



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

TAYNÁ REGINA LEAL DOS SANTOS

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A FRAÇÃO DE  
PLAQUETAS IMATURAS (IPF) E A TROMBOPOESE**

Recife  
2024

TAYNÁ REGINA LEAL DOS SANTOS

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A FRAÇÃO DE  
PLAQUETAS IMATURAS (IPF) E A TROMBOPOESE**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Biomedicina da Universidade Federal de  
Pernambuco, como pré-requisito à  
obtenção do título de Bacharel em  
Biomedicina.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

**Coorientador:** Esp. Raphael Ferreira Pimentel

Recife  
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Santos, Tayna Regina Leal dos.

Estudo de associação entre a fração de plaquetas imaturas (IPF) e a  
trombopose / Tayna Regina Leal dos Santos. - Recife, 2024.

40 p. : il., tab.

Orientador(a): Marcos André Cavacanti Bezerra

Coorientador(a): Raphael Ferreira Pimentel

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de  
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências, anexos.

1. Fração de plaquetas imaturas. 2. Trombocitopenia. 3. Avaliação da  
tecnologia biomédica. I. Bezerra, Marcos André Cavacanti. (Orientação). II.  
Pimentel, Raphael Ferreira. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

TAYNÁ REGINA LEAL DOS SANTOS

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A FRAÇÃO DE PLAQUETAS  
IMATURAS (IPF) E A TROMBOPOESE**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Biomedicina da Universidade Federal de  
Pernambuco, como pré-requisito à  
obtenção do título de Bacharel em  
Biomedicina.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra  
Laboratório Central/Centro de Biociências-UFPE

---

Prof. Dr. Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer  
Departamento de Farmácia/Centro de Ciências da Saúde-UFPE

---

Esp. Lara Gonçalves de Assis Lima  
Analista de Laboratório III/Grupo Fleury

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Antônio e Lucimere, obrigada por  
apoiarem todos os meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu professor e orientador Dr. Marcos André, o qual foi fundamental por me despertar interesse em hematologia, por me apoiar e confiar em mim para o desenvolvimento de um projeto tão incrível.

Ao meu coorientador e mentor, Raphael Pimentel, agradeço do fundo do meu coração. Seus conselhos, sugestões e orientação foram essenciais para realização deste trabalho e para minha formação profissional.

À grande amiga que fiz durante o curso de graduação, Bianca, você tornou a caminhada mais leve, obrigada por toda troca de conhecimentos. Aos meus amigos de longa data, Thiago e João Paulo, e à minha prima Maria Victória, obrigada por não me deixarem desistir. Em especial, agradeço a Carlos Eduardo, obrigada por estar ao meu lado, sei que não foi fácil.

Gostaria de agradecer também a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, que fomentou minha bolsa de estudos e viabilizou o desenvolvimento deste projeto. E, aos funcionários da UNILABE da Fundação HEMOPE, que me acolheram e tornaram os meus dias de pesquisa mais tranquilos, além de tudo que aprendi com vocês, obrigada.

Por último e mais importante, gostaria de agradecer aos meus familiares, por todo o suporte em todos esses anos de graduação, principalmente ao meu avô David Santos e aos meus pais, Antônio e Lucimere, todo esforço e dedicação de vocês me trouxe até aqui, obrigada por tudo.

Sou muito grata a Deus que me abasteceu de fé e me possibilitou alcançar meus objetivos, até quando achei que não era capaz. Por fim, gratidão a todos que fizeram parte da minha trajetória.

"A ciência é uma aventura sem fim em direção a uma compreensão cada vez maior do mundo."

Stephen Hawking

SANTOS, Tayná Regina Leal. **Estudo de associação entre a fração de plaquetas imaturas (IPF) e a trombopoese**. 2024. 40. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

## RESUMO

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos originados dos megacariócitos em um processo chamado trombopoese que ocorre na medula óssea e desempenham um papel fundamental na coagulação sanguínea. As trombocitopenias, contagem de plaquetas abaixo da normalidade, podem indicar diversas manifestações clínicas advindas de diferentes etiologias. Para manejo diagnóstico adequado, pode ser necessário proceder com métodos invasivos, como aspirado ou biópsia de medula óssea para investigação etiológica quando suspeita-se de causas primárias. Com o avanço nas metodologias para contagem de plaquetas por impedância para fluorescência, surge a fração de plaquetas imaturas (IPF%) que, por sua vez, são plaquetas recém-liberadas na corrente sanguínea e ainda contêm resquícios de RNA dos megacariócitos. Essa característica o torna um indicador promissor da atividade trombopoética, com potencial valor clínico no diagnóstico de pacientes com trombocitopenia em investigação, podendo reduzir a necessidade de procedimentos invasivos. Assim, buscou-se avaliar a associação entre a medição de IPF e a avaliação da trombopoese observada no mielograma. No estudo, foi avaliado o IPF em pacientes trombocitopênicos adultos selecionados na Fundação HEMOPE usando o analisador Sysmex XN1000 e depois comparou-se com o grau de trombopoese observado no estudo medular, recomendado para seguimento da investigação. Foram avaliados 150 pacientes com relação de gênero 1:1, mediana de idade 58,5 anos, dos quais 131 eram anêmicos, com variação na leucometria, 82 com trombocitopenia grave e 82% deles oriundos do serviço de emergência. Quanto à contagem de plaquetas pelo método de impedância e fluorescência, foram encontradas medianas de  $45 \times 10^3/\mu\text{L}$  e  $39,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ , respectivamente. Quanto à determinação do IPF%, os pacientes foram categorizados em diminuído (2 pacientes), normal (89 pacientes) e elevado (59 pacientes), a mediana dos pacientes foi de 6,9%, maior em relação à população saudável local (2,95%). A frequências observadas para trombopoese hipoplásica, normoplásica e hiperplásica foram de 56,67%, 15,33% e 28%, respectivamente. O teste exato de Fisher revelou que não houve associação entre os dois métodos avaliados neste estudo ( $p=0,1895$ ), provavelmente pela alta frequência de trombopoese hipoplásica e hiperplásica em pacientes com IPF normal neste estudo. Deve-se considerar que este estudo não avaliou o IPF como parâmetro diagnóstico em trombocitopênicos classificados por sua etiologia, mas buscou associar métodos que, segundo a literatura, podem indicar uma condição biológica comum.

**Palavras-chave:** Fração de plaquetas imaturas. Trombocitopenia. Avaliação da tecnologia biomédica.

SANTOS, Tayná Regina Leal. **Association study between immature platelet fraction (IPF) and thrombopoiesis**. 2024. 40. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

## ABSTRACT

Platelets are cytoplasmic fragments derived from megakaryocytes through a process called thrombopoiesis, which occurs in the bone marrow and plays a fundamental role in blood coagulation. Thrombocytopenia, defined as a platelet count below normal levels, can indicate various clinical manifestations resulting from different etiologies. For proper diagnostic management, invasive methods such as bone marrow aspiration or biopsy may be necessary to investigate the etiology when primary causes are suspected. With advances in platelet counting methods using impedance and fluorescence, the immature platelet fraction (IPF%) has emerged. These immature platelets are newly released into the bloodstream and still contain RNA remnants from megakaryocytes. This characteristic makes IPF% a promising indicator of thrombopoietic activity, with potential clinical value in diagnosing patients with thrombocytopenia, possibly reducing the need for invasive procedures. The study aimed to evaluate the association between IPF measurement and thrombopoiesis observed in bone marrow aspirates. IPF was analyzed in adult thrombocytopenic patients selected from the HEMOPE Foundation using the Sysmex XN1000 analyzer and then compared with the degree of thrombopoiesis observed in bone marrow studies, which were recommended for follow-up. A total of 150 patients were evaluated, with a 1:1 gender ratio and a median age of 58.5 years. Among them, 131 were anemic, with variability in leukocyte counts; 82 had severe thrombocytopenia, and 82% were from emergency services. The median platelet counts using the impedance and fluorescence methods were  $45 \times 10^3/\mu\text{L}$  and  $39.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ , respectively. Regarding IPF%, patients were categorized as low (2 patients), normal (89 patients), or elevated (59 patients), with a median of 6.9%, higher than the local healthy population (2.95%). The observed frequencies of hypoplastic, normoplastic, and hyperplastic thrombopoiesis were 56.67%, 15.33%, and 28%, respectively. However, Fisher's exact test revealed no significant association between the two methods ( $p = 0.1895$ ), likely due to the high frequency of hypoplastic and hyperplastic thrombopoiesis in patients with normal IPF. It is important to note that this study did not evaluate IPF as a diagnostic parameter in thrombocytopenic patients classified by etiology but rather sought to correlate methods that, according to the literature, may indicate a common biological condition.

**Key words:** Immature platelet fraction. Thrombocytopenia. Assessment of biomedical technology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figuras

<b>Figura 1</b> – Esquema da Trombopoese.....	15
<b>Figura 2</b> – (A) Esfregaço de medula óssea evidenciando megacariócito (x100), (B) Esfregaço de sangue periférico evidenciando plaquetas (x100), ambos em coloração May-Grunwald-Giemsa.....	16
<b>Figura 3</b> – Histogramas de distribuição do volume plaquetário. (A) Histograma evidenciando a interferência de macroplaquetas e (B) evidenciando a interferência de fragmentos eritrocitários.....	18
<b>Figura 4</b> – Gráfico de dispersão da medição de plaquetas por fluorescência (PLT-F) por dispersão de luz direta/frontal (FSC) versus fluorescência lateral (SFL).....	20
<b>Figura 5</b> – Distribuição dos pacientes segundo contagem de leucócitos.....	26
<b>Figura 6</b> – Categorização do IPF% nos pacientes.....	27
<b>Figura 7</b> – Distribuição das contagens de plaquetas por impedância (PLT-I) e por fluorescência (PFC).....	28
<b>Figura 8</b> – Classificação da morfologia medular dos pacientes.....	28

### Quadros

<b>Quadro 1</b> – Mecanismos fisiopatológicos e diagnóstico diferencial de trombocitopenias.....	17
<b>Quadro 2</b> – Definição e categorização das variáveis utilizadas no estudo.....	23

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Associação entre a origem dos pacientes e a gravidade da trombocitopenia.....	26
<b>Tabela 2</b> – Correlação entre os valores de PLT-I e PFC entre alguns pacientes.....	27
<b>Tabela 3</b> – Associação entre IPF% e trombopoese.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Anemia aplásica
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
AIQ	Amplitude interquartil
CP	Concentrado de plaquetas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FSC	<i>Forward scatter</i> (dispersão frontal)
FvW	Fator von Willebrand
GP	Glicoproteína
Hb	Hemoglobina
IPF	<i>Immature platelet fraction</i> (fração de plaquetas imaturas)
MK	Megacariócito
MO	Medula óssea
PFC	Plaquetas por fluorescência
PLT-I	Plaquetas por impedância
PTI	Púrpura Trombocitopênica Imune
PNCQ	Plano Nacional de Controle de Qualidade
RNA	Ácido ribonucleico
SFL	<i>Sideward fluorescence</i> (fluorescência lateral)
SK	<i>Skewness e Kurtosis</i>
SPA	Serviço de pronto atendimento
TPO	Trombopoetina
WBC	<i>White blood cells</i> (glóbulos brancos)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
2.1	TROMBOPOESE E BIOLOGIA DAS PLAQUETAS.....	14
2.2	CONTAGEM DE PLAQUETAS.....	16
2.3	FRAÇÃO DE PLAQUETAS IMATURAS.....	19
2.4	AVALIAÇÃO DA TROMBOPOESE.....	20
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
4.1	POPULAÇÃO ALVO.....	23
4.2	DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	23
4.3	OBTENÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	24
4.3.1	Análise da Amostra Biológica.....	24
4.3.2	Análise dos Dados Sociodemográficos e Clínicos.....	25
4.4	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	25
4.5	COMITÊ DE ÉTICA.....	25
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plaquetas são estruturas pequenas e discoides, com um volume médio de 7 a 11fL encontradas em circulação na corrente sanguínea. São produzidas na medula óssea (MO) a partir da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos (MKs). A trombopoese, é o processo ao qual a célula tronco hematopoiética dá origem ao megacarioblasto - precursor do megacariócito, que sofre maturação por meio de replicação endomitótica sincrônica, aumentando o volume do citoplasma ao passo que o número de lobos nucleares aumenta exponencialmente. (HOFFBRAND&MOSS, 2013).

A trombopoese é regulada principalmente pela trombopoetina (TPO), um hormônio glicoproteico responsável principalmente pela maturação dos megacariócitos. Em determinado momento deste processo, o citoplasma do MK fragmenta-se, dando origem até 5.000 plaquetas. Estas vivem, em média, cerca de dez dias na circulação sanguínea. Após esse período, a maioria é removida, com uma parte significativa sendo utilizada no processo de hemostasia (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

A contagem de plaquetas em adultos normalmente está entre 150.000 e 400.000/ $\mu$ L, segundo o Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ). Atualmente, a maioria dos analisadores hematológicos quantifica plaquetas pelo princípio de Coulter, utilizando a metodologia de impedância elétrica, contando-as no mesmo canal que os eritrócitos, levando em conta apenas seu volume celular para fazer a distinção entre ambos: eritrócitos  $>30$ fL e plaquetas  $<20$ fL. Entretanto, esse método possui limitações, visto que a presença de fragmentos eritrocitários ou macroplaquetas pode falsear essa contagem. Por outro lado, a metodologia fluorescente utiliza citometria de fluxo aliada à corantes fluorescentes para determinação das plaquetas, corando fortemente estruturas intraplaquetárias, assim diferenciam-se de outras células sanguíneas mais facilmente, minimizando erros, especialmente em situações de trombocitopenia grave, contagem de plaquetas inferior à 50.000/ $\mu$ L na corrente sanguínea (FAILACE & FERNANDES, 2015; MEINTKER & KRAUSE, 2020; SCHOORL et al. 2013).

Da mesma maneira que os reticulócitos na eritropoese, as plaquetas recém-formadas também possuem resquícios de RNA em seu citoplasma, denominadas assim de plaquetas reticuladas ou imaturas. Essas, têm vida útil mais curta em relação as plaquetas maduras, permanecendo na corrente sanguínea por menos de 24 horas.

Durante a quantificação por metodologia fluorescente, um gráfico de dispersão é gerado, relacionando o tamanho da célula ao conteúdo de RNA. Neste gráfico, as plaquetas imaturas são caracterizadas por seu maior tamanho e maior intensidade de fluorescência. Esta característica define o parâmetro da fração de plaquetas imaturas, conhecido como IPF%, um potencial marcador da atividade trombopoética na medula óssea (HOFFMAN, 2014; GOEL, et. al, 2021; MEINTKER & KRAUSE, 2020).

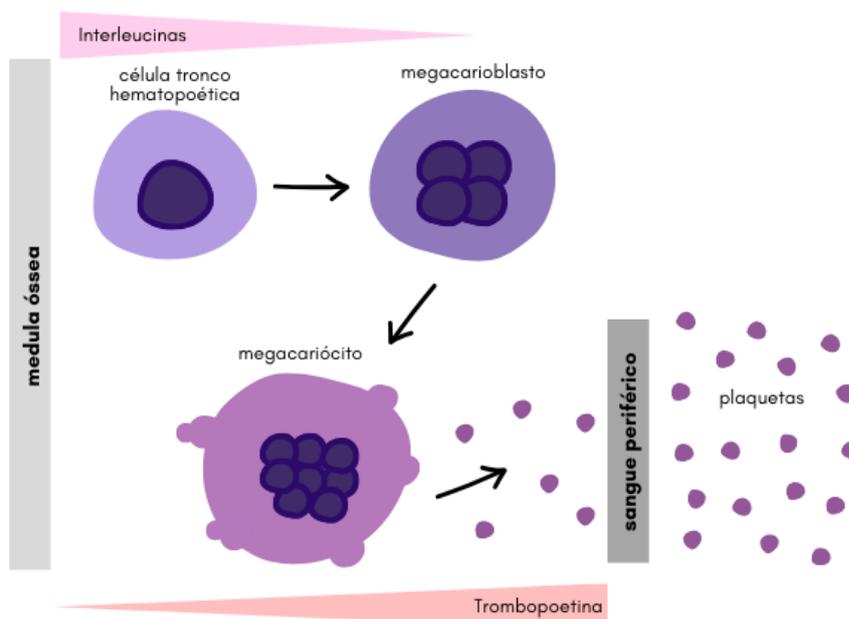
A análise padrão ouro da trombopoese, na investigação de trombocitopenias, é a morfologia medular, seja ela através de exames como mielograma ou biópsia, ambos métodos invasivos e de alto custo. Com base na correlação observada entre o IPF% e a trombopoese em diversas condições de trombocitopenias (GOEL, et. al, 2021), emerge a necessidade de aprofundar sua investigação, estabelecendo uma aplicabilidade clínica que auxiliaria na triagem de trombocitopenias e investigação de sua etiologia de maneira mais rápida, eficaz, menos invasiva e de baixo custo em serviços de referência.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 TROMBOPOESE E BIOLOGIA DAS PLAQUETAS**

As plaquetas, também chamadas de trombócitos, são pequenas estruturas anucleadas em circulação na corrente sanguínea, desempenhando um papel crucial nos processos bioquímicos de hemostasia, trombose e coagulação do sangue. São produzidas na medula óssea (MO) a partir da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos (MKs). A trombopoese (ver figura 1), é o processo através do qual a célula-tronco hematopoiética pluripotente dá origem ao megacarioblasto, sob estímulos de fatores de crescimento e interleucinas. Na sequência, diferenciam-se em megacariócitos maduros, sob influência da trombopoetina (TPO) e outros mediadores. Estes, amadurecem por meio de replicação endomitótica sincrônica, aumentando o volume citoplasmático e o número de lobos nucleares sem ocorrer citocinese. Finalmente, os MKs maduros emitem projeções citoplasmáticas na barreira endotelial e fragmentam-se, liberando as plaquetas na corrente sanguínea através dos sinusoides do endotélio medular (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

**Figura 1** – Esquema da Trombopoese



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

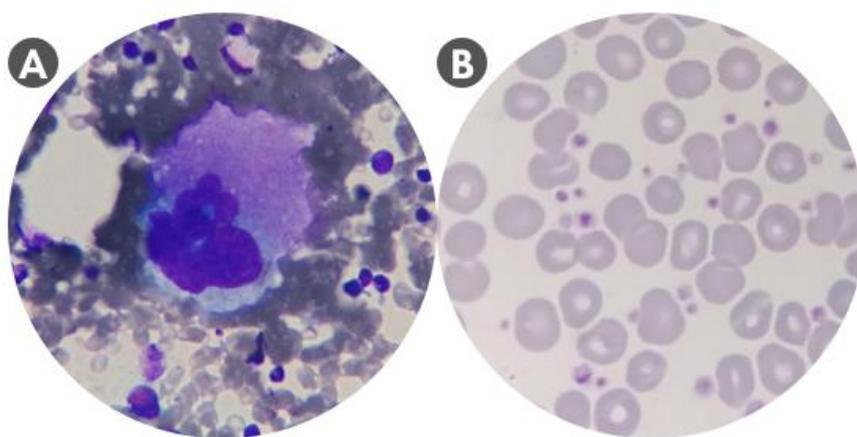
As plaquetas possuem volume médio de 7-11fL, com diâmetros de  $3 \times 0,5 \mu\text{m}$ . Sua estrutura é dividida em quatro zonas: periférica, sol-gel, de organelas e o sistema de membranas. A primeira, inclui as membranas interna e externa, e o sistema canicular aberto, por onde ocorre o troca de moléculas, além disso, abriga glicoproteínas de superfície (GPs) importantes para coagulação: GPIa, GPIb e GPIIb/IIIa e os fosfolípidos de membrana. A segunda zona, localizada ligeiramente abaixo da anterior, abriga o citoesqueleto, responsável pelo formato discoide da plaqueta, e o sistema contrátil, que promove a mudança de conformação plaquetária durante a ativação e facilita a secreção de grânulos. A zona de organelas basicamente comporta os grânulos de armazenamento, que são três: alfa (comportam os fatores von Willebrand – FvW, da coagulação e de crescimento, fibrinogênio e outras proteínas adesivas), densos (comportam trifosfato de adenosina – ATP, difosfato de adenosina – ADP, cálcio e serotonina), e lisossomos que contêm enzimas hidrolíticas. E, por último, o sistema de membranas, que inclui o sistema tubular denso e os sistemas enzimáticos, importantes para a contração plaquetária durante o processo de hemostasia sanguínea (HOFFBRAND&MOSS, 2013; CASTRO et al., 2006).

A principal função das plaquetas é a formação do tampão plaquetário. Após lesão vascular, a interação entre componentes da matriz extracelular subendotelial e as plaquetas culminam na sua ativação. Essa ativação ocorre, principalmente, quando

o colágeno presente na matriz extracelular é exposto – em decorrência de lesão endotelial – e se liga ao FvW, o qual sofre uma mudança de conformação estrutural e se torna capaz de ligar-se à GPIIb. Esse fenômeno, chamado de adesão, desencadeia a ativação plaquetária e a convocação de mais plaquetas para o local da lesão. Quando ativadas, expressam em sua superfície outra glicoproteína de adesão, a GPIIb/IIIa. Esta, associada ao fibrinogênio e ao FvW, formam pontes entre as plaquetas (agregação), completando a formação do trombo plaquetário (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

Ao todo, a trombopoese dura em torno de dez dias e cada megacariócito produz até 5.000 plaquetas (ver figura 2), com sobrevivência média entre 7 e 10 dias e, apesar de circularem no sangue periférico, cerca de 1/3 ficam retidas no baço. Os valores de normalidade para a contagem de plaquetas são entre 150.000 e 400.000/mm<sup>3</sup> de acordo com o Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ), patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (HOFFBRAND&MOSS, 2013).

**Figura 2** - (A) Esfregaço de medula óssea evidenciando megacariócito (x100), (B) Esfregaço de sangue periférico evidenciando plaquetas (x100), ambos em coloração May-Grunwald-Giemsa.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

## 2.2 CONTAGEM DE PLAQUETAS

A quantificação de plaquetas é um exame essencial para o diagnóstico e acompanhamento clínico de pacientes com diversas etiologias. Condições em que a contagem de plaquetas está abaixo do valor de referência, caracterizam o quadro de trombocitopenia, que pode manifestar-se clinicamente através de sangramento de mucosas, petéquias, esplenomegalia, linfadenopatia e hemorragias. Quando os

sintomas são mais graves, envolvendo o sistema nervoso central ou o trato gastrointestinal, é motivo de preocupação, pois nessas circunstâncias, os indivíduos acometidos podem necessitar de transfusão hemoterápica de plaquetas, seja de maneira profilática ou terapêutica. Em suma, a transfusão de concentrado de plaquetas (CP) é indicada em situações de trombocitopenias por falência medular, enquanto raramente é recomendada em casos de trombocitopenias por destruição periférica ou em distúrbios associados à função plaquetária. Por via de regra, a transfusão é recomendada para pacientes oncológicos ou onco-hematológicos que estejam em tratamento com quimio ou radioterapia e após transplante medular, se apresentarem contagens inferiores a 10.000/ $\mu$ L na ausência de fatores de risco ou <20.000/ $\mu$ L em conjunto a manifestações hemorrágicas. Em outras situações, a transfusão deve ocorrer somente quando os pacientes apresentam contagem próxima ao limiar transfusional de 20.000/ $\mu$ L, proposto pelo Ministério da Saúde no Brasil, independente do diagnóstico, ou quando recomendada pelo clínico (BRASIL, 2014).

Compreender a causa da trombocitopenia, clínica e laboratorialmente, é essencial para o manejo adequado do paciente. Essa condição pode resultar de diversos mecanismos (ver Quadro 1), e a correta identificação pelo laboratório é fundamental para garantir um seguimento clínico eficaz (SANTOSHI et al., 2022).

**Quadro 1** - Mecanismos fisiopatológicos e diagnóstico diferencial de trombocitopenias

<b>Mecanismos fisiopatológicos e diagnóstico diferencial de trombocitopenias</b>	<b>Cenário Clínico</b>
Pseudotrombocitopenias	Amostras coaguladas; com agregados causados por anticoagulantes como EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); presença de satelitismo plaquetário envolto de neutrófilos;
Hemodiluição	Infusão de fluídos e/ou plasma; transfusão densa em casos de sangramentos graves;
Diminuição da produção	Anemia aplástica; álcool ou drogas; infecções virais; malignidades hematológicas; deficiência nutricional de vitamina B12 e/ou folato; radiação e quimioterapia;
Aumento do consumo	Grande perda sanguínea; traumas; diálise renal; coagulação intravascular disseminada; circulação extracorpórea;
Aumento do sequestro	Cirrose hepática; osteomielite; hipersplenismo; insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão portal; malignidades hematológicas; distúrbios de armazenamento lipídico;
Destruição plaquetária	Trombocitopenias imunes como infecção por HIV e púrpura trombocitopênica imune (PTI); induzida por drogas; síndrome hemolítico-urêmica; púrpura trombocitopênica trombótica (PTT);

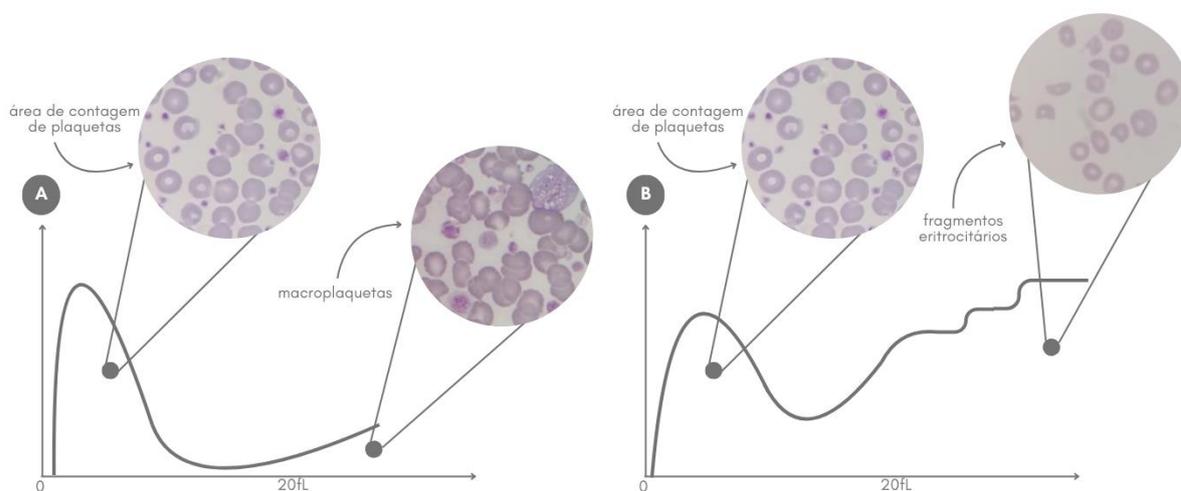
Fonte: adaptado de Santoshi et. al. (2022)

A estimativa de plaquetas em laboratório inicialmente era realizada em hemocítomos, por metodologias manuais, através de análise microscópica de distensões sanguíneas coradas, aplicando métodos como Fônio modificado, Bárbara

O'Connor, Nosanchuk, Chang & Bennet e outros métodos alternativos. Com advento dos analisadores hematológicos modernos, essas técnicas foram sendo substituídas por uma contagem automatizada, mais rápida e precisa. A maioria dos aparelhos utiliza o princípio de Coulter para quantificação de células, empregado inicialmente para contagem de hemácias e leucócitos, e posteriormente aproveitado para as plaquetas. O princípio, devolvido por Wallace Coulter em 1953, consiste no aumento da impedância elétrica quando uma célula sanguínea passa por uma abertura cercada por eletrodos através de uma solução condutora. Assumindo que as células não conduzem eletricidade, o aumento da impedância é proporcional ao volume celular. Logo, eritrócitos e plaquetas são contados no mesmo canal, divergindo-se apenas por limiares de tamanho (COMMAR et al., 2009; SALIGNAC et al., 2013).

Ao passar através do canal, as células uma a uma são medidas e distribuídas em um histograma segundo seu volume, geralmente as plaquetas <20fL e os eritrócitos >30fL (ver figura 3). Essa metodologia entretanto, possui certas limitações quanto as condições da amostra, quando há presença de plaquetas gigantes (>35fL) ou fragmentos eritrocitários, a contagem pode estar sub ou superestimada, respectivamente (FAILACE & FERNANDES, 2015).

**Figura 3** - Histogramas de distribuição do volume plaquetário. (A) Histograma evidenciando a interferência de macroplaquetas e (B) evidenciando a interferência de fragmentos eritrocitários



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Visando superar as limitações impostas pela impedância, novos métodos foram desenvolvidos e aprimorados, a contagem por meio de dispersão de luz por exemplo, utiliza reagentes para marcar o RNA/DNA de células reticuladas, membrana plaquetária e grânulos, uma contagem mais específica e eficaz em contagens inferiores à 100.000/mm, sobretudo na presença de hemácias microcíticas. Entretanto,

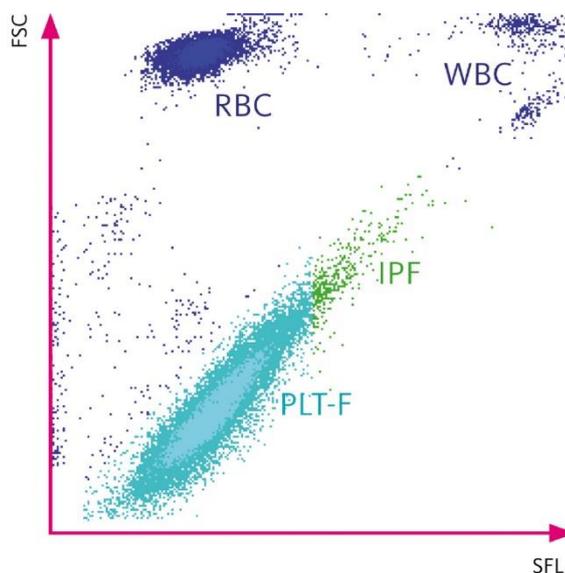
a metodologia não se provou confiável em amostras com presença de fragmentos leucocitários apoptóticos, principalmente em pacientes em uso de quimioterapia (DZIRBA et al., 2018).

Outro método para quantificação de plaquetas é a fluorescência (PFC), que utiliza citometria de fluxo e corantes fluorescentes específicos para estruturas internas das plaquetas, como as mitocôndrias. Esse método permite uma contagem mais precisa e eficiente das plaquetas, apresentando excelente correlação com a análise de CD41 e CD61, glicoproteínas de superfície comumente utilizadas como marcadores na imunofenotipagem por citometria de fluxo. Além disso, essa técnica minimiza as interferências causadas por detritos celulares, como fragmentos eritrocitários e leucocitários, especialmente em contagens inferiores a 50.000/mm<sup>3</sup>. Além de quantificar as plaquetas, o método também determina um novo parâmetro, a fração de plaquetas imaturas (IPF), obtida a partir do gráfico de dispersão gerado durante a contagem. (MEINTKER & KRAUSE, 2020; WADA et al., 2015).

### 2.3 FRAÇÃO DE PLAQUETAS IMATURAS

Quando as plaquetas são jovens na corrente sanguínea, ou seja, recém-liberadas do megacariócito, são maiores e possuem resquícios de RNA em seu citoplasma, além do tempo de vida em circulação ser mais curto (<1 dia). Logo, quando o gráfico de dispersão da medição de plaquetas por fluorescência é formado, um novo parâmetro é obtido: a fração de plaquetas imaturas ou *Immature platelet fraction* (IPF). Esta localiza-se mais à direita e acima do gráfico, afirmando seu volume e sua complexidade, em razão do RNA remanescente (ver figura 4). A medição do IPF determina a velocidade e a frequência com que as plaquetas reticuladas caem no sangue, por sua vez, podendo contribuir para o diagnóstico diferencial da trombocitopenia (HOFFMAN, 2014).

**Figura 4** - Gráfico de dispersão da medição de plaquetas por fluorescência (PLT-F) por dispersão de luz direta/frontal (FSC) versus fluorescência lateral (SFL)



Fonte: Meintker & Krause, 2020.

Essa particularidade das plaquetas reticuladas, assim chamadas em analogia aos reticulócitos na eritropoese, as torna um possível marcador da atividade trombopoética na medula óssea. Nos últimos anos, o IPF tem sido amplamente estudado e demonstrado crescente utilidade no diagnóstico diferencial de trombocitopenias. Não somente, também tem se mostrado um útil marcador na previsão da recuperação plaquetária após terapia transfusional e ainda um possível marcador em doenças cardíacas, além de diversos outros estudos que buscam sua aplicabilidade clínica (MEINTKER & KRAUSE, 2020).

#### 2.4 AVALIAÇÃO DA TROMBOPOESE

Atualmente, a avaliação padrão-ouro da trombopoese é realizada através do mielograma. Durante o procedimento, cerca de 0,5mL de espécime é aspirado com uma seringa de 10 ou 20mL acoplada a uma agulha de grosso calibre, para confecção dos esfregaços imediatamente, sem a presença de anticoagulantes, na intenção de preservar a morfologia, para posterior análise microscópica. O local de punção preferencialmente é a crista ilíaca posterior, mas também pode ser no esterno, crista ilíaca anterior ou na superfície medial da tíbia em situações excepcionais, como idade do paciente ou limitações de mobilidade (LEE et al., 2008).

A análise é feita observando a maturação e quantidade das células sanguíneas,

inclusive avaliação da série megacariocítica. Assim, é possível inferir, entre outras informações, se a causa da trombocitopenia é por consumo de plaquetas ou de causa primária por redução da função medular como na aplasia/infiltração devido ao comportamento morfológico dos megacariócitos: hipo ou hiperplasia desta linhagem, ploidia e evidência de plaquetogênese. Ao contrário da análise morfológica medular, a fração de plaquetas imaturas pode estabelecer uma correlação com a trombopoese, porém, através de um parâmetro obtido de sangue periférico, de forma menos invasiva e mais acessível ao paciente (LEE et al., 2008; GOEL et al., 2021).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a fração de plaquetas imaturas (IPF) em pacientes com trombocitopenia em um hospital de referência em hematologia.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar os pacientes quanto ao gênero, idade, grau de severidade da trombocitopenia, quanto à presença de anemia e leucometria;

Correlacionar a contagem de plaquetas pelo método de impedância (PLT-I) com o método fluorescente (PFC);

Determinar o percentual fração de plaquetas imaturas (IPF%) em pacientes trombocitopênicos;

Descrever os achados morfológicos medulares relacionados a trombopoese dos pacientes cujas amostras foram avaliadas para o estudo;

Comparar a fração de plaquetas imaturas (IPF) com o parâmetro morfológico de trombopoese observado no mielograma.

## 4 METODOLOGIA

Este é um estudo primário, não experimental, de caráter observacional, analítico de base individual e transversal.

### 4.1 POPULAÇÃO ALVO

A população alvo de estudo foram os pacientes adultos triados diariamente no serviço de pronto atendimento, ambulatório e outros setores assistenciais da Unidade de Hematologia Clínica da Fundação HEMOPE no período de junho de 2023 a abril de 2024. Como critério de inclusão foi utilizado contagem de plaquetas inferior a  $150.000/\mu\text{L}$  no primeiro hemograma realizado no serviço, caracterizando o quadro de trombocitopenia, e idade maior ou igual a 18 anos. E, como critério de exclusão, foram afastadas pseudotrombocitopenias em amostras de sangue (causadas por agregação ou satelitismo), pacientes trombocitopênicos cujos exames de medula óssea não tenham sido realizados neste intervalo e amostras armazenadas em tempo superior a 12 horas após coleta.

### 4.2 DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

**Quadro 2** - Definição e categorização das variáveis utilizadas no estudo

Variável	Descrição	Tipo	Formato/ Categorização
Gênero	De acordo com o sexo biológico resgatado do prontuário dos pacientes.	Categórica nominal	Masculino Feminino
Idade	De acordo com o registro de nascimento resgatado do prontuário dos pacientes.	Quantitativa discreta	18, 19, 20 anos...
Contagem de Plaquetas (PLT-I)	Quantidade de plaquetas circulando no sangue em $\times 10^3/\mu\text{L}$ ou $\text{mm}^3$ determinado por método de impedância elétrica.	Quantitativa contínua	$<150 \times 10^3/\mu\text{L}$
Contagem de Plaquetas por fluorescência (PFC)	Quantidade de plaquetas circulando no sangue em $\times 10^3/\mu\text{L}$ ou $\text{mm}^3$ determinado por método de fluorescência.	Quantitativa contínua	$<150 \times 10^3/\mu\text{L}$
Fração de Plaquetas Imaturas (IPF%)	Classificação do percentual das plaquetas imaturas em circulação no sangue, de acordo com o valor de referência local.	Categórica ordinal	Diminuído $<1,3\%$ Normal $1,3-7,9\%$ Aumentado $>7,9\%$
Severidade da Trombocitopenia	Classificação da contagem de plaquetas por método fluorescente.	Categórica ordinal	Grave $<50 \times 10^3/\mu\text{L}$ Moderada $<100$

			x10 <sup>3</sup> /μL Leve <150 x10 <sup>3</sup> /μL
Trombopoese	Classificação da celularidade megacariocítica observada no mielograma.	Categórica nominal	Hipoplástica Normoplástica Hiperplástica
Anemia	Classificação da presença ou ausência de anemia, de acordo com a concentração de hemoglobina abaixo do valor de referência proposto pelo PNCQ, segundo idade e gênero (Hb <12,0 g/dL para mulheres, e Hb <13,0 g/dL para homens, ambos adultos).	Categórica nominal	Não Sim
Leucometria	Classificação da quantidade de leucócitos circulando no sangue em x10 <sup>3</sup> /μL ou mm <sup>3</sup> , segundo PNCQ.	Categórica ordinal	Diminuído Normal Aumentado

Fonte: elaborado pelo autor (2024).

### 4.3 OBTENÇÃO DAS VARIÁVEIS

#### 4.3.1 Análise da Amostra Biológica

Para obter as variáveis primárias analisadas, foram utilizadas amostras de sangue periférico anticoagulado em EDTA dos pacientes elegíveis para o estudo. O parâmetro contagem de plaquetas (PLT-I x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>) foi captado através de análise por impedância elétrica, hemoglobina (Hb g/dL) por determinação colorimétrica, ambos no analisador hematológico XN 1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Hyogo, Japão), instalado no laboratório de citologia da Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE), e os parâmetros *White Blood Cells*/contagem de leucócitos (WBC x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>), plaquetas fluorescentes (PFC x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>) e *immature platelet fraction*/fração de plaquetas imaturas (IPF %) também no mesmo equipamento, porém por método de citometria de fluxo. Para contagem de plaquetas por fluorescência, especificamente, é utilizado um canal único e dedicado para contagem de plaquetas através do corante oxazina, que penetra a membrana plaquetária e permite a classificação das plaquetas em gráfico de espalhamento conforme tamanho e complexidade citoplasmática em software específico. Para garantir a precisão e desempenho do aparelho, as amostras somente eram processadas mediante uso de controles fornecidos pelo fabricante em três níveis.

#### 4.3.2 Análise dos Dados Sociodemográficos e Clínicos

Para determinação das variáveis secundárias (idade e gênero), foram coletadas informações através de prontuário eletrônico (via Sistema PEP MV) de cada paciente. Quanto à análise da morfologia medular, foram reavidos os resultados de mielogramas referentes ao seguimento diagnóstico dos respectivos pacientes avaliados na coleta das primeiras variáveis, disponíveis em prontuários eletrônicos.

Em situações de subjetividade na interpretação dos resultados do mielograma, foi possível mitigar as dúvidas diretamente com o profissional médico hematologista responsável pela emissão do laudo.

#### 4.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O programa Stata Statistical Software versão SE-64 foi utilizado para realizar as análises estatísticas. O teste SK (*Skewness* e *Kurtosis*) foi utilizado para avaliar a normalidade das variáveis quantitativas (idade, PLT-I, PFC, IPF%), que apresentaram distribuição não normal, e assim foram calculadas mediana e amplitude interquartil. O teste de Fisher foi utilizado para avaliar a associação entre os graus de IPF% e os graus de megacariopoese. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para comparar as variáveis contínuas PLT-I e PFC. As variáveis categóricas foram apresentadas em tabelas e gráficos e a associação entre gravidade da trombocitopenia e origem do paciente foi demonstrada através do teste Exato de Fisher. Para fins de significância estatística foi adotado um  $p$  valor  $< 0,05$ .

#### 4.5 COMITÊ DE ÉTICA

O projeto está inscrito na Plataforma Brasil e no Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação HEMOPE conforme CAAE 67609023.4.0000.5195 e aprovado segundo o parecer consubstanciado nº 6.077.121 emitido em 24/05/2023 (ver anexo A).

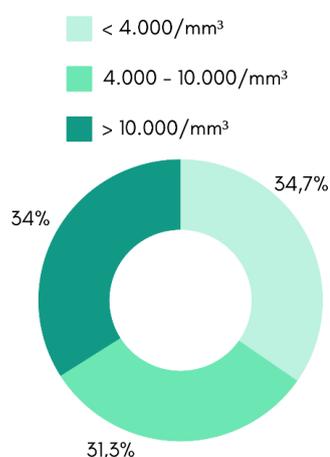
## 5 RESULTADOS

Um total de 429 pacientes foram coletados para esse estudo, no período de junho de 2023 a abril de 2024. No entanto, apenas 150 foram incluídos na análise, pois somente esses obtiveram o parâmetro medular em tempo hábil para comparação com o parâmetro periférico.

A idade dos indivíduos variou de 18 a 91 anos, com mediana de 58,5 anos e amplitude interquartil/AIQ (41-71 anos). Havia 75 homens (50%) e 75 mulheres (50%), não havendo diferença na distribuição da idade por gênero.

Neste estudo, foi observado que 87,33% dos indivíduos cursavam com anemia (níveis de hemoglobina inferior à normalidade) além da trombocitopenia e os demais (12,67%) estavam normais. Outrossim, pouco mais de dois terços dos pacientes também cursavam com valores alterados de leucócitos (figura 5).

**Figura 5** - Distribuição dos pacientes segundo contagem de leucócitos



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

A trombocitopenia é definida por uma contagem de plaquetas inferior a 150.000/mm<sup>3</sup> e pode ser classificada em leve (100-149.000/mm<sup>3</sup>), moderada (50-99.000/mm<sup>3</sup>) e grave (<50.000/mm<sup>3</sup>). Com base nesses critérios, os pacientes foram distribuídos conforme a Tabela 1. Além disso, também foram caracterizados segundo sua origem, setor onde se encontravam no hospital no momento da coleta do seu primeiro hemograma, como indicado na mesma tabela ( $p=0,020$ ).

**Tabela 1** - Associação entre a origem dos pacientes e a gravidade da trombocitopenia

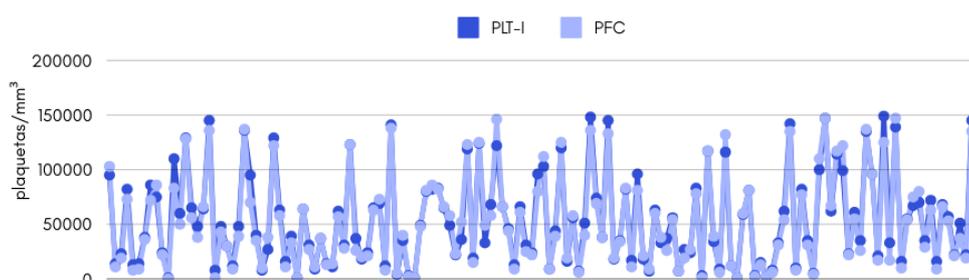
Origem	Gravidade da trombocitopenia			Total
	Grave	Moderado	Leve	
SPA	48%	23,3%	10,6%	81,9%
Ambulatório	4,7%	4%	6%	14,7%

Outros	2%	1,4%	0	3,4%
<b>Total</b>	<b>54,7%</b>	<b>28,7%</b>	<b>16,6%</b>	<b>100%</b>

Fonte: elaborado pelo autor (2024).

No que se refere à distribuição da contagem de plaquetas por método fluorescente (referência para este estudo) foi obtida a mediana 39.500/mm<sup>3</sup> (AIQ 19.000-77.000/mm<sup>3</sup>) e, em relação ao método de impedância a mediana obtida foi de 45.000/mm<sup>3</sup> (AIQ 18.000-82.000/mm<sup>3</sup>). Correlacionando ambas as contagens, alcançamos uma correlação positiva, diretamente proporcional ( $r=0,9858$ ;  $p<0,001$ ) representado na figura 6.

**Figura 6** - Distribuição das contagens de plaquetas por impedância (PLT-I) e por fluorescência (PFC)



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Apesar da boa relação em ambas variáveis, estas são independentes, e por isso possuem medianas distintas, apesar dos valores serem semelhantes entre si. Visto que de todas as medidas de plaquetas coletadas, apenas 17 medidas das 150 foram iguais, enquanto que 42 medidas fluorescentes foram superiores e 91 foram inferiores à impedância. Esse achado é relevante, pois, se o limiar de 20.000/mm<sup>3</sup> fosse adotado para transfusão profilática de plaquetas sem considerar a causa da trombocitopenia, cinco pacientes deixariam de ser tratados, enquanto o oposto não aconteceria (ver Tabela 2).

**Tabela 2** - Correlação entre os valores de PLT-I e PFC entre alguns pacientes

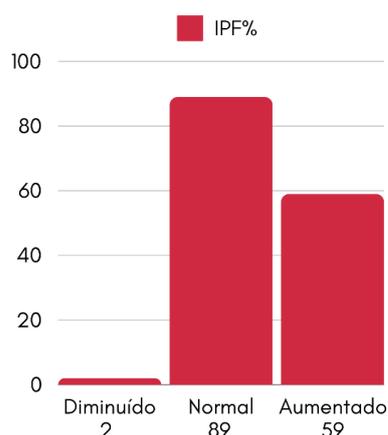
Nº do Paciente	PLT-I	PLT-F
#3	23.000/mm <sup>3</sup>	19.000/mm <sup>3</sup>
#99	27.000/mm <sup>3</sup>	19.000/mm <sup>3</sup>
#132	21.000/mm <sup>3</sup>	17.000/mm <sup>3</sup>
#134	33.000/mm <sup>3</sup>	17.000/mm <sup>3</sup>
#147	22.000/mm <sup>3</sup>	19.000/mm <sup>3</sup>

Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Quanto ao IPF%, a mediana encontrada nos pacientes foi de 6,9% (AIQ 4,2-13,1%), valor superior em relação à população saudável local com mediana 2,95% (AIQ 2,1-4,3%). Em sequência os pacientes foram estratificados nas categorias diminuído (<1,3%), normal (1,3-7,9%) e aumentado (>7,9%), segundo intervalo de

referência estabelecido no local, evidenciado na figura 7.

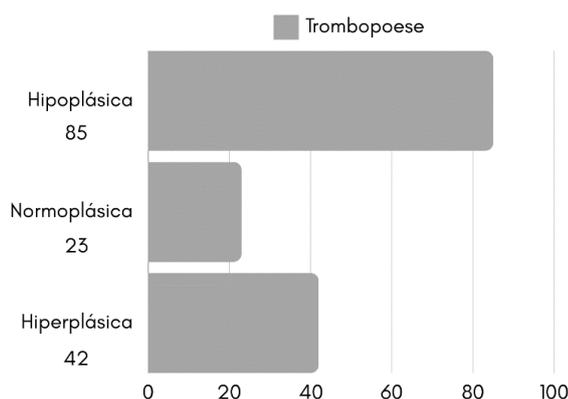
**Figura 7** – Categorização do IPF% nos pacientes



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

A trombopoese de cada paciente foi determinada por meio dos resultados de mielogramas e classificada como hipoplásica, normoplásica ou hiperplásica, com base na quantidade de megacariócitos observados em lâmina, seguindo os critérios estabelecidos pelo analista responsável (ver Figura 8).

**Figura 8** - Classificação da morfologia medular dos pacientes



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Por fim, foi utilizado o teste exato de Fisher para propor a associação entre o IPF% e a megacariopoese (ver Tabela 3) e foi observado  $p=0,1895$ .

**Tabela 3** - Associação entre IPF% e trombopoese

IPF%	Trombopoese			Total
	Hipoplásica	Normoplásica	Hiperplásica	
Diminuído	0,7%	0,7%	0	1,4%
Normal	37,4%	7,3%	14,6%	59,3%
Aumentado	18,6%	7,3%	13,4%	39,3%
<b>Total</b>	56,7%	15,3%	28%	100%

Fonte: elaborado pelo autor (2024).

## 6 DISCUSSÃO

Com o avanço das tecnologias em hematologia, principalmente na contagem das células sanguíneas, houve o surgimento de novos parâmetros automatizados. No âmbito da contagem de plaquetas, por exemplo, surgiu a fração de plaquetas imaturas (IPF). Observou-se então que este parâmetro possibilita realizar uma avaliação preliminar da trombopoese, de maneira mais rápida e menos invasiva para os pacientes. Essa inovação torna o IPF um marcador promissor da atividade trombopoética, sendo potencialmente útil para auxiliar no diagnóstico de pacientes com trombocitopenia.

Ao longo dos anos, diversos estudos têm demonstrado a aplicabilidade do IPF, sobretudo na distinção de trombocitopenias entre destruição/consumo periférico e falência/supressão medular como em Goel et al. (2020) e Jeon et al. (2021), e também na previsão da recuperação plaquetária como em Dadu et al. (2013). Neste estudo, buscou-se avaliar e reafirmar a utilidade clínica do IPF, considerando sua disponibilidade nos analisadores hematológicos modernos. A pesquisa em questão visou analisar pacientes com trombocitopenias de etiologia desconhecida em um serviço referência em distúrbios hematológicos e comparar o parâmetro à morfologia medular, a fim de obter uma associação entre ambos.

Embora todos os pacientes analisados exibissem o quadro de trombocitopenia, os valores de plaquetas/mm<sup>3</sup> encontrados foram bastante heterogêneos. Segundo a classificação: grave, moderada e leve, mais da metade (54,7%) dos pacientes cursavam com a condição grave deste quadro clínico, nesta pesquisa. Ao correlacionar esses dados com a origem do paciente, foi aplicado o teste exato de Fisher, revelando uma associação significativa entre a origem SPA e a trombocitopenia grave ( $p=0,020$ ), visto que 48% do total de 150 pacientes eram graves e estavam no SPA. A unidade de serviço de pronto atendimento da Fundação HEMOPE funciona para atender pacientes em intercorrências, classificados como urgentes e emergentes. A associação observada ocorre, portanto, em razão do estado de saúde dos pacientes ser crítico, frequentemente com sintomas hematológicos graves e risco de morte. No entanto, quando a origem do paciente era ambulatorio, observou-se uma heterogeneidade na severidade da trombocitopenia, não havendo associação significativa em nenhuma categorização. Isso se deve ao fato do setor receber pacientes de etiologias variadas mas, geralmente com maior tolerância a

sangramentos.

A maior parte dos pacientes observados (87,33%) apresentou anemia associada à trombocitopenia. A Organização Mundial da Saúde define anemia como a condição na qual o conteúdo de hemoglobina no sangue está abaixo da normalidade, segundo idade e/ou gênero do paciente, proposto pelo PNCQ. Essa situação pode ser reflexo de um problema primário, como hipofunção ou aplasia medular, ou alguma causa neoplásica subjacente que pode comprometer a hematopoese de forma geral. Um achado consistente com estudos anteriores cujos pacientes foram categorizados no grupo de hipoprodução de plaquetas em Jeon et al. (2021) e falha medular em Butt et al. (2023) também cursavam anemia, com valores médios de hemoglobina 9,5 e 6,5g/dL respectivamente.

Ao confrontar as metodologias fluorescente (PFC) e impedância (PLT-I), apesar da correlação positiva, as variáveis se provaram independentes. De tal maneira que 91 de todas as medidas de plaquetas coletadas foram inferiores à impedância. Este resultado é explicado graças à maior acurácia da PFC para quantificação em relação à PLT-I devido às propriedades do seu corante, capaz de distinguir finamente as plaquetas de esquizócitos, visto que coram estruturas intraplaquetárias fortemente, enquanto que a membrana plasmática das hemácias é corada levemente. Logo, é compreensível que a mensuração das plaquetas pelo método fluorescente seja inferior na maior parte dos resultados comparada à mensuração por impedância, graças a maior acurácia da técnica. Achado este, semelhante ao evidenciado por Schoorl e colaboradores em 2013 no seu estudo, que comprovou a alta eficácia da técnica e sua superioridade não só sobre a metodologia de impedância como também sobre a metodologia óptica. Além dele, estudos como Park et al. (2014) e Wada et al. (2015) também corroboraram para este resultado, afirmando que a técnica PFC é a mais próxima ao método padrão ouro para contagem de plaquetas, imunofenotipagem por citometria de fluxo com CD41 e CD61, sobretudo em situações de trombocitopenia acentuadas.

Mensurar plaquetas com eficiência é importante, principalmente em situações cujo risco de sangramento letal é iminente. Ainda discorrendo sobre o grande número de medidas de PFC inferiores à PLT-I e considerando o limiar de contagem de plaquetas  $20.000/\text{mm}^3$  proposto pelo Ministério da Saúde para realizar prescrição de transfusão profilática de concentrado de plaquetas (CP), cinco pacientes desse estudo com plaquetas determinadas por impedância não receberiam CP, a menos que suas

plaquetas fossem contadas pelo método fluorescente (sem considerar a etiologia da trombocitopenia). Este resultado mostra o quão adequada é a contagem fluorescente de plaquetas comparada ao método de impedância em trombocitopenias graves, corroborando mais uma vez com os achados de Schoorl e colaboradores em 2013 que, ao comparar o método fluorescente com o não-fluorescente em 37 amostras, observaram que 04 pacientes não se beneficiariam com CP utilizando o limiar transfusional plaquetário de 20.000/mm<sup>3</sup> se as plaquetas não fossem contadas pelo método fluorescente.

Em relação ao IPF, além da distribuição não normal, a mediana dos pacientes foi duas vezes maior que a da população saudável local. A distribuição geralmente ocorre desta maneira pois as condições etiológicas e fisiopatológicas que levam à trombocitopenia neste estudo podem ser muito diversas. A distribuição não normal do IPF também ocorreu no estudo de Jeon et al. (2020) com amostragem de 61 pacientes trombocitopênicos com púrpura trombocitopênica imune e anemia aplásica.

Outro ponto a ser destacado é que, além deste estudo, pesquisas anteriores envolvendo pacientes com trombocitopenia também observaram uma inversão nos valores: quando a contagem de plaquetas diminui, há um aumento na fração de plaquetas imaturas, a exemplo do estudo de Cybulska et al. (2017) em 47 pacientes com PTI cuja mediana do IPF% foi 9%, em 58 pacientes com falência da medula óssea, com mediana 10,9% e os controles presumidamente saudáveis (97 indivíduos) com mediana de 1,9%. Em Goel et al. (2021), a fração de plaquetas imaturas era de 2,4% em controles saudáveis e 8,9% em pacientes com trombocitopenia. Em Ali et al. (2019), a fração de plaquetas imaturas era de 4,5% para homens e 4,2% para mulheres em controles normais, em comparação com 5,75% para o sexo masculino e 5,25% para o sexo feminino no subgrupo com trombopoese reduzida, e 8,9% e 9,7% para os sexos masculino e feminino, respectivamente, no subgrupo com aumento de consumo. Esses dados reforçam que, independentemente do diagnóstico dos pacientes com trombocitopenia, a mediana do IPF% é consistentemente maior do que a encontrada na população normal de referência.

O aspirado de medula óssea, é um exame essencial para avaliação da hematopoese, sobretudo na investigação e diagnóstico de distúrbios hematológicos. Durante a análise da morfologia medular, através do esfregaço de MO, a série megacariocítica é observada inicialmente para confirmar a boa representatividade da medula – ausência de megacariócitos na amostra pode significar hemodiluição.

Posteriormente, a granulopoese e eritropoese são avaliadas para contagem e descrição, como parte do exame, e por fim, a série megacariocítica é visualizada para averiguar a presença ou não de displasias, e quantificada, para determinação se os valores estão normais, diminuídos ou elevados, da mesma maneira que Niero-Melo e colaboradores realizaram em seu estudo de 2006, para desenvolver as diretrizes no diagnóstico de síndromes mielodisplásicas.

Neste estudo, a trombopoese foi categorizada de acordo com o critério quantitativo. E desta forma, foram encontradas as frequências: hipoplasia (85 pacientes), normoplasia (23 pacientes) e hiperplasia megacariocítica (42 pacientes). Refletindo, portanto, que apesar de todos os indivíduos explorados apresentarem a condição de trombocitopenia, o grau de trombopoese foi heterogêneo, em razão das diferentes etiologias apresentadas. Contudo, é relevante observar que boa parte cursava com hipoplasia megacariocítica (57%), quadro que pode estar correlacionado a hipofunção por aplasia medular, infecções virais, condições clonais, infiltração por células malignas ou outras condições subjacentes. Portanto, é fundamental estudar o IPF, pois espera-se que haja uma associação mais eficaz entre esse parâmetro e a trombopoese, em vez de se basear na mera correlação entre a contagem de plaquetas e a trombopoese, que já demonstrou ser menos consistente dado o grande espectro de condições etiológicas de trombocitopenias que podem ser encontradas em um serviço especializado em hematologia, sobretudo no serviço de pronto atendimento.

Finalmente, o Teste de Fisher foi aplicado para propor a associação entre o parâmetro IPF e a trombopoese observada nos laudos de mielogramas e foi revelado que não há, ( $p = 0,1895$ ). Isso é evidenciado pela baixa frequência de IPF abaixo do valor de normalidade proposto, em comparação com a alta quantidade de medulas categorizadas com hipoplasia megacariocítica. Isto ocorre provavelmente por dois motivos, o primeiro é o valor de referência local estar estabelecido em uma faixa muito baixa, enquanto os pacientes deveriam ter um valor ainda mais baixo para serem classificados com IPF baixo. O segundo motivo é subjetividade na descrição dos mielogramas, considerando que apesar da competência técnica do analista responsável, a avaliação citomorfológica pode não ter sido suficientemente precisa, especialmente em casos de trombocitopenia causada por infiltração medular por células malignas, observada quando o clone anormal têm vantagem proliferativa sobre a linhagem megacariocítica, causando um 'efeito de diluição' que dificulta a observação desta linhagem ao exame microscópico. Esta limitação, juntamente com

a interpretação de alguns laudos, foi superada através de reuniões e discussões com os analistas responsáveis, tendo em vista que a coleta deste parâmetro foi um dado secundário. Ressalta-se que não há, até o momento em que esta pesquisa foi desenvolvida, estudos que comparem estas metodologias (fração de plaquetas imaturas e trombopoese observada no mielograma) na literatura.

Este trabalho apresenta algumas limitações, dentre as quais já foi mencionada na subjetividade da interpretação da megacariopoese em alguns laudos de pacientes com malignidades hematológicas. Este trabalho não estratifica os pacientes em subgrupos como geralmente é observado na literatura, restringindo a pura comparação de dois métodos analíticos categorizados: a fração de plaquetas imaturas no sangue periférico e a trombopoese no aspirado de medula óssea.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados, é possível concluir que não houve associação entre o parâmetro fração de plaquetas imaturas (IPF) e a trombopoese observada no mielograma. Também é possível afirmar que há uma relação positiva, porém independente, entre as metodologias para mensurar plaquetas, impedância e fluorescência, sendo a última mais assertiva. E, por último, que há uma correlação inversa entre altas frações de plaquetas imaturas e baixas contagens de plaquetas em amostras trombocitopênicas, independentemente do diagnóstico. Deve-se considerar que este estudo não avaliou o IPF% como um parâmetro diagnóstico em trombocitopênicos previamente classificados segundo sua etiologia, mas buscou associar apenas diferentes métodos que, segundo a literatura, podem apontar para uma condição biológica comum.

## REFERÊNCIAS

- ALI, I.; GRAHAM, C.; DEMPSEY-HIBBERT, N. C. Immature platelet fraction as a useful marker in the etiological determination of thrombocytopenia. **Experimental Hematology**, v. 78, p. 56–61, out. 2019.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para o uso de hemocomponentes**. 2.ed. Editora MS. Brasília, 2014. cap. 3, p. 34-39.
- BUTT, A. et al. Reticulated Platelet Count as a Diagnostic Tool in Immune Thrombocytopenia (ITP). **Cureus**, 4 jul. 2023.
- CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 321–332, 1 out. 2006.
- CYBULSKA, A. et al. Measurements of immature platelets with haematology analysers are of limited value to separate immune thrombocytopenia from bone marrow failure. **British Journal of Haematology**, v. 177, n. 4, p. 612–619, 5 abr. 2017.
- DADU, T. et al. Evaluation of the immature platelet fraction as an indicator of platelet recovery in dengue patients. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 36, n. 5, p. 499–504, 12 dez. 2013.
- DZIRBA, T. A. et al. Análise comparativa de contagens de plaquetas entre metodologias de impedância e óptica em amostras de sangue de indivíduos hospitalizados. **Rev. bras. anal. clin.**, v. 50, n. 2, p. 174–178, 2018.
- FAILACE, R. & FERNANDES, F. Hemograma: manual de interpretação. **Plaquetograma**. 6ª edição. Editora Artmed. Porto Alegre: 2015.
- GOEL, G. et al. Immature platelet fraction: its clinical utility in thrombocytopenia patients. **J Lab Physicians**. v.13, p.214-218, 2021.
- HOFFBRAND A. V. & MOSS, P. A. H. Fundamentos em Hematologia. **Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia**. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 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.
- 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, fev. 2020.
- LEE, S.-H. . et al. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 30, n. 5, p. 349–364, out. 2008.
- MEINTKLER, L. & KRAUSE, SW. Reticulated platelets – clinical applications and future perspectives. **J Lab Med**, v.44, n.5, p.241-253, 2020.

NIERO-MELO, L. et al. Diretrizes para diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 3, set. 2006.

PARK, S. H. et al. The Sysmex XN-2000 Hematology Autoanalyzer Provides a Highly Accurate Platelet Count than the Former Sysmex XE-2100 System Based on Comparison with the CD41/CD61 Immunoplatelet Reference Method of Flow Cytometry. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 34, n. 6, p. 471–474, 1 nov. 2014.

SANTOSHI, R. K. et al. A Comprehensive Review of Thrombocytopenia With a Spotlight on Intensive Care Patients. **Cureus**, v. 14, n. 8, 5 ago. 2022.

SCHOORL, M. et al. New Fluorescent Method (PLT-F) on Sysmex XN2000 Hematology Analyzer Achieved Higher Accuracy in Low Platelet Counting. **American Journal of Clinical Pathology**, 2013.

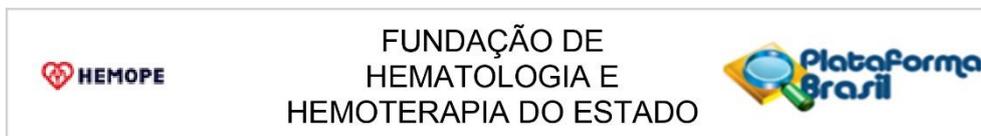
SALIGNAC, S. et al. Platelet Counting. **Methods in molecular biology**, v. 992, p. 193–205, 1 jan. 2013.

WADA, A. et al. Accuracy of a New Platelet Count System (PLT-F) Depends on the Staining Property of Its Reagents. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0141311, 23 out. 2015.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Tratado de Hematologia. **Trombocitopoese**. São Paulo: Atheneu, 2013.

## ANEXO A

### Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da fração de plaquetas imaturas (IPF) na investigação de trombocitopenias

**Pesquisador:** RAPHAEL FERREIRA PIMENTEL

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 67609023.4.0000.5195

**Instituição Proponente:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco -

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.077.121

##### Apresentação do Projeto:

A fração imatura das plaquetas (IPF) representa um parâmetro plaquetário automatizado presente em analisadores hematológicos modernos que é resultado da determinação das plaquetas utilizando um corante adicional que cora os ácidos nucleicos remanescentes mensurados por citometria de fluxo fluorescente. É análoga às plaquetas reticuladas (PR) mensuradas por citometria de fluxo através de métodos imunológicos com anticorpos monoclonais, o que representa o método padrão-ouro para tal determinação. As plaquetas reticuladas apresentam elevado conteúdo de ácido ribonucleico (RNA), pois representam plaquetas recém-liberadas da medula óssea (MO) com menos de 24 horas de liberação para o sangue periférico (SP). Foi observado que este parâmetro pode ser útil para distinguir trombocitopenias devido à elevada destruição/consumo periférico de trombocitopenias causadas por hipofunção medular. Esse projeto : Avalia a possibilidade de utilizar os parâmetros plaquetários, sobretudo o IPF, para realizar a triagem de trombocitopenias em um hospital de referência em hematologia e nortear a investigação da sua origem, auxiliando no diagnóstico.

##### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:** Avaliar os achados de fração de plaquetas imaturas (IPF) na investigação da etiologia das trombocitopenias.

**Endereço:** Rua Joaquim Nabuco, 171

**Bairro:** Graças

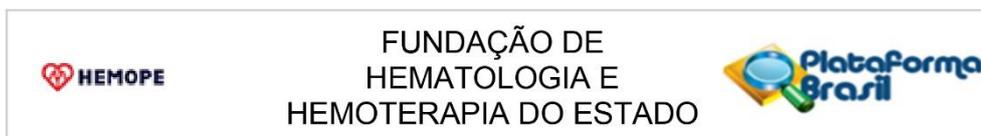
**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**CEP:** 52.011-000

**Telefone:** (81)3182-4771

**E-mail:** cep@hemope.pe.gov.br



Continuação do Parecer: 6.077.121

**Objetivo Secundário:**

1. Determinar valores de referência para os parâmetros PLT-I, PLT-O, PLT-F, IPF%, VPM, PDW e P-LCR na Unidade de laboratórios especializados da Fundação Hemope;
2. Comparar o parâmetro IPF com a avaliação plaquetas reticuladas (PR) por citometria de fluxo;
3. Correlacionar o parâmetro IPF e o diagnóstico final das trombocitopenias.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**4.10 Riscos e benefícios:**

4.10.1. Riscos: O risco avaliado para o paciente/doador é que, em função da coleta de sangue, possa haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha.

4.10.2. Benefícios: Será possível realizar propostas de incorporação deste parâmetro na conduta de plaquetopenias a esclarecer e realizar inferências quanto ao impacto dessa rotina nos custos da Fundação além de corroborar com dados da literatura internacional.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo será do tipo :Primário, transversal e prospectivo.

Local e período do estudo:Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Hemope): Hospital Hemope, Unidade Hemocentro Recife (UHR), Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE). De março de 2023 a março de 2025.

População do estudo para a determinação dos valores de referência para os parâmetros plaquetários automatizados:50 amostras de doadores saudáveis triados na UHR para amostragem normal;Serão coletadas e processadas 25 amostras com diagnóstico confirmado de PTT, PTI, anemia aplásica e aplasia medular secundária à quimioterapia para amostragem patológica.Para a comparação entre o parâmetro IPF pelo método automatizado e método de referência empregando anticorpos antiplaquetários por citometria de fluxo:Serão utilizadas 20 amostras com resultados de IPF díspares entre doadores saudáveis triados na UHR e pacientes com diagnóstico confirmado de plaquetopenia com diferentes etiologias.

Para a correlação entre o parâmetro IPF e o diagnóstico final das trombocitopenias:

Serão utilizadas pelo menos 500 amostras de plaquetopenias encaminhadas à UNILABE para processamento de IPF em analisador e avaliação de prontuário médico para a investigação do diagnóstico final dos pacientes das respectivas amostras.

**Endereço:** Rua Joaquim Nabuco, 171

**Bairro:** Graças

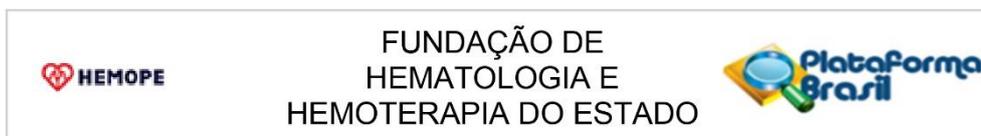
**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**CEP:** 52.011-000

**Telefone:** (81)3182-4771

**E-mail:** cep@hemope.pe.gov.br



Continuação do Parecer: 6.077.121

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Conforme os preceitos éticos:

1. Folha de Rosto
2. O termo de Compromisso e Confidencialidade;
3. Projeto detalhado e Formulário das Informações Básicas da Pesquisa na Plataforma Brasil;
4. Riscos e benefícios;
5. Carta de Anuência;
6. Orçamento e cronograma;
7. Currículo dos pesquisadores.

**Recomendações:**

A recomendação solicitada foi atendida: "Recomendo inserir no projeto os riscos e benefícios, e acrescentar ao texto onde cita o risco da pesquisa, o que foi colocado acima sobre o risco para o paciente, como descrito no TCLE". "Esta alteração foi inserida na página 12 do Projeto Detalhado/Brochura Investigador em realce amarelo".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Foram esclarecidos os fluxos de abordagem e coleta dos pacientes que farão parte da pesquisa e anexado o questionário como solicitado. "Quanto aos doadores, haverá solicitação de dados, algum questionário? ou simplesmente a coleta? se sim, anexar na plataforma o questionário. Quanto aos pacientes, como será o fluxo para a seleção desses pacientes, será feita uma consulta prévia de prontuários e serão abordados na consulta ambulatorial?"

"Tais alterações foram inseridas na página 9 do Projeto Detalhado/Brochura Investigador em realce amarelo. Foi também anexado o questionário como um anexo chamado QUESTIONARIO\_DOADOR, QUESTIONARIO\_PACIENTE\_AMBULATORIAL e

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO, com autorização para iniciar a coleta de dados. Conforme as instruções do Sistema CEP/CONEP, ao término desta pesquisa, o pesquisador tem o dever e a responsabilidade de garantir uma devolutiva acessível e compreensível acerca dos resultados encontrados por meio da coleta de dados a todos os voluntários que participaram deste estudo, uma vez que esses indivíduos têm o direito de tomar conhecimento sobre a aplicabilidade e o desfecho da

**Endereço:** Rua Joaquim Nabuco, 171

**Bairro:** Graças

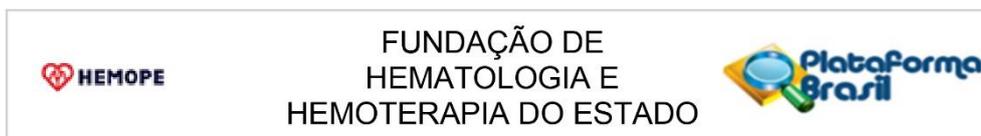
**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**CEP:** 52.011-000

**Telefone:** (81)3182-4771

**E-mail:** cep@hemope.pe.gov.br



Continuação do Parecer: 6.077.121

pesquisa da qual participaram. Informamos que a aprovação definitiva do projeto só será dada após o envio da NOTIFICAÇÃO COM O RELATÓRIO FINAL da pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2068881.pdf	11/05/2023 17:37:26		Aceito
Outros	carta_resposta_11_05_23.pdf	11/05/2023 17:37:03	RAPHAEL FERREIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_MAIORES_DE_18_ANOS_MODIFICADO.pdf	11/05/2023 17:36:43	RAPHAEL FERREIRA PIMENTEL	Aceito
Outros	QUESTIONARIO_DOADOR.pdf	11/05/2023 17:36:08	RAPHAEL FERREIRA	Aceito
Outros	QUESTIONARIO_PACIENTE_INTERNA DO.pdf	11/05/2023 17:35:42	RAPHAEL FERREIRA	Aceito
Outros	QUESTIONARIO_PACIENTE_AMBULATORIAL.pdf	11/05/2023 17:35:26	RAPHAEL FERREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DETALHADO_MODIFICADO_11_05_23.pdf	11/05/2023 17:34:22	RAPHAEL FERREIRA PIMENTEL	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Raphael.pdf	02/01/2023 13:13:56	RAPHAEL FERREIRA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 24 de Maio de 2023

Assinado por:  
**Maria Iraci Buarque Valença**  
 (Coordenador(a))

Endereço: Rua Joaquim Nabuco, 171  
 Bairro: Graças CEP: 52.011-000  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)3182-4771 E-mail: cep@hemope.pe.gov.br