

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LAURA MATTANA DIONÍSIO

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS E MARCADORES
RELACIONADOS À ANGIOGÊNESE NAS SÍNDROMES HIPERTENSIVAS
GESTACIONAIS

PONTA GROSSA
2022

LAURA MATTANA DIONÍSIO

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS E MARCADORES
RELACIONADOS À ANGIOGÊNESE NAS SÍNDROMES HIPERTENSIVAS
GESTACIONAIS

Tese apresentada para obtenção do título de
doutorado na Universidade Estadual de
Ponta Grossa, Área de Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino
Favero

PONTA GROSSA
2022

D592 Dionísio, Laura Mattana
Avaliação de parâmetros plaquetários e marcadores relacionados à
angiogênese nas síndromes hipertensivas gestacionais / Laura Mattana Dionísio.
Ponta Grossa, 2022.
110 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Fávero.

1. Hipertensão gestacional. 2. Índices plaquetários. 3. PIGF. 4. Pré-
eclâmpsia. 5. sFlt-1. I. Fávero, Giovani Marino. II. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615

**Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**
Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa

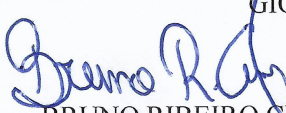
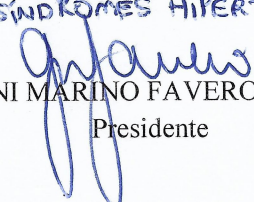
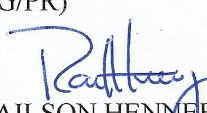
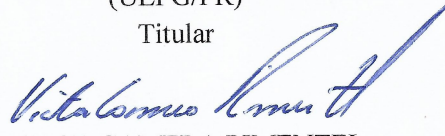
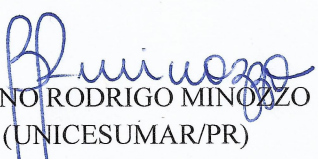
ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 06/2022 DA DOUTORANDA LAURA MATTANA DIONISIO, REALIZADA NO DIA 22 DE SETEMBRO DE 2022, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e dois dias do mês de setembro de dois mil e vinte e dois, às 09h, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão aberta, no Auditório do PPGCF, sala 115, Bloco M, sob a presidência do Professor Doutor Giovani Marino Favero, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda LAURA MATTANA DIONISIO, na linha de pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos, constituída pelo Professor Doutor GIOVANI MARINO FAVERO (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): BRUNO RIBEIRO CRUZ (UEPG/PR); RAILSON HENNEBERG (UFPR/PR); VICTOR CAMERA PIMENTEL (UEPG/PR); e BRUNO RODRIGO MINOZZO (UNICESUMAR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição. O título do trabalho foi: "AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS NAS SÍNDROMES HIPERTENSIVAS GESTACIONAIS". Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADA a Tese, considerada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da Tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário):

Alteração de título: ☒ não ☐

Novo título: "AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS E MARCADORES RELACIONADOS À ANGIOGÊNESE NAS SÍNDROMES HIPERTENSIVAS GESTACIONAIS"

 BRUNO RIBEIRO CRUZ (UEPG/PR) Titular	 GIOVANI MARINO FAVERO (UEPG/PR) Presidente	 RAILSON HENNEBERG (UFPR/PR) Titular
 VICTOR CAMERA PIMENTEL (UEPG/PR) Titular		 BRUNO RODRIGO MINOZZO (UNICESUMAR/PR) Titular

Ponta Grossa, 22 de setembro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e aos meus amigos, mesmo aqueles que estão distantes, pelo incentivo, por me apoiarem e acreditarem em mim.

Ao meu marido Giusepe, pela compreensão, por estar sempre comigo, por me motivar e por toda a ajuda, o que foi essencial para que eu concluísse este trabalho.

Ao professor Giovani Fávero, pela orientação, paciência e confiança no meu trabalho. Agradeço também por sempre me incentivar a melhorar e a aceitar novos desafios que foram muito importantes para a realização desta pesquisa e ao meu crescimento profissional.

À coordenação do laboratório do Hospital Universitário da UEPG que permitiu a realização desta pesquisa no setor, e aos colegas da equipe que me ajudaram na coleta de dados.

Ao Dr. Larry Frelinger, da Universidade de Harvard, por todos os ensinamentos sobre as plaquetas, por me incentivar a sempre buscar respostas para as minhas perguntas, e por ser um exemplo a ser seguido de cientista e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela concessão de bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior.

À *Roche Diagnostics International*, pelo fornecimento dos reagentes e à equipe da Roche Diagnóstica Brasil por todo o apoio prestado.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que a conclusão deste trabalho fosse possível.

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) e outras síndromes hipertensivas gestacionais (SHG) são responsáveis por uma fração substancial da morbidade e mortalidade materna e fetal. A PE é uma doença de etiologia complexa, que envolve disfunção endotelial e a ativação plaquetária. Os parâmetros plaquetários têm sido estudados em inúmeras condições patológicas com o auxílio de analisadores hematológicos de nova geração, os quais fornecem parâmetros calculados referentes às plaquetas. Há indícios que estes parâmetros apresentam associação com a prevalência de SHG, podendo se tornar importantes ferramentas no diagnóstico e manejo dessas pacientes. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o comportamento dos parâmetros plaquetários nas SHG. Foram incluídas no estudo amostras de 32 mulheres não grávidas e 268 gestantes, sendo 114 no grupo controle (C), 112 no grupo hipertensão gestacional (HG) e 42 no grupo pré-eclâmpsia (PE). Os parâmetros plaquetários de contagem de plaquetas por impedância e fluorescência (PLT-I e PLT-F, respectivamente), plaquetócrito (PCT), volume plaquetário médio (VPM), amplitude de distribuição das plaquetas (PDW), percentual de plaquetas grandes (P-LCR) e fração de plaquetas imaturas (IPF% e IPF#, porcentagem e contagem absoluta, respectivamente) foram obtidos no analisador hematológico *Sysmex XN-1000*. Os marcadores relacionados à angiogênese sFlt-1 e PlGF foram determinados por imunoenaios de eletroquimioluminescência, no analisador *Cobas e 411*. Os parâmetros PLT-I, PLT-F e PCT foram significativamente menores nas gestantes saudáveis, quando comparadas a mulheres não grávidas. Nas gestantes saudáveis, PLT-I e PLT-F foram significativamente menores no segundo e terceiro trimestre, em comparação ao primeiro. Na comparação entre os grupos, PLT-I, PLT-F, PCT foram menores nos grupos HG e PE em relação ao C. Já os parâmetros VPM, PDW, P-LCR e IPF foram significativamente maiores na PE e HG. Tais resultados são indicativos de aumento da ativação e do *turnover* plaquetário nas SHG. O marcador sFlt-1 apresentou-se aumentado na HG e PE, enquanto a relação sFlt-1/PlGF é maior em PE em relação à HG e ao controle, achados característicos da disfunção placentária na PE. Há uma moderada correlação positiva entre o sFlt-1 e os parâmetros plaquetários VPM, PDW e P-LCR. Os parâmetros plaquetários fornecem importante informação sobre a ativação e *turnover* plaquetário em pacientes com diagnóstico ou suspeita de SHG. Estes marcadores possuem potencial para serem aplicados como uma ferramenta adicional no manejo de pacientes com SHG.

Palavras-chave: hipertensão gestacional, índices plaquetários; PlGF; pré-eclâmpsia; sFlt-1.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) and other pregnancy hypertensive disorders (PHD) are responsible for a substantial fraction of maternal and neonatal deaths. The physiopathology of PE is complex and concerns endothelial dysfunction and platelet activation, which is considered a key element in the development of PE. Platelet indices have been studied in numerous diseases. These are provided by new generation hematology analyzers mostly without any additional cost. There is evidence of the association between platelet indices and the incidence of PHD, which could be helpful tools for the diagnosis and management of these patients. Thus, this study aimed to assess the behavior of platelet indices in the PHD. 32 healthy non-pregnant and 268 pregnant women were included in this study. 114 were in the control group (C), 112 were diagnosed with pregnancy hypertension (PH), and 42 with preeclampsia (PE). The parameters of impedance and fluorescence platelet counts (PLT-I and PLT-F, respectively), plateletcrit (PCT), mean platelet volume (MPV), platelet distribution width (PDW), platelet large cell ratio (P-LCR) and immature platelet fraction (IPF% and IPF#, percentage and absolute count respectively) were obtained with the hematology analyzer Sysmex XN-1000. The levels of the angiogenesis-related biomarkers sFlt-1 and PlGF were measured by electrochemiluminescence immunoassays in the *Cobas e 411* analyzer. In the comparison between groups PLT-I, PLT-F, PCT were lower for HG and PE than C, whereas VPM, PDW, P-LCR, IPF%, and IPF# were higher for PE and HG. These results indicate increased platelet activation and turnover. The sFlt-1 was increased in HG and PE, while the sFlt-1/PlGF was higher for PE in comparison with HG and C. These finds are characteristic of placental dysfunction in PE. There was a moderate positive correlation between sFlt-1 and the platelet indices VPM, PDW e P-LCR. Platelet indices provide useful information about the platelet activation and turnover in patients with suspect or diagnosis of PHD. These parameters can be used as additional tools for the management of patients with PHD.

Key-words: gestational hypertension, Platelet indices; preeclampsia; PlGF; sFlt-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Invasão deficiente das artérias uterinas na pré-eclâmpsia.....	23
Figura 2 – Gráfico de dispersão nos analisadores da série Sysmex-XN mostrando a diferença na intensidade de dispersão frontal (FSC) e fluorescência lateral SFL de plaquetas imaturas (IPF) e plaquetas maduras (PLT-F).	26
Figura 3 – Curva de distribuição de tamanho das plaquetas no analisador Sysmex XN-1000.....	27
Figura 4 – Papel do sFlt-1 e do PlGF no desenvolvimento da pré-eclâmpsia.....	28
Figura 5 – Analisador hematológico automatizado Sysmex XN-1000	35
Figura 6 – Analisador Cobas e 411.	37
Figura 7 – Distribuição dos parâmetros plaquetários PLT-I, PLT-F, VPM e PDW nas pacientes gestantes.....	45
Figura 8 – Distribuição dos parâmetros plaquetários PCT, P-LCR, IPF% e IPF# nas pacientes gestantes.	46
Figura 9 – Gráfico de Bland-Altman comparando as metodologias de contagem de plaquetas por impedância (PLT-I) e fluorescência (PLT-F) em pacientes gestantes (n=268).	47
Figura 10 – Curva de regressão de Passing-Bablok comparando as metodologias de contagem de plaquetas por impedância (PLT-I) e fluorescência (PLT-F) em pacientes gestantes (n=268).	49
Figura 11 – Níveis de sFlt-1, PlGF e relação sFlt-1/PlGF nos grupos controle (C), hipertensão gestacional (HG) e pré-eclâmpsia.....	50

Figura 12 – Análise de curva ROC para os marcadores relacionados à angiogênese sFlt-1, PlGF e relação sFlt-1/PlGF em pacientes com pré-eclâmpsia (PE) e controles (C). 51

Figura 13 – Análise de curva ROC para os parâmetros plaquetários para a distinção de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) e controles (C). 52

Figura 14 – Índices de correlação (r de Pearson) para os parâmetros plaquetários e marcadores relacionados à angiogênese em pacientes gestantes (n=268). 57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Fatores de risco para pré eclâmpsia.....	20
Quadro 2– Critérios Diagnósticos para PE segundo o Ministério da Saúde e o <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros plaquetários em gestantes saudáveis e mulheres não grávidas.....	41
Tabela 2 – Análise comparativa dos parâmetros plaquetários entre os trimestres gestacionais.....	42
Tabela 3 – Dados clínicos das pacientes gestantes.....	43
Tabela 4 – Parâmetros plaquetários em pacientes gestantes: Mediana e intervalo interquartil (IQR).....	44
Tabela 5 – Resultado da análise de Bland-Altman comparando as metodologias de contagem de plaquetas por impedância (PLT-I) e fluorescência (PLT-F) em pacientes gestantes (n=268).....	47
Tabela 6 - Análise de regressão de Passing-Bablok comparando as metodologias de contagem de plaquetas por impedância (PLT-I) e fluorescência (PLT-F) em pacientes gestantes (n=268).....	48
Tabela 7 – Níveis de sFlt-1, PlGF e relação sFlt-1/PlGF em gestantes nos grupos controle C, hipertensão gestacional (HG) e pré-eclâmpsia (PE).....	50
Tabela 8 – Resultados da análise de curva ROC dos parâmetros plaquetários, para a discriminação de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) e controles (C).....	51
Tabela 9 – Análise de Qui-quadrado de independência para associação entre as características clínicas e o tipo de SHG. (n=268)	52
Tabela 10 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre primigesta e o tipo de SHG. (n=268)	53
Tabela 11 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre primigesta e o tipo de SHG. (n=268)	53

Tabela 12 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre histórico de aborto e o tipo de SHG. (n=268)	54
Tabela 13 – Análise de Qui-quadrado de independência para associação entre parâmetros plaquetários acima dos valores de <i>cut-off</i> e a presença de PE. (n=267).....	54
Tabela 14 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre VPM >11,3 fL e o diagnóstico de PE. (n=267)	55
Tabela 15 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre PDW >14,4 fL e o diagnóstico de PE. (n=268)	55
Tabela 16 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre P-LCR > 35,8% e o diagnóstico de PE. (n=267).....	56
Tabela 17 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre IPF% > 7,8% e o diagnóstico de PE. (n=268)	56
Tabela 18 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre IPF# > $12,21 \times 10^3/\mu\text{L}$ e o diagnóstico de PE. (n=268)	56
Tabela 19 – Valores de R Pearson entre os marcadores sFlt-1, PlGF e sFlt-1/PlGF com os índices plaquetários em mulheres gestantes. (n=268)	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
AT1	Receptor de angiotensina II do tipo 1
AUC	<i>Area under the curve</i> ou área sob a curva
DCSF	Dwass-Steel-Critchlow-Fligner
DP	Desvio padrão
FEBRASGO	Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia
FSC	<i>Forward scattering</i> ou dispersão frontal
HG	Hipertensão gestacional
IC 95%	Intervalo de confiança a 95%
IG	Idade gestacional
IL-1 β	Interleucina-1 β
IM	Idade materna
IPF%	<i>Immature platelet fraction</i> , porcentagem
IPF#	<i>Immature platelet fraction</i> , contagem absoluta
IQR	Intervalo interquartil
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PCT	Plaquetócrito
PDW	<i>Platelet distribution width</i> ou amplitude de distribuição das plaquetas
PE	Pré-eclâmpsia
P-LCR	<i>Platelet large cell ratio</i> ou percentual de plaquetas grandes

PIGF	<i>Placental growth fator</i>
PLT-F	Contagem de plaquetas pela metodologia de fluorescência
PLT-I	Contagem de plaquetas por metodologia de impedância
PSGL-1	<i>P-selectin ligand 1</i>
ROC	<i>Receiver operator characteristic</i>
SFL	<i>Side fluorescence</i> ou fluorescência lateral
sFlt-1	<i>Soluble FMS-like tirosine kinase-1</i>
SHG	Síndromes hipertensivas gestacionais
VEGF	<i>Vascular endotelial growth factor</i>
VPM	Volume plaquetário médio
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 SÍNDROMES HIPERTENSIVAS GESTACIONAIS	18
2.2 EPIDEMIOLOGIA	19
2.3 FATORES DE RISCO PARA PE E HG	20
2.4 FISIOPATOLOGIA: PE E HG	21
2.5 PLAQUETAS E PE	24
2.6 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS	25
2.5 FATORES PRÓ E ANTI-ANGIOGÊNICOS	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 TIPO DE ESTUDO	31
4.2 PACIENTES	31
4.3 ÉTICA	33
4.4 DADOS CLÍNICOS	33
4.5 AMOSTRAS	34
4.6 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS	34
4.6.1 Equipamento <i>Sysmex</i> XN-1000	35
4.6.2 Reagentes para os parâmetros plaquetários	36
4.7 MARCADORES RELACIONADOS À ANGIOGÊNSE sFlt-1 e PlGF	36
4.8 APOIO FINANCEIRO	38
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5 RESULTADOS	41
5.1 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS: GESTANTES SAUDÁVEIS E MULHERES NÃO GRÁVIDAS	41

5.2 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS E OS TRIMESTRES GESTACIONAIS	42
5.3 DADOS GERAIS – GESTANTES	43
5.4 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS	43
5.5 CONCORDÂNCIA ENTRE AS METODOLOGIAS DE IMPEDÂNCIA (PLT-I) E FLUORESCÊNCIA (PLT-F).....	46
5.6 MARCADORES RELACIONADOS À ANGIOGÊNESE: sFlt-1 e PlGF	49
5.7 CURVAS ROC	50
5.8 ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS CATEGÓRICAS	52
5.8.1 Características clínicas e as SHG	52
5.8.2 Parâmetros plaquetários e PE	54
5.9 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS - PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS E MARCADORES RELACIONADOS À ANGIOGÊNESE	57
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO CEP-UEPG	80
ANEXO B – APOIO FINANCEIRO	84

1 INTRODUÇÃO

As Síndromes Hipertensivas gestacionais (SHG) são um grupo heterogêneo de doenças que compreende a hipertensão crônica, hipertensão gestacional sem proteinúria, pré-eclâmpsia/eclâmpsia e a pré-eclâmpsia (PE) sobreposta à hipertensão crônica (ACOG, 2019; BRASIL, 2012).

A PE e outras desordens hipertensivas da gestação são responsáveis por uma fração substancial da morbidade e mortalidade materna e fetal. Há importante associação entre estas condições clínicas e um maior risco de mortalidade materna e infantil, havendo relação com a severidade da PE (FOX *et al.*, 2019; JUSTYNA *et al.*, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a hipertensão gestacional é a segunda maior causa de morte em gestantes, o que corresponde a cerca de 14% das mortes maternas no mundo (SAMMOUR *et al.*, 2011; SAY *et al.*, 2014).

A PE é uma doença de etiologia complexa, que depende de vários fatores para sua instalação, dentre eles estão a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, o estresse oxidativo, a disfunção endotelial e a ativação plaquetária, a qual constitui um elemento chave na fisiopatologia da doença (BURTON; JAUNIAUX, 2011; KOHLI *et al.*, 2016; REDMAN; SACKS; SARGENT, 1999; REDMAN; SARGENT, 2003; TINNAKORN CHAIWORAPONGSA, PIYA CHAEMSAITHONG, LAMI YEO, 2014).

Durante a gestação, além de seus papéis na hemostasia, as plaquetas executam também funções não hemostáticas no remodelamento vascular materno. Este processo assegura a perfusão placentária adequada e a manutenção da gestação. Embora as plaquetas não sejam os únicos elementos que atuam na regulação do remodelamento vascular materno, anormalidades na função plaquetária durante essa etapa estão associadas com o desenvolvimento de doenças no período gestacional, como é o caso da PE. (MOSER *et al.*, 2019; SATO; FUJIWARA; KONISHI, 2010).

Sabe-se ainda que o aumento da ativação plaquetária em gestantes pode tanto causar como propagar processos patológicos em doenças relacionadas à placenta, como a PE (MOSER *et al.*, 2019).

Na última década, os parâmetros plaquetários têm sido estudados em inúmeras condições patológicas com o auxílio de analisadores hematológicos de nova geração. Estes equipamentos são capazes de fornecer uma série de índices calculados referentes às plaquetas, sendo a maioria deles sem custo ou consumo adicional de reagentes. Tais parâmetros

constituem possíveis ferramentas para avaliação de risco, diagnóstico, monitoramento e prognóstico de doenças (HE *et al.*, 2019; OMAR *et al.*, 2018; PYO; SOHN; KANG, 2016; VERDOIA *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020).

Em relação ao período gestacional, o comportamento dos índices plaquetários tem sido avaliado em diversas condições, como partos prematuros, diabetes gestacional, hemorragia pós-parto, PE e outras SHG, gestações ectópicas, restrição do crescimento intrauterino e abortos recorrentes (ARTUNC ULKUMEN *et al.*, 2014; ERIKÇI *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2020; METE URAL *et al.*, 2014; SHAHGHEIBI *et al.*, 2020; SITOTAW; ASRIE; MELKU, 2018; TESFAY *et al.*, 2019; ULKUMEN *et al.*, 2014).

Existem evidências de que os parâmetros plaquetários apresentam padrões distintos nas SHG quando comparados a gestações saudáveis, o que sugere seu potencial para aplicação na detecção, estratificação de risco e manejo das SHG. Os parâmetros de volume plaquetário médio (VPM), amplitude de distribuição das plaquetas (PDW) e plaquetócrito (PCT) são os mais pesquisados, enquanto o percentual de plaquetas grandes (P-LCR) e a fração de plaquetas imaturas (IPF) são abordados em menos estudos (BELLOS *et al.*, 2018; EVERETT *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2013; SHILPA GOPAL REDDY, 2019; TESFAY *et al.*, 2019; THALOR *et al.*, 2019; UMEZULUIKE *et al.*, 2021).

Os marcadores relacionados à angiogênese PlGF (*placental growth factor*) e o seu receptor solúvel sFlt-1 (*soluble FMS-like tyrosine kinase-1*) são fatores pró-angiogênico e antiangiogênico, respectivamente. Durante a gestação, ambas as moléculas são produzidas pela placenta e liberadas na circulação materna. Estas são essenciais para a manutenção da homeostasia do endotélio vascular. O sFlt-1 se liga ao PlGF e ao seu homólogo VEGF (*vascular endothelial growth factor*) reduzindo a sua biodisponibilidade aos receptores nas membranas celulares, inibindo assim, seus efeitos biológicos (KENDALL; THOMAS, 1993; LECARPENTIER *et al.*, 2016; LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016).

Um desequilíbrio entre fatores pró e antiangiogênicos está presente na PE, o qual é caracterizado por níveis aumentados de sFlt-1 e reduzidos de PlGF (KLEIN *et al.*, 2016; MAYNARD *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2006).

Ainda, na PE, plaquetas ativadas podem se ligar a monócitos, formando agregados plaqueta-monócito, os quais produzem sFlt-1, o que pode contribuir para a disfunção endotelial e inflamação sistêmica na doença. (MAJOR *et al.*, 2015).

Diante do exposto, e considerando o importante papel das plaquetas na fisiopatologia das SHG, principalmente da PE, e a crescente relevância dos índices plaquetários, o objetivo

deste estudo foi avaliar o comportamento dos parâmetros plaquetários nas SHG (PE e HG), correlacionando-os a marcadores relacionados à angiogênese.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SÍNDROMES HIPERTENSIVAS GESTACIONAIS

As SHG classificadas em cinco subtipos, sendo elas: a hipertensão crônica, hipertensão gestacional (HG), PE/eclampsia e a PE sobreposta à hipertensão crônica (ACOG, 2019; BRASIL. Ministério da Saúde, 2012).

A PE e outras desordens hipertensivas da gestação são responsáveis por uma fração substancial da morbidade e mortalidade materna e fetal. Há importante associação entre estas condições clínicas e um maior risco de mortalidade materna e infantil (FOX *et al.*, 2019; JUSTYNA *et al.*, 2017; SUTTON; HARPER; TITA, 2018).

Segundo a OMS, a hipertensão gestacional é a segunda maior causa de morte em gestantes, o que corresponde a cerca de 14% das mortes maternas no mundo (SAMMOUR *et al.*, 2011).

A hipertensão crônica é definida como hipertensão diagnosticada antes das 20 semanas de gestação, caracterizada por pressão arterial sistólica (PAS) maior que 140 mmHg, ou pressão arterial diastólica (PAD) maior que 90 mmHg, ou ambas, em pelo menos duas medições com um intervalo de 04 horas entre elas (ACOG, 2019; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2012; SUTTON; HARPER; TITA, 2018).

A hipertensão gestacional é definida como a hipertensão ($PAS \geq 140$ mmHg e/ou $PAD \geq 90$ mmHg) que se instala após a 20ª semana de gestação, sem proteinúria ou outros sinais de PE. (ACOG, 2019; SUTTON; HARPER; TITA, 2018) As mulheres que apresentam hipertensão gestacional possuem alto risco de evolução para PE, que pode chegar a 50%, e estão sujeitas ao risco de todas as complicações obstétricas associadas à essa condição (FOLK, 2018; SUTTON; HARPER; TITA, 2018).

A PE é definida como a hipertensão ($PAS \geq 140$ mmHg e/ou $PAD \geq 90$ mmHg) que se instala após a 20ª semana de gestação, associada à proteinúria (≥ 300 mg/24h, ou relação ureia/creatinina $\geq 0,3$ ou $> 1+$ em tira reativa se o método quantitativo não estiver disponível) e/ou sinais de comprometimento de órgãos, como: sintomas do sistema nervoso central (dor de cabeça e/ou alterações visuais), edema pulmonar, trombocitopenia ou prejuízo da função renal ou hepática (ACOG, 2019; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2012; FOLK, 2018; SUTTON; HARPER; TITA, 2018).

A eclampsia é definida como o aparecimento de convulsões generalizadas em mulher com qualquer quadro hipertensivo, não causadas por epilepsia ou qualquer outra doença convulsiva. Pode ocorrer durante a gestação, no parto e no puerpério imediato. A eclampsia

constitui um importante causa de morte materna, principalmente em regiões onde os recursos de saúde são escassos (ACOG, 2019; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2012; MALIK; KUMAR, 2017).

A síndrome de HELLP é o quadro clínico caracterizado por hemólise (H = “*hemolysis*”), elevação de enzimas hepáticas (EL = “*elevated liver functions tests*”) e plaquetopenia (LP = “*low platelets count*”) e é considerada como um agravamento do quadro de PE. A síndrome de HELLP tem sido associada com elevadas taxas de morbidade e mortalidade materna (ACOG, 2019; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2012; SUTTON; HARPER; TITA, 2018).

A PE sobreposta à hipertensão crônica é caracterizada como o desenvolvimento de PE em mulheres com hipertensão crônica pré-existente. É a SHG com maior risco de desfechos desfavoráveis (ACOG, 2013; SUTTON; HARPER; TITA, 2018).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

As SHG afetam 5 a 10% das gestações no mundo, sendo que a incidência de PE é estimada em 2 a 5%. (DRÖGE *et al.*, 2021; FOLK, 2018).

Em uma revisão sistemática publicada em 2013, considerando aproximadamente 39 milhões de mulheres em 40 países estimou a incidência global da PE em 4,6% e a da eclampsia em 1,4% (ABALOS *et al.*, 2013).

Estima-se que a incidência das SHG aumentou de 16,3 milhões para 18,1 milhões globalmente, com um aumento total de 10,9% entre 1990 e 2019, sendo que somente no ano de 2019, o número de mortes atribuído à essas doenças foi de aproximadamente 27.830 (WANG *et al.*, 2021).

A prevalência das síndromes hipertensivas durante o período gestacional é variável entre as diversas regiões do mundo, possivelmente devido a fatores genéticos, ambientais, sociais e de estilos de vida entre diferentes grupos étnicos e países. Com relação à América Latina, a prevalência da PE varia entre 1,8 a 7,7% (UMESAWA; KOBASHI, 2017).

No Brasil, estima-se que 10,5% das mortes maternas sejam atribuídas à PE, sendo que nas regiões Sudeste e Nordeste a incidência é maior, seguida do Norte, Centro-Oeste e Sul (GOMES *et al.*, 2020).

Segundo a Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO), a PE constitui a principal causa de parto prematuro eletivo no país (FEBRASGO, 2017).

2.3 FATORES DE RISCO PARA PE E HG

Diversas circunstâncias são atribuídas como fatores de risco para PE. Os principais fatores de risco para PE estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Fatores de risco para pré eclâmpsia

• Idade materna >35 anos	• Hipertensão crônica
• Histórico familiar de PE	• Doença renal crônica
• PE em gestação prévia	
• Histórico de trombofilia	• Lúpus eritematoso sistêmico
• Fertilização <i>in vitro</i>	• Obesidade
• Primigesta	• Diabetes gestacional
• Diabetes mellitus 1 ou 2	• Apneia do sono obstrutiva
• Gestação múltipla (mais de um feto)	

Fonte: (ACOG, 2013; BARTSCH *et al.*, 2016; DUCKITT; HARRINGTON, 2005; FOLK, 2018)

Uma mulher tem o risco de desenvolver PE aumentado em duas a quatro vezes se algum parente em primeiro grau teve a doença. O risco de PE aumenta sete vezes se esta já ocorreu em uma gestação anterior (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).

Estima-se que 25 a 50% das mulheres com HG irão desenvolver PE. (SIBAI; STELLA, 2009) e existe uma maior chance de evolução para PE quando a HG se instala antes das 32 semanas de gestação. Segundo o *American College of Obstetricians and Gynecologists*, a incidência de PE sobreposta à hipertensão crônica varia de 13 a 40% (ACOG, 2013).

São apontados como os fatores de risco mais significantes para o desenvolvimento de PE o histórico dessa doença em gestações anteriores e a presença de anticorpos antifosfolípidos (ACOG, 2020; DUCKITT; HARRINGTON, 2005).

Os fatores de risco para HG aparentam ser em geral os mesmos descritos para PE, embora algumas diferenças sejam apontadas. Índice de massa corpórea >24 e idade superior a 34 anos, diabetes mellitus gestacional são descritos como fatores de risco compartilhados

entre HG e PE, enquanto que resultados controversos são relatados para nuliparidade e doença renal (LI *et al.*, 2016; ROS; CNATTINGIUS; LIPWORTH, 1998; SHIOZAKI *et al.*, 2013).

Acredita-se que os fatores de risco em comum entre as duas doenças se dão pelo fato que estas compartilham em parte seus mecanismos fisiopatológicos, enquanto que as diferenças observadas são atribuídas a fatores específicos de cada doença, embora a fisiopatologia destas não esteja completamente elucidada (LEWANDOWSKA *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2016; SHEN *et al.*, 2017).

2.4 FISIOPATOLOGIA: PE E HG

Acredita-se que HG e a PE sejam processos patológicos distintos, embora os mecanismos fisiopatológicos presentes em cada uma não estejam totalmente esclarecidos. No entanto, na HG, aparentam atuar os mesmos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipertensão em indivíduos não gestantes, uma vez que a hipertensão gestacional aumenta o risco do desenvolvimento de hipertensão após o período da gestação (VEST; CHO, 2014).

As mudanças hormonais que ocorrem na gestação levam a adaptações fisiológicas do sistema cardiovascular, em que ocorre vasodilatação e aumento do volume plasmático, o que pode resultar em anemia fisiológica por diluição. Como compensação para estes dois fatores, a frequência cardíaca aumenta, e somada à expansão de volume, resulta em aumento do débito cardíaco. Tal adaptação é necessária para assegurar a pressão sanguínea suficiente para a adequada perfusão de placenta e para os tecidos da gestante (BRAUNTHAL; BRATEANU, 2019).

Embora essas adaptações hemodinâmicas estejam presentes em todas as gestações saudáveis, diferentes tipos de alterações cardiovasculares são observados na HG e na PE. Enquanto na HG a hipertensão arterial está associada à disfunção hemodinâmica central, na PE é observada uma disfunção hemodinâmica venosa associada à hipertensão e outras características clínicas que definem a doença. Tais diferenças são outro indicativo da presença de mecanismos fisiopatológicos distintos atuam na HG e na PE (GYSELAERS *et al.*, 2015).

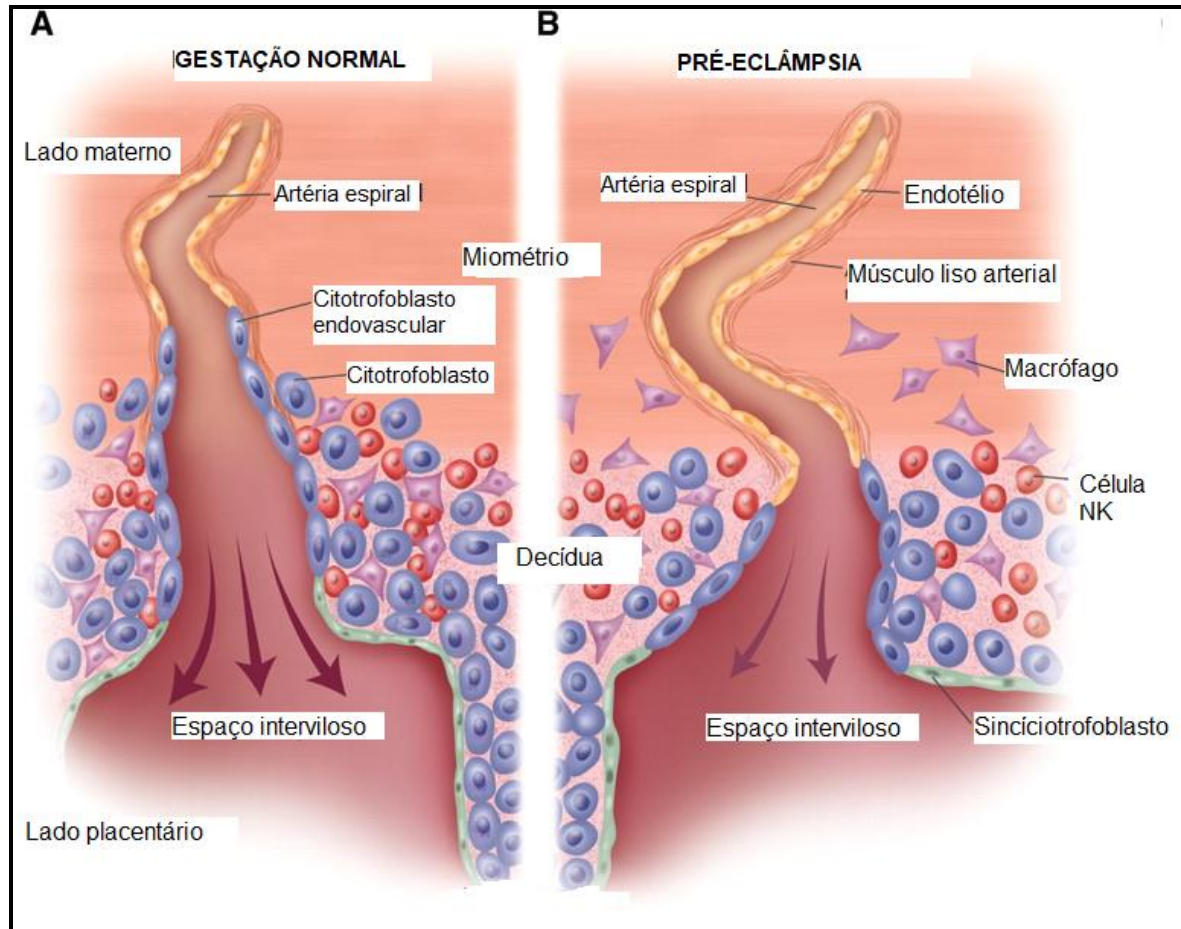
Ainda, com relação aos aspectos hemodinâmicos, gestações saudáveis caracterizam-se por uma reduzida resposta vascular à angiotensina II, enquanto que na PE existe um aumento da sensibilidade à angiotensina II. Uma parcela das mulheres diagnosticadas com PE pode apresentar níveis detectáveis de anticorpos contra o receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1), os quais são capazes de ativar tais receptores, presentes em células endoteliais, mesangiais e da musculatura lisa. A presença de tais anticorpos está associada com

hipertensão, proteinúria, ativação da coagulação e antiangiogênese (DECHEND *et al.*, 2005; TINNAKORN CHAIWORAPONGSA, PIYA CHAEMSAITHONG, LAMI YEO, 2014; WALLUKAT *et al.*, 1999; XIA *et al.*, 2007).

A PE é uma patologia de etiologia complexa e sabe-se que a presença da placenta, mas não do feto é necessária para que esta ocorra. A placenta, que sofre isquemia nesta condição, libera fatores solúveis na circulação materna, os quais medeiam pelas manifestações clínicas da doença (TINNAKORN CHAIWORAPONGSA, PIYA CHAEMSAITHONG, LAMI YEO, 2014).

No desenvolvimento placentário normal, os citotrofoblastos de origem fetal invadem as artérias espirais maternas, transformando artérias de resistência e pequeno calibre em vasos de grande calibre, os quais permitem a perfusão placentária adequada ao desenvolvimento do feto. Na PE este processo de invasão vascular ocorre de forma deficiente e as artérias espirais mantêm seu pequeno calibre, o que resulta em isquemia placentária (Figura 1) (KARUMANCHI *et al.*, 2005; REDMAN; SARGENT, 2005).

Figura 1 – Invasão deficiente das artérias uterinas na pré-eclâmpsia



Fonte: Adaptado de REDMAN; SARGENT, 2005.

Nota: (A) Desenvolvimento normal da placenta, com invasão das artérias espirais uterinas pelos trofoblastos. (B) Desenvolvimento anormal da placenta, com invasão deficiente das artérias uterinas na pré-eclâmpsia.

O estresse oxidativo é um fator importante na fisiopatologia da PE, uma vez que induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Acredita-se que a causa para tal estresse seja a hipóxia resultante da conversão deficiente das artérias espirais em vasos de maior calibre (BURTON; JAUNIAUX, 2011; REDMAN; SARGENT, 2003; SAN JUAN-REYES *et al.*, 2020).

Apesar de existirem evidências de que gestações normais constituem por si só um estado de ativação inflamatória, sabe-se que a magnitude deste fenômeno é consideravelmente aumentada em mulheres com PE. Os mecanismos responsáveis pela inflamação intravascular na PE envolvem a liberação de micropartículas pelo sincício trofoblasto, além de citocinas pró inflamatórias e quimiocinas (MURTHI *et al.*, 2020; REDMAN; SACKS; SARGENT, 1999; REDMAN; SARGENT, 2003).

A disfunção endotelial é outro fenômeno que apresenta papel chave no contexto da patogenia da PE, o qual se apresenta como um fenômeno posterior à inflamação intravascular.

A proteinúria, importante fator diagnóstico para a PE, constitui um bom exemplo de disfunção endotelial, uma vez que pode ser considerada manifestação do dano provocado ao endotélio glomerular (ROBERTS *et al.*, 1989; TINNAKORN CHAIWORAPONGSA, PIYA CHAEMSAITHONG, LAMI YEO, 2014).

2.5 PLAQUETAS E PE

As plaquetas executam um papel chave na fisiopatologia da PE, sendo que a ativação plaquetária, fenômeno já evidenciado nesta condição, ocorre previamente à instalação da doença. Durante o processo de desenvolvimento da PE, vesículas extracelulares patogênicas derivadas de células endoteliais induzem o acúmulo de plaquetas maternas ativadas nos leitos vasculares placentários, as quais são capazes de provocar a ativação do inflamassoma via sinalização purinérgica e o desenvolvimento de um estado inflamatório nas células trofoblásticas (KOHLI *et al.*, 2016; LOK *et al.*, 2007; MACEY *et al.*, 2010).

Ainda, vesículas extracelulares derivadas de plaquetas e células endoteliais são capazes de induzir um fenótipo PE-*like* em estudos *in vivo* com camundongos. Nesse estudo, quando diferentes agentes são usados para inibir a função plaquetária, como aspirina, e anticorpos anti-GPIb α , o desenvolvimento das características de PE após a injeção de VE não ocorre, o que torna evidente a participação das plaquetas no desenvolvimento do estado pró-inflamatório que ocorre nesta patologia (KOHLI *et al.*, 2016).

A ativação plaquetária é um fenômeno evidente e bem caracterizado na PE, sendo demonstrado pelo aumento da expressão da P-selectina (CD62P) na superfície das plaquetas, e também por um maior número micropartículas derivadas de plaquetas contendo de P-selectina (HOLTHE *et al.*, 2004a, 2005; MACEY *et al.*, 2010). Plaquetas ativadas podem interagir com leucócitos na circulação por meio da ligação da P-selectina exposta em sua superfície aos ligantes PSGL-1 (*P-selectin ligand 1*) nos leucócitos, levando à ativação dessas células, e exposição de fator tecidual de superfície e de CD11b/CD18, o qual se liga ao fator Xa, contribuindo para o estado pró-coagulante e de ativação plaquetária observado na PE (BARNARD *et al.*, 2005).

Neste contexto, já foi demonstrado por Macey *et al.* (2010), que em comparação a gestantes normotensas, pacientes com PE apresentam maior número de agregados de monócitos-plaquetas em sua circulação.

Plaquetas ativadas são uma importante fonte de mediadores inflamatórios na circulação do espaço intervilloso da placenta, podendo alterar a secreção hormonal pelas

células trofoblásticas e levar à disfunção placentária, característica de PE (FORSTNER; GUETTLER; GAUSTER, 2021).

Existem diferentes mecanismos envolvidos na ativação plaquetária na interface materno-fetal na PE. Entre eles, estão a adesão das plaquetas ao endotélio lesionado e/ou disfuncional, deposição de fibrina, interação das plaquetas com o colágeno exposto na matriz extracelular, e subsequente geração de trombina, potente ativador plaquetário, e a liberação de outros agonistas como ADP e serotonina dos grânulos plaquetários, ativando por sua vez outras plaquetas (FORSTNER; GUETTLER; GAUSTER, 2021; KAZMI; COOPER; LWALEED, 2011).

As plaquetas contribuem ainda para um processo de autoperpetuação da PE. Plaquetas ativadas acumulam-se nos vasos sanguíneos placentários e induzem a liberação do mediador inflamatório interleucina-1 β (IL-1 β) pelas células trofoblásticas, que por sua vez, é capaz de estimular as plaquetas, as quais expressam receptores para IL-1 β , resultando na manutenção do processo inflamatório (BROWN *et al.*, 2021; KOHLI *et al.*, 2016).

2.6 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS

Os parâmetros ou índices plaquetários podem ser obtidos facilmente a partir de analisadores hematológicos automatizados de diversos fabricantes.

O parâmetro PLT-I corresponde à contagem de plaquetas por metodologia de impedância (D'SOUZA; BRIGGS; MACHIN, 2015; SYSMEX CORPORATION, 2014). O princípio da impedância para contagem de células baseia-se na detecção e medida de alterações na resistência elétrica produzida por células que atravessam uma pequena abertura (RODAK *et al.*, 2019).

Nos analisadores da linha Sysmex (ex.: séries XE e XN) a contagem de plaquetas é baseada na impedância com foco hidrodinâmico. Um gráfico de distribuição de tamanho das plaquetas é produzido utilizando três limites (*thresholds*). Um limite é fixo em 12fL enquanto que os outros irão se mover para alcançar os limites inferior e superior da população de plaquetas. O limite inferior para o tamanho das plaquetas se move entre 2 e 6fL e o superior entre 12 e 30 fL. O propósito de tais limites é tentar distinguir plaquetas de pequenas hemácias, fragmentos de hemácias ou debris no limite inferior (MICHELSON *et al.*, 2019).

O PLT-F corresponde à contagem de plaquetas pela metodologia de fluorescência, realizada em canal óptico exclusivo para a contagem de plaquetas. Neste canal, as plaquetas são coradas com um reagente contendo oxazina, capaz de corar componentes específicos

plaquetários, como mitocôndrias, RNA mensageiro citosólico, o que confere a esta metodologia elevada especificidade para plaquetas. Nos analisadores da linha *Sysmex-XN*, este mesmo canal permite o cálculo da fração de plaquetas imaturas (IPF), que corresponde às plaquetas com maior dispersão frontal ou *forward scattering* (FSC) e maior fluorescência lateral ou *side fluorescence* (SFL) no gráfico FSC x SFL, conforme apresentado na Figura 2.

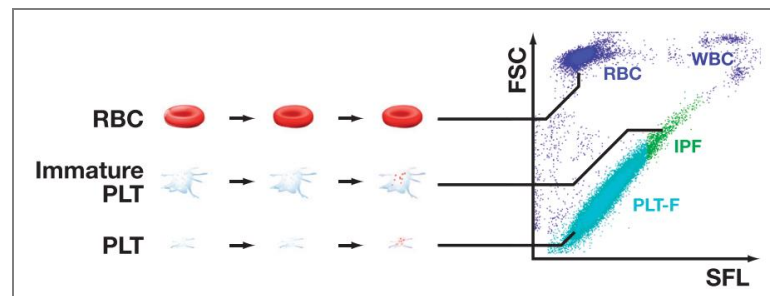
O parâmetro IPF pode ser expresso em porcentagem (IPF%) ou contagem absoluta (IPF#) (D'SOUZA; BRIGGS; MACHIN, 2015; SCHOORL *et al.*, 2013; WADA *et al.*, 2015).

O parâmetro IPF% é obtido a partir da fórmula abaixo, sendo que as regiões de IPF e PLT-F são exemplificadas na Figura 2.

$$IPF\% = \frac{\text{Contagem de partículas na região de IPF}}{\text{Contagem de partículas na região de PLT - F}} \times 100$$

Fonte: SYSMEX CORPORATION, 2014.

Figura 2 – Gráfico de dispersão nos analisadores da série *Sysmex-XN* mostrando a diferença na intensidade de dispersão frontal (FSC) e fluorescência lateral SFL de plaquetas imaturas (IPF) e plaquetas maduras (PLT-F).



Fonte: SCHOORL *et al.*, 2013.

Nota: PLT-F e IPF são distinguidos claramente das hemácias (RBC) e dos leucócitos (WBC).

O volume plaquetário médio (VPM) é derivado da curva de distribuição de plaquetas, e nos analisadores *Sysmex* é calculado pela seguinte fórmula:

$$VPM(fL) = \frac{PCT (\%)}{PLT (\times 10^3)/\mu L} \times 10000$$

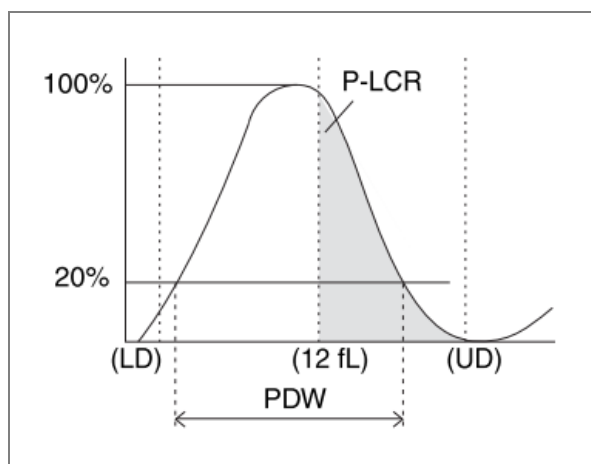
Fonte: SYSMEX CORPORATION, 2014.

O parâmetro PDW, do inglês “*platelet distribution width*”, corresponde à amplitude de distribuição das plaquetas, e é expresso em fentolitros (fL). Tal índice é obtido pela média da dispersão dos sinais durante a contagem das plaquetas por impedância (ALI *et al.*, 2019; D'SOUZA; BRIGGS; MACHIN, 2015; VAGDATLI *et al.*, 2010).

O plaquetócrito (PCT) é o equivalente ao hematócrito, para as plaquetas. Corresponde ao volume ocupado por plaquetas e é relatado em porcentagem (ALI *et al.*, 2019; CHANDRASHEKAR, 2013). Nos analisadores da linha Sysmex é obtido a partir da frequência de plaquetas durante a contagem por impedância (SYSMEX CORPORATION, 2014).

O parâmetro P-LCR (*platelet large cell ratio*) representa o percentual de plaquetas maiores do que 12 fL, também é derivado da curva de distribuição do tamanho das plaquetas (Figura 3) e está relacionado à atividade plaquetária. (ALI *et al.*, 2019)

Figura 3 – Curva de distribuição de tamanho das plaquetas no analisador Sysmex XN-1000.



Fonte: SYSMEX CORPORATION, 2014.

2.5 FATORES PRÓ E ANTI-ANGIOGÊNICOS

O fator de crescimento placentário PlGF (*placental growth factor*) e o seu receptor solúvel sFlt (*soluble FMS-like tyrosine kinase-1*) são respectivamente fatores pró e anti-angiogênicos. Durante a gestação, essas duas moléculas são liberadas na circulação materna pela placenta (LECARPENTIER *et al.*, 2016).

O PlGF é uma glicoproteína do fator de crescimento endotelial vascular, o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) sintetizada em vários tecidos, como coração, cérebro, músculo esquelético e plaquetas, mas principalmente pela placenta durante a gestação. Sua concentração aumenta progressivamente durante esse período, sendo de cerca de 20 pg/mL no primeiro trimestre, e atingindo um máximo de 500 pg/mL por volta da trigésima semana (LECARPENTIER *et al.*, 2016; VERLOHREN *et al.*, 2014).

Com relação ao seu papel fisiológico, o PlGF executa um papel no desenvolvimento e na manutenção da vascularização em diversos tecidos, atuando na migração, proliferação e sobrevivência celular. (DEWERCHIN; CARMELIET, 2012).

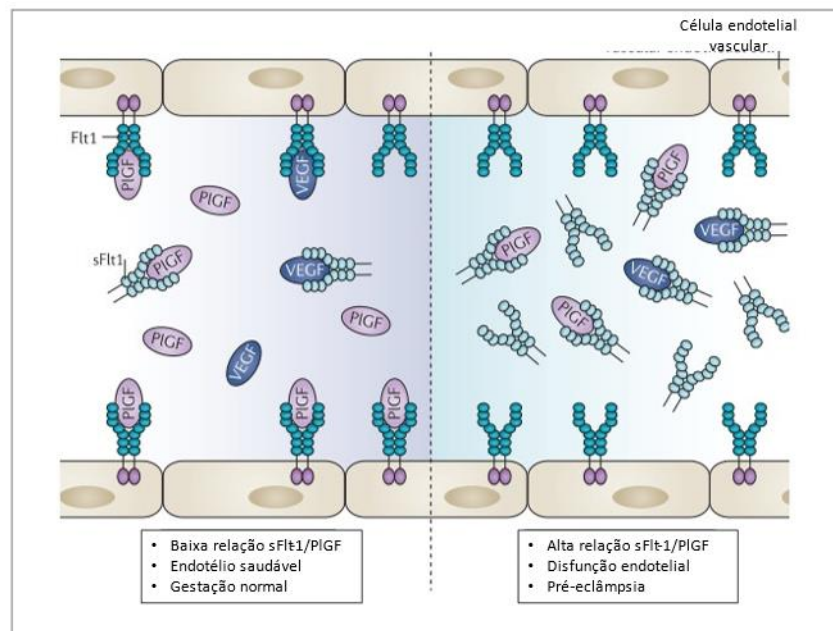
A atividade pró-angiogênica do PlGF é mediada por sua ligação ao receptor de membrana do tipo 1 do VEGF, o VEGFR-1, também chamado de Flt-1 (*FMS-like tyrosine kinase 1*) (LECARPENTIER *et al.*, 2016).

O sFlt-1 é uma forma solúvel do receptor de membrana Flt-1, e pode se ligar tanto ao VEGF como ao PlGF sem induzir sinal intracelular, atuando como um inibidor para essas duas moléculas (KENDALL; THOMAS, 1993).

O sFlt-1 é liberado por células endoteliais vasculares e também por células circulantes, incluindo monócitos e plaquetas. Além disso, é liberado pelo tecido trofoblástico placentário na circulação materna durante a gestação, em concentrações crescentes de 500 pg/mL durante o primeiro trimestre até 2000 pg/mL no terceiro (VERLOHREN *et al.*, 2014).

Um desequilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos (Figura 4) tem sido observado em pacientes com PE, o qual é caracterizado pelo aumento dos níveis de sFlt-1 e redução dos níveis de PlGF (KLEIN *et al.*, 2016; MAYNARD *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2006).

Figura 4 – Papel do sFlt-1 e do PlGF no desenvolvimento da pré-eclâmpsia.



Fonte: Adaptado de BENZING, 2016.

Sabe-se ainda que plaquetas ativadas de mulheres com PE são capazes de ligar-se a monócitos, gerando agregados de plaquetas e monócitos, os quais produzem sFlt-1, contribuindo para a disfunção endotelial e resposta inflamatória na PE (MAJOR *et al.*, 2015).

A razão sFlt-1/PlGF reflete o equilíbrio angiogênico na PE, a qual se apresenta aumentada nesta condição, e está relacionado com a severidade da doença (KLEIN *et al.*, 2016; LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o comportamento dos parâmetros plaquetários e sua relação a marcadores relacionados à angiogênese nas síndromes hipertensivas gestacionais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os valores dos parâmetros plaquetários entre gestantes saudáveis e mulheres não grávidas.
- Avaliar o comportamento dos parâmetros plaquetários entre os três trimestres em gestantes saudáveis.
- Determinar os valores dos parâmetros PLT-I, PLT-F, PCT, VPM, PDW, P-LCR, IPF# e IPF% em pacientes diagnosticadas com HG e PE, avaliando o impacto dessas doenças nos valores dos parâmetros plaquetários, em comparação com gestantes saudáveis.
- Avaliar a concordância entre as metodologias de contagem de plaquetas por impedância (PLT-I) e fluorescência (PLT-F) em pacientes gestantes.
- Avaliar os níveis dos marcadores relacionados à angiogênese sFlt-1 e PlGF em gestantes saudáveis e com SHG.
- Realizar análise de curvas ROC (*receiver operator characteristic*) para os parâmetros estudados para a detecção de pré-eclâmpsia.
- Avaliar a associação entre características clínicas das gestantes (idade superior a 35 anos, primigesta, histórico de aborto) com o diagnóstico de HG e PE.
- Avaliar a associação entre alterações nos parâmetros plaquetários com o diagnóstico de PE.
- Verificar a associação entre os parâmetros plaquetários e os níveis de sFlt-1, PlGF e relação sFlt-1/PlGF.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

A presente pesquisa foi um estudo observacional analítico transversal.

4.2 PACIENTES

Foram incluídas neste estudo pacientes do sexo feminino, incluindo mulheres não gestantes em idade fértil e gestantes, atendidas no do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Ponta Grossa, nos setores de Ambulatório, Pronto Atendimento Obstétrico e Clínica Obstétrica.

O período da coleta foi de março de 2019 a junho de 2021.

As mulheres gestantes foram divididas nos grupos controle (C), hipertensão gestacional (HG) e pré-eclâmpsia (PE).

Os critérios de exclusão para as pacientes gestantes foram: ocorrência de febre na semana anterior à coleta de sangue, doenças crônicas (exceto hipertensão), ocorrência de sangramentos no início da gestação, uso de antibióticos, uso de anticoagulantes, doenças infecciosas, tabagismo, alcoolismo, gestações gemelares, gestações ectópicas, gestações com más formações embrionárias.

As amostras de mulheres não gestantes incluídas no estudo foram obtidas a partir de consultas médicas para exame admissional para a equipe de colaboradores do Hospital Universitário. A coleta de sangue para realização de hemograma fazia parte da conduta médica para todos os exames admissionais. Foram incluídas mulheres entre 18 e 49 anos. Os critérios de exclusão foram: doenças agudas ou crônicas, gravidez, histórico de alcoolismo, tabagismo, uso de qualquer medicamento que possa afetar o número ou a função plaquetária.

Os critérios usados para o diagnóstico das SHG nas pacientes envolvidas neste estudo baseiam-se nas definições do Ministério da Saúde em seu manual técnico para gestações de alto risco, e do *American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)*, conforme descrito no Quadro 2 (ACOG, 2019; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2012).

Quadro 2– Critérios Diagnósticos para PE segundo o Ministério da Saúde e o *American College of Obstetricians and Gynecologists*.

Hipertensão: PAS $\geq$ 140 mmHg e/ou PAD $\geq$ 90 mmHg, e
Proteinúria $\geq$ 300mg/24h, ou relação ureia/creatinina $\geq$ 0.3, ou > 1+ em tira reativa (somente se o método quantitativo não estiver disponível)
Na ausência de proteinúria: Trombocitopenia: contagem de plaquetas $\leq$ $100 \times 10^9/L$, ou Insuficiência renal: creatinina sérica $\geq$ 1,1 mg/dL ou dobrar a concentração sérica de creatinina na ausência de outra doença renal, ou Prejuízo da função hepática: elevação nos níveis séricos das transaminases hepáticas para o dobro da concentração normal, ou Edema pulmonar, Dor de cabeça não responsiva à medicação e não associada a diagnósticos alternativos Sintomas visuais

Fonte: (ACOG, 2019; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2012).

Nota: PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica.

A HG foi definida como hipertensão (PAS $\geq$ 140 mmHg e/ou PAD $\geq$ 90 mmHg) que se desenvolve após as 20 semanas de gestação, sem proteinúria ou outros sinais de PE.

As informações referentes ao diagnóstico das pacientes incluídas no estudo foram obtidas por meio de acesso aos prontuários eletrônicos.

O presente estudo não ofereceu risco às pacientes envolvidas, uma vez que os resultados dos parâmetros plaquetários são fornecidos automaticamente durante a realização dos hemogramas pelo analisador hematológico automatizado. A coleta dos dados ficou restrita às pacientes que tiverem solicitação médica para realização do hemograma, ou análises bioquímicas em amostras de soro. Assim, não foram realizadas coletas de sangue adicionais com exclusivo fim de realização da pesquisa.

4.3 ÉTICA

A presente pesquisa foi desenvolvida em concordância com a Declaração de Helsinki e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob o número 3.591.154. A cópia do parecer consubstanciado está apresentada no ANEXO I.

4.4 DADOS CLÍNICOS

Nos prontuários no sistema GSUS (<http://www.gsus.saude.pr.gov.br>) foram coletados dados clínicos das pacientes como idade materna (IM), idade gestacional (IG), número de gestações prévias, histórico de aborto, diagnósticos e uso de medicamentos.

Os dados de diagnósticos foram usados para a classificação das pacientes nos grupos e para verificar a presença de doenças presentes nos critérios de exclusão.

A informação referente ao uso de medicamentos foi utilizada para estabelecer se havia o uso de antibióticos, anticoagulantes ou qualquer outro medicamento que poderia afetar a função plaquetária.

Drogas associadas à trombocitopenia incluem: heparina, quinina, quinidina, sulfonamidas, rifampicina, penicilina, vancomicina, sais de ouro, procainamida, ácido valpróico, carbamazepina, cloritiazida, abciximabe, tirofibana e eptifibatide (MICHELSON *et al.*, 2019).

Drogas que afetam a função das plaquetas incluem: aspirina e outros anti-inflamatórios não esteroidais (ex.: naproxeno, ibuprofeno), antagonistas dos receptores de ADP (ex.: clopidogrel, prasugrel, ticagrelor), antagonistas de GPIIb/IIIa (abciximabe, tirofibana, eptifibatide), anticoagulantes orais diretos (rivaroxabana, apixabana, edoxabana), agentes antimicrobianos (penicilinas, cefalosporinas, nitrofurantoína, hidroxicloroquina, miconazol), drogas que agem no sistema cardiovascular (propranolol, nitroprussiato, nitroglicerina, furosemida, bloqueadores dos canais de cálcio) e psicotrópicos (antidepressivos tricíclicos, fenotiazinas, inibidores seletivos da recaptação de serotonina) (MICHELSON *et al.*, 2019).

4.5 AMOSTRAS

Para a determinação dos parâmetros plaquetários, foram utilizadas amostras de 2 a 4 mL de sangue venoso, em tubos contendo o anticoagulante EDTA-K₂ (BD Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Após a coleta, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente e analisadas em até duas horas, visando minimizar a interferência do EDTA sobre os parâmetros plaquetários (HARRISON; GOODALL, 2016).

Para a medida dos parâmetros sorológicos sFIt-1 e PlGF, foram utilizadas amostras de soro, obtidas por punção venosa, com volume aproximado de 5 mL, coletadas em tubos contendo gel separador. As amostras foram centrifugadas à 3.200 rpm por 10 minutos para a obtenção de soro, transferidas para tubos de polipropileno com capacidade de 1,5 mL e congeladas à -20°C até o momento das análises.

4.6 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS

Para a obtenção dos parâmetros plaquetários, as amostras foram submetidas à análise completa para hemograma com contagem de plaquetas fluorescente (CBC+DIFF+PLF-F) pelo analisador hematológico automatizado *Sysmex XN-1000* (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

Os parâmetros analisados foram:

- Contagem de plaquetas por metodologia de impedância: PLT-I, expresso em contagem absoluta por microlitro de sangue ($\times 10^3/\mu\text{L}$);
- Contagem de plaquetas metodologia de fluorescência: PLT-F, expresso em contagem absoluta por microlitro de sangue ($\times 10^3/\mu\text{L}$);
- Volume plaquetário médio: VPM, expresso em fL;
- Amplitude de distribuição das plaquetas: PDW, expresso em fL;
- Plaquetócrito: PCT, expresso em porcentagem;
- Percentual de plaquetas grandes (volume maior que 12fL): P-LCR, expresso em porcentagem;
- Fração de plaquetas imaturas: percentual (IPF%) e contagem absoluta por microlitro de sangue ($\times 10^3/\mu\text{L}$) (IPF#).

Foram utilizados diariamente três níveis (baixo, normal e alto) de controle de qualidade interno *XN CHECK* (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) durante todo o período das

análises. Todos os resultados obtidos se apresentaram dentro dos intervalos especificados pelo fabricante.

As amostras cujos resultados obtidos ao final da análise pelo equipamento *Sysmex* XN-1000 apresentaram o alerta (*'flag'*) indicando a presença de possíveis agregados plaquetários (*'platelet clumps'*?) ou o sinal de asterisco (*) ao lado do resultado de qualquer um dos parâmetros plaquetários, indicando a presença de interferentes, foram excluídas do presente estudo.

4.6.1 Equipamento *Sysmex* XN-1000

O equipamento *Sysmex* XN-1000 (Figura 5) é um analisador hematológico automatizado de nova geração, com capacidade de analisar até 100 amostras por hora.

O sistema permite a identificação e contagem de células (hemácias, leucócitos, plaquetas e outras células) presentes em amostras de sangue total e de líquidos biológicos. De acordo com as instruções para uso do equipamento, o volume de sangue total aspirado por amostra é de 88 μ L (SYSMEX CORPORATION, 2014).

O sistema elétrico do instrumento contém uma unidade de controle de válvulas e um sistema hidráulico, responsável pelo controle do fluxo de amostras, reagentes e descarte de resíduos no equipamento.

Os sinais recebidos em cada detector no equipamento são convertidos em sinais digitais, que são então submetidos a um processamento aritmético para a obtenção dos parâmetros estudados.

Figura 5 – Analisador hematológico automatizado *Sysmex* XN-1000



Fonte: *Sysmex Corporation*, 2022.

4.6.2 Reagentes para os parâmetros plaquetários

Os reagentes utilizados para a determinação dos parâmetros plaquetários compreendem aqueles utilizados para a contagem de plaquetas pelas metodologias de impedância e fluorescência.

O reagente *CELLPACK DCL* (Sysmex America, Lincolnshire, IL, United States) é um diluente para sangue total utilizado em analisadores hematológicos da linha Sysmex. É utilizado para determinação do tamanho (volume) das hemácias e plaquetas por focalização hidrodinâmica. Com o uso de tal reagente são determinados os parâmetros PLT-I, PCT, VPM, PDW e P-LCR.

Os reagentes *CELLPACK DFL* e *Fluorocell PLT* (Sysmex America, Lincolnshire, IL, United States) são utilizados de forma combinada para a análise de plaquetas pelo método de citometria de fluxo utilizando um laser semiconductor. Tais reagentes, combinados, permitem a determinação dos parâmetros PLT-F, IPF% e IPF#, conforme descrito na seção “2.4 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS”.

4.7 MARCADORES RELACIONADOS À ANGIOGÊNSE sFlt-1 e PlGF

Os parâmetros sFlt-1 e PlGF foram determinados por imunoensaios de eletroquimioluminescência, *Elecsys sFlt-1* e *Elecsys PlGF* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) no analisador *Cobas e 411* (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland).

O equipamento *Cobas e 411* (Figura 6) é um analisador automatizado multicanal para ensaios imunológicos pela tecnologia de eletroquimioluminescência.

A eletroquimioluminescência envolve a geração de espécies na superfície de eletrodos, as quais sofrerão reações de transferência de elétrons para formar estados excitados capaz de emitir luz, que será mensurada por um detector. (RICHTER, 2004)

Figura 6 – Analisador Cobas e 411.



Fonte: Roche Diagnostics, 2022.

No analisador *Cobas e 411* os testes para determinação de sFlt-1 e PlGF ocorrem de maneira semelhante, em um imunoensaio do tipo sanduíche, conforme as etapas descritas abaixo:

1. Primeira incubação: 20 μ L e 50 μ L de amostras de soro, para sFlt-1 e PlGF, respectivamente, são incubados com anticorpos monoclonais específicos marcados com um complexo de rutênio (Tris(2,2'-bipiridil) rutênio (II)-complexo ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) para cada um dos marcadores, para formar complexos do tipo sanduíche;
2. Segunda incubação: Após a adição de micropartículas recobertas com estreptavidina, os complexos começam a se ligar à fase sólida do ensaio via interação entre biotina e estreptavidina.
3. A mistura de reação é então aspirada para o interior da célula de medição, onde as micropartículas são magneticamente capturadas no interior de um eletrodo. Substâncias não ligadas são removidas por uma etapa de lavagem. A aplicação de uma voltagem ao eletrodo induz a emissão de quimioluminescência, a qual é medida por um fotomultiplicador.
4. Os resultados são determinados via uma curva de calibração específica do instrumento, gerada por uma calibração de 2 pontos e uma curva mestre fornecida por código de barras para cada reagente (ROCHE DIAGNOSTICS, 2022a, 2022b).

O controle de qualidade dos ensaios para sFlt-1 e PlGF foi realizado simultaneamente às análises das amostras, com o uso de dois níveis do controle *Precicontrol Multimarker* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Todos os resultados obtidos se apresentaram dentro dos intervalos especificados pelo fabricante.

A relação sFlt-1/PlGF foi obtida por cálculo, pela divisão do resultado da do sFlt-1 pelo PlGF.

4.8 APOIO FINANCEIRO

Todos os reagentes utilizados para a determinação de parâmetros plaquetários e sorológicos foram fornecidos pela *Roche Diagnostics International Ltd*, mediante aprovação de patrocínio (ANEXO II) para o estudo intitulado “*Platelet parameters in pregnancy hypertensive disorders*”, em 11 de fevereiro de 2021.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Foi concedida bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (Edital de abertura 19/2020), com duração de 06 meses, para a realização de estágio de treinamento sobre testes de função plaquetária e doenças relacionadas às plaquetas no *Center for Platelet Research Studies*, da Universidade de Harvard/*Boston Children's Hospital*.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo amostral foi realizado com base na contagem de plaquetas e PDW (desfechos primários) considerando as gestantes com diferentes condições clínicas, sendo divididas nos grupos C, HG e PE. O cálculo amostral foi realizado a partir de dados obtidos da análise preliminar de 45 gestantes do mesmo universo amostral, sendo $n=15/\text{grupo}$. Desta forma, a contagem de plaquetas apresentou um desvio padrão comum de 38,51, com um tamanho de efeito calculado em 0,28.

Assim, considerando um modelo paramétrico bicaudal (ANOVA de um fator), com um poder de 95% em um nível de significância de 5%, o tamanho amostral total deveria ser de no mínimo de 195 voluntários. Já para o parâmetro PDW para o mesmo nível de significância e poder de teste, foi obtido um desvio padrão comum de 1,62 com um tamanho de efeito calculado em 0,24, desta forma, o tamanho amostral deveria ser no mínimo de 270 indivíduos.

Com intuito de evitar o impacto de eventuais perdas amostrais durante a pesquisa, estabeleceu-se que o número final seria de 300 voluntários. Em uma distribuição balanceada 1:1:1; a amostra deveria ser de $n=100$ por grupo de observação.

Os cálculos para o tamanho amostral foram realizados com o auxílio do programa *G*Power version 3.1.9.2 sample-size calculating software* (<http://www.gpower.hhu.de>).

A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro Wilk, análise dos índices de curtose, assimetria e histogramas.

Como os dados avaliados apresentaram distribuição não normal, os resultados para as variáveis contínuas foram apresentados utilizando a mediana como medida de tendência central e o intervalo interquartil (IQR) como medida de dispersão. O IQR foi representado como: 1º quartil – 3º quartil.

A significância das diferenças entre os grupos foi avaliada pelos testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DCSF) *pairwise comparisons*.

O teste de Qui-quadrado foi utilizado para avaliar a diferença de proporção nas variáveis categóricas (dados clínicos das pacientes gestantes) entre os grupos do estudo.

A análise de regressão de Passing-Bablok foi realizada para avaliar a correlação entre os métodos de contagem de plaquetas por impedância e fluorescência. O teste de Pearson foi usado para obter o coeficiente de correlação. Na regressão de Passing-Bablok o *intercept* corresponde à medida da diferença sistemática entre os dois métodos. Se o intervalo de confiança de 95% não inclui 0, pode-se afirmar que existe diferença sistemática entre os dois métodos avaliados. O *slope* é a medida da diferença na proporção entre os dois métodos. Se o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para o *slope* não contém 1, conclui-se que existe pelo menos uma diferença proporcional entre os dois métodos avaliados (BILIĆ-ZULLE, 2011).

Quando o coeficiente de correlação $r \leq 0,35$ existe um fraco grau de correlação, já quando r está entre 0,36 e 0,67 o grau de correlação é moderado, e r entre 0,68 e 1,0, alto grau de correlação (WANG *et al.*, 2019).

A concordância entre os dois métodos foi avaliada pela análise de Bland-Altman. Os gráficos de Bland-Altman são coordenadas cartesianas de duas dimensões, onde o eixo X representa a média dos resultados dos dois métodos, e o eixo Y representa a porcentagem de diferença entre os dois métodos e o valor médio da amostra. As linhas superior e inferior do gráfico indicam os limites de consistência de 95% (+1,96 desvio padrão (DP) e -1,96 DP, respectivamente).

Foi realizada uma análise de curva ROC (*receiver operator characteristic*) para calcular a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) e área sob a curva ou *area under the curve* (AUC) para os parâmetros estudados para o diagnóstico de PE. Os valores de corte (*cut-off*) foram estabelecidos com

base no maior índice de *Youden* e considerando as consequências de falsos-negativos e falsos-positivos.

Para avaliar a relação entre as características clínicas das gestantes (idade superior a 35 anos, primigesta e histórico de aborto) e o diagnóstico de HG e PE, e entre as alterações nos parâmetros plaquetários e a presença de PE, foi utilizado o teste de Qui-quadrado de independência, após verificação dos pressupostos (observações independentes, contagem de cada célula superior a 5). Como alterações nos parâmetros plaquetários foram considerados os resultados que se apresentaram acima dos valores de *cut-off* obtidos nas análises de curvas ROC para os parâmetros cuja AUC foi significativa: VPM >11,3 fL, PDW >14,4 fL, P-LCR >35,8%, IPF% > 7,8% e IPF# > $12,21 \times 10^3/\mu\text{L}$.

O teste de correlação de Pearson foi utilizado para investigar a correlação entre as variáveis contínuas (correlação entre os parâmetros plaquetários e os marcadores relacionados à angiogênese sFlt-1, PlGF e relação sFlt-1/PlGF).

O nível de significância estabelecido foi de 5%.

Os programas utilizados para a análise estatística foram *Jamovi* (2.2.5) e *MedCalc*® *Statistical Software version 20.104* e o software *GraphPad Prism 9* foi utilizado para a elaboração dos gráficos.

5 RESULTADOS

5.1 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS: GESTANTES SAUDÁVEIS E MULHERES NÃO GRÁVIDAS

Para a determinação dos parâmetros plaquetários para gestantes saudáveis e mulheres não grávidas, foram consideradas 107 pacientes, sendo 75 gestantes e 32 não gestantes. Para o grupo de gestantes, 16 estavam no primeiro trimestre de gestação, 28 no segundo e 31 no terceiro. As pacientes do segundo e terceiro trimestre foram provenientes do grupo C.

As medianas e IQR de idade foram de 24 anos (20 – 24,5) para as mulheres não grávidas, e de 22 anos (21 – 26) para as gestantes saudáveis. Não houve diferença significativa entre as idades dos grupos ($p = 0,050$)

As contagens de plaquetas (PLT-I e PLT-F) e o parâmetro PCT foram significativamente menores nas gestantes saudáveis, quando comparadas a mulheres não grávidas. Não houve diferença significativa entre os dois grupos para os demais parâmetros plaquetários.

As medianas e IQR obtidos para os parâmetros plaquetários estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros plaquetários em gestantes saudáveis e mulheres não grávidas.

Parâmetro	Mediana (IQR)		p^*
	Gestante (n = 75)	Não gestante (n = 32)	
PLT-I ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	235 (192 – 266)	266 (242 – 292)	0,001
PLT-F ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	235 (188 – 264)	263 (233 – 295)	0,002
VPM (fL)	10,1 (9,8 – 10,6)	9,95 (9,5 – 10,6)	0,322
PDW (fL)	11,5 (10,4 – 12,6)	11,1 (10,3 – 12,6)	0,581
PCT (%)	0,24 (0,21 – 0,26)	0,26 (0,24 – 0,30)	0,004
P-LCR (%)	25,9 (20 – 24,5)	26 (21 – 26)	0,397
IPF%	3,6 (2,6 – 4,6)	3 (2,1 – 4)	0,184

IQR, Intervalo interquartil. PLT-I, contagem de plaquetas por impedância; PLT-F, contagem de plaquetas por fluorescência; VPM, volume plaquetário médio; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas; PCT, plaquetócrito; P-LCR, percentual de plaquetas grandes; IPF%, fração de plaquetas imaturas. *Teste de Mann-Whitney. U.

5.2 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS E OS TRIMESTRES GESTACIONAIS

Os resultados da comparação dos parâmetros plaquetários entre os trimestres da gestação (gestantes saudáveis) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise comparativa dos parâmetros plaquetários entre os trimestres gestacionais.

	Trimestre	Mediana	IQR	<i>p</i> *
PLT-I ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1	267 ^b	71	0,013
	2	216 ^a	63	
	3	227 ^a	67	
PLT-F ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1	262 ^b	70	0,027
	2	225 ^a	71	
	3	231 ^a	64,8	
PCT (%)	1	0,26	0,04	0,105
	2	0,24	0,06	
	3	0,24	0,06	
VPM (fL)	1	9,8	1	0,051
	2	10,2	0,8	
	3	10,3	1,1	
PDW (fL)	1	10,8	2,2	0,168
	2	11,5	1,9	
	3	11,7	2,1	
P-LCR (%)	1	22,8	10,4	0,069
	2	27,5	6,3	
	3	26,1	9,3	
IPF%	1	3,6	2,9	0,967
	2	3,6	2,4	
	3	3,5	2,6	

IQR, Intervalo interquartil. PLT-I, contagem de plaquetas por impedância; PLT-F, contagem de plaquetas por fluorescência; VPM, volume plaquetário médio; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas; PCT, plaquetócrito; P-LCR, percentual de plaquetas grandes; IPF%, fração de plaquetas imaturas. *Teste de Kruskal-Wallis com DCSF pairwise comparisons. Letras diferentes sobrescritas nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos.

Os resultados de PLT-I e PLT-F foram significativamente menores no segundo e terceiro trimestre, em comparação ao primeiro ($p= 0,013$ e $p= 0,027$, respectivamente). Para os demais parâmetros, não houve diferença significativa entre os trimestres.

5.3 DADOS GERAIS – GESTANTES

Foram incluídas no estudo um total de 268 pacientes gestantes, distribuídas nos grupos C, HG e PE. Os dados clínicos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Dados clínicos das pacientes gestantes.

	C	HG	PE	<i>p</i>	<i>Shapiro-Wilk p</i>
n	114	112	42	-	-
Idade (anos) mediana (IQR)	22 (20 – 27)	25 (20,8 – 9,3)	24 (22 – 30)	0,007**	< 0,01
Número de gestações mediana (IQR)	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	1,5 (1 – 2)	0,77**	< 0,01
Idade gestacional (semanas) mediana (IQR)	31 (21 – 35)	38 (35 – 39)	36,5 (34 – 39)	< 0,001**	< 0,01
Primigestas n (%)	49 (43)	21 (18,8)	21 (50)	< 0,001*	< 0,01
Caucasianas n (%)	99 (87)	79 (88)	36 (86)	0,950*	-

* Teste de Qui-quadrado; **Teste de Kruskal-Wallis com DCSF *pairwise comparisons*. C, controle; HG, hipertensão gestacional; PE, pré-eclâmpsia. IQR, intervalo interquartil (25% e 75%).

5.4 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS

Os resultados dos parâmetros plaquetários e as comparações entre os grupos estão apresentados na Tabela 4 e Figuras 7 e 8.

Os parâmetros PLT-I, PLT-F e PCT foram significativamente menores no grupo PE, em comparação aos grupos HG e C.

Os índices VPM, PDW, P-LCR e IPF% foram significativamente maiores no grupo PE, seguido pelo grupo HG e C.

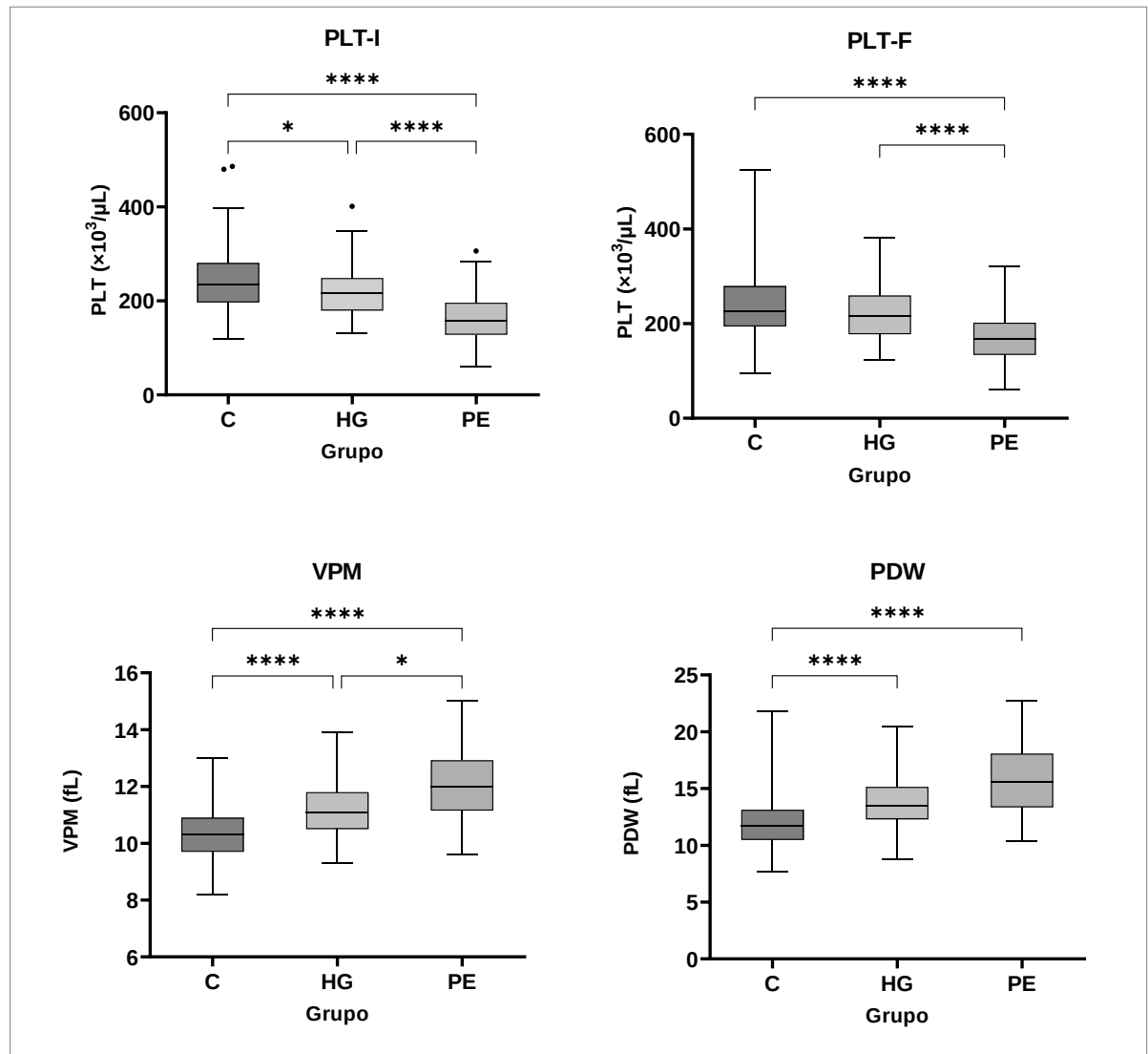
O parâmetro IPF# foi significativamente maior em PE.

Tabela 4 – Parâmetros plaquetários em pacientes gestantes: Mediana e intervalo interquartil (IQR).

	C	HG	PE	p*
PLT-I ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	233 (195 – 271) ^c	219 (182 – 248) ^b	156 (130 – 193) ^a	< 0,001
PLT-F ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	223 (195 – 265) ^b	220 (180 – 259) ^b	165 (135 – 199) ^a	< 0,001
VPM (fL)	10,4 (9,9 – 10,9) ^a	11,1 (10,5 – 11,8) ^b	12 (11,2 – 12,9) ^c	< 0,001
PDW (fL)	12,2 (10,6 – 13,2) ^a	13,8 (12,3 – 15) ^b	15,3 (13,5 – 17,8) ^b	< 0,001
PCT (%)	0,23 (0,2 – 0,27) ^b	0,24 (0,21 – 0,27) ^b	0,20 (0,17 – 0,23) ^a	< 0,001
P-LCR (%)	28,8 (23,6 – 33,6) ^a	33,6 (28,9 – 39) ^b	38,9 (33 – 44,9) ^c	< 0,001
IPF%	3,9 (2,4 – 4,9) ^a	6,6 (3,9 – 9,5) ^b	11 (5,8 – 15,2) ^c	< 0,001
IPF# ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	8,93 (5,5 – 11,8) ^a	13,8 (9,5 – 18) ^b	15,7 (11 – 26,1) ^b	< 0,001

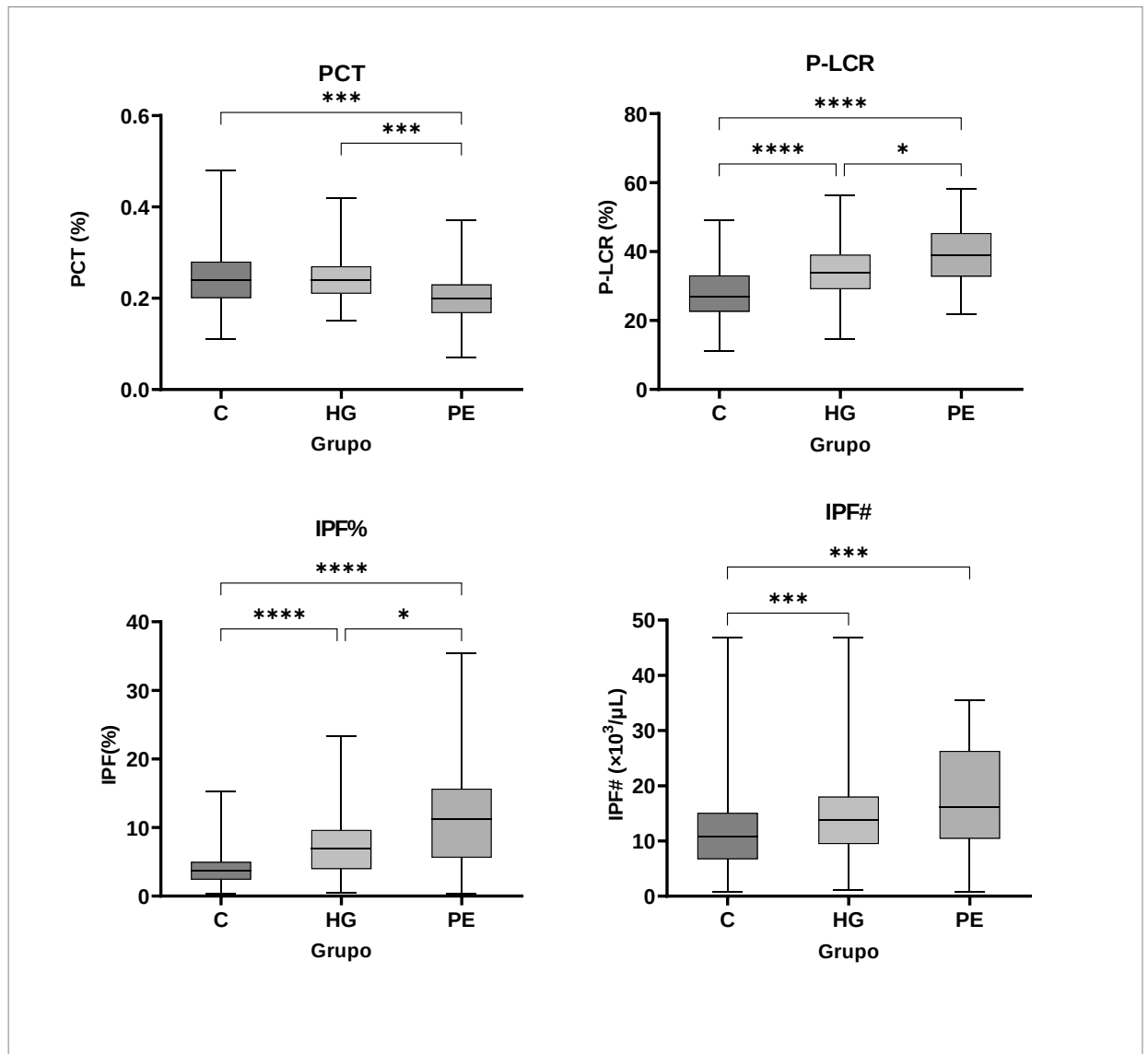
C, Controle: n= 114; HG, Hipertensão gestacional: n=114; PE, pré-eclâmpsia: n=42. PLT-I, contagem de plaquetas por impedância; PLT-F, contagem de plaquetas por fluorescência; VPM, volume plaquetário médio; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas; PCT, plaquetócrito; P-LCR, percentual de plaquetas grandes; IPF, fração de plaquetas imaturas, percentual (%) e contagem absoluta (#). *Teste de Kruskal-Wallis com *DCSF pairwise comparisons*. Letras diferentes (a,b e c) sobrescritas nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos.

Figura 7 – Distribuição dos parâmetros plaquetários PLT-I, PLT-F, VPM e PDW nas pacientes gestantes.



PLT-I, contagem de plaquetas por impedância; PLT-F, contagem de plaquetas por fluorescência; VPM, volume plaquetário médio; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas. Grupos controle (C), hipertensão gestacional (HG) e pré-eclâmpsia (PE). Teste de Kruskal-Wallis com *DCSF pairwise comparisons*. *p < 0,05; **** p < 0,0001.

Figura 8 – Distribuição dos parâmetros plaquetários PCT, P-LCR, IPF% e IPF# nas pacientes gestantes.



PCT, plaquetócrito; P-LCR, percentual de plaquetas grandes; IPF, fração de plaquetas imaturas, percentual (%) e contagem absoluta (#). Teste de Kruskal-Wallis com *DCSF pairwise comparisons*. * $p < 0,5$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

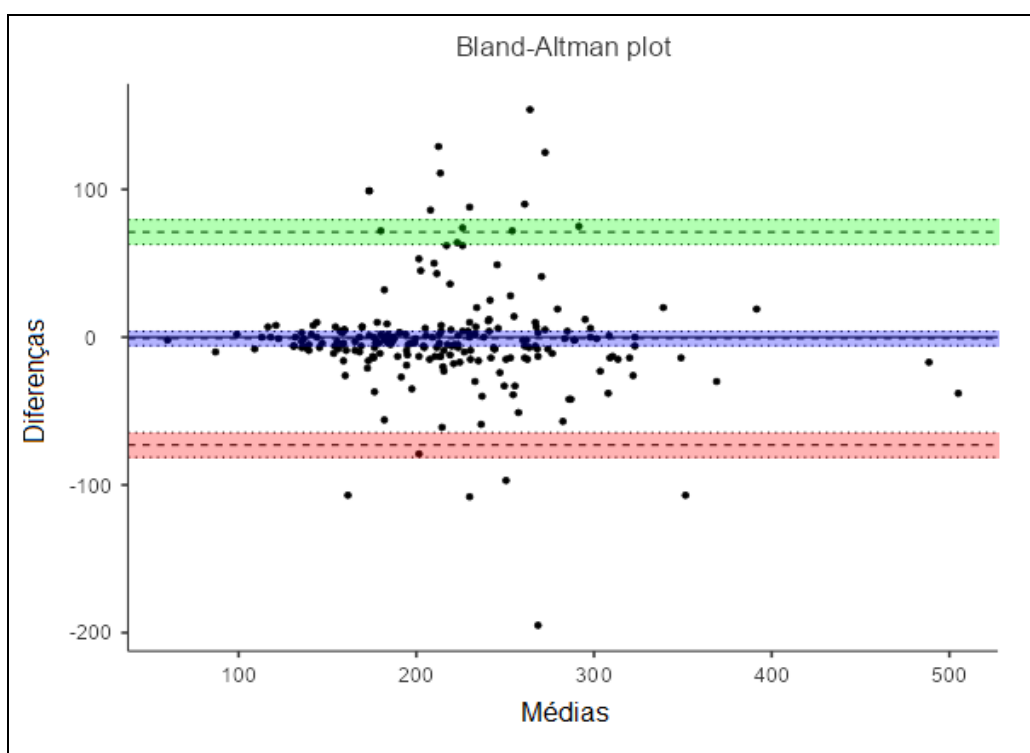
5.5 CONCORDÂNCIA ENTRE AS METODOLOGIAS DE IMPEDÂNCIA (PLT-I) E FLUORESCÊNCIA (PLT-F)

Os resultados da análise de Bland-Altman de concordância entre as metodologias de contagem de plaquetas por impedância (PLT-I) e fluorescência (PLT-F) em pacientes gestantes estão apresentados na Tabela 5 e Figura 9.

Tabela 5 – Resultado da análise de Bland-Altman comparando as metodologias de contagem de plaquetas por impedância (PLT-I) e fluorescência (PLT-F) em pacientes gestantes (n=268).

	Intervalo de confiança a 95%		
	Média	Inferior	Superior
Viés	-0,905	-5,77	3,96
Limite inferior de concordância	-72,955	-81,28	-64,63
Limite superior de concordância	71,144	62,82	79,47

Figura 9 – Gráfico de Bland-Altman comparando as metodologias de contagem de plaquetas por impedância (PLT-I) e fluorescência (PLT-F) em pacientes gestantes (n=268).



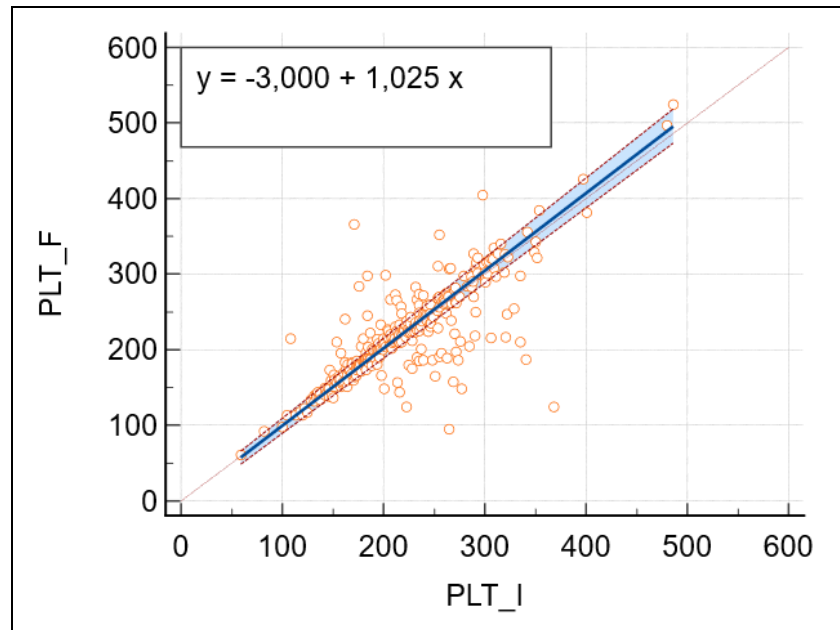
Nota: As linhas pontilhadas representam os limites de 95% concordância. O eixo y representa as diferenças entre os valores e o eixo x as médias dos valores. As linhas pontilhadas superior e inferior indicam os limites de consistência de 95% (+1,96 DP e -1,96 DP, respectivamente). Para o teste t para as diferenças entre as metodologias o valor de p obtido foi de 0,797. As diferenças e médias são expressas em contagens absolutas ($\times 10^3/\mu\text{L}$).

Para a análise de regressão de Passing-Bablok, as equações de regressão estão apresentadas na Tabela 6, e a curva de regressão na Figura 10.

Tabela 6 - Análise de regressão de Passing-Bablok comparando as metodologias de contagem de plaquetas por impedância (PLT-I) e fluorescência (PLT-F) em pacientes gestantes (n=268).

	PLT-I	PLT-F
Mínimo	59	61
Máximo	486	524
Média	223	222
Mediana	218	215
Desvio-padrão	62,28	64,84
Erro padrão da média	3,61	3,76
Equação de regressão $y = -3,000000 + 1,025424 x$		
Diferenças sistemáticas		
<i>Intercept A</i>		-3,0000
95% IC		-10,0400 a 3,3352
Diferenças proporcionais		
<i>Slope B</i>		1,0254
95% IC		0,9945 a 1,0600
Diferenças aleatórias		
Desvio-padrão residual (RSD)		28,2558
Intervalo ± 1.96 RSD		-55,3813 a 55,3813
Validação de modelo linear		
Teste de Cusum para linearidade	Sem desvio significativo da linearidade (P= 0,76)	

Figura 10 – Curva de regressão de Passing-Bablok comparando as metodologias de contagem de plaquetas por impedância (PLT-I) e fluorescência (PLT-F) em pacientes gestantes (n=268).



PLT-I, contagem de plaquetas por impedância; PLT-F, contagem de plaquetas por fluorescência. Ambas as contagens são expressas em $\times 10^3/\mu\text{L}$.

Os resultados indicam uma correlação linear entre os resultados das contagens de plaquetas pelos métodos de impedância e fluorescência. O IC 95% para o *intercept* da equação de regressão inclui 0, portanto, não há erro sistemático entre os dois métodos. O IC 95% para o *slope* contém 1, e, portanto, não há diferença proporcional entre os dois métodos. O valor de *r* de Pearson é 0,837 (IC 95%: 0,792 – 0,872, $p < 0,001$) indicando alto grau de correlação entre os métodos.

5.6 MARCADORES RELACIONADOS À ANGIOGÊNESE: sFlt-1 e PlGF

A Tabela 7 e a Figura 11 apresentam os resultados das comparações entre os grupos para os parâmetros sFlt-1, PlGF e relação sFlt-1/PlGF.

O parâmetro sFlt-1 apresentou-se significativamente maior nos grupos HG e PE em relação ao C, enquanto que o PlGF foi significativamente menor no grupo PE, em relação aos grupos C e HG.

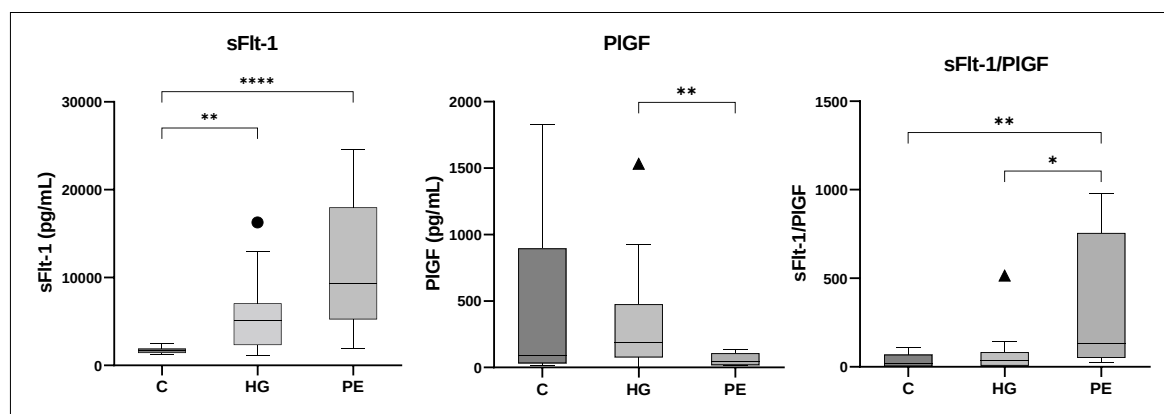
A relação sFlt-1/PlGF foi significativamente maior no grupo PE em relação aos demais grupos.

Tabela 7 – Níveis de sFlt-1, PlGF e relação sFlt-1/PlGF em gestantes nos grupos controle C, hipertensão gestacional (HG) e pré-eclâmpsia (PE).

	C	HG	PE	<i>p</i>
sFlt-1 (pg/mL)	1706 (1500 – 1797) ^a	4417 (2273 – 6464) ^b	10915 (4039 – 17112) ^b	0,010
PlGF (pg/mL)	484 (31,3 – 656) ^b	314 (81,4 – 416) ^b	57,5 (19,6 – 92,9) ^a	0,002
sFlt-1/PlGF	36,5 (2,5 – 54,6) ^a	57,5 (5,4 – 69,7) ^a	339 (62,8 – 631) ^b	0,003

Resultados expressos em mediana (IQR). sFlt-1, *soluble vascular endothelial growth factor receptor-1*; PlGF, *placental growth factor*. Teste de Kruskal-Wallis com *DCSF pairwise comparisons*. Letras diferentes sobrescritas nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos.

Figura 11 – Níveis de sFlt-1, PlGF e relação sFlt-1/PlGF nos grupos controle (C), hipertensão gestacional (HG) e pré-eclâmpsia.



sFlt-1, *soluble vascular endothelial growth factor receptor-1*; PlGF, *placental growth factor*. Teste de Kruskal-Wallis com *DCSF pairwise comparisons*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. Os símbolos ● e ▲ indicam a presença de outliers.

5.7 CURVAS ROC

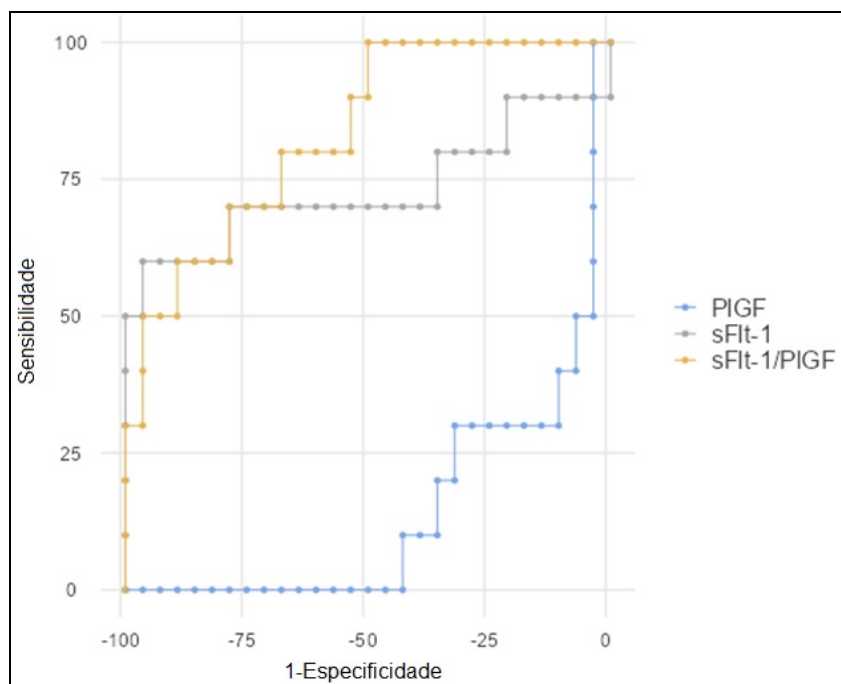
No presente estudo, foram realizadas análises de curvas ROC para determinar valores de corte (*cut-off*) para os marcadores relacionados à angiogênese (Figura 12) e os parâmetros plaquetários (Figura 13), para discriminar pacientes com PE e controles (C).

O parâmetro sFlt-1, a um *cut-off* de 3122 pg/mL, teve uma AUC de 0,878, sensibilidade de 80%, especificidade de 100%, VPP e VPN de 100% e 81,62%, respectivamente.

Para o parâmetro PlGF, a um *cut-off* de 35,64 pg/mL, obteve-se uma AUC de 0,333, 60% de sensibilidade, 44,44% de especificidade, VPP e VPN de 54,5% e 50%, respectivamente.

Para a relação sFlt-1/PlGF, a um valor ótimo de *cut-off* estabelecido em 119,12, a AUC foi de 0,878, com 60% de sensibilidade, 100% de especificidade, VPP de 100% e VPN de 69,23%.

Figura 12 – Análise de curva ROC para os marcadores relacionados à angiogênese sFlt-1, PlGF e relação sFlt-1/PlGF em pacientes com pré-eclâmpsia (PE) e controles (C).



ROC, receiver operating characteristic; sFlt-1, *soluble vascular endothelial growth factor receptor-1*; PlGF, *placental growth factor*.

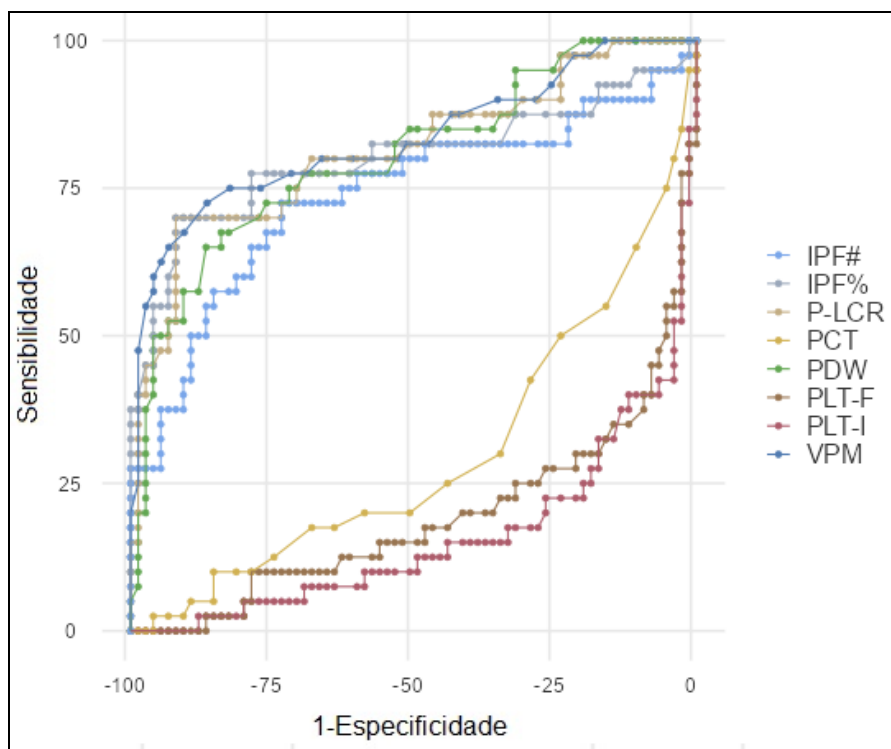
Para os parâmetros plaquetários, como mostrado na Tabela 8 e Figura 13, o parâmetro VPM, a um *cut-off* ideal estabelecido em 11,3 fL, apresentou a maior AUC (0,833).

Tabela 8 – Resultados da análise de curva ROC dos parâmetros plaquetários, para a discriminação de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) e controles (C).

	<i>Cut-off</i>	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	Índice de Youden	AUC
PLT-I	354	0	96	0	64,29	-0,04	0,160
PLT-F	405	0	96	0	64,29	-0,04	0,160
VPM	11,3	72,5	86,49	74,36	85,33	0,590	0,833
PDW	14,4	65	86,67	72,22	82,28	0,517	0,803
PCT	0,31	10	85,33	26,67	64	-0,047	0,300
P-LCR	35,8	70	92	82,35	85,19	0,620	0,814
IPF%	7,8	70	92	82,35	85,19	0,621	0,801
IPF#	12,21	72,5	73,33	59,18	83,33	0,458	0,739

ROC, receiver operating characteristic; AUC, área sob a curva; VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo; PLT-I, contagem de plaquetas por impedância; PLT-F, contagem de plaquetas por fluorescência; VPM, volume plaquetário médio; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas; PCT, plaquetócrito; P-LCR, percentual de plaquetas grandes; IPF, fração de plaquetas imaturas, percentual (%) e contagem absoluta (#).

Figura 13 – Análise de curva ROC para os parâmetros plaquetários para a distinção de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) e controles (C).



PLT-I, contagem de plaquetas por impedância; PLT-F, contagem de plaquetas por fluorescência; VPM, volume plaquetário médio; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas; PCT, plaquetócrito; P-LCR, percentual de plaquetas grandes; IPF, fração de plaquetas imaturas, percentual (%) e contagem absoluta (#).

5.8 ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS CATEGÓRICAS

5.8.1 Características clínicas e as SHG

Os resultados do teste de Qui-quadrado de independência indicam que há associação entre as características de idade materna superior a 35 anos, primigesta e aborto prévio com o tipo de SHG (controle, HG ou PE), conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 – Análise de Qui-quadrado de independência para associação entre as características clínicas e o tipo de SHG. (n=268)

Condição	χ^2	Graus de liberdade	V de Cramer	p
Idade materna > 35 anos	8,84	2	0,146	0,012
Primigesta	20,5	2	0,277	< 0,001
Aborto prévio	34,6	2	0,359	< 0,001

SHG, Síndromes hipertensivas gestacionais.

Existe uma proporção superior à esperada de gestantes com idade maior que 35 anos nos grupos HG e PE, conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre primigesta e o tipo de SHG. (n=268)

Grupo		Idade > 35 anos		Total
		Sim	Não	
Controle	Observado	5	109	114
	Esperado	12	102	114
HG	Observado	15	97	112
	Esperado	12	100	112
PE	Observado	8	34	42
	Esperado	4	38	42
Total	Observado	28	240	268
	Esperado	28	240	268

SHG, Síndromes hipertensivas gestacionais; HG, hipertensão gestacional; PE, pré-eclâmpsia.

Existe uma proporção superior à esperada de gestantes primigestas nos grupos controle e PE, conforme descrito na Tabela 11.

Tabela 11 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre primigesta e o tipo de SHG. (n=268)

Grupo		Primigesta		Total
		Sim	Não	
Controle	Observado	49	65	114
	Esperado	39	75	114
HG	Observado	21	91	112
	Esperado	38	74	112
PE	Observado	21	21	42
	Esperado	14	28	42
Total	Observado	91	177	268
	Esperado	91	177	268

SHG, Síndromes hipertensivas gestacionais; HG, hipertensão gestacional; PE, pré-eclâmpsia.

Foi observada uma proporção superior à esperada de gestantes com histórico de aborto no grupo HG, conforme descrito na Tabela 12.

Tabela 12 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre histórico de aborto e o tipo de SHG. (n=268)

Grupo		Histórico de aborto		Total
		Sim	Não	
Controle	Observado	17	97	114
	Esperado	31	83	114
HG	Observado	51	61	112
	Esperado	30	82	112
PE	Observado	4	38	42
	Esperado	11	31	42
Total	Observado	72	196	268
	Esperado	72	196	268

SHG, Síndromes hipertensivas gestacionais; HG, hipertensão gestacional; PE, pré-eclâmpsia.

5.8.2 Parâmetros plaquetários e PE

Os resultados do teste de Qui-quadrado de independência indicam que há associação entre parâmetros plaquetários (VPM, PDW, P-LCR, IPF% e IPF#) acima dos valores de *cut-off* estabelecidos pela análise de curvas ROC, com a presença de PE (Tabela 13).

Tabela 13 – Análise de Qui-quadrado de independência para associação entre parâmetros plaquetários acima dos valores de *cut-off* e a presença de PE. (n=267)

Parâmetro	χ^2	Graus de liberdade	V de Cramer	p
VPM > 11,3 fL	35,9	1	0,367	< 0,001
PDW > 14,4 fL	29,0	1	0,329	< 0,001
P-LCR > 35,8%	37,2	1	0,374	< 0,001
IPF% > 7,8%	34,7	1	0,360	< 0,001
IPF# > 12,21×10 ³ /μL	14,4	1	0,231	<0,001

PE, pré-eclâmpsia, VPM, volume plaquetário médio; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas; P-LCR, percentual de plaquetas grandes; IPF, fração de plaquetas imaturas, percentual (%) e contagem absoluta (#).

Para os parâmetros VPM, PDW, P-LCR, IPF% e IPF# no grupo PE houve uma quantidade superior ao esperado de pacientes com resultados acima dos valores de *cut-off*

estabelecidos pela análise de curvas ROC, conforme apresentado nas tabelas de contingência do teste de Qui-quadrado (Tabelas 14 a 18).

Tabela 14 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre VPM >11,3 fL e o diagnóstico de PE. (n=267)

PE		VPM > 11,3 fL		Total
		Sim	Não	
Não	Observado	59	166	225
	Esperado	76	149	225
Sim	Observado	31	11	42
	Esperado	14	28	42
Total	Observado	90	177	267
	Esperado	90	177	267

PE, pré-eclâmpsia, VPM, volume plaquetário médio

Tabela 15 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre PDW >14,4 fL e o diagnóstico de PE. (n=268)

PE		PDW > 14,4 fL		Total
		Sim	Não	
Não	Observado	52	174	226
	Esperado	67	160	226
Sim	Observado	27	15	42
	Esperado	12	30	42
Total	Observado	79	189	268
	Esperado	79	189	268

PE, pré-eclâmpsia; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas.

Tabela 16 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre P-LCR > 35,8% e o diagnóstico de PE. (n=267)

PE		P-LCR > 35,8%		Total
		Sim	Não	
Não	Observado	50	175	225
	Esperado	67	158	225
Sim	Observado	29	13	42
	Esperado	12	30	42
Total	Observado	79	188	267
	Esperado	79	188	267

PE, pré-eclâmpsia, P-LCR, percentual de plaquetas grandes.

Tabela 17 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre IPF% > 7,8% e o diagnóstico de PE. (n=268)

PE		IPF% > 7,8%		Total
		Sim	Não	
Não	Observado	53	173	226
	Esperado	70	157	226
Sim	Observado	29	13	42
	Esperado	13	29	42
Total	Observado	82	186	268
	Esperado	82	186	268

PE, pré-eclâmpsia; IPF% fração de plaquetas imaturas, percentual.

Tabela 18 – Tabela de contingência de Qui-quadrado para a associação entre IPF# > $12,21 \times 10^3/\mu\text{L}$ e o diagnóstico de PE. (n=268)

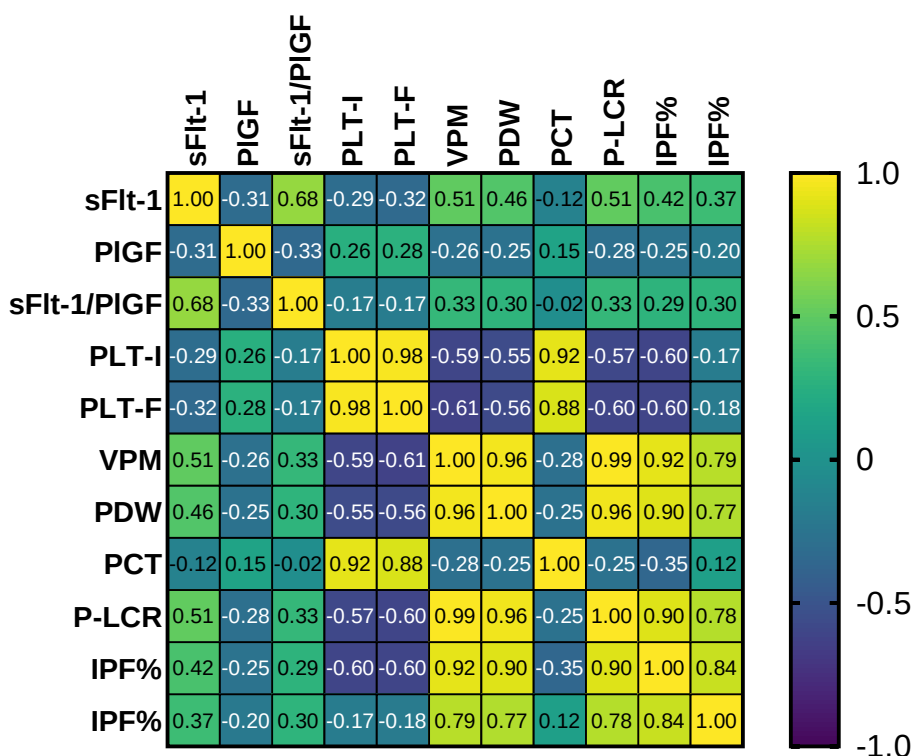
PE		IPF# > $12,21 \times 10^3/\mu\text{L}$		Total
		Sim	Não	
Não	Observado	95	131	226
	Esperado	106	120	226
Sim	Observado	31	11	42
	Esperado	20	22	42
Total	Observado	126	142	268
	Esperado	126	142	268

PE, pré-eclâmpsia; IPF#, fração de plaquetas imaturas, contagem absoluta.

5.9 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS - PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS E MARCADORES RELACIONADOS À ANGIOGÊNESE

Os valores de correlação (Pearson) entre todas as variáveis estudadas estão apresentados na Figura 14.

Figura 14 – Índices de correlação (r de Pearson) para os parâmetros plaquetários e marcadores relacionados à angiogênese em pacientes gestantes (n=268).



PLT-I, contagem de plaquetas por impedância; PLT-F, contagem de plaquetas por fluorescência; VPM, volume plaquetário médio; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas; PCT, plaquetócrito; P-LCR, percentual de plaquetas grandes; IPF, fração de plaquetas imaturas, percentual (%) e contagem absoluta (#). sFlt-1, *soluble vascular endothelial growth factor receptor-1*; PlGF, *placental growth factor*.

O parâmetro sFlt-1 apresentou correlação negativa com PLT-I e PLT-F, e uma correlação positiva com VPM, PDW, P-LCR, IPF# e IPF%. Não houve correlação significativa entre o PlGF e os parâmetros plaquetários estudados. A relação sFlt-1/PlGF apresentou correlação positiva com VPM, PDW, P-LCR, IPF% e IPF#.

As correlações significantes entre os marcadores relacionados à angiogênese e os índices plaquetários estão detalhadas na Tabela 19.

Tabela 19 – Valores de R Pearson entre os marcadores sFlt-1, PlGF e sFlt-1/PlGF com os índices plaquetários em mulheres gestantes. (n=268)

Parâmetro	r de Pearson (IC 95%)	p
sFlt-1 vs. PLT-I	- 0,295 (-0,537 – - 0,008)	0,044
sFlt-1 vs. PLT-F	- 0,320 (-0,556 – -0,033)	0,028
sFlt-1 vs. VPM	0,512 (0,263 – 0,696)	< 0,001
sFlt-1 vs. PDW	0,457 (0,195 – 0,657)	0,001
sFlt-1 vs. P-LCR	0,514 (0,268 – 0,698)	< 0,001
sFlt-1 vs. IPF%	0,421 (0,153 – 0,632)	0,003
sFlt-1 vs. IPF#	0,370 (0,092 – 0,594)	0,011
sFlt-1/PlGF vs. VPM	0,326 (0,043 – 0,561)	0,025
sFlt-1/PlGF vs. PDW	0,297 (0,010 – 0,538)	0,043
sFlt-1/PlGF vs. P-LCR	0,331 (0,049 – 0,565)	0,023
sFlt-1/PlGF vs. IPF%	0,289 (0,002 – 0,532)	0,049
sFlt-1/PlGF vs. IPF#	0,300 (0,014 – 0,540)	0,041

IC 95%, Intervalo de confiança a 95%; PLT-I, contagem de plaquetas por impedância; PLT-F, contagem de plaquetas por fluorescência; VPM, volume plaquetário médio; PDW, amplitude de distribuição das plaquetas; PCT, plaquetócrito; P-LCR, percentual de plaquetas grandes; IPF, fração de plaquetas imaturas, percentual (%) e contagem absoluta (#). sFlt-1, *soluble vascular endothelial growth factor receptor-1*; PlGF, *placental growth factor*.

6 DISCUSSÃO

Uma vez que as SHG, principalmente a PE, constituem relevantes causas de mortalidade e morbidade materno e fetal, são necessárias ferramentas úteis para diagnóstico e estratificação de risco para essas condições (FOX *et al.*, 2019; JUSTYNA *et al.*, 2017).

Considerando que a idade materna e a primigestação constituem fatores de risco para o desenvolvimento de PE, e que existem fatores de risco compartilhados entre PE e HG, foi avaliada a associação entre tais características e o diagnóstico dessas duas doenças.

A característica clínica de idade materna acima de 35 anos está associada com o diagnóstico das SHG, sendo que houve uma quantidade superior ao esperado de gestantes com mais de 35 anos tanto no grupo de paciente com HG como no de PE, o que está de acordo com a maior incidência das SHG em mulheres nessa faixa etária (ACOG, 2020; VEST; CHO, 2014).

Foi observada uma maior proporção de primigestas no grupo PE, sendo este apontado como um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença (HUTCHEON; LISONKOVA; JOSEPH, 2011).

Com relação ao histórico de aborto prévio, foi encontrada associação entre tal característica e o diagnóstico das SHG, sendo que no grupo PE, houve uma quantidade de pacientes com aborto prévio inferior ao esperado, enquanto no grupo HG uma proporção de mulheres com tal histórico foi superior aos valores esperados. Tais resultados corroboram com o fato de que o histórico de aborto é apontado como um fator protetor para o desenvolvimento de PE, principalmente para mulheres em que a concepção ocorre com o mesmo parceiro da gestação anterior, embora não tenha sido possível avaliar tal característica no presente estudo. Acredita-se que tal fator protetor está associado à hipótese de que fatores imunológicos relacionados à exposição a antígenos do feto e do espermatozoide estejam associados à fisiopatologia da PE (ERAS *et al.*, 2000; SAFTLAS *et al.*, 2003).

Tais dados corroboram que a idade superior a 35 anos e a primigestação são fatores de risco para PE, porém o cenário clínico atual ainda carece de ferramentas auxiliares na detecção precoce na detecção dessa doença.

A ativação plaquetária é considerada um elemento chave na fisiopatologia da PE, e embora os marcadores laboratoriais que possuem associação com este fenômeno, como os parâmetros plaquetários, estejam amplamente disponíveis e sejam custo-efetivos, seu uso para o manejo de pacientes com SHG ainda permanece limitado (KOHLI *et al.*, 2016; MOSER *et al.*, 2019).

Considerando o fato de que o período da gestação é marcado por profundas alterações em muitas funções fisiológicas, incluindo a hemostasia, o presente estudo confirmou as principais diferenças entre os parâmetros plaquetários entre gestantes saudáveis e mulheres não grávidas.

Neste contexto, o principal achado foi uma menor contagem de plaquetas em gestantes, quando comparada a mulheres não grávidas observada nos resultados, o que é uma das mais frequentes alterações na hemostasia durante as gestações saudáveis, principalmente no último trimestre. As modificações na hemostasia são consequência de alterações hormonais fisiológicas como parte de um processo adaptativo da gestação (CHANDRA *et al.*, 2012; VALERA *et al.*, 2010).

Contagens de plaquetas mais baixas observadas no presente estudo podem ser atribuídas à hemodiluição, como resultado da expansão do volume plasmático e a um aumento do consumo de plaquetas e seu sequestro na circulação placentária (MOSER *et al.*, 2019).

Como o PCT é um parâmetro proporcional à contagem de plaquetas, este se apresentou menor no grupo das gestantes (ALI *et al.*, 2019; CHANDRASHEKAR, 2013).

Foi observada uma redução gradual nas contagens de plaquetas ao longo dos 3 trimestres da gestação, o que já foi descrito previamente em outros estudos (AKINBAMI *et al.*, 2013; MILMAN *et al.*, 2007; MOSER *et al.*, 2019).

Embora gestações saudáveis sejam associadas ao aumento do consumo de plaquetas, compensado por um aumento em sua produção, os parâmetros associados à ativação e à produção de novas plaquetas, VPM, PDW, P-LCR e IPF% não foram significativamente maiores no grupo das gestantes saudáveis. Contudo, a ativação plaquetária em gestações não patológicas ainda não está totalmente compreendida e permanece controversa, possivelmente pela diversidade de biomarcadores utilizados para avaliar a função plaquetária (FRANCHINI, 2006; VALERA *et al.*, 2010).

Considerando as diferenças encontradas entre gestantes saudáveis e mulheres não grávidas e, as alterações fisiológicas na hemostasia durante a gestação, é imprescindível o estabelecimento de valores normais para os parâmetros plaquetários específicos para este período. A obtenção de tais valores permite a adequada interpretação clínica dos resultados.

Assim, ainda pode ser necessária a segregação das pacientes por trimestre gestacional, embora o único parâmetro que tenha apresentado diferença entre os trimestres tenha sido a contagem de plaquetas, um achado bem caracterizado na literatura (AKINBAMI *et al.*, 2013; MILMAN *et al.*, 2007; MOSER *et al.*, 2019).

Os resultados de contagens significativamente menores de plaquetas (PLT-I e PLT-F) e PCT nos grupos HG e PE, em comparação ao grupo controle, estão de acordo com o observado em diferentes estudos acerca das contagens de plaquetas em pacientes com SHG (ALSHEEHA *et al.*, 2016; DOGAN *et al.*, 2015; HASSAN *et al.*, 2019).

No presente estudo, observou-se que as contagens de plaquetas e PCT foram significativamente menores no grupo PE em comparação com HG. A redução nas contagens de plaquetas pode ser atribuída ao estado de ativação da coagulação e inflamação gerado na PE, o que resulta em um *turnover* maior de plaquetas (DOGAN *et al.*, 2015; GILES; INGLIS, 1981).

Os resultados significativamente elevados dos parâmetros VPM e P-LCR para o grupo PE, os quais fazem referência ao tamanho das plaquetas, justificam-se pela bem caracterizada ativação plaquetária nessa condição (HOLTHE *et al.*, 2004b; KAZMI; COOPER; LWALEED, 2011; MACEY *et al.*, 2010). Nossos achados estão de acordo com o observado em outros estudos, embora resultados controversos também tenham sido relatados na literatura (ALSHEEHA *et al.*, 2016; ANNAM *et al.*, 2011; BELLOS *et al.*, 2018; DOGAN *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2013; TESFAY *et al.*, 2019).

Além disso, uma vez que plaquetas recém liberadas na circulação são maiores e, que um maior *turnover* plaquetário ocorre na PE, tal fator também pode contribuir para o aumento do VPM e P-LCR (D'SOUZA; BRIGGS; MACHIN, 2015).

Observou-se ainda que tanto o VPM como o P-LCR apresentaram-se aumentados no grupo HG em relação ao controle, um indicativo de que a ativação plaquetária também pode estar presente nessa condição. Considerando o papel chave da ativação plaquetária na fisiopatologia da PE, é ainda possível que a ativação plaquetária esteja presente em uma parcela das gestações hipertensivas antes de sua evolução para PE, o que se estima que ocorra em 20 a 50% das gestações com HG (HARLOW *et al.*, 2002; HOLTHE *et al.*, 2004a).

Na análise de curvas ROC, para a discriminação entre pacientes com PE e controles (C), a um *cut-off* de 11,3 fL, o parâmetro VPM apresentou o valor mais alto de AUC (0,833) entre os índices plaquetários, com adequada sensibilidade e especificidade (72,5% e 86,49%, respectivamente). Esses achados estão de acordo com estudos publicados previamente (SHILPA GOPAL REDDY, 2019; TESFAY *et al.*, 2019; WALLE *et al.*, 2022).

O parâmetro PDW se mostrou significativamente elevado nos grupos HG e PE em comparação ao controle, sendo este mais um indicativo da ativação plaquetária nas SHG, achado já descrito por outros autores, embora a ausência de diferença significativa entre pacientes com PE e controles normotensos também tenha sido reportada (DOGAN *et al.*,

2015; MANCHANDA; MALIK, 2020; NOOH; ABDELDAYEM, 2015; SITOTAW; ASRIE; MELKU, 2018).

Foi demonstrado anteriormente que o PDW permite estratificar a severidade dos casos de PE, e que este possui ainda uma correlação com a pressão arterial média nesse grupo de pacientes (DOGAN *et al.*, 2015; NOOH; ABDELDAYEM, 2015; SINGH; VARMA, 2018; YANG *et al.*, 2014). Valores maiores PDW no grupo HG em relação ao controle podem indicar a presença da ativação plaquetária na HG, a qual pode anteceder a instalação da PE. Com uma AUC de 0,803, sensibilidade de 65% e especificidade de 86,67%, a um *cut-off* de 14,4 fL, o PDW foi caracterizado como um bom marcador para a distinção entre pacientes com PE e gestantes saudáveis.

Os valores de IPF (porcentagem e absoluto) foram mais altos no grupo PE, seguido do HG, caracterizando mais um sinal do aumentado *turnover* plaquetário existente nessas condições.

Para o IPF%, a análise de curva ROC (AUC 0,801, *cut-off* 7,8%) apresentou resultados semelhantes aos de um estudo publicado em 2016 que utilizou outro analisador da linha Sysmex para avaliar o IPF% em pacientes com PE (AUC de 0,830), o que sugere que esse parâmetro pode ser útil no manejo da doença (MORAES *et al.*, 2016).

Um maior IPF% em mulheres com PE foi relatado por outros autores, embora o número de estudos realizados acerca de tal parâmetro nas SHG ainda seja menor em comparação com os que utilizam PDW e VPM, por exemplo (BERNSTEIN *et al.*, 2019; EVERETT *et al.*, 2014).

Os achados referentes aos parâmetros plaquetários indicam que apenas a contagem de plaquetas ou a simples presença ou não de plaquetopenia em gestantes com SHG não é suficiente para caracterizar o estado da trombopoese e ativação plaquetária nessas pacientes. Com relação à trombopoese, destaca-se a relevância do uso do IPF, parâmetro que fornece importante informação acerca do equilíbrio entre consumo e produção das plaquetas (ABE *et al.*, 2006).

No presente estudo, foi verificada a associação entre resultados acima dos valores de *cut-off* para parâmetros plaquetários e o diagnóstico de PE. Para tal análise foram considerados os parâmetros que apresentaram resultados significantes para a detecção de PE por meio das análises de curvas ROC, considerando os resultados de AUC, sensibilidade, especificidade, VPP e VPN. Os parâmetros que apresentaram melhor desempenho foram: VPM, PDW, P-LCR, IPF% e IPF#. Para todos esses índices, foi observado que existe associação entre valores acima dos *cut-offs* estabelecidos e a presença de PE, sendo que no

grupo PE, a quantidade de resultados acima do *cut-off* foi superior ao esperado. Tais achados corroboram os demais resultados do presente estudo, indicativos de que na PE ocorre um maior *turnover* e ativação plaquetária.

Considerando que as plaquetas de gestantes com PE são maiores do que de gestantes saudáveis, o que é caracterizado por maior VPM e P-LCR, e que o método da impedância leva em consideração o tamanho das partículas contadas, foi verificada a concordância entre as metodologias de contagem de plaquetas por impedância (PLT-I) e fluorescência (PLT-F) em pacientes gestantes.

Apesar da metodologia de contagem de plaquetas por fluorescência ser o método mais confiável para contagem de plaquetas, especialmente em pacientes com trombocitopenia, condição frequente na PE, tal método não está disponível em todos os analisadores hematológicos, o que limita seu uso (HUMMEL *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2021; SCHOORL *et al.*, 2013).

Com relação à contagem de plaquetas por impedância elétrica, tecnologia padrão de uso nos analisadores hematológicos automatizados, esta apresenta como principal desvantagem a dificuldade na distinção entre plaquetas anormalmente grandes e hemácias microcíticas, além da interferência de fragmentos de hemácias, mesmo quando a focalização hidrodinâmica é utilizada. Valores falsamente diminuídos nas contagens de plaquetas podem ocorrer na presença de plaquetas com volume aumentado, quando contadas pelo método da impedância elétrica (BACCINI *et al.*, 2020; MICHELSON *et al.*, 2019).

A análise da regressão de Passing-Bablok para comparação entre as duas metodologias para contagens de plaquetas apresentou uma correlação linear entre os resultados os métodos de impedância e fluorescência, e não há erro sistemático e diferenças proporcionais entre as duas metodologias. O alto coeficiente de correlação ($r = 0,837$) obtido indica que os métodos podem ser substituídos um pelo outro.

O método de Bland-Altman foi então usado para comparar a consistência entre as duas metodologias, o que mostrou que mais de 95% das medições se encontravam dentro dos limites de consistência de 95%. Dentro dos limites de consistência, o valor absoluto da diferença entre as contagens (-0,905, IC95% (-5,77 – 3,96)) foi considerado clinicamente aceitável.

Assim, pode-se considerar que, nas condições estudadas, os resultados das duas metodologias são consistentes e podem ser intercambiáveis para a contagem de plaquetas em pacientes gestantes.

Entretanto, destaca-se a importância de confirmar resultados de contagem baixas de plaquetas com outra metodologia (ex.: contagem por metodologia óptica) quando a contagem por metodologia de fluorescência não esteja disponível. Ainda, é recomendada a revisão do histograma de distribuição da população de plaquetas e a análise da morfologia das plaquetas por microscopia óptica sempre que possível, uma vez que a presença de plaquetas com volume acima do normal, achado comum em gestantes com PE, é um interferente nas contagens por impedância (BACCINI *et al.*, 2020; GILES; INGLIS, 1981; JAKOBSEN *et al.*, 2019).

Com relação aos fatores relacionados à angiogênese, os resultados obtidos estão de acordo com o observado em outros estudos utilizando os marcadores sFlt-1 e PlGF, em que há aumento nos níveis de sFlt-1, redução do PlGF e aumento da relação sFlt-1/PlGF em pacientes com PE, indicando a presença da disfunção placentária, importante característica fisiopatológica da doença (JEON *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2021; STEPAN; HUND; ANDRACZEK, 2020; VERLOHREN *et al.*, 2022; ZEISLER *et al.*, 2016).

A relação sFlt-1/PlGF apresentou-se significativamente maior em pacientes com HG em relação ao grupo controle e nas pacientes do grupo PE em relação ao controle e ao HG. Tal achado está de acordo com a literatura que indica que a relação sFlt-1/PlGF possui um alto valor preditivo negativo para descartar o diagnóstico de PE em casos suspeitos, sendo essa uma importante ferramenta prognóstica para o desenvolvimento da doença e para desfechos adversos (JEON *et al.*, 2021; VERLOHREN *et al.*, 2014).

Embora o sFlt-1 seja produzido pelo tecido placentário em resposta à hipóxia na PE, a quantidade de sFlt-1 produzida por essas células aparenta ser insuficiente para justificar os altos níveis dessa molécula na circulação de gestantes com PE (LI *et al.*, 2005; MAJOR *et al.*, 2015).

No presente estudo, foi observada uma moderada correlação positiva entre o sFlt-1 e os parâmetros plaquetários VPM, PDW e P-LCR. Uma vez que tais índices são associados com a ativação plaquetária, e há evidência da produção de sFlt-1 por monócitos mediante a sua associação com plaquetas ativadas (agregados monócitos-plaquetas), tais achados sugerem que as plaquetas ativadas possam atuar em conjunto com monócitos como uma fonte extra de sFlt-1 na PE (MAJOR *et al.*, 2015; RAJAKUMAR *et al.*, 2005). Sabe-se ainda que uma quantidade aumentada de agregados monócitos-plaquetas está presente na circulação de gestantes com PE. (LUKANOV *et al.*, 2009; MACEY *et al.*, 2010)

Uma fraca correlação negativa entre as contagens de plaquetas (PLT-I e PLT-F) e os níveis de sFlt-1 foi encontrada na presente pesquisa, o que está de acordo com o publicado por

Li *et al.* (2021). Tal achado provavelmente é uma consequência das menores contagens de plaquetas e dos elevados níveis de sFlt-1, característicos na PE (ALSHEEHA *et al.*, 2016; JEON *et al.*, 2021). A fraca correlação positiva encontrada entre IPF#, sFlt-1 e sFlt-1/PlGF pode ser atribuída aos elevados níveis de IPF# e sFlt-1, como consequência do aumentado *turnover* plaquetário e da hipóxia e disfunção placentária presentes na PE (EVERETT *et al.*, 2014; STEPAN; HUND; ANDRACZEK, 2020).

Na análise de curvas ROC para os marcadores relacionados à angiogênese para discriminar entre pacientes com PE e controles saudáveis, como esperado, as maiores AUC (0,878 para ambos) foram as do sFlt-1 e relação sFlt-1/PlGF, o que está de acordo com o observado em estudos prévios (VERLOHREN *et al.*, 2022). Para este marcador, o *cut-off* ideal foi de $\geq 119,6$ para a detecção de PE, com um VPP de 100% e VPN de 69,23%, sendo, portanto, um valor de corte maior do que o de ≥ 85 já reportado (VERLOHREN *et al.*, 2010). Tal achado pode ser possivelmente atribuído ao fato que o início (precoce ou tardio) da PE e a severidade da doença (leve ou severa) não foram avaliados no presente estudo.

Considerando-se apenas a fase gestacional tardia (≥ 34 semanas), um *cut-off* de ≥ 110 forneceu sensibilidade e especificidade de 58,2% e 95,5%, respectivamente, o que é similar aos achados da presente pesquisa, cujos valores de *cut-off* ideais para a detecção de PE foram estimados considerando todas as pacientes com PE como um único grupo, onde 78,6% das integrantes possuíam idade gestacional igual ou superior a 34 semanas (VERLOHREN *et al.*, 2014).

Apesar da boa performance diagnóstica apresentada pelos fatores relacionados à angiogênese, uma desvantagem relacionada ao uso desses marcadores sorológicos é o seu alto custo (SEBASTIÃO *et al.*, 2019). Além disso, há limitada disponibilidade de fabricantes e reagentes, principalmente para os países em desenvolvimento, onde as SHG permanecem como uma importante causa de morte. Neste contexto, destaca-se o crescente potencial do uso dos parâmetros plaquetários para a estratificação de risco dos casos suspeitos e confirmados de PE, que possuem a vantagem de geralmente não implicar em custos adicionais. Além disso, os índices plaquetários são facilmente obtidos durante a realização do hemograma, exame realizado rotineiramente durante o atendimento de gestantes, seja nas consultas pré-natal ou de emergência.

Embora o uso clínico dos parâmetros plaquetários como exames laboratoriais ainda não esteja consolidado na maioria dos serviços de saúde no Brasil, tais parâmetros possuem potencial para uso como uma ferramenta adicional no manejo das gestantes com SHG, pois

fornece valiosa informação acerca da ativação plaquetária nas pacientes com diagnóstico ou suspeita de SHG, fenômeno que possui papel essencial da fisiopatologia dessas doenças.

Entretanto, é preciso cautela para a interpretação dos resultados dos índices plaquetários. Ainda, valores de referência locais devem ser utilizados sempre que possível, uma vez que existe variabilidade entre instrumentos e diferentes grupos étnicos e populacionais (CEYHAN *et al.*, 2006; MALUF; BARRETO; VIDIGAL, 2015). O uso combinado de biomarcadores aparenta ser sempre a melhor estratégia.

Assim, para a confirmação dos resultados obtidos no presente estudo sugere-se a realização de um estudo multicêntrico, longitudinal, com maior número de participantes, considerando a severidade da doença e a estratificação por trimestre gestacional. Sugere-se ainda a associação de marcadores sorológicos de ativação plaquetária.

O presente estudo apresentou algumas limitações, como: a diferença no número de pacientes por grupo, a não estratificação por trimestre gestacional e severidade e a diferença de idade materna e gestacional no grupo controle em comparação aos demais grupos de estudo. Entretanto, as evidências relacionadas ao efeito da idade sobre as contagens de plaquetas e os parâmetros plaquetários apontam que o impacto significativo da idade ocorre quando diferentes grupos etários são considerados, como por exemplo, infância e adolescência, comparados à fase adulta, ou adultos em relação a idosos (BIINO *et al.*, 2013; SANTIMONE *et al.*, 2011; SEGAL; MOLITERNO, 2006; VÁZQUEZ-SANTIAGO *et al.*, 2016). Nesses casos, recomenda-se o uso de valores de referência estabelecidos por grupos (ex.: infância, adolescência, adultos e idosos) para a interpretação adequada dos resultados de contagens de plaquetas e índices plaquetários, sendo a fase adulta considerada como um grupo único, geralmente estratificado apenas por gênero.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste estudo, foi possível concluir que:

- Os parâmetros PLT-I, PLT-F e PCT foram significativamente menores nas gestantes saudáveis.
- Somente a contagem de plaquetas (PLT-I e PLT-F) apresentou redução significativa ao longo dos trimestres da gestação.
- Os parâmetros PLT-I, PLT-F e PCT foram significativamente menores nos grupos HG e PE em relação ao controle.
- Os parâmetros VPM, PDW, P-LCR, IPF# e IPF% apresentaram-se elevados nos grupos HG e PE.
- Os achados corroboram com as características de aumento do *turnover* plaquetário e ativação das plaquetas, presentes na PE.
- As metodologias para contagens de plaquetas por impedância e fluorescência no analisador Sysmex XN-1000 são consistentes, e estas podem ser intercambiáveis para a contagem de plaquetas em pacientes gestantes.
- Os marcadores relacionados à angiogênese sFlt-1 e relação s-Flt-1/PlGF foram significativamente maiores no grupo PE, enquanto PlGF apresentou-se diminuído. Tais achados, em conjunto, indicam disfunção placentária.
- Na análise de curvas ROC, o parâmetro plaquetário que apresentou melhor desempenho para a detecção de PE foi o VPM, a um *cut-off* de 11,3 fL.
- Existe a associação entre valores aumentados para os parâmetros VPM, PDW, P-LCR, IPF% e IPF# e o diagnóstico de PE.
- A característica clínica de idade materna superior a 35 anos está associada com o diagnóstico de PE e HG. Histórico de aborto está associado apenas com a HG e primigestação está associada ao diagnóstico de PE.
- Há uma moderada correlação positiva entre o sFlt-1 e os parâmetros plaquetários VPM, PDW e P-LCR.
- Os parâmetros plaquetários possuem potencial para serem aplicados como uma ferramenta adicional no manejo de pacientes com SHG.

REFERÊNCIAS

- ABALOS, Edgardo; CUESTA, Cristina; GROSSO, Ana L.; CHOU, Doris; SAY, Lale. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: A systematic review. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, [S. l.], v. 170, n. 1, p. 1–7, 2013.
- ABE, Yasunori *et al.* A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). **Thrombosis Research**, [S. l.], v. 118, n. 4, p. 463–469, 2006.
- ACOG. ACOG Practice Bulletin No. 202: Gestational Hypertension and Preeclampsia. **Obstetrics and gynecology**, [S. l.], v. 133, n. 1, p. e1–e25, 2019.
- ACOG. Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin, Number 222. **Obstetrics and gynecology**, [S. l.], v. 135, n. 6, p. e237–e260, 2020.
- AKINBAMI, Akinsegun A.; AJIBOLA, Sarah O.; RABIU, Kabiru A.; ADEWUNMI, Adeniyi A.; DOSUNMU, Adedoyin O.; ADEDIRAN, Adewumi; OSUNKALU, Vincent O.; OSIKOMAIYA, Bodunrin I.; ISMAIL, Kamal A. Hematological profile of normal pregnant women in Lagos, Nigeria. **International Journal of Women's Health**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 227–232, 2013.
- ALI, Usman; GIBBS, Roz; KNIGHT, Gavin; TSITSIKAS, Dimitris. Sex-divided reference intervals for mean platelet volume, platelet large cell ratio and plateletcrit using the Sysmex XN-10 automated haematology analyzer in a UK population. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 153–157, 2019.
- ALSHEEHA, Muneera A.; ALABOUDI, Rafi S.; ALGHASHAM, Mohammad A.; IQBAL, Javed; ADAM, Ishag. Platelet count and platelet indices in women with preeclampsia. **Vascular Health and Risk Management**, [S. l.], v. 12, p. 477–480, 2016.
- ANNAM, Vamseedhar; SRINIVASA, K.; YATNATTI, Santhosh K.; RES, Suresh Dr. Evaluation of platelet indices and platelet counts and their significance in pre-eclampsia and eclampsia. **Nature and Science**, [S. l.], v.12, n.3, p. 147–153, 2014.
- ARTUNC ULKUMEN, Burcu; PALA, Halil Gursoy; CALIK, Esat; ORUC KOLTAN, Semra. Platelet distribution width (PDW): A putative marker for threatened preterm labour. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 745–748, 2014.
- BACCINI, Véronique *et al.* Platelet counting: Ugly traps and good advice. proposals from the french-speaking cellular hematology group (gfhc). **Journal of Clinical Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 3, 2020.
- BARNARD, M. R.; LINDEN, M. D.; FRELINGER, A. L.; LI, Y.; FOX, M. L.; FURMAN, M. I.; MICHAELSON, Alan D. Effects of platelet binding on whole blood flow cytometry assays of monocyte and neutrophil procoagulant activity. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [S. l.], v. 3, n. 11, p. 2563–2570, 2005.
- BARTSCH, Emily *et al.* Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: Systematic review and meta-analysis of large cohort studies. **The BMJ**, [S. l.], v.

353, 2016.

BELLOS, Ioannis; FITROU, Georgia; PERGIALIOTIS, Vasilios; PAPANTONIOU, Nikolaos; DASKALAKIS, Georgios. Mean platelet volume values in preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. **Pregnancy Hypertension**, [S. l.], v. 13, p. 174–180, 2018.

BENZING, Thomas. Hypertension: Testing for pre-eclampsia: Paving the way to early diagnosis. **Nature Reviews Nephrology**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 200–201, 2016.

BERNSTEIN, Ulrike; KAISER, Thorsten; STEPAN, Holger; JANK, Alexander. The immature platelet fraction in hypertensive disease during pregnancy. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, [S. l.], v. 299, n. 6, p. 1537–1543, 2019.

BIINO, Ginevra *et al.* Age- And Sex-Related Variations in Platelet Count in Italy: A Proposal of Reference Ranges Based on 40987 Subjects' Data. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–7, 2013.

BILIĆ-ZULLE, Lidija. Comparison of methods : Passing and Bablok regression. **Lessons in biostatistics**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 49–52, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Gestação de Alto Risco Manual Técnico**. 2012[s.l: s.n.]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/gestacao_alto_risco.pdf. Acesso em: 20 fev. 2019.

BRAUNTHAL, Stephanie; BRATEANU, Andrei. Hypertension in pregnancy: Pathophysiology and treatment. **SAGE Open Medicine**, [S. l.], v. 7, p. 205031211984370, 2019.

BROWN, G. Thomas; NARAYANAN, Padmini; LI, Wei; ROY, L.; MCINTYRE, Thomas M. Lipopolysaccharide Stimulates Platelets through an IL-1 β Autocrine Loop. **J Immunol**, [S. l.], v. 191, p. 5196-5203 2013; DOI: 10.4049/jimmunol.1300354.

BURTON, Graham J.; JAUNIAUX, Eric. Oxidative stress. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 287–299, 2011.

CEYHAN, Temel; BEYAN, Cengiz; BAŞER, Iskender; KAPTAN, Kürşat; GÜNGÖR, Sadettin; IFRAN, Ahmet. The effect of pre-eclampsia on complete blood count, platelet count and mean platelet volume. **Annals of Hematology**, [S. l.], v. 85, n. 5, p. 320–322, 2006.

CHANDRA, Surabhi; TRIPATHI, Anil Kumar; MISHRA, Sanjay; AMZARUL, Mohammad; VAISH, Arvind Kumar. Physiological changes in hematological parameters during pregnancy. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 144–146, 2012.

CHANDRASHEKAR. Plateletcrit as a Screening Tool for Detection of Platelet Quantitative Disorders. **Journal of Hematology**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 22–26, 2013.

D'SOUZA, Carol; BRIGGS, Carol; MACHIN, Samuel J. Platelets. The Few, the Young, and the Active. **Clinics in Laboratory Medicine**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 123–131, 2015.

DECHEND, Ralf; MÜLLER, Dominik N.; WALLUKAT, Gerd; HOMUTH, Volker; KRAUSE, Manja; DUDENHAUSEN, Joachim; LUFT, Friedrich C. Activating auto-antibodies against the AT1 receptor in preeclampsia. **Autoimmunity Reviews**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 61–65, 2005.

DEWERCHIN, Mieke; CARMELIET, Peter. PlGF: A multitasking cytokine with disease-restricted activity. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 8, p. 1–24, 2012.

DOGAN, Keziban; GURASLAN, Hakan; SENTURK, Mehmet Baki; HELVACIOGLU, Caglar; IDIL, Sevda; EKIN, Murat. Can platelet count and platelet indices predict the risk and the prognosis of preeclampsia? **Hypertension in Pregnancy**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 434–442, 2015.

DRÖGE, Lisa Antonia; PERSCHEL, Frank Holger; STÜTZ, Natalia; GAFFRON, Anna; FRANK, Lisa; BUSJAHN, Andreas; HENRICH, Wolfgang; VERLOHREN, Stefan. Prediction of Preeclampsia-Related Adverse Outcomes With the sFlt-1 (Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1)/PlGF (Placental Growth Factor)-Ratio in the Clinical Routine: A Real-World Study. **Hypertension**, [S. l.], v.77, p. 461–471, 2021.

DUCKITT, Kirsten; HARRINGTON, Deborah. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: Systematic review of controlled studies. **British Medical Journal**, [S. l.], v. 330, n. 7491, p. 565–567, 2005.

ERAS, Jennifer L.; SAFTLAS, Audrey F.; TRICHE, Elizabeth; HSU, Chaur Dong; RISCH, Harvey A.; BRACKEN, Michael B. Abortion and its effect on risk of preeclampsia and transient hypertension. **Epidemiology**, v.11, n.1, p.36-43, 2000.

ERIKÇI, Alev Akyol; MUHÇU, Murat; DÜNDAR, Özgür; ÖZTÜRK, Ahmet. Could mean platelet volume be a predictive marker for gestational diabetes mellitus? **Hematology**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 46–48, 2008.

EVERETT, Thomas R.; GARNER, Stephen F.; LEES, Christoph C.; GOODALL, Alison H. Immature platelet fraction analysis demonstrates a difference in thrombopoiesis between normotensive and preeclamptic pregnancies. **Thrombosis and Haemostasis**, [S. l.], v. 111, n. 6, p. 1177–1179, 2014.

FEBRASGO. FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. Pré-eclâmpsia nos seus diversos aspectos. **Série Orientações e Recomendações FEBRASGO.**, [S. l.], v. 8, p. 1–56, 2017. Disponível em: https://www.febRASGO.org.br/media/k2/attachments/12-PRE_ECLAMPSIA.pdf. Acesso em: Mar. 2019

FOLK, Diane M. Hypertensive Disorders of Pregnancy: Overview and Current Recommendations. **Journal of Midwifery and Women's Health**, [S. l.], v. 63, n. 3, p. 289–300, 2018.

FORSTNER, Désirée; GUETTLER, Jacqueline; GAUSTER, Martin. Changes in maternal platelet physiology during gestation and their interaction with trophoblasts. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 19, 2021.

FOX, Rachael; KITT, Jamie; LEESON, Paul; AYE, Christina Y. L.; LEWANDOWSKI, Adam J. Preeclampsia: Risk Factors, Diagnosis, Management, and the Cardiovascular Impact on the Offspring. **Journal of Clinical Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 1625, 2019.

FRANCHINI, Massimo. Haemostasis and pregnancy. **Thrombosis and Haemostasis**, [S. l.], v. 95, n. 3, p. 401–413, 2006. DOI: 10.1160/TH05-11-0753.

FREITAS, Letícia Gonçalves *et al.* Preeclampsia : Are platelet count and indices useful for its prognostic ? **Hematology**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 360-364, 2013.

GILES, C.; INGLIS, T. C. M. Thrombocytopenia and Macrothrombocytosis in Gestational Hypertension. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, [S. l.], v. 88, n. 11, p. 1115–1119, 1981.

GOMES, Tayná Bernardino; SILVA, Larissa Isabelle de Lima Pessoa; MANGUEIRA, Natália Pessoa; SILVA, Carolynne Saturnino Da; PAIVA, Mirtes Teresa Gomes; LIRA, Vitória Maria de Lima Pessoa; MENDES, Cristina Katya Torres Teixeira; ASSIS, Thais Josy Castro Freire De. Pré-Eclâmpsia: Importante Causa De Óbitos Maternos No Brasil Entre Os Anos De 2010-2017 / Pre-Eclampsia: Important Cause of Maternal Deaths in Brazil Between the Years 2010-2017. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 6, n. 10, p. 75496–75510, 2020.

GYSELAERS, W.; STAELENS, A.; MESENS, T.; TOMSIN, K.; OBEN, J.; VONCK, S.; VERRESEN, L.; MOLENBERGHS, G. Maternal venous Doppler characteristics are abnormal in pre-eclampsia but not in gestational hypertension. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 421–426, 2015.

HARLOW, Françoise H.; BROWN, Mark A.; BRIGHTON, Timothy A.; SMITH, Susan L.; TRICKETT, Annette E.; KWAN, Y. L.; DAVIS, Gregory K. Platelet activation in the hypertensive disorders of pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 187, n. 3, p. 688–695, 2002.

HASSAN, Hend El Sayed; AZZAM, Hanan; OTHMAN, Maha; HASSAN, Mohammad; SELIM, Tarek. Soluble E-selectin, platelet count and mean platelet volume as biomarkers for pre-eclampsia. **Pregnancy Hypertension**, [S. l.], v. 17, n. April, p. 1–4, 2019.

HE, Shiqi *et al.* Relation of Platelet Parameters With Incident Cardiovascular Disease (The Dongfeng-Tongji Cohort Study). **American Journal of Cardiology**, [S. l.], v. 123, n. 2, p. 239–248, 2019.

HOLTHE, Mette R.; STAFF, Anne C.; BERGE, Lillian N.; LYBERG, Torstein. Different levels of platelet activation in preeclamptic, normotensive pregnant, and nonpregnant women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 190, n. 4, p. 1128–1134, 2004. a.

HOLTHE, Mette Ree; LYBERG, T.; STAFF, A. C.; BERGE, L. N. Leukocyte-platelet interaction in pregnancies complicated with preeclampsia. **Platelets**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 91–97, 2005.

HUANG, Ying; CHEN, Xi; YOU, Ze Shan; GU, Fang; LI, Li; WANG, Dongyu; LIU, Jun;

- LI, Yinguang; HE, Shanyang. The value of first-trimester platelet parameters in predicting gestational diabetes mellitus. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, [S. l.], v. 7058, 2020.
- HUMMEL, Kornelia; SACHSE, Michaela; HOFFMANN, Johannes J. M. L.; VAN DUN, Ludi P. J. M. Comparative evaluation of platelet counts in two hematology analyzers and potential effects on prophylactic platelet transfusion decisions. **Transfusion**, [S. l.], v. 58, n. 10, p. 2301–2308, 2018.
- HUTCHEON, Jennifer A.; LISONKOVA, Sarka; JOSEPH, K. S. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 391–403, 2011.
- JAKOBSEN, Carina; LARSEN, Julie Brogaard; FUGLSANG, Jens; HVAS, Anne Mette. Platelet function in preeclampsia—a systematic review and meta-analysis. **Platelets**, [S. l.], v. 30, n. 5, p. 549–562, 2019. DOI: 10.1080/09537104.2019.1595561.
- JEON, Hae Rin; JEONG, Da Hoe; LEE, Jin Young; WOO, Eun Young; SHIN, Gwi Taek; KIM, Suk Young. sFlt-1/PlGF ratio as a predictive and prognostic marker for preeclampsia. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, [S. l.], v. 47, n. 7, p. 2318–2323, 2021.
- JUSTYNA, Widomska *et al.* Hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis, and management recommendations for international practice. **Physiology & behavior**, [S. l.], v. 176, n. 1, p. 139–148, 2017.
- KARUMANCHI, S. Ananth; MAYNARD, Sharon E.; STILLMAN, Isaac E.; EPSTEIN, Franklin H.; SUKHATME, Vikas P. Preeclampsia: A renal perspective. **Kidney International**, [S. l.], v. 67, n. 6, p. 2101–2113, 2005.
- KAZMI, Rashid S.; COOPER, Alan J.; LWALEED, Bashir A. Platelet function in pre-eclampsia. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 131–136, 2011.
- KENDALL, Richard L.; THOMAS, Kenneth A. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, [S. l.], v. 90, n. November, p. 10705–10709, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.22.10705.
- KEOHANE, Elaine; OTTO, Catherine N.; WALENGA, Jeanine. **Rodak's Hematology-E-Book: Clinical Principles and Applications**. Elsevier Health Sciences, 2019.
- KIM, Hyun Young; BANG, Sung Hwan; CHO, Duck; KIM, Hee Jin; KIM, Sun Hee. Performance evaluation of platelet counting of Abbott Alinity hq and Sysmex XN-9000 automated hematology analyzer compared with international reference method. **International Journal of Laboratory Hematology**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 387–394, 2021.
- KLEIN, Evelyn *et al.* Influence of the sFlt-1 / PlGF Ratio on Clinical Decision-Making in Women with Suspected Preeclampsia. **PLoS ONE**, [S. l.], v.11, n.5, p. 1–19, 2016.
- KOHLI, Shrey *et al.* Maternal extracellular vesicles and platelets promote preeclampsia via inflammasome activation in trophoblasts. **Blood**, [S. l.], v. 128, n. 17, p. 2153–2164, 2016.

LECARPENTIER, Édouard; TSATSARIS, Vassilis. Angiogenic balance (sFlt-1_PlGF) and preeclampsia _ Elsevier Enhanced Reader.pdf. **Ann Endocrinol (Paris)**, [S. l.], v. 77, p. 97–100, 2016.

LECARPENTIER, Édouard; VIEILLEFOSSE, Sarah; HADDAD, Bassam; FOURNIER, Thierry; LEGUY, Marie Clémence; GUIBOURDENCHE, Jean; TSATSARIS, Vassilis. Le facteur de croissance placentaire (PlGF) et son récepteur soluble (sFlt-1) au cours de la grossesse: physiologie, dosage et intérêt dans la prééclampsie. **Annales de Biologie Clinique**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 259–267, 2016.

LEWANDOWSKA, Małgorzata; WIĘCKOWSKA, Barbara; SAJDAK, Stefan; LUBIŃSKI, Jan. Pre-pregnancy obesity vs. Other risk factors in probability models of preeclampsia and gestational hypertension. **Nutrients**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 1–19, 2020.

LI, H.; GU, B.; ZHANG, Y.; LEWIS, D. F.; WANG, Y. Hypoxia-induced increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta. **Placenta**, [S. l.], v. 26, n. 2–3, p. 210–217, 2005.

LI, Xun; TAN, Hongzhuan; HUANG, Xin; ZHOU, Shujin; HU, Shimin; WANG, Xiaojuan; XU, Xin; LIU, Qian; WEN, Shi Wu. Similarities and differences between the risk factors for gestational hypertension and preeclampsia: A population based cohort study in south China. **Pregnancy Hypertension**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 66–71, 2016.

LI, Yan; SUN, Lifang; ZHENG, Xiuli; LIU, Jingfang; ZHENG, Rong; LV, Yanwei. The clinical value of platelet parameters combined with sflt-1/ plgf in predicting preeclampsia. **Annals of Palliative Medicine**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 7619–7626, 2021.

LOK, Christine A. R.; NIEUWLAND, Rienk; STURK, Auguste; HAU, C. H. I. M.; BOER, Kees; VANBAVEL, E. D.; VANDERPOST, Joris A. M. Microparticle-associated P-selectin reflects platelet activation in preeclampsia. **Platelets**, [S. l.], v. 18, n. February, p. 68–72, 2007.

LUKANOV, Tzvetan Hristoforov et al. Flow cytometric investigation of CD40-CD40 ligand system in preeclampsia and normal pregnancy. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 16, n. 3, p. 306–312, 2010.

MACEY, M. G.; BEVAN, S.; ALAM, S.; VERGHESE, L.; AGRAWAL, S.; BESKI, S.; THURAISINGHAM, R.; MACCALLUM, P. K. Platelet activation and endogenous thrombin potential in pre-eclampsia. **Thrombosis Research**, [S. l.], v. 125, n. 3, p. e76–e81, 2010.

MAJOR, Heather D.; 2, Robert A. Campbell; SILVER, Robert M. D.; BRANCH, Ware; WEYRICH, Andrew S. Synthesis of sFlt-1 by platelet-monocyte aggregates contributes to the pathogenesis of preeclampsia Heather. **Am J Obstet Gynecol**, [S. l.], v. 210, n. 6, p. 1–14, 2015.

MALIK, Roopa; KUMAR, Viral. Hypertension in pregnancy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. l.], v. 956, p. 375–393, 2017. DOI: 10.1007/5584_2016_150.

MALUF, Chams B.; BARRETO, Sandhi M.; VIDIGAL, Pedro G. Standardization and reference intervals of platelet volume indices: Insight from the Brazilian longitudinal study of

adult health (ELSA-BRASIL). **Platelets**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 413–420, 2015.

MANCHANDA, Jaya; MALIK, Ajay. Study of platelet indices in pregnancy-induced hypertension. **Medical Journal Armed Forces India**, [S. l.], v. 76, n. 2, p. 161–165, 2020.

MAYNARD, Sharon E. *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction , hypertension , and proteinuria in preeclampsia. **J Clin Invest**, [S. l.], v. 111, n. 5, p. 649–658, 2003.

METE URAL, Ülkü; BAYOĞLU TEKIN, Yeşim; BALIK, Gülşah; KIR ŞAHİN, Figen; ÇOLAK, Sabri. Could platelet distribution width be a predictive marker for unexplained recurrent miscarriage? **Archives of Gynecology and Obstetrics**, [S. l.], v. 290, n. 2, p. 233–236, 2014.

MICHELSON, A. D. *et al.* **Platelets**. London: Elsevier/Academic Press, 2019.

MILMAN, Nils; BERGHOLT, Thomas; BYG, Keld Erik; ERIKSEN, Lisbeth; HVAS, Anne Mette. Reference intervals for haematological variables during normal pregnancy and postpartum in 434 healthy Danish women. **European Journal of Haematology**, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 39–46, 2007.

MORAES, Daniela; MUNHOZ, Terezinha Paz; PINHEIRO DA COSTA, Bartira E.; HENTSCHKE, Marta Ribeiro; SONTAG, Fernando; SILVEIRA LUCAS, Luiza; GADONSKI, Giovani; ANTONELLO, Ivan Carlos; POLI-DE-FIGUEIREDO, Carlos E. Immature platelet fraction in hypertensive pregnancy. **Platelets**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 333–337, 2016.

MOSER, Gerit; GUETTLER, Jacqueline; FORSTNER, Désirée; GAUSTER, Martin. Maternal platelets of the human placenta: Friend or foe? **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 22, 2019.

MURTHI, Padma; PINAR, Anita A.; DIMITRIADIS, Evdokia; SAMUEL, Chrishan S. Inflammasomes—a molecular link for altered immunoregulation and inflammation mediated vascular dysfunction in preeclampsia. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 4, 2020.

NOOH, Ahmed Mohamed; ABDELDAYEM, Hussein Mohammed. Changes in Platelet Indices during Pregnancy as Potential Markers for Prediction of Preeclampsia Development. **Open Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], n. October, p. 703–712, 2015.

OMAR, Muhyettin *et al.* Role of increased mean platelet volume (MPV) and decreased MPV/platelet count ratio as poor prognostic factors in lung cancer. **Clinical Respiratory Journal**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 922–929, 2018.

PYO, Jung Soo; SOHN, Jin Hee; KANG, Guhyun. Diagnostic and prognostic roles of the mean platelet volume in malignant tumors: a systematic review and meta-analysis. **Platelets**, [S. l.], v. 27, n. 8, p. 722–728, 2016.

RAJAKUMAR, A. *et al.* Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

in normotensive and preeclamptic pregnant women. **Placenta**, v. 26, n. 7, p. 563-573, 2005.

REDMAN, Christopher W. G.; SACKS, Gavin P.; SARGENT, Ian L. Preeclampsia : An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, [S. l.], v. 180, n.2, p. 499–506, 1999.

REDMAN, Christopher W. G.; SARGENT, I. L. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response - A review. **Placenta**, [S. l.], v. 24, n. SUPPL. A, p. 21–27, 2003.

REDMAN, Christopher W.; SARGENT, Ian L. Latest advances in understanding preeclampsia. **Science**, [S. l.], v. 308, n. 5728, p. 1592–1594, 2005.

RICHTER, Mark M. Electrochemiluminescence (ECL). **Chem. Rev**, [S. l.], v. 104, n. 6, p. 3003-3034, 2004.

ROBERTS, James M.; TAYLOR, Robert N.; MUSCI, Thomas J.; RODGERS, George M.; HUBEL, Carl A.; MCLAUGHLIN, Margaret K. Preeclampsia: An endothelial cell disorder. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 161, n. 5, p. 1200–1204, 1989.

ROCHE DIAGNOSTICS. Elecsys® PlGF. [S. l.], n. Version 12.0, p. 1–6, 2022. a. Disponível em: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/e5e0f82e-0e88-ec11-0e91-005056a772fd?countryIsoCode=pi>. Acesso em: 20 fev. 2020.

ROCHE DIAGNOSTICS. Elecsys sFlt-1. [S. l.], n. Version 11.0, p. 6–11, 2022. b. Disponível em: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/be4543f4-6f8e-ec11-0f91-005056a772fd?countryIsoCode=pi>. Acesso em: 20 fev. 2020.

ROS, Helena Salonen; CNATTINGIUS, Sven; LIPWORTH, Loren. Comparison of Risk Factors Preeclampsia and Gestational Hypertension in a Population-based Cohort Study. **American Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 147, n. 11, p. 1062–1070, 1998.

SAFTLAS, Audrey F.; LEVINE, Richard J.; KLEBANOFF, Mark A.; MARTZ, Karen L.; EWELL, Marian G.; MORRIS, Cynthia D.; SIBAI, Baha M. Abortion, changed paternity, and risk of preeclampsia in nulliparous women. **American Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 157, n. 12, p. 1108–1114, 2003.

SAMMOUR, M. B.; EL-KABARITY, H.; FAWZY, M. M.; SCHINDLER, A. E. WHO Recommendations for prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, [s.l: s.n.]. v. 97, p. 1-37, 2011.

SAN JUAN-REYES, Sindy; GÓMEZ-OLIVÁN, Leobardo Manuel; ISLAS-FLORES, Hariz; DUBLÁN-GARCÍA, Octavio. Oxidative stress in pregnancy complicated by preeclampsia. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 681, p. 108255, 2020.

SANTIMONE, Iolanda *et al.* White blood cell count, sex and age are major determinants of heterogeneity of platelet indices in an adult general population: Results from the MOLI-SANI project. **Haematologica**, [S. l.], v. 96, n. 8, p. 1180–1188, 2011.

SATO, Yukiyasu; FUJIWARA, Hiroshi; KONISHI, Ikuko. Role of platelets in placentation.

Medical Molecular Morphology, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 129–133, 2010.

SAY, Lale; CHOU, Doris; GEMMILL, Alison; TUNÇALP, Özge; MOLLER, Ann Beth; DANIELS, Jane; GÜLMEZOĞLU, A. Metin; TEMMERMAN, Marleen; ALKEMA, Leontine. Global causes of maternal death: A WHO systematic analysis. **The Lancet Global Health**, [S. l.], v. 2, n. 6, p. 323–333, 2014.

SCHOORL, Margreet; SCHOORL, Marianne; OOMES, Jeanette; VAN PELT, Johannes. New fluorescent method (PLT-F) on sysmex XN2000 hematology analyzer achieved higher accuracy in low platelet counting. **American Journal of Clinical Pathology**, [S. l.], v. 140, n. 4, p. 495–499, 2013.

SEBASTIÃO, Mariana Mioti *et al.* Análise de impacto orçamentário do uso da razão dos testes sFlt-1: PlGF na exclusão de pré-eclâmpsia em mulheres com suspeita clínica na perspectiva do sistema de saúde suplementar. **J. bras. econ. saúde (Impr.)**, p. 244–254, 2019.

SEGAL, Jodi B.; MOLITERNO, Alison R. Platelet counts differ by sex, ethnicity, and age in the United States. **Annals of Epidemiology**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 123–130, 2006.

SHAHGHEIBI, Shole; MARDANI, Roya; BABAEI, Erfan; MARDANI, Parastoo; REZAIE, Masomeh; FARHADIFAR, Fariba; ROSHANI, Daem; NAQSHBANDI, Mobin; JALILI, Ali. Platelet indices and CXCL12 levels in patients with intrauterine growth restriction. **International Journal of Women's Health**, [S. l.], v. 12, p. 307–312, 2020. DOI:

SHEN, Minxue; SMITH, Graeme N.; RODGER, Marc; WHITE, Ruth Rennicks; WALKER, Mark C.; WEN, Shi Wu. Comparison of risk factors and outcomes of gestational hypertension and pre-eclampsia. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 1–13, 2017.

SHILPA GOPAL REDDY, Chinaiah Subramanyam Babu Rajendra Prasad. Significance of platelet indices as severity marker in nonthrombocytopenic preeclampsia cases. **Journal of Laboratory Physicians**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 186–191, 2019.

SHIOZAKI, Arihiro; MATSUDA, Yoshio; SATOH, Shoji; SAITO, Shigeru. Comparison of risk factors for gestational hypertension and preeclampsia in Japanese singleton pregnancies. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 492–499, 2013.

SIBAI, Baha M.; STELLA, Caroline L. Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 200, n. 5, p. 481.e1–481.e7, 2009.

SINGH, Abha; VARMA, Ruchi. Role of Platelet Distribution Width (PDW) and Plateletcrit in the Assessment of Nonthrombocytopenic Preeclampsia and Eclampsia. **Journal of Obstetrics and Gynecology of India**, [S. l.], v. 68, n. 4, p. 289–293, 2018.

SITOTAW, Chomaw; ASRIE, Fikir; MELKU, Mulugeta. Evaluation of platelet and white cell parameters among pregnant women with Preeclampsia in Gondar, Northwest Ethiopia: A comparative cross-sectional study. **Pregnancy Hypertension**, [S. l.], v. 13, n.

STEPAN, Holger; HUND, Martin; ANDRACZEK, Theresa. Combining biomarkers to predict pregnancy complications and redefine preeclampsia the angiogenic-placental

syndrome. **Hypertension**, [S. l.], v. 75, p. 918–926, 2020.

SUTTON, Amelia L. M.; HARPER, Lorie M.; TITA, Alan T. N. Hypertensive Disorders in Pregnancy. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 333–347, 2018.

SYSMEX CORPORATION. XN series (XN-1000) - Instructions for use. [S. l.], n. May, 434 p. 2014.

TESFAY, Feven; NEGASH, Mikias; ALEMU, Jemal; YAHYA, Mohammedtahir; TEKLU, Gebre; YIBRAH, Meseret; ASFAW, Tsegay; TSEGAYE, Aster. Role of platelet parameters in early detection and prediction of severity of preeclampsia: A comparative cross-sectional study at Ayder comprehensive specialized and Mekelle general hospitals, Mekelle, Tigray, Ethiopia. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 14, n. 11, p. 1–10, 2019.

THALOR, Nitesh; SINGH, Kanika; PUJANI, Mukta; CHAUHAN, Varsha; AGARWAL, Charu; AHUJA, Rashmi. A correlation between platelet indices and preeclampsia. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 129–133, 2019.

TINNAKORN CHAIWORAPONGSA, PIYA CHAEMSAITHONG, LAMI YEO, Roberto Romero. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. **Nat Rev Nephrol**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 466–480, 2014.

ULKUMEN, Burcu Artunc; PALA, Halil Gursoy; CALIK, Esat; KOLTAN, Semra Oruc. Can mean platelet volume and platelet distribution width be possible markers for ectopic pregnancy and tubal rupture? (MPV and PDW in ectopic pregnancy). **Pakistan Journal of Medical Sciences**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 352–355, 2014.

UMESAWA, Mitsumasa; KOBASHI, Gen. Epidemiology of hypertensive disorders in pregnancy: Prevalence, risk factors, predictors and prognosis. **Hypertension Research**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 213–220, 2017.

UMEZULUIKE, Benjamin S.; ANIKWE, Chidebe C.; NNACHI, Oluomachi C.; IWE, Bobbie C. A.; IFEMELUMMA, Chinedu C.; DIMEJESI, Ikechukwu B. O. Correlation of platelet parameters with adverse maternal and neonatal outcomes in severe preeclampsia: A case-control study. **Heliyon**, [S. l.], v. 7, n. 12, p. e08484, 2021. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e08484.

VAGDATLI, E.; GOUNARI, E.; LAZARIDOU, E.; KATSIBOURLIA, E.; SIKOPOULOU, F.; LABRIANOU, I. Platelet distribution width: A simple, practical and specific marker of activation of coagulation. **Hippokratia**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 28–32, 2010.

VALERA, Marie Cecile; PARANT, Olivier; VAYSSIERE, Christophe; ARNAL, Jean François; PAYRASTRE, Bernard. Physiologic and pathologic changes of platelets in pregnancy. **Platelets**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 587–595, 2010.

VÁZQUEZ-SANTIAGO, Miquel; ZIYATDINOV, Andrey; PUJOL-MOIX, Núria; BRUNEL, Helena; MORERA, Agnès; SORIA, José Manuel; SOUTO, Juan Carlos. Age and gender effects on 15 platelet phenotypes in a Spanish population. **Computers in Biology and Medicine**, [S. l.], v. 69, p. 226–233, 2016.

VERDOIA, Monica; NARDIN, Matteo; NEGRO, Federica; TONON, Francesco; GIOSCIA, Rocco; ROLLA, Roberta; DE LUCA, Giuseppe. Impact of aging on immature platelet count and its relationship with coronary artery disease. **Platelets**, [S. l.], v. 00, n. 00, p. 1–9, 2020.

VERLOHREN, Stefan *et al.* An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 202, n. 2, p. 161.e1-161.e11, 2010.

VERLOHREN, Stefan *et al.* New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. **Hypertension**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 346–352, 2014.

VERLOHREN, Stefan *et al.* Clinical interpretation and implementation of the sFlt-1/PlGF ratio in the prediction, diagnosis and management of preeclampsia. **Pregnancy Hypertension**, [S. l.], v. 27, n. August 2021, p. 42–50, 2022.

VEST, Amanda R.; CHO, Leslie S. Hypertension in pregnancy. **Current Atherosclerosis Reports**, [S. l.], v. 16, n. 3, 2014.

WADA, Atsushi; TAKAGI, Yuri; KONO, Mari; MORIKAWA, Takashi. Accuracy of a new platelet count system (PLT-F) depends on the staining property of its reagents. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 1–13, 2015.

WALLE, Muluken; ASRIE, Fikir; GELAW, Yemataw; GETANEH, Zegeye. The role of platelet parameters for the diagnosis of preeclampsia among pregnant women attending at the University of Gondar Comprehensive Specialized Hospital antenatal care unit, Gondar, Ethiopia. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 1–9, 2022.

WALLUKAT, Gerd *et al.* Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 103, n. 7, p. 945–952, 1999.

WANG, Jing; ZHAO, Shengmei; SU, Zhenguo; LIU, Xiangdong. Analytical comparison between two hematological analyzer systems: Mindray BC-5180 vs Sysmex XN-1000. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [S. l.], v. 33, n. 8, p. 1–6, 2019.

WANG, Wei; XIE, Xin; YUAN, Ting; WANG, Yanyan; ZHAO, Fei; ZHOU, Zhangjian; ZHANG, Hao. Epidemiological trends of maternal hypertensive disorders of pregnancy at the global, regional, and national levels: a population-based study. **BMC Pregnancy and Childbirth**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 1–10, 2021.

XIA, Yang; ZHOU, Cissy Chenyi; RAMIN, Susan M.; KELLEMS, Rodney E. Angiotensin Receptors, Autoimmunity, and Preeclampsia. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 179, n. 6, p. 3391–3395, 2007.

YANG, Seung Woo; CHO, Soo Hyun; KWON, Han Sung; SOHN, In Sook; HWANG, Han Sung. Significance of the platelet distribution width as a severity marker for the development of preeclampsia. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, [S. l.], v. 175, n. 1, p. 107–111, 2014.

YU, Kai F.; PH, D.; MAYNARD, Sharon E.; SACHS, Benjamin P.; SIBAI, Baha M.; EPSTEIN, Franklin H.; ROMERO, Roberto; THADHANI, Ravi; KARUMANCHI, S. Ananth. Soluble Endoglin and Other Circulating Antiangiogenic Factors in Preeclampsia. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 355, p. 992-1005, 2006.

ZEISLER, Harald *et al.* Predictive value of the sFlt-1:PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 374, n. 1, p. 13–22, 2016.

ZHANG, Hongyu; LIANG, Ka; KE, Liuhua; TANG, Shifu. Clinical application of red cell distribution width, mean platelet volume, and cancer antigen 125 detection in endometrial cancer. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 1–6, 2020. DOI: 10.1002/jcla.23309.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO CEP-UEPG

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS NAS SÍNDROMES HIPERTENSIVAS GESTACIONAIS

Pesquisador: LAURA MATTANA DIONISIO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 14369319.7.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Ponta Grossa

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.591.154

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa:

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS NAS SÍNDROMES HIPERTENSIVAS GESTACIONAIS.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o comportamento de parâmetros plaquetários nas síndromes hipertensivas gestacionais e outras condições clínicas durante a gestação.

Objetivo Secundário:

Determinar os valores de PLT, PLT-F, PCT, VPM, PDW, P-LCR, IPF# e IPF% em pacientes gestantes. Verificar associação em alterações dos

parâmetros plaquetários com os dados clínicos gerais e a incidência dos desfechos clínicos. Avaliar os parâmetros plaquetários nas condições de

SHG e associá-los com marcadores de ativação plaquetária e expressão de citocinas por meio de citometria de fluxo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Endereço: Continuação do Parecer: 3.591.154; Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvarararas, Bloco M, Sala 116-B

Bairro:

8

Uvarararas

Município: PONTA

(42)3

E-mail:

A presente pesquisa não oferece risco às pacientes envolvidas, uma vez que os resultados dos parâmetros plaquetários são fornecidos

automaticamente durante a realização dos hemogramas pelo analisador hematológico automatizado. A coleta dos dados ficará restrita às pacientes

que tiverem solicitação médica para realização do hemograma, assim, não serão realizadas coletas de sangue adicionais para a realização da pesquisa.

Benefícios:

Com o presente estudo, pretende-se estabelecer o comportamento e a relevância clínica dos parâmetros plaquetários estudados para as SHG. Por

tratar-se de parâmetros que não implicam em custo ou risco adicional às pacientes, tais marcadores apresentam-se vantajosos como ferramenta de

manejo clínico no âmbito das SHG. Espera-se ainda que estes parâmetros possam ser incluídos em estratégias futuras para o desenvolvimento de

scores para diagnóstico, estratificação de risco, acompanhamento e prognóstico das SHG.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa é um estudo observacional transversal, no qual serão incluídas pacientes do sexo feminino, gestantes, atendidas no do

Hospital Universitário Regional dos Campos Gerais nos setores de ambulatório, Pronto Atendimento obstetrícia e Clínica Obstétrica. Serão coletados

dados provenientes dos hemogramas solicitados nos setores PA obstetrícia e Clínica Obstétrica do HURCG.

Serão coletados dados de

aproximadamente 1000 pacientes durante um período de 18 meses.

Nos prontuários disponíveis no sistema GSUS (<http://www.gsus.saude.pr.gov.br>) serão coletados dados clínicos gerais como idade materna (IM),

idade gestacional (IG), número de gestações (G), número de partos normais (P), número de cesáreas (C) e número de abortos (A). Também serão

coletados dados clínicos considerando os desfechos: aborto, trabalho de parto prematuro, óbito da gestante,

SHG, eventos

trombo hemorrágicos e

óbito do recém nascido.

Serão realizados hemogramas no analisador hematológico Sysmex XN-1000 (SYSMEX, Kobe, Japão) do Laboratório de Análises Clínicas do HURCG, e serão avaliados os seguintes parâmetros: WBC, RBC, HB, HCT, VCM, CHCM, PLT, RDW, PLT-F, PCT, VPM, PDW, P-LCR, IPF# e IPF%.

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 116-B

Bairro:

8

Uvaranas

Município: PONTA

(42)3

E-mail:

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em anexo e de acordo com as normas 466/2012 e 510/2016

Recomendações:

Enviar o relatório final ao término do projeto por Notificação via Plataforma Brasil para evitar pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	A rq uiv o	P ostagem	A uto r	ituação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASI CAS_DO_P ROJETO_1345458.pdf	15 /07/2019 1 3:34:54		ceito
Folha de Rosto	FOLHA.pdf	04 /06/2019 1 6:23:53	LAURA MATTANA DIONISIO	ceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOPBRASIL.docx	09 /05/2019 2 3:54:33	LAURA MATTANA DIONISIO	ceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	aprovacaohu.pdf	09 /05/2019 2 3:07:02	LAURA MATTANA DIONISIO	ceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

NãoPONTA GROSSA, 22 de Setembro de 2019

Assinado por: ULISSES COELHO

(Coordenador(a))

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvarararas, Bloco M, Sala 116-B

Bairro: 8

Uvarararas - **Município:** PONTA

(42)3

E-mail:

ANEXO B – APOIO FINANCEIRO

INVESTIGATOR INITIATED STUDY AGREEMENT
“PLATELET PARAMETERS IN PREGNANCY HYPERTENSIVE
DISORDERS”

between

Roche Diagnostics International Ltd
Forrenstrasse 2
6343 Rotkreuz
Switzerland

– “**ROCHE**” –

and

Universidade Estadual de Ponta Grossa
Campus Central - Praça Santos Andrade, 01 - Centro
Ponta Grossa - PR, CEP 84010-330
Brazil

– “**INSTITUTION**” –

each hereafter referred to individually as a “**Party**” and together as the “**Parties**”

- WHEREAS,** INSTITUTION through its employee Dr. Laura Mattana Dionisio (“**INVESTIGATOR**”) has proposed and wishes to conduct certain research according to the protocol “Platelet parameters in pregnancy hypertensive disorders” (“**Study**”) attached as **Exhibit 1** to this Investigator Initiated Study Agreement (“**Agreement**”);
- WHEREAS,** INSTITUTION is the sponsor of the Study, meaning that the design and performance of the Study lies in the exclusive responsibility of the INSTITUTION.
- WHEREAS,** ROCHE desires to support the Study as set forth herein and INSTITUTION agrees to grant ROCHE certain rights to the data and the results generated under the Study as provided for herein;
- THEREFORE,** the Parties agree as follows:

1. CONDUCT OF THE STUDY

- 1.1 Conduct of the Study. INSTITUTION is the sponsor of the Study. INVESTIGATOR will conduct the Study under the supervision and responsibility of the INSTITUTION. INSTITUTION will use its reasonable efforts to complete the Study by March 31, 2022. In case of any anticipated delay in the completion of the Study, INSTITUTION will provide ROCHE written notice 60 (sixty) days prior to the original Study completion date. INSTITUTION will ensure that all individuals involved in conducting the Study are appropriately qualified and trained and made aware of the obligations contained in this Agreement.
- 1.2 Investigator. INVESTIGATOR is an employee of INSTITUTION and will be responsible for performing the Study and directly supervising any individual performing any part of the Study. INSTITUTION shall inform ROCHE at least 30 (thirty) days in advance of any change regarding INVESTIGATOR’s employment or role insofar as this change may have an impact on the conduct of the Study and/or the fulfillment of any rights and obligations under this Agreement.
- 1.3 Compliance. INSTITUTION agrees to comply with this Agreement, the protocol, the requirements of the appropriate Ethics Committee/Institutional Review Board in connection with the Study, and all applicable local, national, and international laws and regulations, including but not limited to data protection laws and patient confidentiality laws. In case of any discrepancy between this Agreement and the protocol, the Agreement will prevail.

- 1.4 Ethics Committee / Institutional Review Board Approval. INSTITUTION shall be responsible for obtaining and maintaining all approvals for the conduct of the Study from an independent Ethics Committee/Institutional Review Board and the relevant local authorities in accordance with local laws and regulations, before commencement of any Study procedure. INSTITUTION will provide copies of all such approvals to ROCHE.
- 1.5 Subject Information / Informed Consent. INSTITUTION shall ensure that written informed consent will be obtained from each subject or subject's legal representative enrolling in the Study (“**Study Subject**”) prior to commencement of any Study procedures.
- 1.6 Study Documentation. INSTITUTION will maintain written records, notes, reports and data related to the Study. INSTITUTION shall keep all documents and records related to the Study in a secure place as required by local laws.
- 1.7 Restrictions on Charging. INSTITUTION will not charge any Study Subject or third party payer for the Products or for other services forming part of the Study.
- 1.8 Insurance. INSTITUTION represents that it has and will maintain at its own expense appropriate insurance for all risks reasonably associated with the conduct of the Study.

2. ROCHE SUPPORT

- 2.1 Roche’s Role. ROCHE’s support for the Study is strictly limited to that set forth herein. For the avoidance of doubt nothing contained in this Agreement shall imply that ROCHE accepts any responsibility as sponsor of the Study.
- 2.2 Products. Subject to receipt of a copy of the Ethics Committee/Institution Review Board Study approval, ROCHE will support the Study with the products listed in the table below (“**Products**”). The total market value of the Products amounts to BRL 21,000 (twenty one thousand Brazilian Real). The INSTITUTION shall order the Products within the term of the Agreement. Thereafter, unless otherwise agreed by all Parties in written form, ROCHE shall no longer be obliged to provide any Products free of charge.

Product	Article No.	No. of Articles
Sys Wash Elecsys,cobas e	11930346122	2
CleanCell M 2x2 L Elecsys, cobas e	4880293190	2
ProCell Elecsys,cobas e	11662988122	2
CELLCLEAN AUTO	6975445001	1
CELLPACK – DCL	7420005001	1

Product	Article No.	No. of Articles
CELLPACK DFL	6510205001	1
Assay Cup Elecsys ModularE170	11706802001	2
LYSERCELL - WNR	7838000001	1
Assay Tip Elecsys ModularE170	11706799001	2
SULFOLYSER 5L	5406668001	1
LYSERCELL - WDF	7837984001	1
PreciControl Multimarker Elecsys	5341787190	2
FLUOROCCELL - WNR	6510248001	1
FLUOROCCELL PLT	6510299001	1
PLGF CS Elecsys	5144701190	1
sFLT1 CS Elecsys	5109531190	1
PLGF Elecsys cobas e 100	5144671190	1
sFLT1 Elecsys cobas e 100	5109523190	1

2.3 Shipment of Products. INSTITUTION will place the orders for the Products with ROCHE. Products will be shipped by the ROCHE Affiliate local to the INSTITUTION or the study site which was nominated by the INSTITUTION.

2.4 Use and Return of Products. All Products provided for the Study will be used solely for the purposes described in the protocol and for no other purpose. Any unused Products will be returned to ROCHE at ROCHE's expense upon the completion of the Study, unless otherwise agreed or otherwise required by law.

3. STUDY DATA, FINAL STUDY REPORT & MANUSCRIPT FOR PUBLICATION

3.1 Study Data. Any Study data generated by INSTITUTION (“**Study Data**”) shall be owned by the INSTITUTION.

3.2 Final Study Report. At the conclusion of the Study, INSTITUTION will submit to ROCHE a final Study report (“**Final Study Report**”). The Final Study Report shall comply with the commonly accepted formats and standards and shall contain comprehensible and

scientifically sound explanations on the Study design, the applied treatments and the medical and scientific knowledge gained from the Study. The Final Study Report shall only contain anonymized health-related data and shall be provided to ROCHE not later than 90 (ninety) days after completion of the Study. Before the first publication of the Study Data by the INSTITUTION, ROCHE may use the Final Study Report for internal purposes only. After the first submission for publication of the Study Data by the INSTITUTION, ROCHE may use the Final Study Report for any and all purposes, including but not limited to, research and development or future regulatory submissions.

- 3.3 Manuscript for Publication. A manuscript for publication shall be submitted to ROCHE for review not later than 180 (one hundred and eighty) days after completion of the Study.

4. PUBLICATION AND NAME

- 4.1 International Guidelines, Information, Submission. Any publications relating to the Study, including but not limited to publications, dissertations, lectures, and scientific posters, (“**Publication**”) shall comply with applicable laws and guidelines, for example the Good Publication Practice guideline (“**GPP**”) and the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (“**ICMJE**”) in its most current versions. In the event of any intended Publication, INSTITUTION shall safeguard intellectual property rights and provide to ROCHE the manuscript in its near final form at least 3 (three) months prior to submission to obtain ROCHE’s scientific check as well as to coordinate with ROCHE the date of publication in order to preclude any preliminary publication which may be detrimental to the novelty of any proposed patent application. For clarification, nothing contained herein shall limit the authors’ responsibility for content, accuracy, and completeness of the Publication and the authors’ right to take final decisions on the content.
- 4.2 Disclosure. ROCHE’s support of the Study shall be disclosed in any Publication, as required by applicable laws, regulations, codes, and guidelines.

5. INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

- 5.1 Pre-Existing Intellectual Property. Each Party shall reserve and retain full title and rights to any pre-existing intellectual property.
- 5.2 Disclosure. INSTITUTION will promptly disclose exclusively to ROCHE any discovery, invention, know-how and development resulting from performance of the Study (“**Study IP**”). In the event that any patent filing based on Study IP is planned, INSTITUTION shall ensure that all relevant Study IP is not published before the filing date of the respective patent application to avoid jeopardizing any such patent filing by the creation of prior art. Publishing in this respect includes, but shall not be limited to, sharing abstracts, posters,

presentations, lectures, roundtables and advisory board meetings, conversations with 3rd parties not involved in this Agreement, and manuscripts.

- 5.3 Ownership of Study IP. Any Study IP will be owned by INSTITUTION. INSTITUTION hereby grants to ROCHE a non-exclusive, royalty-free, worldwide, license to Study IP for ROCHE's and its Affiliates' use in all fields. INSTITUTION will ensure that all individuals working on the Study have assigned to INSTITUTION their rights to any Study IP.
- 5.4 Filing and Maintenance. In the event that INSTITUTION wishes not to file or wishes to abandon any patent or patent application relating to Study IP in a certain country or region, INSTITUTION shall notify ROCHE hereof in writing in due time, i.e. at least 3 (three) months prior to the respective deadline for national or regional patent filing or patent maintenance. ROCHE shall have the right, but not the obligation, to file in ROCHE's name or to take over such patent rights in such country or region at ROCHE's sole discretion and at ROCHE's sole expense. In case ROCHE files for or takes over any patent application or patent relating to Study IP, INSTITUTION shall retain the right to use Study IP for its own research purposes.

6. CONFIDENTIALITY

- 6.1 Confidentiality. This Agreement and the terms and conditions hereof as well as all information obtained in connection with this Agreement are confidential and neither Party shall, without the prior written permission of the disclosing Party, disclose the same to any third party except to the extent this may be required by applicable law or as necessary for the conduct of the Study. Affiliates of both Parties shall not be considered third parties for the purposes of this Agreement.

“**Affiliates**” shall mean (a) an organization, which directly or indirectly controls a Party to this Agreement; (b) an organization, which is directly or indirectly controlled by a Party to this Agreement; (c) an organization, which is controlled, directly or indirectly, by the ultimate parent company of a Party to this Agreement. Control as per (a) to (c) is defined as owning more than fifty percent of the voting stock of a company or having otherwise the power to govern the financial and the operating policies or to appoint the management of an organization. With respect to ROCHE, the term “Affiliates” shall not include Chugai Pharmaceutical Co., Ltd, 1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo, 103-8324, Japan (“**Chugai**”) and its respective subsidiaries, unless ROCHE opts for an inclusion of Chugai and/or its respective subsidiaries by giving written notice to the INSTITUTION.

- 6.2 Exclusions. The obligations of confidentiality set out herein shall not apply to confidential information that (a) was in receiving Party's possession prior to disclosure by the disclosing Party; (b) is or later becomes, through no fault of receiving Party, publicly available; (c) is rightfully received by receiving Party from a third party without a duty of confidentiality; (d) is independently developed by employees, agents, vendors, consultants, distributors,

partners or Affiliates of receiving Party; or (e) is required to be disclosed by law or pursuant to a judicial or governmental order.

7. TERM AND TERMINATION

- 7.1 Term. This Agreement shall enter into effect on the date of the last signature by the Parties (“**Effective Date**”) and will continue in force until March 31, 2023 unless terminated earlier.
- 7.2 Termination for Convenience. ROCHE may terminate this Agreement for any reason upon 30 (thirty) days prior written notice.
- 7.3 Termination for Material Breach. Either Party may terminate this Agreement immediately by written notice in the event of any material breach of this Agreement by the other Party if such breach is not cured within 30 (thirty) days after the non-breaching Party delivers notice of such breach to the breaching Party.
- 7.4 Termination for Bankruptcy. Either Party may terminate this Agreement immediately by written notice in the event the other Party makes a general assignment for the benefit of its creditors, a petition in bankruptcy is filed by or against such other Party or a receiver is appointed on account of such other Party’s insolvency or events analogous to the foregoing occur.
- 7.5 Effect of Termination. Upon termination of this Agreement any Product and other materials supplied hereunder which are not used prior to termination of this Agreement will be returned to ROCHE or its designee unless otherwise instructed in writing by ROCHE.
- 7.6 Continuing Obligations. The provisions of Section 4 (Publication and Name), Section 5 (Intellectual Property), Section 6 (Confidentiality), Section 8 (Indemnification), Section 10 (General Provisions) and Section 11 (Governing Law and Jurisdiction) of this Agreement will survive any termination of this Agreement.

8. INDEMNIFICATION

- 8.1 Indemnification by Institution. INSTITUTION will indemnify ROCHE and its Affiliates, employees and agents from and against all losses, expenses, claims, actions, lawsuits and judgments thereon (including reasonable attorney fees), arising out of or in connection with the Study to the extent such losses, expenses, claims, actions, law suits and judgments thereon are not the direct result of a defect in the Product.
- 8.2 Indemnification by Roche. ROCHE will indemnify INSTITUTION and its employees and agents from and against all losses, expenses, claims, actions, law suits and judgments thereon (including reasonable attorney fees), directly arising out of a defect in the Product provided that (i) the Study was conducted in accordance with this Agreement and the

protocol, and (ii) that such claims, demands or judgments do not arise, in whole or in part, from the negligent or willful acts or omissions or any misuse of the Product.

9. ADVERSE EVENT

9.1 Adverse Event Reporting. INSTITUTION shall report all Adverse Events, Adverse Device Effects, Incidents, complaints or inquiries to the local competent authorities as required under applicable laws and regulations and in accordance with the protocol. INSTITUTION shall provide a copy of each such report – insofar as it relates to a Product - to ROCHE within 3 (three) business days to the following address: *Roche Diagnostica Brasil Ltda., Avenida Engenheiro Billings 1729, Sao Paulo 05321-900, Brazil, contact person: Paula Bresciani, email. paula.bresciani@roche.com, phone: +55 11 3719-8511*. INSTITUTION agrees to cooperate and provide additional information requested by ROCHE to enable ROCHE to meet its independent reporting obligations.

9.2 Definitions. For the purposes of this section 9, the following terms shall have the following meanings:

- (a) “**Adverse Events**” shall mean any untoward medical occurrence, unintended disease or injury or any untoward clinical signs (including an abnormal laboratory finding) in subjects, users or other persons whether or not related to the investigational medical device (MEDDEV).
- (b) “**Adverse Device Effect**” shall mean any adverse event related to the use of an investigational medical device. This includes any adverse event resulting from insufficiencies or inadequacies in the instructions for use, the deployment, the implantation, the installation, the operation, or any malfunction of the investigational medical device. This includes any event that is a result of use error or intentional misuse (MEDDEV).
- (c) “**Incident**” shall mean any malfunction or deterioration in the characteristics and/or performance of a device, as well as any inadequacy in the labeling or the instructions for use which, directly or indirectly, might lead to or might have led to the death of a patient, or user or of other persons or to a serious deterioration in their state of health.

10. GENERAL PROVISIONS

10.1 Poster Presenter. In the event that INVESTIGATOR attends third party organized educational conferences as a research poster presenter for ROCHE (“**Poster Presenter**”), ROCHE herewith agrees to support the INVESTIGATOR with a grant. The details of such support shall be agreed upon in a separate speaker agreement between the INVESTIGATOR and ROCHE. The foregoing is subject to the following cumulative requirements: i) the INVESTIGATOR is selected as a Poster Presenter for ROCHE, ii) the selection of the Poster

Presenter is done independently by the third party organizer of the event, and iii) ROCHE is not directly involved in the selection of the INVESTIGATOR who will benefit from the aforementioned support.

- 10.2 GDPR Compliance. Each Party will comply with all applicable laws and regulation governing the processing of personal data as such terms are defined in Regulation (EU) 2016/679 in relation to the performance of its obligations under this Agreement and the conduct of the Study.
- 10.3 Assignment. INSTITUTION may not assign its rights nor delegate its obligations under this Agreement without the prior written consent of ROCHE. ROCHE is entitled to transfer its rights and obligations hereunder in whole or in part to any of its Affiliates.
- 10.4 Modifications. No modifications or changes to this Agreement, including the scope and term of the Study and/or any Exhibit, shall be effective unless set forth in a written amendment and signed by ROCHE and INSTITUTION.
- 10.5 Confidentiality Agreement. Upon execution, all confidential information disclosed under any previous confidentiality agreement between INSTITUTION and ROCHE relating to the same subject matter as covered by Study, shall be governed by this Agreement superseding such prior agreement.
- 10.6 No Inducement. The Parties acknowledge and agree that INSTITUTION shall continue to make all decisions regarding treatment, prescribing decisions or purchasing decisions (including prescribing and purchasing Roche products) solely in accordance with independent medical and clinical judgment and that such decisions shall not be affected by this Agreement, the payments made hereunder or the relationship created hereby. The Parties also acknowledge and agree that the support received by the INSTITUTION under this Agreement is not intended to require, induce or in any way influence INSTITUTION to prescribe, promote, recommend, purchase or require the use of any Roche product.
- 10.7 Compliance. INSTITUTION and INVESTIGATOR recognize that it is the policy of ROCHE to comply with all applicable laws, regulations, permits, consent orders and applicable industry codes and to act in a proper and ethical manner.
- 10.8 Disclosure. INSTITUTION understands and agrees that, pursuant to legal obligation or generally applicable policy, ROCHE may disclose the financial relationship between ROCHE and INSTITUTION, including any compensation or other transfer of value under this Agreement, and does not object to any such disclosure required by law or policy. INSTITUTION may disclose only the terms or existence of this Agreement as required by law and after prior written notice to ROCHE.

- 10.9 Access. For the purpose of determining compliance with this Agreement, INSTITUTION agrees to allow ROCHE access to INSTITUTION's financial records and/or records relating to the use of the Products, as applicable, upon reasonable prior notice.
- 10.10 Contact Person at Roche. CPS Global IIS Team, global.ctrp_cps@roche.com.
- 10.11 Notices. Notices under this Agreement will be given by personal delivery, registered mail, or courier service to the address designated below:

If to ROCHE:

Roche Diagnostics International Ltd
 Centralised and PoC Solutions
 Medical Affairs - Investigator Initiated Studies
 Forrenstrasse 2
 6343 Rotkreuz
 Switzerland

If to INSTITUTION:

Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Campus Central - Praça Santos Andrade, 01 - Centro
 Attn: Dr. Laura Mattana Dionisio
 Ponta Grossa - PR, CEP 84010-330
 Brazil

- 10.12 Severability. If any part or any provision of this Agreement proves to any extent to be invalid, illegal or unenforceable in law, the remainder of such provision and all other provisions of this Agreement shall remain valid and enforceable to the fullest extent permissible by law and regulation and such provision shall be deemed to be omitted from this Agreement to the extent of such invalidity, illegality or unenforceability. The remainder of this Agreement shall continue in full force and effect and the Parties shall negotiate in good faith to replace the invalid, illegal or unenforceable provision with a valid, legal and enforceable provision which has an effect as close as possible to the provision or terms being replaced. The corresponding shall apply in the event of an omission.
- 10.13 Signatures. This Agreement may be executed by the Parties hereto in separate counterparts, each of which when so executed and delivered shall be deemed an original, but all such counterparts shall together constitute one and the same agreement. The Parties agree that execution of this Agreement by exchanging facsimile, PDF, or Electronic Signature (as defined below) shall have the same legal force and effect as the exchange of original

signatures. Pursuant to this Agreement, Electronic Signatures shall mean a signature that consists of one or more letters, characters, numbers or other symbols in digital form incorporated in, attached to or associated with the electronic document, such as electronic signatures as required by Regulation (EU) 910/2014.

11. GOVERNING LAW AND JURISDICTION

This Agreement shall be governed and construed in accordance with the laws of Switzerland, excluding conflict of laws' principles. Both Parties agree to use good faith efforts to settle as promptly as possible any and all disputes arising from this Agreement. In the event that such efforts are not successful the Parties agree to the exclusive jurisdiction of the competent courts in Zug, Switzerland, to the exclusion of any other jurisdiction or arbitration.

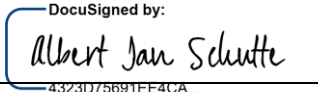
IN WITNESS THEREOF, the Parties caused this Agreement to be executed by their duly authorized representatives:

Rotkreuz, 18-Mar-2021
(Date)

Ponta Grossa, 19-mar-2021
(Date)

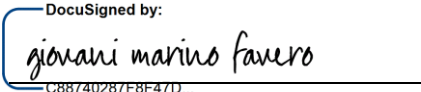
Roche Diagnostics International Ltd

Universidade Estadual de Ponta Grossa

Signature: ppa  4323D75691EE4CA...

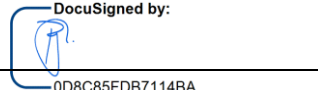
Name: Albert Jan Schutte

Title: Global Head MSA Medical
Affairs CPS

Signature:  C88740287F8F47D...

Name: giovani marino favero

Title: _____

Signature: ppa  0D8C85FDB7114BA...

Name: Raima Sherifoska

Title: Legal Counsel

Signature: _____

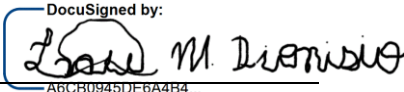
Name: _____

Title: _____

Ponta Grossa, 19-mar-2021
(Date)

Agreed and acknowledged:

INVESTIGATOR

Signature:  A6CB0945DE6A4B4...

Name: Dr. Laura Mattana Dionisio

Title: _____

EXHIBIT 1**Final Research Protocol****Version 01, dated February 2019**

STUDY PROTOCOL TEMPLATE

INSTRUCTIONS:

- Explanations to the corresponding sections are provided in black.
- Proposed *text in green/italics* is provided for your consideration
- Depending on study design, not all sections may apply.
- Content has to be in compliance with local legal and regulatory requirements.
- A study synopsis may be inserted but is not mandatory.

General information	
Full study title and acronym	• “Platelet parameters in pregnancy hypertensive disorders” • Version number: 01 (February, 2019).
Name and contact details of principal investigator	Name: Laura Mattana Dionisio e-mail: mattana.laura@gmail.com telephone: +55 41 99905-4105 Mailing address: Rua Nicolau Florenzano, 356, Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná, Brazil. ZIP CODE: 84031120 
Study duration	• This study started at 03/2019. The estimated date for the end of the study is 03/2021.
Study sites	• The study will take place at the Clinical Laboratory of Hospital Universitário Regional dos Campos Gerais, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.
1. Introduction, study rationale and study objective(s)	
Introduction and rationale	• According to the World Health Organization (2011), hypertensive gestational syndromes are the second main cause of death in pregnant women. Hypertensive gestational syndromes are classified into five groups: chronic hypertension, gestational hypertension without proteinuria, preeclampsia, eclampsia and HELLP syndrome

	(BRASIL, 2012). This group of diseases affect about 10% of all pregnant women around the world (WHO, 2011). These conditions show considerable correlation with infant morbidity and mortality. The physiopathology of this syndromes, especially of preeclampsia, concerns several processes like, synthesis and release of proinflammatory cytokines, oxidative stress, endothelial dysfunction and platelet activation (BURTON, 2011; REDMAN & SARGENT, 2003; REDMAN et al 1999; CHAIWORAPONGSA et al, 2014; KOHLI et al, 2016) • The platelet parameters provided by the new hematologic analyzers seem to be altered pregnant women with hypertensive disorders, differently than the normotensive pregnancies (. Thus, these parameters may show clinical usefulness for the diagnosis and monitoring of pregnancy hypertensive disorders (SITOTAWA et al, 2018). • Therefore, this study has the aim to assess the impact of pregnancy hypertensive disorders in platelet parameters, and correlate these parameters with serological biomarkers of preeclampsia. • Platelet parameters will be determined at maximum two hours after sample taking in EDTA anticoagulated whole blood on the Sysmex platform XN-1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). The analyzer cited above is already in our institution. • For the analysis of the comparison, the Roche's assays Elecsys PIGF (REF 0514467) and Elecsys sFlt-1 (REF 05109523190) will be used as biomarkers of preeclampsia.
Study objective(s)	• Primary objective: This study has the aim to assess the impact of pregnancy hypertensive disorders in platelet parameters. • Secondary objectives: Assess the correlation of platelet parameters and the serological biomarkers of preeclampsia.
2. Investigational material	
Investigational material and comparator product(s)	• Roche assays: Elecsys PIGF and Elecsys sFlt-1. • Roche instrument: Cobas e411 • Platelet parameters: Sysmex XN-1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) • The analyzers cited above are already in our institution.
3. Study population	

Recruitment, enrollment period, and sample size	• For the serological analysis for correlation studies, approximately 80 subjects will be recruited (40 control and 40 hypertensive disorders group). All patient with matches the inclusion criteria and has a medical requirement for a hemogram and any immunochemical analysis (serum samples) will be included in the study. No additional blood withdrawal will be necessary for this study. The 80 sample number will be reached approximately in six months. • For the platelet parameters, the data collection is already in process. All patient that matches the inclusion criteria and has a medical requirement for a hemogram is included in the study. The strength of the association between each of the platelet indices and the biomarkers for preeclampsia will be estimated using the Pearson correlation coefficient (r). • For the platelet parameters, the descriptive statistics will be presented as means $\pm$ standard deviation. The between-group differences will be determined using Mann-Whitney's U test. • To estimate the sensitivity value of the platelet parameters as severity markers of pregnancy hypertensive disorders, receiver operating characteristic (ROC) analysis will be performed. • Study groups for evaluation: For the serological analysis for correlation studies, approximately 80 subjects will be recruited (40 control group and 40 preeclampsia group). For the platelet parameters studies, approximately 500 subjects will be recruited (165 patients for each group: control, pregnancy hypertension and preeclampsia). The n for the platelet parameters group is substantially greater than the correlation studies because the platelet indices are the primary objective of this study. • The number of 500 samples will be reached approximately in six months.
Inclusion criteria	• Pregnant women with pregnancy hypertensive disorder diagnosis and healthy pregnant women.
Exclusion criteria	• The exclusion criteria are the use of antibiotics, use of anticoagulants, infectious diseases, smoking, multiple pregnancies, ectopic pregnancies, and pregnancies with embryonic structural malformations.
4. Study design and study procedure	
Study design	• This is a clinical utility study for platelet parameters in pregnancy hypertensive disorders. This is a monocentric

	study, with a control group of healthy pregnancies, a group for preeclampsia, and a group for gestational hypertension.
Study procedure	• Patients: Pregnant women that attended the Hospital Universitario Regional dos Campos Gerais, that matches the inclusion criteria and without any exclusion criteria cited above will be included in this study. • Samples: The samples withdrawal will be performed only for patients with a medical requirement for a hemogram and any immunochemical analysis (serum samples). No additional blood withdraw will be necessary for this study. No additional cost will be implied for the platelet parameters analysis. Blood samples will be collected in tubes containing EDTA (2mL for hemogram) and in tubes without an anticoagulant (5 mL for immunochemical analysis). The serum samples will be obtained by centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes within 1 hour after phlebotomy. Serums will be separated and kept in a new microtube, labelled and kept at -20 °C until the test. • Platelet parameters: PLT-I (impedance count), PLT-F (fluorescence count), MPV (mean platelet volume), PDW (platelet distribution width), PCT (plateletcrit), P-LCR (platelets >12 fL) and IPF (immature platelet fraction) will be determined on the Sysmex platform XN-1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). The analyzer and reagents for the platelet parameters are already in our institution. • Biomarkers of preeclampsia: The Roche's assays Elecsys PIGF and Elecsys sFlt-1 will be used as biomarkers of preeclampsia on the analyzer Cobas e411 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The analyzer cited above is already in our institution.
5. Statistics	
Primary and secondary endpoint(s)	• The outcome of this study is a complete analysis of the behaviour of platelet parameters in pregnancy hypertensive disorders, including its clinical sensitivity and correlation with serological biomarkers of preeclampsia.
Statistical methods	• The strength of the association between each of the platelet indices and the biomarkers for preeclampsia (sFlt-1 and PIGF) will be estimated using the Pearson correlation coefficient (r).

	• For the platelet parameters, the descriptive statistics will be presented as means $\pm$ standard deviation. The between-group differences will be determined using Mann-Whitney's U test. • To estimate the sensitivity value of the platelet parameters as severity markers of pregnancy hypertensive disorders, receiver operating characteristic (ROC) analysis will be performed. • Study groups for evaluation: For the serological analysis for correlation studies, approximately 80 subjects will be recruited (40 control group and 40 preeclampsia group). For the platelet parameters studies, approximately 500 subjects will be recruited (165 patients for each group: control, pregnancy hypertension and preeclampsia).
Sample size, level of significance, and power	• We performed the sample size calculation considering the platelet count and PDW as primary outcomes with samples from three groups of patients: control, preeclampsia and pregnancy hypertension. We performed a preliminary analysis of 45 samples (n=15 per group) from the sample universe. The platelet count (PLT-I) showed a standard deviation of 38.51 with an effect size of 0.28. Thus, considering a two-tailed model (One Way ANOVA), with a power of 95% and a significance level of 5%, the total sample size would be 195. However, for PDW with the same power and significance level, we obtained a standard deviation of 1.62 and an effect size of 0.24. Thus, the total sample size would be 270. To avoid the eventual sample excluded during the study, we considered the total number of samples for the two parameters, then the final sample size was 465. In a balanced distribution 1:1:1, the sample should be n=155 per group. The calculation was performed with G*Power version 3.1.9.2 sample-size calculating software (http://www.gpower.hhu.de).
6. Safety assessment	
	This study does not offer any potential risk for the patients included, as long as no additional blood withdraw will be necessary.
Definitions	Not applicable.
Classification of AEs/SAEs (if	Not applicable.

appropriate) and AE/SAE recording and reporting	
<i>If applicable: Laboratory abnormalities and other abnormal assessments</i>	Not applicable.
<i>If applicable: Malfunction / incidents and indirect harm reporting</i>	Not applicable.
Follow up of ongoing AEs and SAEs	Not applicable.
Treatment of any AE / SAE	Not applicable.
Assessment of causality (relationship to IVD and indirect harm)	Not applicable.
7. Compliance Statements	
	General requirements: The study will be conducted in compliance with this study protocol. The protocol was approved by the Ethical Research Committee of our institution according to the criteria set by the declaration of Helsinki, under the number of 3.591.154. Any protocol amendments or new or amended information that requires ethical consideration will be submitted for written approval, too. Also, a study report will be submitted to regulatory authorities in line with applicable timelines. Subject insurance: Not applicable. Subject information and informed consent: Not applicable.

	Clinical study results and publication: The results of this clinical utility study will be documented and published in a scientific journal, if possible in a scientific meeting.
8. Data confidentiality and protection	
Data confidentiality and data protection	Auditors, Ethics Committee, and the regulatory authorities will be granted direct access to the subject's medical records to the extent permitted by the applicable law and regulation for verification of clinical study procedures, and/or data control, ensuring subject data confidentiality. The subject's file and the source data will be archived in line with national and international legal requirements.
9. Quality controls and assurance	
Quality controls and quality assurance	The quality control will be performed by the laboratory staff once a day using three levels of control (XN-Check from Sysmex America) and two levels of control (PreciControl, Cobas, Roche Diagnostics), according to the manufacturer's instructions.
10. References	
Literature references	- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Gestação de alto risco: manual técnico / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações programáticas Estratégicas. – 5. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2012. 302 p. - World Health Organization. WHO recommendations for prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. 2011. - BURTON, G. J.; JANIAUX, E. Oxidative stress. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, v. 25, p.287–299, 2011. - REDMAN, C. W. G.; SARGENT, I.L. Pre-eclampsia, the Placenta and the Maternal Systemic Inflammatory Response—A Review. Placenta, v.24, 2003. - REDMAN CW, SACKS GP, SARGENT IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. American journal of obstetrics and gynecology. 1999 Feb 1;180(2):499-506. - CHAIWORAPONGSA T, CHAEMSAITHONG P, YEO L, ROMERO R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. Nature Reviews Nephrology. 2014 Aug;10(8):466-80. - KOHLI, S. et al. Maternal extracellular vesicles and platelets promote preeclampsia through inflammasome activation in embryonic trophoblast. Blood, v.128, 2016. - SITOTAWA, C.; ASRIEB, F.; MELKU, M. Evaluation of platelet and white cell parameters among pregnant women with Preeclampsia in Gondar,

	Northwest Ethiopia: A comparative cross-sectional study. <i>Pregnancy Hypertension</i>, v.13, p. 242–247, 2018. 9. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, Olovsson M, Brennecke SP, Stepan H, Allegranza D, Dilba P. Predictive value of the sFlt-1: PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. <i>N Engl J Med</i>. 2016 Jan 7;374:13-22. 10. XN-Series Instructions for use. SYSMEX Corporation, Kobe, Japan, 2015.
--	---

Certificate Of Completion

Envelope Id: 5ABE4D65F2354B519047854CDE56A960	Status:
CompletedSubject: Please DocuSign: Universidad Estadual Ponta Grossa_Dionisio_Platelet parameters_FINAL.pdf	
Source Envelope:	
Document Pages: 21	Signatures: 4
Certificate Pages: 4	Initials: 0
AutoNav: Enabled	
Envelopeld Stamping: Enabled	
Time Zone: (UTC+01:00) Amsterdam, Berlin, Bern, Rome, Stockholm, Vienna	Envelope Originator:
	Enisa Alibasic
	Grenzachstrasse 124
	Basel, Basel-Stadt 4070
	enisa.alibasic@roche.com
	IP Address: 196.3.50.247

Record Tracking

Status: Original	Holder: Enisa Alibasic	Location: DocuSign
3/18/2021 5:20:28 PM	enisa.alibasic@roche.com	

Signer Events

Raima Sherifoska
raima.sherifoska@roche.com
Legal Counsel
SES Joint - Parent_789
Security Level: Email, Account Authentication (None)

Signature

DocuSigned by:

0D8C85FDB7114BA...

Signature Adoption: Uploaded Signature Image
Using IP Address: 84.227.81.246

Timestamp

Sent: 3/18/2021 5:21:27 PM
Viewed: 3/18/2021 6:37:11 PM
Signed: 3/18/2021 6:37:17 PM

Electronic Record and Signature Disclosure:

Accepted: 2/22/2021 12:39:41 PM
ID: dc372771-53cd-4340-9a0a-4fd630d9c2cd
Company Name: F. Hoffmann-La Roche Ltd

Albert Jan Schutte
albert_jan.schutte@roche.com
Head Medical Affairs CPS
Security Level: Email, Account Authentication (None)

DocuSigned by:

4323D75691EE4CA...

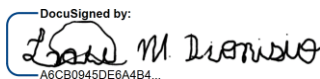
Signature Adoption: Pre-selected Style
Using IP Address: 85.5.105.225

Sent: 3/19/2021 7:00:41 AM
Viewed: 3/19/2021 8:41:44 AM
Signed: 3/19/2021 8:41:56 AM

Electronic Record and Signature Disclosure:

Accepted: 3/19/2021 2:58:23 PM
ID: 0ecf1d87-1245-414c-8397-27645fd5162c
Company Name: F. Hoffmann-La Roche Ltd

Laura Mattana Dionisio
lmdionisio@uepg.br
Security Level: Email, Account Authentication (None)

DocuSigned by:

A6CB0945DE6A4B4...

Signature Adoption: Drawn on Device
Using IP Address: 177.101.17.77

Sent: 3/19/2021 8:42:02 AM
Viewed: 3/19/2021 5:25:54 PM
Signed: 3/19/2021 5:30:21 PM

Electronic Record and Signature Disclosure:

Accepted: 3/19/2021 5:25:54 PM
ID: 66a11a2e-771d-438a-8368-3c9c5760490e
Company Name: F. Hoffmann-La Roche Ltd

giovani marino favero
gmfavero@uepg.br
Security Level: Email, Account Authentication
(None)

DocuSigned by:

C88740287F8F47D...

Signature Adoption: Pre-selected Style
Using IP Address: 138.204.25.54

Sent: 3/19/2021 5:30:26 PM
Viewed: 3/19/2021 6:17:31 PM
Signed: 3/19/2021 6:20:56 PM

Signer Events	Signature	Timestamp
Accepted: 3/19/2021 6:17:31 PM ID: f88f189a-f086-4696-b946-fa516bdfc48b Company Name: F. Hoffmann-La Roche Ltd		

In Person Signer Events	Signature	Timestamp
-------------------------	-----------	-----------

Editor Delivery Events	Status	Timestamp
Sandra Gut sandra.gut@roche.com SES Joint - Parent_789 Security Level: Email, Account Authentication (None)	VIEWED Using IP Address: 196.3.50.247	Sent: 3/18/2021 6:37:22 PM Viewed: 3/19/2021 6:57:42 AM Completed: 3/19/2021 7:00:40 AM

Electronic Record and Signature Disclosure:

Accepted: 2/10/2021 11:35:07 AM
ID: 91be3b28-1ba3-40ef-820b-b4ae86180bc8
Company Name: F. Hoffmann-La Roche Ltd

Agent Delivery Events	Status	Timestamp
-----------------------	--------	-----------

Intermediary Delivery Events	Status	Timestamp
------------------------------	--------	-----------

Certified Delivery Events	Status	Timestamp
---------------------------	--------	-----------

Carbon Copy Events	Status	Timestamp
--------------------	--------	-----------

Polona Levpuscek
polona.levpuscek@roche.com
Security Level: Email, Account Authentication (None)
Sent: 3/19/2021 6:21:03 PM

Electronic Record and Signature Disclosure:

Not Offered via DocuSign

Witness Events	Signature	Timestamp
----------------	-----------	-----------

Notary Events	Signature	Timestamp
---------------	-----------	-----------

Envelope Summary Events	Status	Timestamps
-------------------------	--------	------------

Envelope Sent	Hashed/Encrypted	3/18/2021 5:21:27 PM
Certified Delivered	Security Checked	3/19/2021 6:17:31 PM
Signing Complete	Security Checked	3/19/2021 6:20:56 PM
Completed	Security Checked	3/19/2021 6:21:03 PM

Payment Events	Status	Timestamps
----------------	--------	------------

Electronic Record and Signature Disclosure

Guidelines for the use of the DocuSign electronic signing system within F. Hoffmann-La Roche and companies of the Roche Group

LEGAL DISCLOSURE

By placing my electronic signature on this document, I expressly consent to use and rely on Electronic and Digital Signatures and I understand my signature will have the same binding effect as if I was providing a handwritten signature.

I also confirm the email address that I am using as a valid one to be notified and identified electronically, for example through the DocuSign System, and/or to identify me as the signer of the document. I should inform Roche in the case that the email address changes.

CONSUMER DISCLOSURE

From time to time, F. Hoffmann-La Roche and companies of the Roche Group (hereinafter referred to as we, us or Company) may be required by law to provide to you certain written notices or disclosures. Described below are the terms and conditions for providing to you such notices and disclosures electronically through the DocuSign, Inc. (DocuSign) electronic signing system. Please read the information below carefully and thoroughly, and if you can access this information electronically to your satisfaction and agree to these terms and conditions, please confirm your consent by clicking the 'I agree' button at the bottom of this document.

Consequences of changing your mind

To indicate to us that you are changing your mind, you must withdraw your consent using the DocuSign 'Withdraw Consent' form on the signing page of a DocuSign envelope instead of signing it. This will indicate to us that you have withdrawn your consent to receive required notices and disclosures electronically from us and you will no longer be able to use the DocuSign system to receive required notices and consents electronically from us or to sign electronically documents from us.

All notices and disclosures will be sent to you electronically

Unless you tell us otherwise in accordance with the procedures described herein, we will provide electronically to you through the DocuSign system all required notices, disclosures, authorizations, acknowledgements, and other documents that are required to be provided or made available to you during the course of our relationship with you. To reduce the chance of you inadvertently not receiving any notice or disclosure, we prefer to provide all of the required notices and disclosures to you by the same method and to the same address that you have given us. If you do not agree with this process, please let us know as described below. Please also see the paragraph immediately above that describes the consequences of your electing not to receive delivery of the notices and disclosures electronically from us.

How to contact us

You may contact us to let us know of your changes as to how we may contact you electronically, to request certain information from us and to withdraw your prior consent to receive notices and disclosures electronically. To do so contact the sender of the envelope.

To advise us of your new email address

To let us know of a change in your email address where we should send notices and disclosures electronically to you, you must send an email message to the sender of the envelope and in the body of such request you must state: your previous email address, your new email address. We do not require any other information from you to change your email address. In addition, you must notify DocuSign, Inc. to arrange for your new email address to be reflected in your DocuSign account by following the process for changing email in the DocuSign system.

To withdraw your consent

To inform us that you no longer want to receive future notices and disclosures in electronic format you may decline to sign a document from within your DocuSign session, and on the subsequent page, select the check-box indicating you wish to withdraw your consent.

Acknowledging your access and consent to receive materials electronically

To confirm to us that you can access this information electronically, which will be similar to other electronic notices and disclosures that we will provide to you, please verify that you were able to read this electronic disclosure and that you also were able to print on paper or electronically save this page for your future reference and access or that you were able to email this disclosure and consent to an address where you will be able to print on paper or save it for your future reference and access. Further, if you consent to receiving notices and disclosures exclusively in electronic format on the terms and conditions described above, please let us know by clicking the 'I agree' button below.

By checking the 'I agree' box, I confirm that:

- I can access and read this Electronic CONSENT TO ELECTRONIC RECEIPT OF ELECTRONIC CONSUMER DISCLOSURES document; and
- I can print on paper the disclosure or save or send the disclosure to a place where I can print it, for future reference and access; and
- Until or unless I notify the account owner as described above, I consent to receive from exclusively through electronic means all notices, disclosures, authorizations, acknowledgements, and other documents that are required to be provided or made available to me by the account owner during the course of my relationship with you.
- I acknowledge the information included in the [DocuSign Privacy Policy](#)