

PESQUISA DE ANTICORPOS ANTIPLAQUETÁRIOS

As primeiras cem amostras estudadas

MARIA MANUEL CAMPOS, ERNESTO FERNÁNDEZ, MARIA JOSÉ MARQUES, ALICE CORDEIRO

Serviço de Imuno-Hemoterapia. Hospital de Curry Cabral. Lisboa.

RESUMO

Consideram-se dois tipos de aloantígenos plaquetários: o tipo I que corresponde a aloantígenos compartilhados pelas plaquetas e outras células e o tipo II, designando os aloantígenos específicos das plaquetas. O sistema de Aloantígenos Plaquetários Humanos (HPA) é constituído por cinco aloantígenos bialélicos e onze antígenos de baixa frequência. As glicoproteínas (GP) da membrana plaquetária associadas a uma maior frequência de anticorpos são as GPIIb-IIIa, GPIb-IX e GPIa-IIa, de acordo com estudos serológicos de fixação de antígenos, imunoquímicos e do âmbito da Biologia Molecular. A detecção de anticorpos antiplaquetários é possível através de diversos métodos laboratoriais, sendo apresentada a nossa experiência no serviço de Imuno-Hemoterapia do Hospital Curry Cabral, relativamente à pesquisa em Fase Sólida. A utilização da técnica indirecta para a detecção de aloanticorpos e da técnica directa para os autoanticorpos, bem como a realização do procedimento com solução de cloroquina para o esclarecimento da presença de anticorpos anti-HLA, representam os aspectos fundamentais descritos. Comentamos os resultados obtidos em cem amostras no período de onze meses e procedemos a uma breve revisão de aspectos clínicos relacionados com o diagnóstico da trombocitopenia autoimune, aloimune, a fármacos e por outras causas frequentes. São abordados conceitos da prática transfusional, aplicados a situações de emergência, de estratégia para a refractariedade plaquetária e de enquadramento multidisciplinar das medidas terapêuticas.

SUMMARY

Platelet Antibodies Detection - Experience of the Immunohaemotherapy of Curry Cabral Hospital. The first hundred studied samples

Two types of platelet alloantigens are considered: type I, which refers to platelet alloantigens shared by platelets and other cells; and type II, which comprises the platelet-specific alloantigens. The Human Platelet Alloantigens (HPA) System consists of five diallelic alloantigens and eleven low frequency antigens. According to serological antigen capture assays, immunochemical methods and studies of Molecular Genetics, the glycoproteins (GP) of platelet membrane that are most frequently associated with antibodies are GPIIb-IIIa, GPIb-IX and GPIa-IIa. It is possible to detect platelet antibodies using different laboratory methods. Our experience was restricted to a solid phase system. In this method we used the indirect technique for the screening of alloantibodies and the direct technique for the detection of autoantibodies. The procedure with chloroquine solution was performed in order to differentiate between the presence of HLA and non-HLA platelet specific antibodies. Our comments are based on results obtained in a hundred samples tested throughout a period of eleven months and we briefly review the clinical features related to the diagnosis of autoimmune and alloimmune thrombocytopenia, drug-induced thrombocytopenia and other different factors of platelet destruction. The concepts of transfusional practice applied to emergency situations, platelet refractoriness strategy and the comprehensive management of patients are approached in this work.

INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas verificou-se um progresso considerável na caracterização dos aloantígenos plaquetários, através de técnicas serológicas e de genotipagem.

Os aloantígenos plaquetários são definidos pelos aloanticorpos dirigidos contra variações moleculares determinadas geneticamente nas proteínas e hidratos de carbono da membrana plaquetária^{1,2}. Estes aloanticorpos são formados após exposição a aloantígenos, habitualmente durante a gravidez, por transfusão sanguínea ou transplante alogénico de medula óssea¹⁻³.

Consideram-se dois tipos de aloantígenos plaquetários relevantes^{1,2,4}:

Tipo I: são aloantígenos que as plaquetas compartilham com outras células e tecidos, tais como os glicoproteínas do sistema de grupos sanguíneos ABO e as moléculas HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) da classe I altamente polimórficas.

Tipo II: são aloantígenos mais ou menos específicos das plaquetas, convencionalmente chamados aloantígenos específicos das plaquetas. Muitos também se encontram expressos noutras células e tecidos, estando a maioria relacionada com a superfamília das moléculas de adesão. Alguns aloantígenos plaquetários foram igualmente detectados nas células endoteliais, células do músculo liso e fibroblastos - integrina β_3 (GPIIIa), bem como nos linfócitos T activados e células endoteliais - integrina α_2 (GPIa). Contudo, os aloantígenos localizados na integrina α_{IIb} e na GPIb α e GPIb β parecem ser exclusivos das plaquetas¹.

O sistema dos Aloantígenos Plaquetários Humanos (HPA) é constituído por 5 aloantígenos bialélicos (HPA 1,2,3,4,5) e 11 antígenos de baixa frequência (HPA - 6bW, ...) ¹. Estes antígenos encontram-se nas 5 GP da membrana plaquetária: GPIa, GPIb α , GPIb β , GPIIb e GPIIIa. As 5 GP são codificadas por 5 genes diferentes. A substituição de um único nucleótido conduz à substituição de um único aminoácido, condicionando estas variações todas as determinantes antigénicas¹ (vd Quadro I). Destas mutações de aminoácidos resultam alterações conformacionais na estrutura tridimensional das GP plaquetárias, que podem criar determinantes aloantigénicas passíveis de reconhecimento pelos linfócitos B e T^{1,3}.

O alelo de elevada frequência de um sistema é designado pela letra a e o alelo de baixa frequência pela letra b¹.

Conhecimentos recentes da Genética Molecular sugerem que cada nova alteração de bases não constitui um novo sistema de aloantígenos bialélicos, mas define um

único alelo que expressa um novo epitopo¹.

De acordo com a Nomenclatura dos Genes Humanos, os genes das GPIa, GPIb α , GPIb β , GPIIb e GPIIIa devem ser chamados respectivamente GP1A, GP1BA, GP1BB, GP2B e GP3A. As variantes alélicas dos genes são designadas por números árabes e separadas da designação do gene por um asterisco (GP1A*1, GP1BA*1, por exemplo)¹.

A produção de isoanticorpos pode ocorrer como consequência da deficiência de GP da membrana plaquetária, após a transfusão de plaquetas ou durante a gravidez, quando há exposição a plaquetas normais. Foram descritos isoanticorpos em doentes com Trombastenia de Glanzmann (deficiência de GPIIb-IIIa), que reconhecem como estranhos os epitopos existentes no complexo GPIIb-IIIa³.

O primeiro aloantígeno foi descrito em 1959 por van Loghem et al, num doente com Púrpura Pós-transfusional (PPT), sendo o antígeno plaquetário clinicamente mais significativo: Zw^a (PIA¹, HPA-1a). Na PPT, a especificidade dos anticorpos é anti-Zw^a ou anti-HPA-1a em cerca de 85% dos casos. Desde então, foram descritos mais de 20 aloantígenos plaquetários e atribuídos a diferentes sistemas antigénicos².

Os aloanticorpos formados em pessoas fenotipicamente negativas, quando expostas aos aloantígenos correspondentes, são responsáveis por situações clínicas definidas: Trombocitopénia Aloimune Fetal e Neonatal (TAFN), PPT, Trombocitopénia Aloimune Passiva, Trombocitopénia Associada a Transplantação e Refratariedade à Transfusão Plaquetária (geralmente, na presença de anticorpos HLA)^{1,4-7}.

Relativamente à Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI), o principal epitopo encontra-se associado ao complexo GPIIb-IIIa ou ao complexo GPIb-IX⁶.

Na PTI aguda ocorre um aumento transitório da expressão das moléculas HLA-DR, provavelmente induzido por citocinas tais como o Interferão (IFN)- γ . Pode existir uma elevação dos níveis séricos de Interleuquina (IL)-2 e IL-10. Relativamente à PTI crónica, verificam-se concentrações séricas elevadas de IL-2, IFN- γ e IL-10 (activação *in vivo* das células T). Na PTI aguda, a hipótese de uma resposta imune cruzada com a dirigida contra um agente infeccioso é considerada; na PTI crónica, existe uma resposta imune estimulada pelas moléculas HLA-DR com aumento da produção de citocinas, da activação das células T e da geração de autoanticorpos específicos⁶.

Os métodos de tipagem de aloantígenos plaquetários podem ser serológicos e do âmbito da Genética

Quadro 1 - Genética Molecular dos Aloantígenos Plaquetários Humanos

ANTIGÊNIO	SINÓNIMO	LOCALIZAÇÃO NA GLICOPROTEÍNA	SUBSTITUIÇÃO NO NUCLEÓTIDO	SUBSTITUIÇÃO NO AMINOÁCIDO
HPA-1a	Zw ^a , P1 ^{A1}	GPIIIa	T ₁₉₆	Leu ₃₃
HPA-1b	Zw ^b , P1 ^{A2}		C ₁₉₆	Pro ₃₃
HPA-2a	Ko ^b	GPIb _α	C ₅₂₄	Thr ₁₄₅
HPA-2b	Ko ^a , Sib ^a		T ₅₂₄	Met ₁₄₅
HPA-3a	Bak ^a , Lek ^a	GPIIb	T ₂₆₂₂	Ile ₈₄₃
HPA-3b	Bak ^b		G ₂₆₂₂	Ser ₈₄₃
HPA-4a	Yuk ^b , Pen ^a	GPIIIa	G ₅₂₆	Arg ₁₄₃
HPA-4b	Yuk ^a , Pen ^b		A ₅₂₆	Gln ₁₄₃
HPA-5a	Br ^b , Zav ^b	GPIa	G ₁₆₄₈	Glu ₅₀₅
HPA-5b	Br ^a , Zav ^a , Hc ^a		A ₁₆₄₈	Lys ₅₀₅
HPA-6bW	Ca ^a , Tu ^a	GPIIIa	A ₁₅₆₄	Gln ₄₈₉
			G ₁₅₆₄	Arg ₄₈₉
HPA-7bW	Mo ^a	GPIIIa	G ₁₃₁₇	Ala ₄₀₇
			C ₁₃₁₇	Pro ₄₀₇
HPA-8bW	Sr ^a	GPIIIa	T ₂₀₀₄	Cys ₆₃₆
			C ₂₀₀₄	Arg ₆₃₆
HPA-9bW	Max ^a	GPIIb	A ₂₆₀₃	Met ₈₃₇
			G ₂₆₀₃	Val ₈₃₇
HPA-10bW	La ^a	GPIIIa	A ₂₈₁	Gln ₆₂
			G ₂₈₁	Arg ₆₂
HPA-11bW	Gro ^a	GPIIIa	A ₁₉₉₆	His ₆₃₃
			G ₁₉₉₆	Arg ₆₃₃
HPA-12bW	Iy ^a	GPIb _β	A ₁₄₁	Glu ₁₅
			G ₁₄₁	Gly ₁₅
HPA-13bW	Sit ^a	GPIa	T ₂₅₃₁	Met ₇₉₉
			C ₂₅₃₁	Thr ₇₉₉
HPA-	Oe ^a	GPIIIa		
HPA-	Va ^a	GPIIIa		
HPA-	Pe ^a	GPIb _α		

Adaptado de S. Santoso, V. Kiefel: Human Platelet-Specific Alloantigens: Update. Vox Sanguinis 1998; 74 (Suppl. 2): 249 -253

Molecular^{2,8}, conforme referido acima. Relativamente aos primeiros, são necessários reagentes para fenotipagem dos antígenos investigados e podem ser realizados com plaquetas intactas ou serem específicos de GP². São exemplos: o teste de imunofluorescência plaquetária realizado como teste de suspensão ou de adesão modificado e com leitura microscópica ou por citometria de fluxo; as técnicas imuno-enzimáticas (ELISA); a técnica de hemaglutinação passiva mista (MPHA); o teste de imobilização específica de antígenos plaquetários por anticorpos monoclonais (MAIPA); o teste imuno-enzimático de *captura* de antígenos modificado (MACE); as técnicas de imunoprecipitação e de *immunoblotting*^{2,6,8}. Os métodos de genotipagem permitem o estudo do DNA

do genoma celular e conduziram à identificação de 12 polimorfismos plaquetários, sobretudo através da tecnologia de *polymerase chain reaction*^{2,8}.

A nossa experiência baseia-se na utilização do método de aderência eritrocitária em fase sólida, utilizando eritrocitos cobertos com anti-IgG, na pesquisa de anticorpos antiplaquetários, com a realização das técnicas indirecta (aloanticorpos) e directa (autoanticorpos)^{4,9,10}. Foi igualmente efectuado o procedimento com solução de cloroquina, que causa a eluição dos antígenos HLA da classe I das plaquetas, para o esclarecimento da presença de aloanticorpos anti-HLA¹¹. Os aspectos específicos da nossa rotina neste âmbito e as conclusões decorrentes são apresentados ao longo deste artigo.

MATERIAL E MÉTODOS

Protocolo: De modo a uniformizar os procedimentos laboratoriais e sistematizar os dados clínicos fornecidos com as amostras de sangue a estudar, dispomos de um protocolo. A primeira parte destina-se à identificação do doente; a segunda parte contempla a informação referente ao diagnóstico, resumo da história clínica actual, antecedentes pessoais (obstétricos, transfusionais e esplenectomia); o grupo de estudos laboratoriais anteriores engloba a contagem plaquetária recente, o mielograma, a pesquisa de anticorpos antiplaquetários e anti-HLA; acerca da terapêutica instituída (em curso ou recentemente suprimida), discriminam-se os agentes antiplaquetários, os anticoagulantes, as imunoglobulinas e os imunossuppressores - corticóides ou citostáticos; solicitam-se amostras de sangue total em tubos com ácido etileno-diaminotetra-acético (EDTA): 4 tubos se contagem plaquetária $\leq 50000/\text{mm}^3$ e 3 tubos se contagem plaquetária $> 50000/\text{mm}^3$.

Método: É utilizado o método de aderência eritrocitária em fase sólida para a detecção de anticorpos antiplaquetários da classe IgG. Utilizamos a técnica indirecta para a pesquisa de aloanticorpos e a técnica directa para o despiste de autoanticorpos. O facto de podermos separar plasma para o estudo, permite-nos executar as duas técnicas, pois o uso de soro limita o método à técnica indirecta. As instruções fornecidas pelo fabricante do *kit* e de outros reagentes são criteriosamente seguidas.

O princípio deste método consiste na detecção de anticorpos antiplaquetários IgG através da incubação do plasma a testar em cavidades revestidas com membranas plaquetárias de 12 dadores do grupo O (aloanticorpos) e numa cavidade revestida com plaquetas do próprio doente (autoanticorpos), de modo a permitir que os anticorpos, quando presentes, se liguem à camada plaquetária de revestimento. Após essa incubação (a 37°C e em meio salino de baixa força iónica), procede-se à lavagem das cavidades para remoção das imunoglobulinas não ligadas e à posterior adição de eritrocitos indicadores cobertos com anti-IgG. A centrifugação imediata coloca as células indicadoras em contacto com os anticorpos ligados às plaquetas imobilizadas nas cavidades.

Relativamente à pesquisa de autoanticorpos, procedemos à obtenção de plasma rico em plaquetas (3-7 ml) ao qual é posteriormente adicionada solução de lavagem e de armazenamento de plaquetas, com etapas sucessivas de centrifugação e remoção do sobrenadante, de modo a resultar um *botão* de plaquetas lavadas. Na cavidade destinada à pesquisa de autoanticorpos, dispensa-se o volume recomendado da suspensão plaquetária

preparada e inclui-se esta posição no procedimento definido para a técnica indirecta.

Se o teste é positivo, verifica-se que a migração dos eritrocitos indicadores (cobertos com anti-IgG) é impedida pela formação de complexos IgG - anti-IgG, entre os anticorpos ligados às plaquetas imobilizadas (que expressam os antigénios correspondentes) e as células indicadoras, originando uma camada de eritrocitos aderente à camada de plaquetas de revestimento das cavidades. Se o teste é negativo, verifica-se a ausência de interacção antigénio-anticorpo, as células indicadoras não são impedidas da sua migração e depositam-se no fundo das cavidades, formando um *botão* eritrocitário bem definido.

As amostras são trabalhadas nas 48 horas seguintes à sua obtenção; caso o estudo laboratorial não possa ser efectuado nesse período, o plasma é congelado e a suspensão de plaquetas autólogas é preparada e conservada na solução de lavagem e armazenamento específica a uma temperatura de $2-8^\circ\text{C}$.

Devido ao facto de podermos detectar anticorpos específicos das plaquetas e anticorpos anti-HLA, dispomos de um procedimento adicional com utilização de solução de difosfato de cloroquina para destruição das moléculas HLA da classe I, ocorrendo a negatificação do teste anteriormente positivo em todas as cavidades da dupla tira destinadas à pesquisa de aloanticorpos. Quando isto acontece a hipótese da presença de anticorpos anti-HLA é colocada como a mais provável.

Este método é útil em termos de pesquisa, dada a relativa rapidez de execução, bem como a interpretação simples dos resultados. Cada tira dupla contempla três cavidades destinadas a controlos: negativo, positivo fraco e positivo forte.

Através deste método também é possível o estudo de trombocitopénia por fármacos e a execução de *cross-match* plaquetário.

RESULTADOS

As primeiras 100 amostras foram estudadas entre 19 de Dezembro de 1997 e 3 de Novembro de 1998, correspondendo 52 ao sexo feminino e 48 ao sexo masculino. A variação etária tem como limite inferior os 15 anos e como limite superior os 97 anos de idade. A contagem plaquetária dos doentes teve como valor mais baixo as 2000 plaquetas $/\text{mm}^3$ e valor mais elevado as 357000 $/\text{mm}^3$.

Do total de amostras, 50 tiveram origem em Serviços/Consultas dos Hospital de Curry Cabral e 50 foram enviadas do Hospital de Santo António dos Capuchos (a maioria do Serviço de Hematologia), do

Hospital de São José, do Hospital do Desterro e do Hospital Distrital de Torres Vedras.

Relativamente aos Serviços Internos, 28 amostras foram enviadas dos Serviços de Internamento de Medicina (incluindo Infecçiology), quatro do Serviço de Nefrologia, dois do Serviço de Urgência, um da Unidade de Cuidados Intensivos e um oriunda do Serviço de Imuno-Hemoterapia. Das Consultas, verificou-se que 5 amostras procederam da Infecçiology, 4 das Doenças Auto-imunes, três da Medicina, um da Nefrologia e um da Medicina Física e de Reabilitação.

A maioria das requisições tem como informação diagnóstica: trombocitopenia - em 33 casos e Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI) - em 32 casos. Os diagnósticos são diversos, mas seguem-se a infecção pelo Vírus de Imunodeficiência Humana (VIH) e pelo Vírus da Hepatite C (VHC), o Lupus Eritematoso Sistémico (LES), a Doença Hepática Crónica (DHC) em termos de frequência. Em nove das requisições encontra-se referida a ocorrência de discrasia, habitualmente equimoses, petéquias e epistaxis.

No que concerne à terapêutica instituída, em 14 doentes há referência aos corticóides, isoladamente ou em associação com outros imunossuppressores e imunoglobulina (Ig) intravenosa (iv), bem como em simultâneo com anti-inflamatórios não esteróides e inibidores da função plaquetária. Existe registo de outra medicação indicada pela doença de base ou acidentes patológicos, nomeadamente agentes anti-retrovirais, anti-hipertensores, heparinas de baixo peso molecular, antidiabéticos orais, eritropoietina, anticonvulsivantes, antidepressivos, antibióticos, hipolipemiantes e hormona tiroideia.

Das amostras testadas, o resultado foi positivo em 5 e negativo nas restantes (vd Quadro II). Na maioria das

Quadro II - Pesquisa de Anticorpos Antiplaquetários (Resultados nas 100 Amostras - Método de Fase Sólida)

Téc. Indirecta POS. + Téc. Directa POS.	1
Téc. Indirecta POS. + Téc. Directa NEG.	2
Téc. indirecta NEG. + Téc. Directa POS.	2
Téc. Indirecta NEG. + Téc. Directa NEG.	73
Téc. Indirecta NEG. (s/ Téc. Directa)	22
Total	100

amostras foram executadas as técnicas directa e indirecta, mas em 22 só foi executada a técnica indirecta (no primeiro mês após a implementação do método e quando a amostra enviada se apresentava insuficiente para ambas as técnicas). No Quadro III estão referidos os ele-

Quadro III - Pesquisa de Anticorpos Antiplaquetários (Amostras Positivas - Método de Fase Sólida)

TÉCNICA	Nº	DOENTES	COMENTÁRIO
Indirecta	2	⇒ Homem, 45 anos, PTI + DHC, 64000 plaq./mm ³	⇒ Aloanticorpos antiplaquetários (identificação impossível)
		⇒ Mulher, 85 anos, Hepatite C Crónica + S. Sjögren, 34000 plaq./mm ³	
Directa	2	⇒ Homem, 28 anos, PTI + infecção viral + equimoses, 53000 plaq./mm ³	⇒ Autoanticorpos antiplaquetários
		⇒ Mulher, 48 anos, trombocitopenia, 134000 plaq./mm ³	
Indirecta + Directa	1	⇒ Mulher, 19 anos, PTI, ACA* e anticorpos anti-DNA nativo positivos, 65000 plaq./mm ³	⇒ Autoanticorpos antiplaquetários + Aloanticorpos anti-HLA

* anticorpos anticardiolipina

mentos clínicos principais dos doentes com pesquisa positiva, de acordo com a informação complementar fornecida, que negava a instituição de terapêutica à data de obtenção das amostras.

Relativamente à amostra em que foram detectados aloanticorpos HLA, através da eluição da β₂-microglobulina e consequente abolição da reactividade desses anticorpos (procedimento com cloroquina), não foi identificada a especificidade, mas sugerido o interesse da realização de outros estudos complementares.

De referir também, que nas três situações de pesquisa positiva para aloanticorpos específicos das plaquetas, não foi possível a identificação através do painel incluído no respectivo kit.

O facto de ser baixa a frequência de autoanticorpos, detectados na população avaliada, poderá ser interpretado em função do tempo de obtenção das amostras e da instituição de terapêutica imunomoduladora, da fase de evolução clínica dos doentes, bem como este estudo laboratorial ser solicitado no âmbito de uma investigação abrangente das causas de trombocitopenia.

DISCUSSÃO

A nossa experiência relativa à pesquisa dos anticorpos antiplaquetários traduz-se na execução de um meio com-

plementar de diagnóstico útil aos médicos assistentes dos doentes, a maioria das vezes como elemento de exclusão de causas imunes de trombocitopénia. Verificámos que em 5% das amostras estudadas a pesquisa foi positiva, tendo sido detectados aloanticorpos específicos das plaquetas, cuja identificação foi impossível, aloanticorpos HLA (através do procedimento com cloroquina) e autoanticorpos plaquetários.

O recurso a outros métodos (ELISA, MACE, MAIPA, entre outros) conduziria certamente a um esclarecimento diagnóstico dos doentes com pesquisa positiva pela fase sólida^{2,8}. A eluição dos autoanticorpos das plaquetas e a sua posterior incubação em cavidades cobertas com as GP IIB-IIIa, GP Ib-IX e GP Ia-IIa, seguida das restantes etapas da técnica imuno-enzimática, poderia elucidar a especificidade desses anticorpos. Por outro lado, o estudo em paralelo do soro do doente, para a determinação de aloanticorpos, através de técnica imuno-enzimática, utilizando cavidades previamente revestidas com GP IIB-IIIa, GP Ia-IIa, GP Ib-IX, GP IV e antigénios HLA da classe I, contribuiria para outras conclusões. Em breve passaremos a aplicar o método MACE (detecção de anticorpos IgG contra o complexo GP IIB-IIIa e os antigénios HLA da classe I).

CONCLUSÃO

Constatámos uma associação entre doenças autoimunes e infecções virais e a ocorrência destes anticorpos, embora a dimensão do material avaliado não permita atribuir um significado estatístico a este facto.

Entre os doentes com pesquisa positiva, não encontramos predomínio de grupo etário, sendo importante realçar a ausência de terapêutica médica e/ou cirúrgica à data de obtenção das amostras, bem como a ocorrência de discrasia em 1/5 doentes. Cerca de 10% dos doentes (9/100) em que efectuámos a pesquisa de anticorpos antiplaquetários apresentava manifestações ligeiras e moderadas de diátese hemorrágica.

A ocorrência de trombocitopénia imune pode ser autoimune (PTI aguda e crónica), estar associada a doenças infecciosas, doenças do tecido conjuntivo, ao período pós-transplante de medula óssea (TMO), corresponder a aloimunização, como acontece na TAFN e na PPT, ou ser observada na administração de fármacos (heparina, rifampicina, quinidina, entre outros) sobretudo em adultos^{4,6,12,14,15}.

Estudos serológicos com o método MAIPA e estudos de Biologia Molecular demonstraram que as glicoproteínas da membrana plaquetária que estão associadas a uma maior frequência de anticorpos são as GPIIb-IIIa, GPIb-IX e GPIa-IIa^{2,8,16,17}. Relativamente à aloimunização

HLA, verifica-se que é responsável por 1/3 dos casos de refractariedade à transfusão plaquetária e 10-15% destes doentes desenvolve aloanticorpos específicos das plaquetas: Zw^b ou HPA-1b em 55%, Br^a ou HPA-5b em 30% das situações².

A terapêutica utilizada na trombocitopénia imune contempla o recurso aos corticóides (metilprednisolona, dexametasona), Ig iv e esplenectomia, numa abordagem clássica^{6,16}. Relativamente às Ig (IgG humana poliespecífica), o seu mecanismo de acção é múltiplo: a) interacção da porção Fc da Ig iv com os receptores Fc dos fagocitos e linfocitos; b) interacção entre as regiões variáveis da Ig iv e as regiões variáveis das Ig circulantes e os receptores das células B (interacções idiotípicas); c) interacção entre Ig iv e outras moléculas de superfície relevantes das células inflamatórias e dos linfocitos, resultando na modulação da produção de citocinas e alterações funcionais das células imunocompetentes^{4,6,13,18}. Existem referências na literatura à utilização de Ig anti-Rh(D), IFN- α , Danazol, agentes citostáticos, plasmaferese e imuno-adsorção de anticorpos através de colunas com proteína A, vitamina C, entre outras medidas imunomoduladoras^{6,12}. A transfusão de plaquetas está indicada quando a contagem plaquetária é muito reduzida e o quadro clínico ou a instituição de medidas diagnósticas ou terapêuticas assim determina^{5,6,12}. Os valores considerados limiares variam com a natureza aguda ou crónica da trombocitopénia, as manifestações de discrasia ou factores de consumo associados, a idade e a valorização do contexto clínico. A decisão depende da ponderação oportuna dessas variáveis e a modificação dos componentes a administrar obedece a critérios estabelecidos de acordo com as boas práticas clínicas.

A estratégia transfusional começa pela utilização de plaquetas randomizadas desleucocitadas, passando a plaquetas HLA-compatíveis após o desenvolvimento de refractariedade clínica; quando a refractariedade se instala mesmo com o uso de plaquetas HLA-compatíveis é importante recorrer a plaquetas HLA- e HPA-compatíveis^{5,6}.

Entre as causas imunes de refractariedade são representativos os anticorpos anti-HLA contra os antigénios HLA da classe I, os anticorpos dirigidos contra os antigénios específicos das plaquetas, os anticorpos contra antigénios ABO e, no caso de autoimunidade, a PTI.

A esplenomegália, o TMO, a Coagulação Intravascular Disseminada (CID), a Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT), a Anfotericina B iv, bem como o uso de certos antibióticos, a presença de febre e/ou hemorragia constituem as principais causas não imunes de

refratariedade^{2,4,5}. De referir, contudo, que em determinadas situações clínicas como sépsis, quimioterapia intensiva, esplenomegália, CID, hemorragia digestiva ou Doença-Enxerto-Contra-Hospedeiro, é difícil distinguir refratariedade não específica de refratariedade devida a aloimunização⁷.

No caso particular da PPT e da TAFN, a administração de plaquetas HPA-1a negativas pode ser necessária, quando se pretende um aumento rápido da contagem plaquetária, embora no primeiro caso nem sempre seja benéfica^{2,4,5}. O recurso a medidas como as Ig iv e a plasmaferese terapêutica condiciona melhor sucesso na PPT, estando as Ig iv também indicadas no caso da TAFN durante o período neonatal, bem como no tratamento materno^{2,12}.

A aplicação de novas modalidades terapêuticas como o Factor Estimulante de Colónias de Granulocitos (G-CSF) e as trombopoietinas condicionam a diminuição do período de trombocitopenia grave e reduzem a necessidade de transfusão de plaquetas⁷.

BIBLIOGRAFIA

1. SANTOSO S, KIEFEL V: Human Platelet- Specific Alloantigens: Update; *Vox Sanguinis* 1998; 74 (Suppl. 2): 249-253.
2. KROLL H, KIEFEL V, SANTOSO S: Clinical Aspects and Typing of Platelet Alloantigens; *Vox Sanguinis* 1998; 74 (Suppl. 2): 345-354.
3. KAPLAN C: Evaluation of Serological Platelet Antibody Assays; *Vox Sanguinis* 1998 (Suppl. 2): 355-358.
4. GARRATTY G: Review: Platelet Immunology - Similarities and Differences with Red Cell Immunology; *Immunohematology* 1998, 11 (4):112-124.
5. VANGELEN-TYLER V et al. Technical Manual, 12th ed. American Association of Blood Banks, Bethesda, Maryland, 1996.
6. IMBACH P, KÜHNE T: Immune Thrombocytopenic Purpura - ITP; *Vox Sanguinis* 1998; 74 (Suppl. 2), 309-314.
7. KEKOMÄKI R: Use of HLA- and HPA-Matched Platelets in Alloimmunized Patients; *Vox Sanguinis* 1998; 74 (Suppl. 2): 359-363.
8. DE SOUSA G: Citopénias Neonatais Imunes. In: Martín-Vega C, De Sousa G, editoras. *Medicina Transfusional en/em Pediatría - Transfusión/Transfusão Autóloga. Conferencias/Lições del/do Curso Residencial Ibérico de la/da ESTM organizado en cooperación con:/em cooperação com: Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS), Associação Portuguesa de Imuno-Hemoterapia (APIH)* 1996; Oct./Out. 3-5, Lisboa: 43-49.
9. RACHEL JM, SUMMERS TC, SINOR LT, PLAPP FV: Use of a Solid Phase Red Blood Cell Adherence Method for Pretransfusion Platelet Compatibility Testing; *Am J Clin Pathol* 1988; 90 (1): 63-68.
10. JONES CD, GOULD LM, LEE S: An Evaluation of a Solid Phase Red Cell Adherence Test for Detecting Platelet-Associated IgG in Immune Thrombocytopenia; *Am J Clin Pathol* 1990; 93 (4): 552-554.
11. NORDHAGEN R, FLAATHAN ST: Chloroquine Removal of HLA Antigens from Platelets for the Platelet Immunofluorescence Test. *Vox Sanguinis* 1985; 48: 156-159.
12. GEORGE JN, EL-HARAKE MA, ASTER RH: Thrombocytopenia Due to Enhanced Platelet Destruction by Immunologic Mechanisms (Ch. 129). In Beutler E et al., editors. *Williams Hematology*, 5th ed.. McGraw-Hill, Inc. 1995: 1315-1355.
13. MOUTHON L, PIKETTY C, KAZATCHKINE: Immunomodulation of Autoimmune and Systemic Inflammatory Diseases with Intravenous Immunoglobulin; *Vox Sanguinis* 1994; 67 (Suppl. 3): 53-59.
14. TRICERRI A, VANGELI M, ADDARIO C, GUIDI L, BARTOLONI C, MAGALINI S, GANTILONI-SILVERI N: Adverse Drug Reaction to Rifampicin: a Case with Long Lasting Antiplatelet Antibodies; *Panminerva Medica* 1997; 39 (1): 64-66.
15. O'CONNELL BA: Case Report: Solid-phase Platelet Crossmatching to Support the Alloimmunized Patient; *Immunohematology* 1995; 11 (4): 150-152.
16. HOU M, STOCKELBERG D, KUTTI J, WADENVIK H: Immunoglobulins Targeting Both GPIIb/IIIa and GPIb/IX in Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura (ITP): Evidence For at Least Two Different IgG Antibodies; *Brit J Haematol* 1997; 98 (1): 64-67.
17. MACCHI L, RISPAL P, CLOFENT-SANCHEZ G, PELLEGRIN JL, NURDEN P, LENG B, NURDEN AT: Anti-platelet Antibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and the Primary Antiphospholipid Antibody Syndrome: Their Relationship with the Observed Thrombocytopenia; *Brit J Haematol* 1997; 98 (2):336-341.
18. MACRO M, BOUTARD P, LEPORRIER M: Autoimmune Thrombocytopenic Purpura. Therapeutic Modalities; *Presse Medicale* 1997; 26 (9): 439-443.