

FRAÇÃO DE PLAQUETAS IMATURAS COMO BIOMARCADOR PRECOCE DE SEPSE

Immature platelet fraction as an early sepsis biomarker

Márcia Lopes Segobia^{*1}

¹ Farmacêutica-Bioquímica especialista em citologia clínica e hematologia clínica.

* Correspondência do Autor: (51) 991757381- marcia.segobia@hotmail.com

RESUMO

A sepse é um conjunto de manifestações graves em todo o organismo do hospedeiro em resposta a um microorganismo invasor. A fração de plaquetas imaturas (do inglês *immature platelet fraction - IPF*) é um novo parâmetro obtido na contagem de células do sangue total de alguns contadores hematológicos. Atualmente seu uso é bastante conhecido no diagnóstico de trombocitopenias devido a destruição pelo aumento da atividade megacariopoiética e diminuído na deficiência medular. Novos estudos, porém, demonstram utilidade como biomarcador precoce na detecção do paciente séptico, pois a trombocitopenia ocorre com frequência na sepse. Consequentemente, um marcador que detecta uma queda inicial do número de plaquetas poderia ajudar na identificação de pacientes com risco de coagulopatias severas e no prognóstico nos estágios iniciais da sepse.

Este artigo de revisão visa encontrar estudos clínicos e experimentais que comprovem a eficácia do IPF como biomarcador precoce de sepse. Devido ao alto número de pacientes críticos que desenvolvem algum grau de resposta inflamatória, tendo ou não sepse, é extremamente importante que se descubra uma forma de diagnosticá-los de forma rápida, econômica e segura utilizando-se de apenas um marcador que seja suficiente para detectar os estágios iniciais da sepse.

PALAVRAS-CHAVE

Sepse, plaquetas imaturas, biomarcador, IPF

INTRODUÇÃO

Infecções bacterianas, sepse e choque séptico estão entre os maiores problemas de saúde pública, afetando anualmente milhões de pessoas em todo o mundo ⁽¹⁾, e apesar das melhorias

nos tratamentos e desenvolvimento de vários biomarcadores utilizados para detecção precoce, a sepse permanece sendo uma importante causa de morte, especialmente nas unidades de tratamento intensivo ⁽²⁾. A resposta à sepse é uma corrente complexa de eventos que envolve processos inflamatórios e antiinflamatórios, respostas humorais e celulares e anormalidades no sistema circulatório. O diagnóstico e a gravidade da sepse possuem muitas variáveis não específicas dos sinais e sintomas da sepse contribuindo para um diagnóstico mais difícil. Entretanto, o diagnóstico precoce e a classificação da severidade da sepse é essencial, pois aumenta a possibilidade de um tratamento mais sensível e específico. Os biomarcadores são muito importantes nesse processo, porque podem indicar a presença ou ausência de um quadro mais grave, e podem diferenciar infecções bacterianas de virais e fúngicas e de sepse sistêmica e infecção local. Os biomarcadores também têm um importante papel no prognóstico, na escolha da antibioticoterapia antes mesmo do resultado da cultura estar disponível, na avaliação da resposta à terapia e recuperação da sepse, como preditores de complicações e no desenvolvimento de disfunção de órgãos (coração, rins, fígado, ou múltiplos órgãos). Entretanto o papel exato dos biomarcadores no manejo de paciente sépticos permanece indefinido ^(1,2,3,4).

A sepse é consequência de uma complexa resposta do hospedeiro a um microorganismo invasor. As bactérias invasoras são reconhecidas pelas células do sistema imune inato com consequente liberação de múltiplas citocinas, as quais em conjunto com a ativação de outros sistemas de defesa podem resultar em um quadro clínico conhecido como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) ⁽⁵⁾. A SRIS corresponde a um conjunto de respostas do organismo a determinado agente agressor. Suas manifestações variam de acordo com a idade do indivíduo, estado imunológico, uso de medicações e comorbidades, e tem como sinais: febre ($>38,3^{\circ}\text{C}$) ou hipotermia ($<36^{\circ}\text{C}$), leucocitose ($>12000/\mu\text{l}$), leucopenia ($< 4000/\mu\text{l}$), contagem normal de leucócitos com mais de 10% de formas imaturas, taquicardia (>90 bpm), hipoxemia arterial, anormalidade na coagulação, variáveis hemodinâmicas e outras disfunções orgânicas. Quando essa resposta é desencadeada por um agente infeccioso, diz-se que o paciente com SRIS tem sepse. A sepse, quando associada à disfunção orgânica aguda, denomina-se sepse grave. Choque séptico ocorre quando a sepse é complicada tanto por hipotensão refratária a reposição de volume, como por hiperlactatemia ⁽⁶⁾.

A patogênese da sepse envolve uma série de interações regulatórias complexas, com processos simultâneos e antagônicos, resultando em uma resposta desregulada do hospedeiro que incluem inflamação exagerada e supressão do sistema imune. A resposta inflamatória da

sepsis leva à ativação do sistema da coagulação com a inibição de mecanismos anticoagulantes e fibrinólise simultaneamente. Inicialmente após a infecção, a ativação local da coagulação contribui para a defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos na tentativa de aprisionar e matar os microorganismos invasores. Uma resposta procoagulante descontrolada, entretanto, pode levar a uma síndrome clínica conhecida como coagulação intravascular disseminada (CIVD) caracterizada por formação de trombos microvasculares e hemorragia ^(7,8). A CIVD é caracterizada pela ativação da coagulação intravascular sistêmica e injúria endotelial microvascular com anticoagulação debilitada e fibrinólise insuficiente, que leva a geração de trombina e difusão da trombose na microvasculatura. O excesso de trombina e subsequente depósito de fibrina exacerbam a inflamação e a isquemia, contribuindo para o dano de órgãos ^(7,8,9). O desencadeamento da inflamação e a cascata da coagulação, junto com o dano endotelial, invariavelmente levam à ativação das plaquetas, as quais podem ser estimuladas através de interações diretas com patógenos ^(7,8) (Ver figura 1).

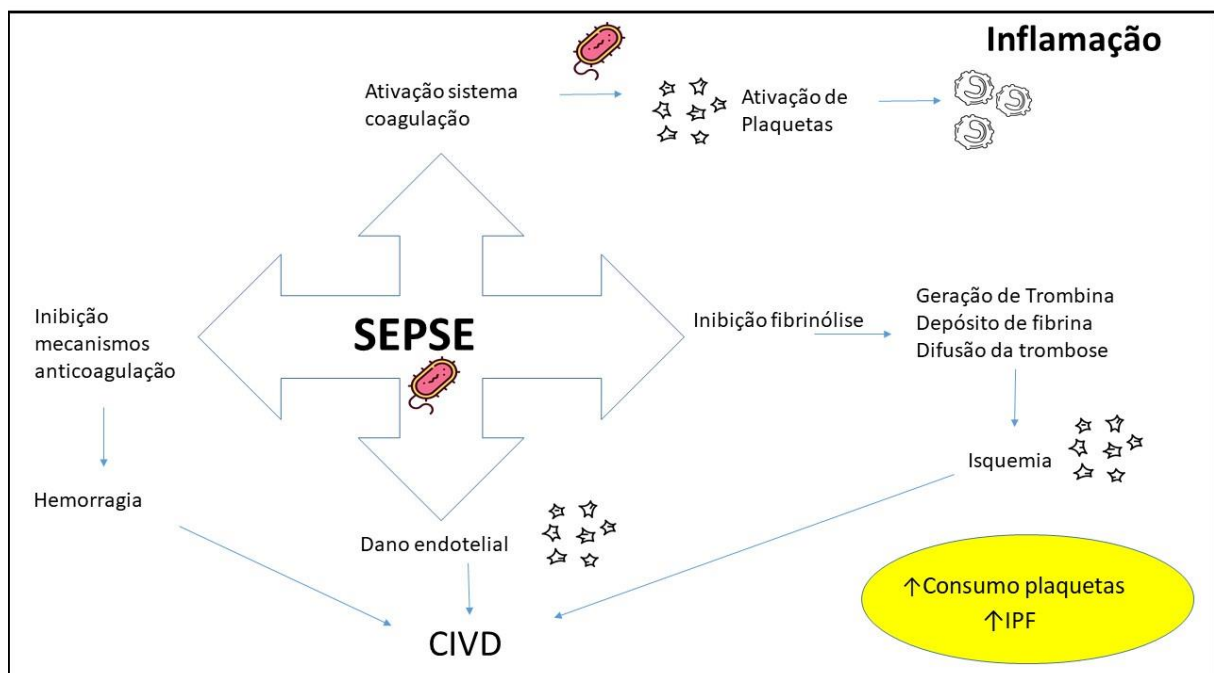


Figura1. Mecanismo geral sepsis. Icon made by Freepik from www.flaticon.com

As plaquetas circulam no interior de todo o corpo e exercem duas principais funções: proteção contra sangramento e patógenos invasores. As plaquetas reconhecem patógenos pelos vários receptores presentes em sua superfície, os atacam e tornam-se ativadas, liberando o conteúdo de seus grânulos. Consequentemente, peptídeos antimicrobianos exercem efeito direto contra patógenos, e as citocinas/quimiocinas atacam e ativam outras células imunes.

Evidências sugerem que as plaquetas detectam e respondem a infecções bacterianas através de receptores específicos tais como receptores *Toll-like* e liberam citocinas e quimiocinas. Em paralelo, citocinas próinflamatórias produzidas pelo hospedeiro contra a infecção, ativam a cascata de coagulação, levando a massiva geração de trombina, o mais potente agonista de plaquetas. As plaquetas ativadas interagem com leucócitos e células endoteliais, fornecem uma superfície fosfolipídica para coagulação, e são consumidas por serem capturadas em uma malha de fibrina microvascular ^(7,10,11). A trombocitopenia é, portanto, comum em pacientes com infecção severa ou sepse e indica um estado fisiopatológico grave associado com a coagulopatia. A trombocitopenia é um importante marcador de coagulopatia severa ou CIVD em pacientes com sepse, e a própria CIVD é um fator de risco independente para mortalidade. Plaquetas são consumidas na presença de coagulopatia séptica, e são necessários vários dias para que a contagem de plaquetas caia o suficiente para que o critério do diagnóstico de CIVD seja alcançado ^(7,9,10,11,12).

As plaquetas possuem no seu citoplasma organelas como mitocôndrias, lisossomos e grânulos denominados corpúsculos densos e grânulos- α . Os grânulos- α são as vesículas secretoras mais abundantes e contém moléculas que incluem peptídeos microbicidas, fatores de crescimento, moléculas de adesão, e proteínas de coagulação. Além disso, as plaquetas armazenam moléculas próinflamatórias como citocinas, quimiocinas e interleucinas ^(7,10,11).

Em pacientes com sepse, a contagem de células brancas está normalmente elevada (leucocitose), tipicamente às custas de um aumento no número de neutrófilos (neutrofilia). Muitos mecanismos contribuem para a neutrofilia, incluindo a desmarginação, aumento da liberação a partir da medula óssea e aumento da produção de neutrófilos. A mobilização da medula óssea pode resultar no aumento do número de células bastonadas e/ou formas mielóides mais jovens no sangue periférico (desvio à esquerda) ⁽¹⁾. Plaquetas e granulócitos polimorfonucleares são conhecidos por aderirem-se um ao outro e formar complexos plaqueta-neutrófilo (*do inglês platelet-neutrophil complex-PNCs*). Johanson também demonstrou em seu estudo que a formação de PNCs é mais provável que aconteça em infecções por bactérias gram positivas, demonstrando a importância da interação entre bactérias, plaquetas e leucócitos. Os PNCs pressupõem-se que desempenham um papel no desenvolvimento de falência múltipla de órgãos, na doença severa, devido a ativação de neutrófilos, primeiramente nas microcirculações pulmonares e hepáticas ⁽⁵⁾.

A fração de plaquetas imaturas (do inglês *immature platelet fraction - IPF*) é um novo parâmetro, obtido em alguns analisadores hematológicos durante a contagem de células do sangue total. Seu uso é bem conhecido em pacientes adultos no reconhecimento da etiologia de trombocitopenias (IPF encontra-se elevado em trombocitopenias periféricas e reduzido quando é uma deficiência da medula óssea) ^(1,3,7,13). Autores também reconhecem um IPF aumentado em neonatos não-trombocitopênicos comparados a adultos, provavelmente refletindo uma maior atividade megacariopoiética ligada a um aumento da concentração de trombopoetina circulante no período fetal e neonatal. Também há um aumento no IPF antes de um aumento da contagem de plaquetas na maioria dos pacientes tratados com quimioterapia e/ou após transplante de células tronco hematopoiéticas. As contagens de plaquetas e reticulócitos, utilizando o analisador hematológico XE 5000 Sysmex são realizadas através de um canal óptico com fluorescência. O RNA dos reticulócitos e das plaquetas são corados por um corante de *polimentine* e *oxazine*. Durante a contagem, cada célula corada passa através de um feixe de luz de um laser semiconductor onde a dispersão da luz (volume da célula) e a intensidade da fluorescência gerada por cada célula é analisada, permitindo a separação das mesmas ⁽¹⁾.

MATERIAIS E MÉTODOS

Revisão de artigos científicos nacionais e internacionais utilizando as palavras chave “sepsis”, “IPF”, “plaquetas imaturas” e “biomarcador” a fim de encontrar estudos clínicos e experimentais que comprovassem a eficácia do índice de plaquetas imaturas em pacientes diagnosticados com sepsis. Alguns artigos utilizados tratam as novas funções descobertas sobre as plaquetas, porém não dispõe da nova tecnologia que possibilita mensurar a quantidade de plaquetas jovens circulantes. Outros artigos analisam o perfil de pacientes que desenvolveram a sepsis em apenas uma única amostra enquanto outro acompanhou os pacientes por 7 dias obtiveram resultados semelhantes, indicando também que o acompanhamento se mostra crucial para determinar o início do processo infeccioso e o desfecho se mostrar compatível com a sepsis para validar o questionamento do marcador estudado.

A bibliografia atual sobre as plaquetas ainda está sendo pesquisada, pois durante anos sua função na hemostasia sempre foi estabelecida e nos últimos anos redescoberta, sendo necessária mais pesquisas para determinar sua real função.

Devido ao envolvimento das plaquetas na fisiologia da sepsis, essa revisão tem como objetivo corroborar com estudos alheios resumindo as informações mais importantes que

constam em artigos que pesquisam novas metodologias diagnósticas que envolvem a sepse, dando maior ênfase para artigos que mencionam o envolvimento de plaquetas imaturas. O surgimento de um novo marcador que evite a evolução para um quadro mais grave é imprescindível, devido ao grande número de óbitos decorrente dessa complicação, tornando-se de grande interesse para área médica e consequentemente da população.

RESULTADOS

Foram utilizados nesse artigo de revisão treze referências científicas, seis delas foram experimentos que utilizaram o índice de plaquetas imaturas em pacientes com suspeita de sepse. Artigos de revisão de inflamação, coagulação e sepse que mencionavam o papel das plaquetas nesse processo, também foram inseridas nesse estudo. Os marcadores mais mencionados nos artigos foram TP, aPTT, D-dímeros que correlacionam o envolvimento da coagulação em processos inflamatórios e o lactato resultado da falta de oxigênio dos tecidos devido a hipoperfusão e ao choque.

No estudo de Hubert et al ⁽¹³⁾ em 2015 comparou-se grupos de pacientes saudáveis, com SIRS e com sepse que demonstrou que IPF não poderia diferenciar pacientes com sepse daqueles com SIRS, porém quando comparado pacientes com sepse e pacientes saudáveis houve um aumento significativo. Também não houve correlação entre IPF e tempo de protrombina (TP) ou tempo de tromboplastina ativada (aPTT) nem entre IPF e D-dímeros. Blasi et al ⁽³⁾ não encontrou associação entre IPF, TP e aPTT e Park et al ⁽²⁾ também não demonstrou correlação entre IPF e TP, aPTT e D-dímeros. Porém Muronoi et al ⁽⁹⁾ reportou a associação do sistema de coagulação e biomarcadores fibrinolíticos em pacientes com sepse e decréscimo de plaquetas e verificou que o TP (marcador de coagulação global) e a TAT (marcador de geração de trombina) foram maiores nos pacientes com queda de plaquetas que exibiram coagulopatia mais severa.

Muronoi et al ⁽⁹⁾ demonstrou em seus estudos que IPF poderia ser utilizado como indicador precoce da queda plaquetária associada com alterações severas na coagulação (coagulopatia séptica) e também como preditor de mortalidade em pacientes com sepse no período de 28 dias. Reportou também a associação do sistema de coagulação e biomarcadores fibrinolíticos com o decréscimo de plaquetas em pacientes com sepse e verificou que o TP e a TAT foram maiores nos pacientes com queda de plaquetas. Evidenciou a teoria de que a trombocitopenia na sepse é principalmente causada pelo consumo, pois descobriram que o

AIPC calculado (contagem absoluta de plaquetas imaturas), que é usado como marcador de trombopoese, não foi diferente entre os pacientes com e sem um declínio na contagem de plaquetas.

Em 2009 Mario et al ⁽¹⁾ publicou um estudo com o IPF em 535 pacientes hospitalizados com neutrofilia e suspeita de infecção bacteriana e demonstrou que o IPF seria um bom marcador facilmente disponível e barato. Blasi et al. ⁽³⁾ em 2013 concluiu em seu estudo observacional prospectivo durante 7 dias que o IPF pode sinalizar o desenvolvimento da sepse dentro de 6 dias, dando aos clínicos informações anteriores as manifestações clínicas da sepse. Stoppelaar et al ⁽⁷⁾ em 2014 reforça que o IPF além de ajudar na distinção entre trombocitopenia devido ao aumento da destruição ou relacionada a falência da medula óssea, seu aumento também se relaciona a eventos trombóticos incluindo CIVD e sepse e corrobora com vários estudos que demonstram um aumento de IPF antes da manifestação clínica da sepse em pacientes com inflamação sistêmica, podendo ser útil como um marcador prognóstico nessas condições. Hubert et al ⁽¹³⁾ em 2015 confere ao IPF como um biomarcador informativo de sepse, em uma população independente e clinicamente representativa. Mais estudos devem ser feitos a fim de definir como esse parâmetro pode ser incorporado nos protocolos de sepse. O estudo de Park et al ⁽²⁾ em 2016 avaliou o IPF e outros marcadores utilizados para diferenciar pacientes sépticos de não sépticos e constatou também que o IPF possui alta sensibilidade e acurácia nesses pacientes. Muronoi et al ⁽⁹⁾ em um artigo publicado recentemente em 2016 mostrou que IPF é uma alternativa prontamente disponível e útil para elucidar mecanismos fisiopatológicos da trombocitopenia na sepse, e identificar pacientes com coagulopatia séptica iminente. O diagnóstico de sepse é desafiador porque testes clínicos e laboratoriais utilizados na prática clínica hoje em dia não são muito úteis, porque a maioria dos pacientes críticos desenvolvem algum grau de resposta inflamatória, tendo ou não sepse. Até mesmo a avaliação microbiológica não é confiável porque em muitas culturas não há crescimento de microorganismos nestes pacientes.

DISCUSSÃO

Hubert em 2015 demonstrou que o IPF não poderia diferenciar pacientes com sepse daqueles com SIRS, porém houve um aumento significativo quando comparado pacientes com sepse e pacientes saudáveis. Também não houve correlação entre IPF, TP, aPTT e D-dímeros não serviria como marcador da ativação da coagulação durante a sepse. Blasi e Park também não demonstraram essa correlação. Porém Muronoi reportou a associação do sistema de

coagulação e biomarcadores fibrinolíticos em pacientes com sepse e decréscimo de plaquetas e verificou que o TP (marcador de coagulação global) e a TAT (marcador de geração de trombina) foram maiores nos pacientes com queda de plaquetas que exibiram coagulopatia mais severa. Evidenciou que o mecanismo de elevação do IPF na fase aguda da sepse foi principalmente relacionado a coagulopatia através do consumo de plaquetas e não pelo aumento da trombopoese.

O IPF e o lactato de acordo com Hubert foram relacionados com a severidade, porém Park demonstra que o IPF possui alta sensibilidade e acurácia na diferenciação de pacientes sépticos de não sépticos independente do local de infecção, entretanto o IPF não discrimina eficientemente a severidade de sepse.

CONCLUSÕES

Todos os artigos encontrados relacionam as plaquetas com reação inflamatória por diversos fatores. Sua queda já está sendo relacionada a um pior prognóstico devido as suas complicações em resposta a um mecanismo complexo que envolve diversos parâmetros utilizados hoje em dia como biomarcadores em pacientes com risco de sepse. É necessário devido a um grande número de mortes encontrar um biomarcador que possa ser detectado precocemente e impedir o desenvolvimento da sepse através de uma antibioticoterapia adequada. Os estudos pesquisados foram unânimes quanto ao bom desempenho de um novo marcador que detecta a fração de plaquetas imaturas antes de sua queda, além de ser um procedimento fácil, barato e rápido de ser executado.

As plaquetas estão envolvidas na patofisiologia da sepse como um marcador devido a freqüente ocorrência de trombocitopenia na sepse. Consequentemente, um marcador que detecta uma queda inicial do número de plaquetas poderia ajudar na identificação de pacientes com risco de coagulopatias severas e no prognóstico nos estágios iniciais da sepse. Estudos recentes têm chamado a atenção no valor de alguns biomarcadores em pacientes com sepse severa. Entretanto, a rotina de ensaios que utilizam citocinas são limitados devido aos problemas existentes com a complexidade biológica, desafios da medição e custo. Como alternativa, o uso de parâmetros laboratoriais de fácil execução, pouco dispendiosos e que façam parte da rotina diagnóstica, como a contagem de células sanguíneas e o IPF, seriam úteis para uma possível predição da sepse em pacientes com neutrofilia.

Hoje em dia os hospitais seguem protocolos de sinais e sintomas para enquadramento de pacientes com suspeita de sepse. Vários exames físicos e biológicos envolvendo a área de bioquímica, hematologia e microbiologia são analisados em conjunto para tentar diagnosticar o risco de cada paciente para desenvolvimento dos mais variados níveis de infecções e seus possíveis prognósticos. Novos marcadores, são portanto, de extrema importância para que esse processo de diagnóstico seja mais efetivo e salve mais vidas.

ABSTRACT

Sepsis is a group of severe manifestations throughout the host's body in response to an invading microorganism. Immature platelet fraction (IPF) is a new parameter obtained in total blood cell count of some hematological counters. Currently its use is well known in diagnosis of thrombocytopenia showing higher values in peripheral destruction due to the increase of megakaryocytic activity and decreased values in marrow deficiency. New studies, however, demonstrate its utility as an early biomarker detection of septic patients, since thrombocytopenia often occurs in sepsis.

Consequently, a marker that detects an initial drop in platelet count could help identify patients at risk of severe coagulopathies and prognosis in the early stages of sepsis.

This review aims to find clinical and experimental studies that prove the efficacy of IPF as an early sepsis biomarker. Due to the high number of critical patients who develop some degree of inflammatory response, whether or not they have sepsis, it is extremely important to find a way to diagnose them quickly, economically and safely. Therefore, nowadays, as there is no single marker that has good enough value to help clinicians in daily practice, several biomarkers are used.

KEYWORDS

Sepsis, immature platelets, biomarker, IPF

REFERÊNCIAS

1. Mario AD, Garzia M, Leone F, Arcangeli A, Pagano L, Zini G. Immature platelet fraction (IPF) in hospitalized patients with neutrophilia and suspected bacterial infection. *Journal of Infection*. 2009; v.59, p.201-206. doi:10.1016/j.jinf.2009.07.007.
2. Park SH, Ha SO, Cho YU, Park CJ, Jang S, Hong SB. Immature platelet fraction in septic patients: Clinical relevance of immature platelet fraction is limited to the sensitive and accurate discrimination of septic patients from non-septic patients, not to the discrimination of sepsis severity. *Annals of laboratory medicine*. 2016; 36:1-8.
3. Blasi RA, Cardelli P, Costante A, Sandri M, Mercieri M, Arcioni R. Immature platelet fraction in predicting sepsis in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2013; v.39, p.636-643.doi:10.1007/s00134-012-2725-7.
4. Pierrakos C e Vincent, JL. Sepsis biomarkers:a review. *Critical care*. 2010; 14;R15.
5. Johansson D, Shannon O, Rasmussen M. Platelet and neutrophil responses to gram positive pathogens in patients with bacteremic infection. *PLoS ONE*. 2011; v.6, p.1-9.
6. Dellinger PR, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM et al. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive care med*. 2013; v 39, p. 165-228. doi 10.1007/s00134-012-2769-8.
7. Stoppelaar SF; Veer CV; Poll T. The role of platelets in sepsis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2014; v.112, p.666-677.
8. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *Journal of Leukocyte biology*. 2008; 83:536-545. doi: 10.1189/jlb.0607373
9. Muronoi T, Koyama K, Nunomiya S, Lefor AK, Wada M, Koinuma T et al. Immature platelet fraction predicts coagulopathy-related platelet consumption and mortality in patients with sepsis. *Thrombosis Research*. 2016; 144: 169-175.
10. Speth C, Löffler J, Krappmann S, Lass-Flörl C, Rambach G. Platelets as immune cells in infectious diseases. *Future Microbiol*. 2013; v. 8, p. 1431-1451.
11. Semple JW, Italiano Jr JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nature reviews- Immunology*. 2011; 11:264-274.
12. Boechat TO, Silveira MFBB, Faviere W, Macedo GL. Trombocitopenia na sepse: um importante marcador prognóstico. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2012; v. 24, p. 35-42.
13. Hubert RME, Rodrigues MV, Andreguetto BD, Santos TM, Gilberti MFP, Castro V et al. Association of the immature platelet fraction with sepsis diagnosis and severity. *Scientific Reports*. 2015; 5, 8019; DOI:10.1038/srep08019.