelet counts in autoimmune thrombocytopenic purpura. **Pediatr Blood Cancer**, v. 47, Suppl. 5, p. 671-674, 2006.

CURTIS, B. R.; MCFARLAND, J. G. Human platelet antigens - 2013. **Vox Sang**, v. 106, n. 2, p. 93-102, 2014.

CZAPIGA, M.; KIRK, A. D.; LEKSTROM-HIMES, J. Platelets deliver costimulatory signals to antigen-presenting cells: a potential bridge between injury and immune activation. **Exp Hematol**, v. 32, n. 2, p. 35-39, 2004.

DAVIZON-CASTILLO, P. *et al.* TNF-alpha-driven inflammation and mitochondrial dysfunction define the platelet hyperreactivity of aging. **Blood**, v. 134, n. 9, p. 727-740, 2019.

DE JONG, J. S.; DEKKER, L. R. Platelets and cardiac arrhythmia. **Front Physiol**, v. 1, artigo 166, 2010.

DONATO, H. *et al.* Demographic data, natural history, and prognostic factors of idiopathic thrombocytopenic purpura in children: a multicentered study from Argentina. **Pediatr Blood Cancer**, v. 52, n. 4, p. 491-496, 2009.

ENGELMANN, B.; MASSBERG, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 1, p. 34-45, 2013.

FERNANDEZ, D. I.; KUIJPERS, M. J. E.; HEEMSKERK, J. W. M. Platelet calcium signaling by G-protein coupled and ITAM-linked receptors regulating anoctamin-6 and procoagulant activity. **Platelets**, v. 32, n. 7, p. 863-871, 2021.

FERREIRA, C. E. S.; ANDRIOLO, A. Intervalos de referência no laboratório clínico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 44, n. 1, p. 11-16, 2008.

FERREIRA, C. N. *et al.* A cell-based model of coagulation and its implications. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, n. 5, 2010.

FLAUMENHAFT, R. Molecular basis of platelet granule secretion. **Arter Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 7, p. 1152-1160, 2003.

FRELINGER, A. L. 3RD. *et al.* Platelet function tests, independent of platelet count, are associated with bleeding severity in ITP. **Blood**, v. 126, n. 7, p. 873-879, 2015.

GOEL, C. *et al.* Immature Platelet Fraction: Its Clinical Utility in Thrombocytopenia Patients. **J Lab Physicians**, v. 13, n. 03, p. 214-218, 2021.

- GRIMALDI-BENSOUA, L. *et al.* Immune thrombocytopenia in adults: a prospective cohort study of clinical features and predictors of outcome. **Haematologica**, v. 101, n. 10, p. 1039-1045, 2016.
- GUMUS, H.; DEMIR, A.; YUKKALDIRAN, A. Is mean platelet volume a predictive marker for the diagnosis of COVID-19 in children? **Int J Clin Pract**, v. 75, e13892, 2021.
- GUPTA, A. *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nat Med**, v. 26, n. 7, p. 1017-1032, 2020.
- HE, J. *et al.* Dynamic trajectory of platelet-related indicators and survival of severe COVID-19 patients. **Crit Care**, v. 24, n. 1, p. 607, 2020.
- HE, R. *et al.* Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum ntiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. **Blood**, v. 83, n. 4, p. 1024-1032, 1994.
- HENRY, B. M. *et al.* Hematologic, Biochemical and Immune Biomarker Abnormalities Associated with Severe Illness and Mortality in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Meta-Analysis. **Clin Chem Lab Med**, v. 58, n. 7, p. 1021-1028, 2020.
- HICKEY, M. J.; KUBES, P. Intravascular immunity: the host–pathogen encounter in blood vessels. **Nature Rev Immunol**, v. 9, n. 5, p. 364-375, 2009.
- HOFFBRAND, V. A.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em Hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 462 p.
- HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **J Thromb Thrombolysis**, v. 16, n. 1-2, p. 17-20, 2003.
- HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. 3RD. A cell-based model of hemostasis. **Thromb Haemost**, v. 85, n. 6, p. 958-965, 2001.
- HOFFMANN, J. J.; VAN DEN BROEK, N. M.; CURVERS, J. Reference intervals of reticulated platelets and other platelet parameters and their associations. **Arch Pathol Lab Med**, v. 137, n. 11, p. 1635-1640, 2013.
- HOFFMANN, J. J. M. L. Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility. **Clin Chem Lab Med**, v. 52, n. 8, p. 1107-1117, 2014.
- HOUWERZIJL, E. J. *et al.* Megakaryocytic dysfunction in myelodysplastic syndromes and idiopathic thrombocytopenic purpura is in part due to different forms of cell death. **Leukemia**, v. 20, n. 11, p. 1937-1942, 2006.
- HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

- JEON, K. *et al.* Immature platelet fraction: A useful marker for identifying the cause of thrombocytopenia and predicting platelet recovery. **Medicine**, v. 99, n. 7, p. e19096, 2020.
- JIANG, S.; HILLYER, C.; DU, L. Neutralizing antibodies SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. **Trends Immunol**, v. 41, n. 5, p. 355-359, 2020.
- JIN, J. *et al.* RhoA downstream of G(q) and G(12/13) pathways regulates protease-activated receptor-mediated dense granule release in platelets. **Biochem Pharm**, v. 77, n. 5, p. 835–844, 2009.
- JUNT, T. *et al.* Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. **Science**, v. 317, n. 5845, p. 1767-1770, 2007.
- JURK, K.; KEHREL, B. E. Platelets: Physiology and Biochemistry. **Semin thromb and hemost**, v. 31, n. 4, p. 381-392, 2005.
- KABUTOMORI O.; KANAKURA, Y.; IWATANI, Y. Characteristic changes in platelet-large cell ratio, lactate dehydrogenase and C-reactive protein in thrombocytosis-related diseases. **Acta Haematol**, v. 118, n. 2, p. 84-87, 2007.
- KAHN, M. L. *et al.* Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. **J Clin Investig**, v. 103, n. 6, p. 879-887, 1999.
- KAMIGUTI, A. S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 1041-1049, 2005.
- KANEIDER, N. C. *et al.* CD40 ligand-dependent maturation of human monocyte-derived dendritic cells by activated platelets. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 16, n. 3, p. 225-231, 2003.
- KATAYEV, A.; BALCIZA, C.; SECCOMBE, D. W. Establishing Reference Intervals for Clinical Laboratory Test Results: Is There a Better Way? **Am J Clin Pathol**, v. 133, n. 2, p. 180-186, 2010.
- KAUSHANSKY, K. Thrombopoietin and hematopoietic stem cell development. **Ann NY Acad Sci**, v. 30, n. 872, p. 314-319, 1999.
- KICKLER, T. Platelet biology – an overview. **Transfus Altern Transfus Med**, v. 8, n. 2, p. 79-85, 2006.
- KIENAST, J.; SCHMITZ, G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. **Blood**, v. 75, n. 1, p. 116-121, 1990.
- KIRTIPAL, N.; BHARADWAJ, S.; KANG, S. G. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. **Infec Genet Evol**, v. 86, 104502, 2020.

- KOUPENOVA, M.; RAVID, K. Biology of Platelet Purinergic Receptors and Implications for Platelet Heterogeneity. **Front. Pharm**, v. 9, artigo 37, 2018.
- KUTER, D. J. The physiology of platelet production. **Stem Cells**, v. 14, Suppl 1, p. 88-101, 1996a.
- KUTER, D. J. Thrombopoietin: biology and clinical applications. **Oncologist**, v. 1 (1 & 2), p. 98-106, 1996b.
- KUTER, D. J. The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists. **Int J Hematol**, v. 98, n. 1, p. 10-23, 2013.
- LAI, C. K. C.; LAM, W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 538, p. 226-230, 2021.
- LECOMPTE, T. P.; BERNIMOULIN, M. P. Novel Parameters in Blood Cell Counters. **Clin Lab Med**, v. 35, n. 1, p. 209-224, 2015.
- LEE, N. C. J. *et al.* Immature Platelets and Disease Severity in Patients Hospitalized with Acute COVID-19 Who Are Vaccinated Against COVID-19. **Blood**, v. 138, suplemento 1, 2021.
- LEE, R. G. *et al.* **Wintrobe's clinical hematology**. 13. ed. Nova York: Williams & Wilkins, 2013, 2312 p.
- LEFRANÇAIS, E. *et al.* The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. **Nature**, v. 544, n. 7648, p. 105-109, 2017.
- LEVINE, D. N.; BROOKS, M. B. Immune thrombocytopenia (ITP): Pathophysiology update and diagnostic dilemmas. **Vet Clin Pathol**, v. 48, Suppl 1, p. 17-28, 2019.
- LI, N. Platelet-lymphocyte cross-talk. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 5, p. 1069-1078, 2008.
- LI, R.; EMSLEY, J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. **J Thromb Haemost**, v. 11, n. 4, p. 605-614, 2013.
- LICHTMAN, M. *et al.* **Williams Hematology**. 7. ed. Nova York: McGraw Hill Professional, 2005, cap. 105.
- LING, L. Q. *et al.* Evaluation of an automated light transmission aggregometry. **Platelets**, v. 28, n. 7, p. 712-719, p. 2017.
- LOUWETTE, S.; VAN GEET, C.; FRESON, K. Regulators of G protein signaling: Role in hematopoiesis, megakaryopoiesis and platelet function. **J Thromb Haemost**, v. 10, n. 11, p. 2215-2222, 2012.
- MAKHOUL, S. *et al.* The Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A (PP2A) Regulates Syk Activity in Human Platelets. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 23, p. 8939, 2020.

MALIK, P. *et al.* Biomarkers and Outcomes of COVID19 Hospitalisations: Systematic Review and Meta-Analysis. **BMJ Evidence-Based Med**, v. 26, n. 3, p. 107–108, 2021.

MALUF, C. B.; BARRETO, S. M.; VIDIGAL, P. G. Standardization and reference intervals of platelet volume indices: Insight from the Brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-BRASIL). **Platelets**, v. 26, n. 5, p. 413-420, 2015.

MARTA, R. F. *et al.* Normal platelets possess the soluble form of IL-6 receptor. **Cytokine**, v. 29, n. 1, p. 13-17, 2005.

MICHEL, M. *et al.* Characteristics and outcome of immune thrombocytopenia in elderly: results from a single center case-controlled study. **Am J Hematol**, v. 86, n. 12, p. 980-984, 2011.

MIDDELBURG, R. A. *et al.* Platelet function in adult ITP patients can be either increased or decreased, compared to healthy controls, and is associated with bleeding risk. **Hematology**, v. 21, n. 9, p. 549-551, 2016.

MILTIADOUS, O.; HOU, M.; BUSSEL J. B. Identifying and treating refractory ITP: difficulty in diagnosis and role of combination treatment. **Blood**, v. 135, n. 7, p. 472-490, 2020.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M.; ROBERTS, H. R. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 7, n. 4, p. 459-464, 1996.

MONTEIRO, L. Valores de referencia dos índices plaquetários e construção de algoritmo para liberação do plaquetograma. **RBAC**, v. 49, n. 3, p. 263-267, 2017.

MORAN, L. A. *et al.* Katakine is a new ligand of CLEC-2 that acts as a platelet agonist. **Thromb Haemost**, v. 122, n. 8, p. 1361-1368, 2022.

MORRELL, C. N. *et al.* Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. **Blood**, v. 123, n. 18, p. 2759-2767, 2014.

MOULIS, G. *et al.* Epidemiology of incident immune thrombocytopenia: a nationwide population-based study in France. **Blood**, v. 124, n. 22, p. 3308-3315, 2014.

NAQVI, A. A. T. *et al.* Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1866, n. 10, p. 1-16, 2020.

NAVARRO-NUNEZ, L. *et al.* The physiological and pathophysiological roles of platelet CLEC-2. **Thromb Haemost**, v. 109, n. 6, p. 991-998, 2013.

NEUNERT, C. *et al.* American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. **Blood Adv**, v. 3, n. 23, p. 3829-3866, 2019.

NIESSEN, F. *et al.* Dendritic cell PAR1–S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 654-658, 2008.

NORIS, P.; MELAZZINI, F.; BALDUINI, C. L. New roles for mean platelet volume measurement in the clinical practice? **Platelets**, v. 27, n. 7, p. 607-612, 2016.

OLIVER, J. A. *et al.* Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 1, p. 170-177, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 25 out. 2022.

PARCO, S.; VASCOTTO, F. Application of reticulated platelets to transfusion management during autologous stem cell transplantation. **Onco Targets Ther**, v. 5, p. 1-5, 2012.

PEERSCHKE, E. I. The laboratory evaluation of platelet dysfunction. **Clin Lab Med**, v. 22, n. 2, p. 405-420, 2002.

PROVAN, D. *et al.* International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. **Blood**, v. 115, n. 2, p. 168-186, 2010.

RANUCCI, M. *et al.* The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. **J Thromb Haemost**, v. 18, n. 7, p. 1747-1751, 2020.

RAUCH, A.; PARIS, C. Hemostasia primária. EMC – **Tratado de Medicina**, v. 22, n. 1, p. 1-12, 2018.

REGNAULT, V. *et al.* Platelet activation induced by human antibodies to interleukin-8. **Blood**, v. 101, n. 4, p. 1419-1421, 2003.

RESENDE, P. C. *et al.* A potential SARS-CoV-2 variant of interest (VOI) harboring mutation E484K in the Spike protein was identified within lineage B.1.1.33 circulating in Brazil. **Viruses**, v. 13, n. 5, p. 724, 2021.

REVEL-VILK, S. *et al.* Age and duration of bleeding symptoms at diagnosis best predict resolution of childhood immune thrombocytopenia at 3, 6, and 12 months. **J Pediatr**, v. 163, n. 5, p. 1335-1339, 2013.

RODEGHIERO, F. *et al.* Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. **Blood**, v. 113, n. 11, p. 2386-2393, 2009.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. *et al.* Clinical, Laboratory and Imaging Features of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Travel Med Infect Dis**, v. 34, 101623, 2020.

ROSA, D. A. C. *et al.* Púrpura trombocitopênica imune - tratamento e associação com a COVID-19. **Brasília Med**, v. 59, p. 1-11, 2022.

ROȘU, V. E. *et al.* The Use of Clinical Scores in the Management of Immune Thrombocytopenic Purpura in Children. **Front Pediatr**, v. 10, artigo 870064, 2022.

ROUSE, B. T.; SEHRAWAT, S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 7, p. 514-526, 2010.

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

SCHMIDT, D. E. *et al.* A clinical prediction score for transient versus persistent childhood immune thrombocytopenia. **J Thromb Haemost**, v. 19, n. 1, p. 121-130, 2021.

SCHOORL, M. *et al.* New fluorescent method (PLT-F) on Sysmex XN2000 hematology analyzer achieved higher accuracy in low platelet counting. **Am J Clin Pathol**, v. 140, n. 4, p. 495-499, 2013.

SERRANDO, M. *et al.* Clinical significance of IPF% measurement in diagnosing thrombocytopenic disorders: distinguishing primary immune thrombocytopenia from other disorders. **Int J Lab Hematol**, v. 38, n. 3, p. 65-e68, 2016.

SPETH, C. *et al.* Complement and platelets: mutual interference in the immune network. **Mol Immunol**, v. 67, n. 1, p. 108-118, 2015.

SURIN, W. R.; BARTH WAL, M. K.; DIKSHIT, M. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. **Thromb Res**, v. 122, n. 6, p. 786-803, 2008.

TALAAT, R. M. *et al.* Alterations in immune cell subsets and their cytokine secretion profile in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). **Clin Exp Immunol**, v. 176, n. 2, p. 291-300, 2014.

TAN, I. J.; PEEVA, E.; ZANDMAN-GODDARD, G. Hormonal modulation of the immune system - A spotlight on the role of progestogens. **Autoimmun Rev**, v. 14, n. 6, p. 536-542, 2014.

TARANTINO, M. D.; BUCHANAN, G. R. The pros and cons of drug therapy for immune thrombocytopenic purpura in children. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 18, n. 6, p. 1301-1314, 2004.

TAY, M. Z. *et al.* The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nat Rev Immunol**, v. 20, n. 6, p. 363-374, 2020.

THEOFILIS, P. *et al.* Factors Associated with Platelet Activation-Recent Pharmaceutical Approaches. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 6, p. 3301, 2022.

THOTA, S. *et al.* Immune thrombocytopenia in adults: An update. **Cleve Clin J Med**, v. 79, n. 9, p. 641-650, 2012.

VAN DER MEIJDEN, P. E. J.; HEEMSKERK, J. W. M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. **Nat Rev Cardiol**, v. 16, n. 3, p. 166-179, 2019.

VAN KOLEN, K.; SLEGGERS, H. Integration of P2Y receptor-activated signal transduction pathways in G protein-dependent signalling networks. **Purinergic Signal**, v. 2, n. 3, p. 451-469, 2006.

VIEIRA, C. O. **Mecanismo hemostático da serpente crotalus durissus terrificus (ophidia: viperidae, crotalinae)**. Tese (Doutorado em ciências na área de Fisiologia) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2014. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41135/tde-26012015-141001/publico/Carol_Okamoto_Vieira_CORR.pdf. Acesso em: 01 de outubro de 2022.

WANG, J. J. *et al.* Prognostic Values of Platelet-Associated Indicators in Resectable Lung Cancers. **Technol Cancer Res Treat**, v. 18, 2019.

WATANABE, K. *et al.* Automated measurement of reticulated platelets in estimating thrombopoiesis, **Eur J Haematol**, v. 54, n. 3, p. 163-171, 1995.

WATANABE, K.; KAWAI, Y.; TAKEUCHI, K. Reticulated platelets – automated measurement and clinical utility. **Rinsho Ketsueki**, v. 36, n. 4, p. 267-272, 1995.

WEISS, S. R., NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Microbiol Mol Biol Ver**, v. 69, n. 4, p. 635-664, 2005.

WELDER, D. *et al.* Immature platelets as a biomarker for disease severity and mortality in COVID-19 patients. **Br J Haematol**, v. 194, n. 3, p. 530-536, 2021.

WENDLAND, A. E.; FARIAS, M. G.; MANFROI, W. C. Volume plaquetário médio e a doença cardiovascular. **J Bras Patol e Med Lab**, v. 45, n. 5, p. 371-378, 2009.

WING, K.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. **Nat Immunol**, v. 11, n. 1, p. 7-13, 2010.

WONG, C. K. *et al.* Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. **Clin Exp Immunol**, v. 136, n. 1, p. 95-103, 2004.

WOODS, V. L. J. *et al.* Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. **Blood**, v. 64, n. 1, p. 156-160, 1984a.

WOODS, V. L. J. *et al.* Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. **Blood**, v. 63, n. 2, p. 368-375, 1984b.

XU, P.; ZHOU, Q.; XU, J. Mechanism of thrombocytopenia in COVID-19 patients. **Ann Hematol**, v. 99, n. 6, p. 1205-1208, 2020.

XU, Z. *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **Lancet Respir Med**, v. 8, n. 4, p. 420-422, 2020.

YOUNG, B. E. *et al.* Viral Dynamics and Immune Correlates of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Severity. **Clin Infect Dis**, v. 73, n. 9, p. e2932–e2942, 2021.

ZAID, Y. *et al.* Platelets Can Associate with SARS-Cov-2 RNA and Are Hyperactivated in COVID-19. **Circ Res**, v. 127, n. 11, p. 1404-1418, 2020.

ZAPATA, J. C.; COX, D.; SALVATO, M. S. The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fevers. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 6, e2858, 2014.

ZHAO, X. *et al.* Early decrease in blood platelet count is associated with poor prognosis in COVID-19 patients—indications for predictive, preventive, and personalized medical approach. **EPMA J**, v. 11, n. 2, p. 1-7, 2020.

ZHONG, Q.; PENG, J. Mean platelet volume/platelet count ratio predicts severe pneumonia of COVID-19, **J Clin Lab Anal**, v. 35, n. 1, e2360, 2021.

ZHOU, F. *et al.* Clinical Course and Risk Factors for Mortality of Adult Inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A Retrospective Cohort Study. **Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054-1062, 2020.

ZUFFEREY, A.; KAPUR, R.; SEMPLE, J. W. Pathogenesis and Therapeutic Mechanisms in Immune Thrombocytopenia (ITP). **J Clin Med**, v. 6, n. 2, p. 16, 2017.

APÊNDICE A – Submissão do Manuscrito I ao periódico Journal of Investigative Medicine

Journal of Investigative Medicine

Journal of Investigative Medicine

Immature platelets and its association with the need for intensive care in COVID-19 patients

Journal:	<i>Journal of Investigative Medicine</i>
Manuscript ID	jim-2022-002802
Article Type:	Brief report
Date Submitted by the Author:	04-Nov-2022
Complete List of Authors:	Pereira, Karla; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas; Hospital Universitario de Santa Maria De Carvalho, José ; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Paniz, Clóvis; Universidade Federal de Santa Maria, Análises Clínicas e Toxicológicas Fernandes, Natieli ; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Grellmann, Mônica Lais; Federal University of Santa Maria, Department of Clinical and Toxicological Analysis Fontana de Andrade, Sabrina; Hospital Universitario de Santa Maria Dornelles, Vera Jesse; Hospital Universitario de Santa Maria Moresco, Rafael; Federal University of Santa Maria, Department of Clinical and Toxicological Analysis da Silva, José Edson; Federal University of Santa Maria, Department of Clinical and Toxicological Analysis
Keywords:	COVID-19, Platelet Activation, Thrombosis

SCHOLARONE™
Manuscripts