"Jamais consideres os teus estudos como uma obrigação, mas sim como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para o teu próprio prazer pessoal e para o proveito da comunidade à qual pertence o teu futuro trabalho."

Albert Einstein

(1879-1955)

Agradecimentos

Agradeço à Doutora Maria Letícia Ribeiro, Directora do Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra-E.P.E., a disponibilidade e permissão, bem como a excelente orientação científica e extrema dedicação e amabilidade, as quais possibilitaram o desenvolvimento deste estudo.

Agradeço ao Mestre Rogério Filipe Barreira, do Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra-E.P.E., o meu mentor, pela orientação, incentivo, apoio didáctico e extraordinária sabedoria profissional que foram cruciais e fundamentais na projecção e desenvolvimento deste estudo, bem como o carinho, amizade, preocupação e compreensão que demonstrou.

Agradeço à Mestre Teresa Fidalgo, responsável funcional da Unidade de Hemostase do Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra-E.P.E., pela sua permissão na minha integração junto da sua equipa técnica para a realização deste estudo.

Agradeço à Professora Doutora Emília da Conceição Duarte, coordenadora do Mestrado em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra pela sua orientação, prestação e disponibilidade oferecidas sempre que precisei.

Agradeço à equipa médica do Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra-E.P.E. pela sua prestável colaboração, nomeadamente, ao Dr. Ramón Salvado, Dra. Teresa Sevivas, Dra. Natália Martins e Dr. José Carlos Almeida.

Agradeço à equipa técnica do Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra-E.P.E., com a qual convivi diariamente e que, de alguma forma,

me ajudaram no decorrer deste estudo, em especial à Dra. Ana Teresa Simões, Dra. Ana Paula Gonsalves, D. Adília Marques, Dra. Sílvia Rodrigues e Dra. Dalila Patrício.

Agradeço à D. Maria João Vieira e ao Sr. Carlos Pedro do Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra-E.P.E. pelo agradável "bom dia" e boa disposição.

Agradeço aos meus amigos, aos verdadeiros, pelo seu ombro quando dele precisei…

Agradeço aos meus pais, irmão, avós e tio pela atenção, força, motivação e carinho que só eles me souberam dar… Por me apoiarem incondicionalmente… Por chorarem e rirem comigo… Por conseguirem com que alcançasse os meus sonhos mais além do que jamais imaginei… Sem eles eu não teria conquistado tal feito…

Agradeço ao grande amor da minha vida pelo delicado carinho, excepcional dedicação e extrema atenção… E pela força de coragem que me ofereceu nos bons e maus momentos… E por acreditar em mim…

Aos meus pais, irmão, avós e tio

Abreviaturas

%	Percentagem
ADP	Adenosina difosfato
AHAI	Anemia Hemolítica Auto-imune
ATP	Adenosina trifosfato
Ca^{2+}	Ião cálcio
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
CMV	Citomegalovírus
DH	Doença de Hodgkin
EDTA K_3	*Ethylenediaminetetraacetic acid tripotassic* (ácido etilenodiaminotetracético tripotássico)
Fab	*Fragment antigen binding* (Fragmento de ligação ao antigénio)
Fc	Fragmento Critalisável
FcγR	*Fragment Crystallizable Gamma Receptor* (Receptor do Fragmento Cristalizável gama)
fL	fentolitro
FLSA	*Forward Light Scatter Assembly*
FvW	Factor von Willebrand
Gp	Glicoproteína
GSD	*Geometric Standard Deviation*
HELLP	*Hemolysis Elevated Liver Enzimes Low Platelet Count*
HLA	*Human Leukocyte Antigen* (Antigénios de leucócitos humanos)
HP	*Helicobacter pylori*
IDCV	Imunodeficiência Comum Variável

Ig	Imunoglobina
IgIV	Imunoglobina Intravenosa
L	Litro
LES	Lúpus Eritematoso Sistémico
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LLG	Leucemia de Linfócitos T Granulares
MAIPA	*Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platetet Antigens Assay*
MAPSS	*Multi-Angle Polarized Scatter Separation*
Meg-CFC	Célula Formadora de Colónias de Megacariócitos
mg	Miligrama
MHC	*Major Histocompatibility Complex*
mL	Mililitro
MPV	*Mean Platelet Volume*
PAIgG	*Platelet-associated immunoglobulin G* (Imunoglobina G associada a plaquetas)
PCT	Plaquetócrito
PDW	*Platelet Distribution Width*
PEG-rhMGDF	*Pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor*
PL4	*Platelet factor 4* (Factor plaquetário 4)
PLT_i	Contagem de plaquetas por impedância eléctrica
PLT_o	Contagem de plaquetas por metodologia óptica
PMT	*Photomultiplier Tube*
PT	Pós-transplante

PTI	Púrpura Trombocitopénica Imune
PTT	Púrpura Trombocitopénica Trombótica
Ret	Reticulócitos
rhTPO	*Recombinant human thrombopoietin*
RNA	*Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)
rP	*Reticulated platelet* (plaquetas reticuladas)
SAF	Síndrome Antifosfolipídico
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SLPA	Síndrome Linfoproliferativo Auto-imune
SLSFA	*Side Light Scatter/Fluorescence Assembly*
TAR	Trombocitopenia e Ausência de Rádio
TCR	*T Cell Receptor* (Receptor de células T)
TO	*Thiazole Orange*
TPO	Trombopoietina
UKNEQAS	*United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for General Haematology*
VASPR	Vacina combinada anti-Sarampo, -Parotidite e -Rubéola
VHC	Vírus da Hepatite C
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VVZ	Vírus Varicela-Zoster
µL	Microlitro

Resumo

Introdução: A Púrpura Trombocitopénica Imune (PTI) é uma doença auto-imune que se caracteriza pela presença de auto-anticorpos contra as glicoproteínas plaquetares, que levam à destruição das plaquetas no sistema reticulo-endotelial. Para o diagnóstico diferencial entre trombocitopenias por hiperdestruição periférica, como a PTI, ou por hipoprodução medular (aplasia ou invasão medular por proliferação celular anormal) é necessário, frequentemente, fazer a observação morfológica da medula óssea. As plaquetas reticuladas (rP – r*eticulated platelet*) são plaquetas recentemente libertadas da medula óssea, têm um maior volume, são mais densas e têm ácido ribonucleico (RNA – *ribonucleic acid*) residual. A percentagem de rP (%rP) é um novo parâmetro plaquetar do CELL-DYN® Sapphire que utiliza o marcador de fluorescência CD4K-530.

Objectivo: O objectivo principal deste trabalho é determinar a fiabilidade da %rP na avaliação da actividade trombopoiética da medula óssea, com o intuito de vir a substituir o medulograma na abordagem diagnóstica da maioria dos casos de PTI primária.

Material e métodos: Em 139 amostras de sangue periférico, colhidas em ácido etilenodiaminotetracético tripotássico (EDTA K_3 – *ethylenediaminetetraacetic acid tripotassic*), foram determinados os diferentes parâmetros plaquetares, incluindo a %rP, e a contagem de reticulócitos. Foi utilizado um equipamento CELL-DYN® Sapphire com tecnologia de citometria de fluxo. O valor de %rP foi obtido por metodologia óptica, por detecção da dispersão do feixe de luz (laser) nos ângulos 7º e 90º, e por fluorescência emitida por CD4K-530, um marcador de RNA. As amostras foram divididas em 4 grupos: PTI primária n=34; trombocitopenia induzida por quimioterapia

n=11; anemia hemolítica autoimune (AHAI) n=18; e controlo n=76. A análise estatística foi efectuada com o *software* StatView 5.0.

Resultados: No grupo com PTI primária foi encontrada uma média (± desvio padrão) de percentagem de plaquetas reticuladas de 6.435 ± 3.584%; no grupo com trombocitopenia induzida por quimioterapia, 2.649 ± 1.382%; no grupo com AHAI, 2.012 ± 1.130%; e no grupo controlo, 1.632 ± 0.985%. As diferenças nos valores de %rP entre o grupo PTI e cada um dos outros grupos são estatisticamente significativas e não há diferenças entre os outros grupos. Na PTI primária a percentagem de reticulócitos, avaliada pelo parâmetro %Ret, não tem correlação com a %rP; o MPV (*Mean Platelet Volume*) está aumentado e o PDW (*Platelet Distribution Width*) está dentro dos valores normais.

Conclusão: O novo parâmetro plaquetar %rP provou ser um parâmetro útil no diagnóstico da PTI primária, porque, para um número de plaquetas semelhante, a %rP é significativamente mais elevada na PTI primária do que na trombocitopenia pós-quimioterapia e não é influenciada pelos reticulócitos presentes na amostra. Embora sejam necessários estudos mais alargados, nomeadamente em doentes que se apresentem com trombocitopenia associada a neoplasias linfoproliferativas, a %rP tem potencial para vir a ser utilizada como teste complementar no diagnóstico diferencial de trombocitopenias, podendo, em alguns casos, vir a substituir o medulograma. De notar ainda que, a avaliar pelo MPV e pelo PDW, na PTI primária as plaquetas têm, uniformemente, um maior volume, o que corresponde ao que é possível observar no esfregaço de sangue periférico.

Palavras-chave: Trombocitopenia; PTI primária; Plaquetas reticuladas; CELL-DYN® Sapphire; Citometria de fluxo; CD4K-530.

Abstract

Introduction: Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP) is an immune condition due to the presence of self-reactive antibodies against platelet glycoproteins, causing platelet destruction in the reticulo-endothelial system. Diagnosis is performed mainly by bone marrow aspirate, which can distinguish between thrombocytopenia by enhanced peripheral destruction (such as ITP) or thrombocytopenia due to decreased thrombopoietic activity (aplasia or medullar invasion by abnormal cell proliferation). Reticulated platelets (rP) are large, immature platelets, with residual ribonucleic acid (RNA), recently released from the bone marrow. The hematologic analyzer CELL-DYN® Sapphire allows the determination of reticulated platelets percentage (rP%), using CD4K-530 as a fluorescence marker.

Purpose of the study: The main goal of this study is to assess the reliability of rP% in the evaluation of bone marrow thrombopoietic activity, possibly replacing bone marrow aspirate in the diagnosis of primary ITP.

Material and methods: Determination of platelet parameters (including rP%) and reticulocyte counts in 139 peripheral blood samples collected in ethylenediaminetetraacetic acid tripotassic (EDTA K_3), using CELL-DYN® Sapphire haematological analyzer, with flow cytometry technology. The rP% was obtained using optic methodology, with dispersion angles of 7º and 90º, and with fluorescence of CD4K-530, a RNA marker. Samples divided in 4 groups: Primary ITP n=34; chemotherapy-induced thrombocytopenia n=11; auto-immune haemolytic anaemia (AIHA) n=18; and control n=76. Statistical analysis with StatView 5.0 software.

Results: Average rP% (± standard deviation) in: Primary ITP group = 6.435 ± 3.584%; chemotherapy-induced thrombocytopenia group =2.649 ± 1.382%; AIHA group = 2.012

± 1.130% and control group = 1.632 ± 0.985%. Statistically significant differences between rP% values in ITP group and each one of the other groups. In ITP group, there is no correlation between reticulocyte percentage (evaluated by the parameter Ret%) and rP%; mean platelet volume (MPV) is higher and platelet distribution width (PDW) is in the normal range.

Conclusion: The new platelet parameter rP% proved to be an useful tool in primary ITP diagnosis because, for a similar platelet count, rP% is significantly higher in primary ITP than in chemotherapy-induced thrombocytopenia, with no influence of reticulocyte counts. Even though it is necessary to perform more complimentary studies, especially in patients with lymphoproliferative malignancies associated thrombocytopenia, rP% has potential to be used as complimentary test in thrombocytopenia differential diagnosis, replacing bone marrow aspiration in some cases. It is important to note that, regarding MPV and PDW in primary ITP, platelets have higher size, which can be corroborated by the peripheral blood smear observation.

Keywords: Thrombocytopenia; Primary Immune Thrombocytopenic Purpura; Reticulated Platelets; CELL-DYN® Sapphire; Flow Cytometry; CD4K 530.

Índice

Agradecimentos ii

Abreviaturas v

Resumo viii

Abstract x

Índice xii

Capítulo 1 – Introdução 1

1.1 – Plaqueta 2

1.1.1 – Estrutura e função plaquetar 2

1.1.1.1 – Glicoproteínas plaquetares 3

1.1.2 – Produção de plaquetas 4

1.2 – Trombocitopenia 5

1.3 – Plaquetas reticuladas 7

1.4 – Púrpura Trombocitopénica Imune 7

1.4.1 – Definição e Classificação 7

1.4.2 – Patofisiologia 8

1.4.2.1 – Auto-anticorpos 8

1.4.2.2 – Envolvimento de Células B e T 10

1.4.2.3 – Destruição no sistema reticulo-endotelial 10

1.4.2.4 – Papel do sistema complemento 12

1.4.2.5 – Trombopoietina 12

1.4.3 – Genética 13

1.4.4 – Apresentação Clínica 13

1.4.5 – Incidência 16

1.4.6 – Diagnóstico 16

1.4.7 – Tratamento 17

1.5 – Anemia Hemolítica Auto-imune 18

1.6 – Trombocitopenia induzida por quimioterapia 19

1.7 – CELL DYN® Sapphire 19

1.7.1 - Metodologias 20

1.7.1.1 – Espectrofotometria de absorção 20

1.7.1.2 – Metodologia por impedância eléctrica 20

1.7.1.3 – Citometria de fluxo 21

1.7.1.3.1 – Metodologia óptica 21

1.7.2 – Parâmetros plaquetares 23

1.7.3 – Interpretação dos gráficos plaquetares 24

Capítulo 2 – Objectivo 25

Capítulo 3 – Material e Métodos 27

3.1 – População em estudo 28

3.2 – Amostras de sangue periférico 28

3.3 – Selecção de amostras 28

3.4 – Contagem das plaquetas 29

3.5 – Determinação dos índices plaquetares MPV e PDW 29

3.6 – Análise das plaquetas reticuladas 30

3.7 – Análise dos reticulócitos 31

3.8 – Controlo de Qualidade 31

3.9 – Organização de dados 32

3.10 – Análise Estatística 32

Capítulo 4 – Resultados 33

4.1 – Intervalo de valores de referência para o parâmetro %rP 34

4.2 – Percentagem de plaquetas reticuladas 34

4.2.1 – Grupo com PTI 35

4.2.2 – Grupo com trombocitopenia induzida por quimioterapia 36

4.2.3 – Grupo com AHAI 37

4.3 – Determinação do MPV e PDW 37

4.3.1 – Grupo com PTI 38

4.3.2 – Grupo com trombocitopenia induzida por quimioterapia 39

4.3.3 – Grupo com AHAI 39

Capítulo 5 – Discussão 40

Capítulo 6 – Conclusão 46

Referências bibliográficas 48

Capítulo 1 Introdução

O sangue periférico é constituído por plasma com uma suspensão de células hematopoieticas produzidas na medula óssea. A plaqueta é a mais pequena destas células, mas não a menos importante. Alterações plaquetares, quantitativas e/ou qualitativas, podem desencadear sintomatologia hemorrágica grave. A diminuição do número de plaquetas no sangue periférico, trombocitopenia, pode estar associada a diversas patologias, que no essencial se agrupam em situações de hiperdestruição periférica ou de hipoprodução medular. A Púrpura Trombocitopénica Imune (PTI) é caracterizada por uma produção normal ou aumentada de plaquetas que, após a sua libertação da medula óssea, são destruídas por um mecanismo imune. Esta patologia está associada a uma elevada percentagem de plaquetas reticuladas, que traduz o estado de actividade trombopoiética da medula óssea (Lichtman et al., 2006).

1.1 – Plaqueta

1.1.1 – Estrutura e função plaquetar

A plaqueta tem uma forma discóide, quando inactiva, e é anucleada, com um diâmetro de cerca de 3-5µm (Hoffbrand et al., 2005) e um volume plaquetar médio (MPV – *Mean Platelet Volume*) entre 8.17-9.65fL. A estrutura da plaqueta e os seus constituintes (Figura 1) distribuem-se, segundo Castro et al. (2006), em quatro zonas: (1) Zona periférica (membrana plasmática e sistema canicular aberto); (2) Zona sol-gel (citoesqueleto); (3) Zona de organelos (grânulos α e grânulos densos, mitocôndrias e lisossomas); (4) Sistema membranar (sistema tubular denso).

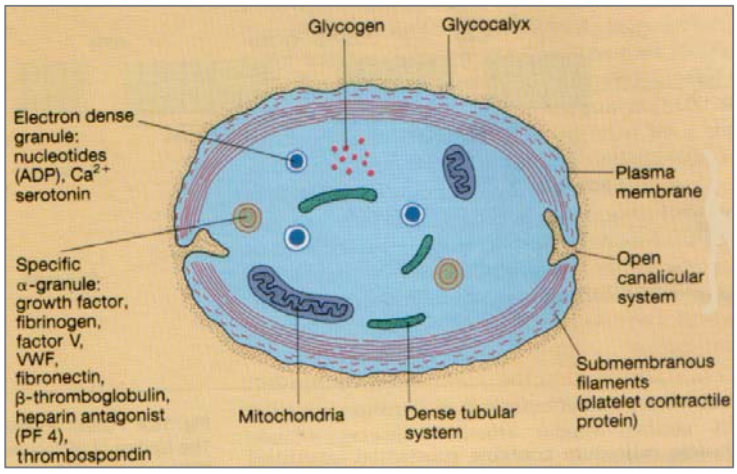

Figura 1 – Estrutura celular da plaqueta. ADP: adenosina difosfato; Ca^{2+}: ião de Cálcio; PL4: *Platelet factor 4* (Factor plaquetário 4); VWF: *Von Willebrand Factor* (FvW – Factor von Willebrand). (Hoffbrand et al., 1993)

As plaquetas circulam na corrente sanguínea num estado quiescente mas, sempre que há lesão da parede do vaso sanguíneo com exposição da matriz do sub-endotélio, dirigem-se ao local lesionado onde promovem a rápida formação do coágulo que vai encerrar a lesão. Neste processo, denominado hemostase primária, interferem outros factores da coagulação que levam à hemostase secundária (Hoffbrand et al., 2005).

1.1.1.1 – Glicoproteínas plaquetares

As plaquetas apresentam uma série de glicoproteínas (Gp) transmembranares que são muito importantes na sua função hemostática, entre outras: GpIIb/IIIa (ligação ao fibrinogénio); GpIa/IIa (ligação ao colagénio); GpIb/IX/V (ligação ao Factor von Willebrand – FvW); GpIV (liga à trombospondina) e GpVI (ligação ao colagénio) (Lichtman et al., 2006).

1.1.2 – Produção de plaquetas

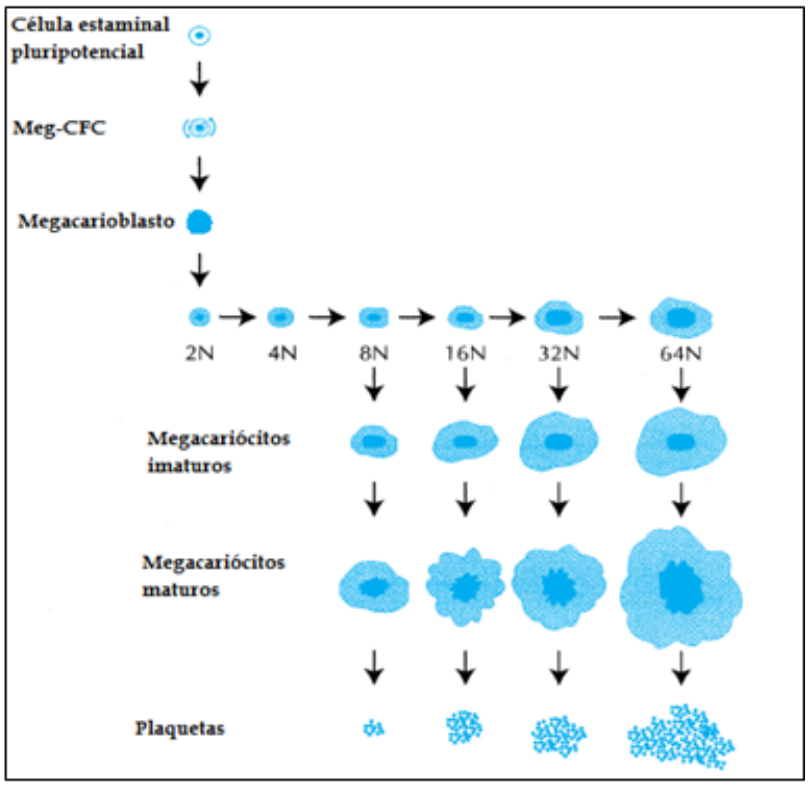

Figura 2 – Megacariopoiese e trombopoiese. A megacariopoiese é o processo de produção de megacariócitos maduros; a trombopoiese leva à produção de plaquetas, que resultam da fragmentação citoplasmática dos megacariócitos. Meg-CFC: Célula Formadora de Colónias de Megacariócitos. (Adaptado de Lichtman et al. (2006))

As células do sangue periférico são formadas na medula óssea, mais concretamente nos espaços do tecido intersinusoidal, e derivam das células estaminais pluripotenciais hematopoiéticas que, quando estimuladas, se diferenciam para dar origem a uma determinada linhagem celular (Lichtman et al., 2006). A megacariopoiese é a linhagem de produção de megacariócitos na medula óssea, onde o megacarioblasto é um precursor do megacariócito. O megacarioblasto tem um único núcleo e muito pouco citoplasma e, a partir do momento em que sofre divisão nuclear sem divisão citoplasmática (replicação nuclear endomitótica sincronizada), dá origem ao megacariócito, uma célula plurinuclear (poliplóide) com um citoplasma extenso

(Hoffbrand et al., 1993). A concentração de vários núcleos no interior do megacariócito possibilita a produção das inúmeras proteínas que constituem as 2000-3000 plaquetas produzidas por cada megacariócito (Lichtman et al., 2006). As plaquetas resultam da fragmentação citoplasmática do megacariócito, num processo denominado trombopoiese, que é estimulado pela hormona trombopoietina (TPO) (Lichtman et al., 2006) (Figura 2).

O baço tem um papel muito importante na regulação do número de plaquetas no sangue periférico, servindo de reservatório para cerca de ⅓ das plaquetas produzidas (Hilman et al., 2005), o que permite um equilíbrio dinâmico dentro de um intervalo de valores normais de 150-400x10^9/L. Na corrente sanguínea as plaquetas têm uma vida média de 10 dias (Hoffbrand et al., 1993).

1.2 – Trombocitopenia

Quando o número de plaquetas no sangue periférico se encontra abaixo de 150x10^9/L diz-se que há trombocitopenia (Lewis et al., 2006).

A trombocitopenia pode ser devida a: elevada destruição periférica de plaquetas (hiperdestruição periférica); distribuição anormal das plaquetas no organismo (hiperesplenismo); ou baixa produção de plaquetas na medula óssea (hipoprodução medular) (Tabela I) (Hilman et al., 2005). A avaliação do aspirado medular permite perceber se há ou não diminuição da produção de plaquetas (Hilman et al., 2005; Hoffbrand et al., 2005; Lichtman et al., 2006). Antes de se proceder ao diagnóstico diferencial é importante excluir artefactos que podem ser responsáveis por uma falsa trombocitopenia (ou pseudo-trombocitopenia), como a presença de um coágulo na

amostra, microcoágulos ou agregados plaquetares, visíveis no esfregaço de sangue periférico (Lewis et al., 2006).

Tabela I – Diagnóstico diferencial da trombocitopenia. Na coluna da esquerda estão as causas da trombocitopenia e na coluna da direita as situações clínicas associadas. (Adaptado de Hilman et al., 2005)

Causa da trombocitopenia	Situação clínica	
Elevada destruição plaquetar (hiperdestruição)	Não imune	CID
		Síndrome hemolítico-urémico
		PTT
		Síndrome HELLP
	Imune	Secundária a outras doenças (SIDA, LES, aloimunização, doenças linfoproliferativas)
		PTI
Baixa produção plaquetar (hipoprodução)	Alteração da produção medular	Aplasia
		Drogas/toxinas/citostáticos
		Proliferação celular anormal
		Invasão medular por neoplasia
	Defeitos congénitos	Anemia de Fanconi
		Síndrome TAR
		Rubéola
		Anomalia May-Hegglin
		Síndrome Wiskoot-Aldrich
	Produção ineficaz	Deficiência em B_{12}/Folato
Distribuição plaquetar anormal	Hiperesplenismo	Hepatopatias
		Mielofibrose

CID: Coagulação Intravascular Disseminada; HELLP: *Hemolysis Elevated Liver Enzimes Low Platelet Count*; LES: Lúpus Eritematoso Sistémico; PTI: Púrpura Trombocitopénica Imune; PTT: Púrpura Trombocitopénica Trombótica; SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida; TAR: Trombocitopenia e Ausência de Rádio.

1.3 – Plaquetas reticuladas

As plaquetas reticuladas (rP – *Reticulated Platelet*) são plaquetas recentemente libertadas da medula óssea; são maiores, mais densas, têm ácido ribonucleico (RNA – *ribonucleic acid*) residual, e são mais activas no processo de formação do trombo hemostático do que as plaquetas maduras (Lichtman et al., 2006; Hilman et al., 2005).

Dos parâmetros que podem ser usados para o diagnóstico diferencial das trombocitopénias destacamos o medulograma, o doseamento de trombopoietina e percentagem de plaquetas reticuladas (Kurata et al., 2001). Vários autores sugerem uma associação entre a percentagem aumentada de rP e as trombocitopenias hiperdestrutivas (Kurata et al., 2001; Monteagudo et al., 2008; Koike et al., 1998; Saxon et al., 1998), e uma contagem absoluta de rP diminuída, mas não a percentagem, em situações hipoprodutivas (Kurata et al., 2001). Assim, a percentagem de plaquetas reticuladas no sangue periférico traduz a actividade trombopoiética da medula óssea, à semelhança da contagem de reticulócitos, que permite avaliar a actividade eritropoiética (Lichtman et al., 2006).

1.4 – Púrpura Trombocitopénica Imune

1.4.1 – Definição e Classificação

A Púrpura Trombocitopénica Imune (PTI) é uma desordem auto-imune que se caracteriza por trombocitopenia resultante da destruição acelerada e descontrolada de plaquetas por auto-anticorpos anti-plaquetas (Hoffbrand et al., 2005). A PTI pode ser do adulto ou da criança; PTI primária, se é um achado isolado, ou PTI secundária, se

associada a outras doenças; e pode ser aguda ou crónica (Lichtman et al., 2006; Cines et al., 2009). Na PTI o MPV é elevado devido ao grande número de megatrombócitos (Kelton et al., 1979).

1.4.2 – Patofisiologia

1.4.2.1 – Auto-anticorpos

Na década de 50, em ensaios de administração de plasma de doentes com PTI em voluntários normais, Harrington evidenciou a presença de auto-anticorpos anti-plaquetas, uma vez que esses voluntários adquiriram trombocitopenia severa (Lichtman et al., 2006). Nestes primeiros estudos atribuía-se a trombocitopenia, dos doentes com PTI crónica, apenas à destruição periférica das plaquetas; mais tarde provou-se que os auto-anticorpos também têm afinidade para os megacariócitos (McKenna et al., 1962), o que pode causar diminuição da trombopoiese (McMillan et al., 1978).

No início dos anos 70, dois grupos de investigadores comprovaram que as plaquetas de doentes com PTI crónica contêm elevados níveis de PAIgG (*Platelet-associated immunoglobulin G* – Imunoglobina G associada a plaquetas) (Luiken et al., 1977; Kelton et al., 1979).

No final dos anos 80, foram descritos dois ensaios específicos para os auto-antigénios alvos: *Immunobead Assay* (McMillan et al., 1987) e MAIPA (*Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platetet Antigens Assay*) (Kiefel et al., 1987).

Na PTI os auto-anticorpos estão dirigidos contra a GpIIb/IIIa (Woods et al., 1984), a GPIb/IX (Szatkowski et al., 1986), ou ambas (McMillan et al., 1987), e a GPIa/IIa (Deckmyn et al., 1994). Num dos estudos iniciais, envolvendo a GpIIb/IIIa, foi

observada uma não ligação dos auto-anticorpos de doentes com PTI às plaquetas de doentes com Trombastenia de Glanzmann, que são deficientes nesta glicoproteína, embora esses mesmos auto-anticorpos se ligassem a plaquetas normais, comprovando que a GpIIb/IIIa é um auto-antigénio alvo na PTI (Leeuwen et al., 1982).

Os epítopos imunodominantes da GPIIb/IIIa reconhecidos pelos auto-anticorpos encontram-se no domínio extracelular (terminal amínico) tanto da GPIIbα como da GPIIIa (Kuwana et al., 2001). No entanto, também são reconhecidos os epítopos do domínio citoplasmático (terminal carboxílico) (Souza et al., 1991; Bowditch et al., 1996). Estudos da reacção de auto-anticorpos Imunoglobina G (IgG) contra este complexo glicoproteico plaquetar indicam que menos de 50% dos doentes com PTI têm auto-anticorpos que não são patogénicos, porque estão direccionados contra epítopos localizados no domínio citoplasmático que é apenas exposto durante a destruição plaquetar. Estes auto-anticorpos poderão ter um papel importante na trombocitopenia severa (Fujisawa et al., 1991 e Fujisawa et al., 1992). Também foram feitos estudos para determinar os epítopos do domínio extracelular da GpIb/IX, estudando uma sequência de aminoácidos da GpIbα, o maior componente deste complexo glicoproteico (He et al., 1995).

Os auto-anticorpos contra epítopos externos das glicoproteínas são considerados marcadores distintivos na PTI em 80% dos doentes, enquanto que os auto-anticorpos contra epítopos internos das glicoproteínas são um fenómeno secundário de destruição plaquetar e não patogénica (He et al. 1994).

Os auto-anticorpos podem ser produzidos contra antigénios proteicos virais que são "cross-reactivos" contra auto-antigénios plaquetares, por mimificação molecular, como acontece, por exemplo, pela infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e pela bactéria *Helicobacter pylori* (PTI secundária) (Cines et al., 2009).

1.4.2.2 – Envolvimento de Células B e T

Inicialmente, os auto-anticorpos na PTI foram classificados como sendo policlonais, no entanto, mais tarde verificou-se que pelo menos alguns doentes com PTI têm proliferação clonal de células B e, tanto as células B $CD5^-$ como as células B $CD5^+$, produzem auto-anticorpos IgG contra as glicoproteínas GpIIb/IIIa e GpIb (Harst et al., 1990).

Alguns autores defendem que a PTI pode ser causada não só pelos auto-anticorpos, mas também por células T direccionadas contra as plaquetas e/ou megacariócitos, por recrutamento das células T, possivelmente devido à elevada expressão dos genes VLA-4 e CX3CR1 (Olsson et al., 2008).

1.4.2.3 – Destruição no sistema reticulo-endotelial

Os auto-anticorpos são responsáveis pela destruição de plaquetas no sistema reticulo-endotelial ao nível do baço (principalmente), fígado e medula óssea (Karpatkin et al., 1980). Em estudos em ratos observou-se a presença de auto-anticorpos e/ou auto-anticorpos ligados a agregados plaquetares principalmente na polpa vermelha do baço e também no fígado (particularmente nas células de Kupffer, e também nas células endoteliais hepáticas) (Bagchus et al., 1989). No entanto, o baço não é apenas o principal local de destruição das plaquetas, como também é o local onde se inicia a sua sensibilização e onde se produzem auto-anticorpos (McMillan et al., 1980).

As plaquetas revestidas por auto-anticorpos são rapidamente retiradas da circulação via ligação do fragmento cristalizável (Fc) das IgG aos receptores FcγR (*Fragment Crystallizable Gamma Receptor* – Receptor do Fragmento Cristalizável

gama) dos macrófagos presentes nos cordões de Billroth (ou cordões esplénicos) e noutros locais do sistema reticulo-endotelial (Hoffbrand et al., 2005; Male et al., 2006) (Figura 3). O "bloqueio" dos receptores FcγR é um mecanismo terapêutico importante dos esteróides e especialmente da Ig intravenosa (IgIV) em doentes com PTI (Bussel et al., 1983). Existem polimorfismos nos receptores FcγR, mais concretamente no FcγRIIa (CD32) e no FcγRIIIa (CD16), que podem estar envolvidos na resposta ao tratamento na PTI (Fujimoto et al., 2001).

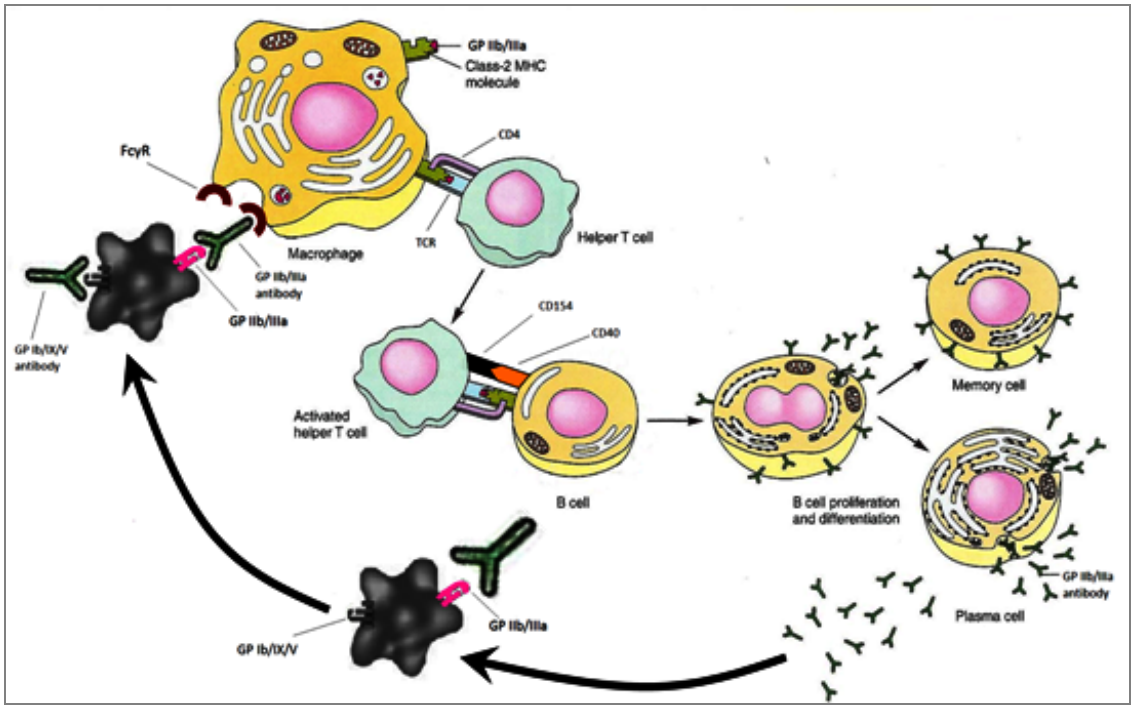

Figura 3 – Mecanismo de destruição plaquetar no sistema reticulo-endotelial. As plaquetas opsonizadas por auto-anticorpos anti-GpIIb/IIIa são fagocitadas e destruídas por macrófagos (células apresentadoras de antigénios) após ligação do fragmento Fc dos auto-anticorpos aos receptores FcγR. As células T $CD4^+$ (*helper T cells*) auto-reactivas reconhecem porções peptídicas da GpIIb/IIIa (Kuwana et al., 1998; Sukati et al., 2007) expostas pelo complexo MHC classe II e vão activar as células B, que sofrem proliferação e diferenciação em plasmócitos, células produtoras de auto-anticorpos anti-GpIIb/IIIa. De notar que a activação completa das células B necessita também da ligação do CD40 ao CD154 (Male et al., 2006). FcγR: *Fragment Crystallizable Receptor Gamma* (Receptor do Fragmento Cristalizável gama); Gp: glicoproteína; MHC: *Major Histocompatibility Complex*; TCR: *T Cell Receptor* (Receptor de células T). (Figura adaptada de Maluf Júnior (2007) e Fox (2002))

1.4.2.4 – Papel do sistema complemento

A activação do sistema complemento tem um papel importante na trombocitopenia em alguns doentes com PTI, nos quais se verifica o aumento de C3 (Hauch et al., 1977), C4 e C9 (Lichtman et al., 2006). Estudos *in vitro* mostraram que, na presença de auto-anticorpos anti-plaquetas, o C3 e o C4 podem ligar-se às plaquetas, desencadeando a sua lise (Hymes et al., 1993).

1.4.2.5 – Trombopoietina

A trombopoietina (TPO) é um regulador primário da produção de plaquetas e actua através do receptor c-Mpl que se encontra nos megacarioblastos, megacariócitos e plaquetas (Kuter et al., 1995). O nível de TPO circulante é regulado primariamente pela *clearance* da TPO ligada aos receptores c-Mpl das plaquetas circulantes.

O número de plaquetas circulantes pode ser mediado por um *feedback* auto-regulador: 1) na trombocitopenia há níveis elevados de TPO em circulação, porque há poucas plaquetas, que se vai ligar ao c-Mpl nos megacariócitos, estimulando a sua maturação e a produção de mais plaquetas (Li et al., 1999); 2) quando a contagem de plaquetas é elevada, há menos TPO livre no sangue periférico, há menos quantidade a ligar-se aos megacariócitos e a produção de plaquetas na medula óssea baixa. No entanto, a massa de megacariócitos aparenta ser o factor mais determinante dos níveis de TPO em doentes trombocitopénicos (Koike et al., 1998).

Medir os níveis de TPO no soro pode ser útil no diagnóstico diferencial das trombocitopenias (se por hiperdestruição periférica ou. por hipoprodução medular)

(Emmons et al., 1996). Os níveis de TPO são normais ou ligeiramente aumentados nos doentes com PTI (Emmons et al., 1996; Hirayama et al., 1998).

1.4.3 – Genética

Roark e os colaboradores (2002) demonstraram que alguns auto-anticorpos anti-glicoproteínas plaquetares resultam de rearranjos de um único gene da região variável da cadeia pesada da imunoglobina, no fragmento de ligação ao antigénio (Fab – *Fragment antigen binding*): o gene V_H3-30. Estes autores concluíram que os auto-anticorpos direccionados contra as plaquetas surgem por mutação somática e expansão clonal de células B.

A influência de factores genéticos leva a que haja uma predisposição para determinadas doenças auto-imunes, no entanto, pouco se sabe acerca da predisposição para a PTI. Foi encontrada uma prevalência ligeiramente superior dos alelos HLA-DRw2 (Karpatkin, 1980; Karpatkin et al., 1979) e HLA-DRB1*0410 (Nomura et al., 1998), no entanto, poucos estudos mostram de forma consistente a ligação entre a PTI e o complexo MHC (*Major Histocompatibility Complex*). Parece haver diferenças raciais em HLA (*Human Leukocyte Antigen* (Antigénios de leucócitos humanos)) entre populações japonesas de doentes com PTI e populações de outros países (Nomura et al., 1998).

1.4.4 – Apresentação Clínica

A apresentação clínica da PTI difere entre os doentes adultos e pediátricos. A PTI nas crianças está normalmente associada a uma infecção viral precedente, e é, em

geral, uma trombocitopenia severa que se desenvolve subitamente (Hoffbrand et al., 2005) e ambos os sexos são igualmente afectados (Lichtman et al., 2006). Em cerca de 80% das crianças a trombocitopenia regride dentro de 6 a 12 meses (Cines et al., 2009). A PTI aguda pode ocorrer também após vacinação contra vários agentes infecciosos, como, por exemplo, a VASPR (Vacina combinada anti-Sarampo, -Parotidite e -Rubéola) (Cines *et al*., 2009).

Ao contrário da PTI da infância, a PTI em adultos é, geralmente, uma doença crónica, sem associação com um evento óbvio e manifesta-se por hemorragia moderada a severa (Hoffbrand et al., 2005; Lichtman et al., 2006) e é predominante em mulheres (Cines et al., 2005; Lichtman et al., 2006). Alguns adultos com PTI têm uma apresentação aguda semelhante à das crianças, no entanto, alguns estudos referem que aproximadamente 50% dos doentes estão assintomáticos e são diagnosticados numa análise de rotina (Hoffbrand et al., 2005). A PTI crónica caracteriza-se por uma contagem de plaquetas inferior a $150x10^9$/L por mais de 6 meses consecutivos (Lichtman et al., 2006).

Muitos dos casos de PTI são considerados primários (idiopáticos), enquanto que outros são atribuídos a condições co-existentes (PTI secundária) (Figura 4), nomeadamente a doenças linfoproliferativas [leucemia linfocítica crónica (PTI-LLC), doença de Hodgkin (PTI-DH), leucemia de linfócitos T granulares (PTI-LLG), síndrome linfoproliferativo auto-imune (PTI-SLPA)]; infecções [vírus da imunodeficiência humana (PTI-VIH), citomegalovírus (PTI-CMV), vírus Varicela-Zoster (PTI-VVZ), Vírus da hepatite C (PTI-VHC), *Helicobacter pylori* (PTI-HP)]; doenças auto-imunes sistémicas [anemia hemolítica auto-imune (PTI-AHAI) – síndrome de Evans –, lúpus eritematoso sistémico (PTI-LES)]; imunodeficiência

comum variável (PTI-IDCV); síndrome antifosfolipídico (ITP-SAF) e situações de pós-transplante (PTI-PT) (Cines et al., 2009).

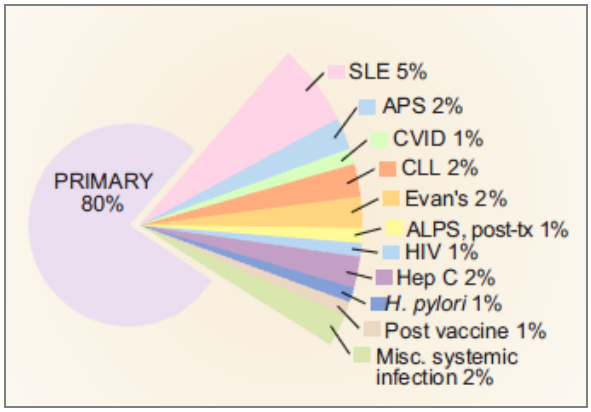

Figura 4 – Proporção estimada das várias formas da PTI secundária (num total de 20%). ALPS: *autoimmune lymphoproliferative syndrome* (síndrome linfoproliferativo auto-imune); APS: *antiphospholipid syndrome* (síndrome antifosfolipídico); CLL: *chronic lymphocytic leukemia* (leucemina linfocítica crónica); CVID: *common variable immune deficiency* (imunodeficiência comum variável); Post-tx: *post–bone marrow or solid organ transplantation* (pós-transplante); SLE: *systemic lupus erythematosus* (lúpus eritematoso sistémico). (Cines et al., 2009)

O número de plaquetas circulantes condiciona os sintomas e sinais da PTI (quer primária, quer secundária). Aproximadamente um terço dos doentes apresenta contagens superiores a $30x10^9$/L, sem hemorragia significativa; os doentes com contagens inferiores podem ter manifestações hemorrágicas, em que são comuns a púrpura (equimoses e petéquias), epistaxis, menorragias e hemorragias gengivais, sendo os menos comuns a hematúria, hemoptises e hemorragias gastrointestinais (Lichtman et al., 2006). Os doentes com contagem de plaquetas persistentemente abaixo de 10-$20x10^9$/L podem ter hemorragias graves, mas não são frequentes (Hoffbrand et al., 2005); a hemorragia intra-craniana está, normalmente, associada a trauma ou lesões vasculares (Lichtman et al., 2006), e que requer um tratamento mais agressivo (Psaila et al., 2009).

O baço tem um tamanho normal ou ligeiramente aumentado, com peso inferior a 200g (Hoffbrand et al., 2005); histologicamente pode apresentar uma aparência granular ou "suja" devido às plaquetas acumuladas nos cordões de Billroth (Hoffbrand et al., 2005).

1.4.5 – Incidência

A PTI é uma doença rara, no adulto a incidência é maior em mulheres, aumenta com a idade, ocorrendo numa média de idades de 56 anos, e as complicações de risco de vida são mais frequentes em doentes idosos com mais de 60 anos (Frederiksen et al., 1999; Cines et al., 2005). A taxa de mortalidade na PTI crónica é relativamente baixa (5-20%) (Wong et al., 1998), mesmo em doentes com trombocitopenia severa (Portielje et al., 2001).

1.4.6 – Diagnóstico

O diagnóstico da PTI é feito por exclusão de outras causas de trombocitopenia, através da história clínica, exame físico, análise do sangue perifério (observação morfológica e contagem diferencial das células) e exame morfológico da medula óssea (medulograma). Podem também ser feitos outros testes, nomeadamente a determinação dos níveis de trombopoietina (Cines et al., 2005; Provan et al., 2010).

O medulograma (análise morfológica do aspirado medular), mostra um número normal ou aumentado de megacariócitos de morfologia normal. A eritropoiese e a mielopoiese são normais. A *American Society of Hematology* recomenda que, se os doentes com trombocitopenia isolada tiverem menos de 60 anos, a aspiração da medula

é desnecessária na apresentação da doença. No entanto, alguns hematologistas aconselham o medulograma para descartar leucemias e mielodisplasias, especialmente em indivíduos com mais de 40 anos (Lichtman et al., 2006).

Sintomas como perda de peso, febre, hepatomegalia, linfadenopatias e esplenomegalia excluem a PTI, sugerindo um diagnóstico alternativo (Lichtman et al., 2006).

1.4.7 – Tratamento

Tabela II. Opções de tratamento na PTI e respectivos mecanismos de acção. (Gernsheimer, 2009; Provan et al., 2010)

Mecanismo	Opção de tratamento
Interferência na destruição de plaquetas por acção dos auto-anticorpos	Corticosteroides
	IgIV
	Imunoglobina Anti-D
	Esplenectomia
	Danazol
	Vinca alcalóides
Limpeza de anticorpos da circulação	Plasmaférese
Imunossupressão não específica de células T	Azatioprina
	Ciclofosfamida
	Ciclosporina A
	Corticosteróides
	Danazol
Interferência na participação das células B e T na síntese de auto-anticorpos	Anticorpo para o CD-20 (Rituximab)
	Anticorpo para o ligando do CD40
	IgIV
	Mofetil micofenolato

Fornecimento de plaquetas	Transfusão de plaquetas
Aumento da produção de plaquetas	Transplante de medula óssea
	Agonistas de trombopoietina recombinante (rhTPO, PEG-rhMGDF)
	Agonistas do receptor da trombopoietina (romiplostim, eltrombopag, AKR-501)
	Corticosteroides

IgIV: imunoglobina intravenosa; PEG-rhMGDF: *Pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor*; rhTPO: *Recombinant human thrombopoietin*.

São vários os estudos acerca do tratamento adequado para a PTI, no que respeita às dosagens e tempos de tratamento (Marín, 2009; Provan et al., 2010; Gernsheimer, 2009; Cines et al., 2005; Nakhoul et al., 2006). Os mecanismos de acção de alguns agentes terapêuticos estão representados na Tabela II.

1.5 – Anemia Hemolítica Auto-imune

A Anemia Hemolítica Auto-imune (AHAI) caracteriza-se por anemia com uma diminuição do número de eritrócitos no sangue circulante ($<4.5x10^{12}$/L), devido à hiperdestruição periférica destas células, que são opsonizadas por auto-anticorpos e fagocitadas no sistema reticulo-endotelial, principalmente no baço (Lichtman et al., 2006).

A produção de eritrócitos (eritropoiese) ocorre na medula óssea por diferenciação das células estaminais hematopoiéticas, dando origem ao eritroblasto, que após perda do núcleo, resulta numa célula precursora do eritrócito – o reticulócito. Esta célula é um eritrócito jovem recentemente libertado da medula óssea e contêm elevada quantidade de RNA residual (Lichtman et al., 2006). A percentagem de reticulócitos

(%Ret) permite avaliar a actividade eritropoiética da medula óssea face a uma anemia, distinguindo entre hipoprodução e hiperdestruição periférica de eritrócitos (Lichtman et al., 2006). No caso da AHAI a percentagem de reticulócitos é elevada (>2%). Teoricamente, o RNA residual dos reticulócitos poderia interferir na contagem das plaquetas reticuladas.

1.6 – Trombocitopenia induzida por quimioterapia

A quimioterapia é um dos tratamentos usados em doentes com cancro, que acarreta, como efeito secundário, uma aplasia medular transitória, uma diminuição drástica da hematopoiese na medula óssea, que afecta todas as linhagens celulares (Hilman et al., 2005; Lichtman et al., 2006). A linhagem plaquetar é afectada pelas drogas quimioterápicas por indução da apoptose nos megacariócitos nos seus primeiros estadios de diferenciação, daí a reduzida massa destes precursores na medula óssea, o que afecta a produção de plaquetas e provoca trombocitopenia (Zeuner et al., 2007).

1.7 – CELL DYN® Sapphire

O CELL-DYN® Sapphire (Abbott Diagnostics Division, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064, USA) (Figura 5) é um analisador automático multiparamétrico para contagem de células hematológicas que possibilita a avaliação qualitativa dos componentes celulares do sangue, recorrendo a várias metodologias: espectrofotometria de absorção, impedância eléctrica e citometria de fluxo.

Figura 5 – CELL-DYN® Sapphire. (Abbott Diagnostics Division, 2009)

1.7.1 - Metodologias

1.7.1.1 – Espectrofotometria de absorção

A espectrofotometria de absorção baseia-se numa relação linear entre a quantidade de luz que uma amostra absorve num determinado espectro de absorção e a concentração da entidade absorvente. No CELL-DYN® Sapphire, a espectrofotometria de absorção mede a quantidade de hemoglobina, usando esta molécula como a entidade absorvente de luz (pico de absorção de 544nm). O procedimento começa pela lise dos eritrócitos da amostra, previamente diluída e homogeneizada. A amostra é iluminada por luz de comprimento de onda de 540nm e um foto-detector mede a quantidade de luz que atravessa a amostra (transmitância). Também é medida a trânsmitância de uma solução transparente livre de hemoglobina. O CELL-DYN® Sapphire calcula a concentração de hemoglobina na amostra através da diferença do valor de absorção entre a solução transparente e a amostra lisada.

1.7.1.2 – Metodologia por impedância eléctrica

A metodologia por impedância eléctrica baseia-se no Principio de Coulter. A amostra previamente diluída encontra-se numa câmara (câmara de pré-análise), que

possui um elétrodo interno negativo, e as células vão migrar para uma câmara adjacente (câmara de pós-análise), que contém um eléctrodo interno positivo. Ao passar através de um orifício, com um determinado diâmetro e comprimento, é gerado um impulso eléctrico. O número de impulsos eléctricos indica a quantidade de células, com um determinado tamanho; a amplitude dos impulsos é proporcional ao volume das partículas. Com esta metodologia, a quantificação das células constituintes do sangue é calculada pelo seu tamanho.

1.7.1.3 – Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um processo de contagem e medição das características celulares. As células são levadas por um fluxo de fluido e passam individualmente através de uma zona de detecção, onde são medidas as suas características físicas e/ou químicas. Os princípios científicos e técnicos da citometria de fluxo são aplicados na metodologia óptica do CELL-DYN® Sapphire.

1.7.1.3.1 – Metodologia óptica

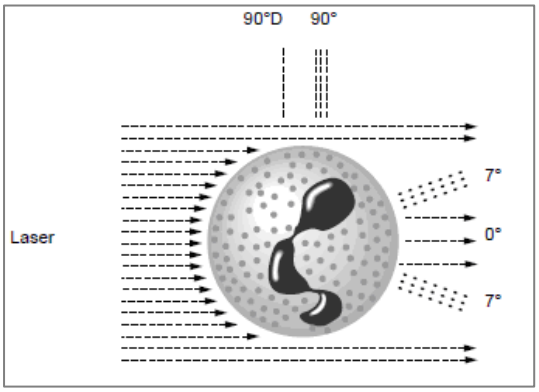

Figura 6 – Ângulos de dispersão. Os feixes com ângulos de dispersão têm origem no embate do laser numa célula constituinte do sangue (aqui representada por um neutrófilo). (Abbott Diagnostics Division, 2009)

Tabela III – Componentes do sistema óptico responsáveis pela captação dos feixes de luz dispersos em vários ângulos e da fluorescência. (Abbott Diagnostics Division, 2009)

Detector	Sensor	Ângulo de dispersão / Fluorescência
FLSA	Díodo interno	0º
	Díodo externo	7º
SLSFA	PMT 1 (*Photomultiplier Tube 1*)	90º (despolarizado)
		FL1 (fluorescência de 530nm)
	PMT 2 (*Photomultiplier Tube 2*)	90º (polarizado)
		FL2 (fluorescência de 570nm)
	PMT 3 (*Photomultiplier Tube 3*)	FL3 (fluorescência de 630nm)

FLSA: *Forward Light Scatter Assembly*; PMT: *Photomultiplier Tube*; SLSFA: *Side Light Scatter/Fluorescence Assembly*.

A tecnologia óptica consiste em fazer interceptar perpendicularmente um laser de cor azul (comprimento de onda de 488nm) com as células encaminhadas individualmente e de forma ordenada num fluxo de líquido. O feixe único de radiação, ao embater na célula, é desviado em diferentes ângulos (Figura 6) produzindo vários feixes luminosos que são captados por dois sistemas de detectores (Tabela III). O detector FLSA (*Forward Light Scatter Assembly*) está situado na direcção do laser e tem dois sensores que captam os ângulos de dispersão de 0º e de 7º. O detector SLSFA (*Side Light Scatter/Fluorescence Assembly*) é constituído por espelhos, filtros e lentes que direccionam a radiação dispersa para 3 sensores que detectam a dispersão do feixe no ângulo de 90º (polarizado e despolarizado) e a fluorescência. Esta fluorescência (pode ser FL1, FL2 ou FL3, consoante o seu comprimento de onda) advém da utilização de fluorocromos e imuno-fluorocromos. Os sensores captam estes feixes dispersos em vários ângulos e convertem-nos em sinais eléctricos que irão ser analisados pelo computador, que avalia as propriedades e características celulares capazes de distinguir

as células constituintes do sangue por tamanho (0º), complexidade (7º), lobularidade (90º) e granularidade (90º despolarizado). Designa-se por MAPSS (*Multi-Angle Polarized Scatter Separation*) a técnica que utiliza a dispersão nestes quatro ângulos.

1.7.2 – Parâmetros plaquetares

Tabela IV – Parâmetros plaquetares usados pelo CELL-DYN® Sapphire.
(Abbott Diagnostics Division, 2009)

Parâmetro	Unidades S.I.	Unidades U.S.	Fórmula	Metodologia	Intervalo de valores de referência*
PLTi	10^9/L	10^3/µL	-	Impedância eléctrica	150 – 400
PLTo	10^9/L	10^3/µL	-	Óptica	150 – 400
MPV	fL	fL	-	Impedância eléctrica	8,17 – 9,65
PCT	mL/L	%	(PLTo x MPV)/10.000	Impedância eléctrica	0,167 – 0,293
PDW	10 (GSD)	10 (GSD)	10 x GSD	Óptica	14,7 – 17,4

* referente ao estabelecido pelo Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra-E.P.E.
fL: fentolitro; GSD: *Geometric Standard Deviation*; L: litro; mL: mililitro; µL: microlitro

Os parâmetros plaquetares (Tabela IV) usados na contagem automática de plaquetas são: PLT_i (contagem de plaquetas por impedância eléctrica), PLT_o (contagem de plaquetas por metodologia óptica), PCT (plaquetócrito), MPV (*Mean Platelet Volume*), PDW (*Platelet Distribution Width*). O MPV é a média do volume das plaquetas contadas pelo PLTi; o PCT corresponde à percentagem de volume ocupado pelas plaquetas no sangue (o PLTo e o MPV são usados no seu cálculo); o PDW representa a

dispersão da distribuição do volume das plaquetas (cálculo do desvio padrão geométrico da distribuição do volume das plaquetas contadas pelo PLTi, multiplicado por 10).

1.7.3 – Interpretação dos gráficos plaquetares

Na metodologia óptica é usado um algoritmo para identificar as plaquetas recorrendo a dois ângulos de dispersão (7º e 90º), que exclui as partículas não-plaquetares (análise a duas dimensões); pela metodologia por impedância eléctrica obtém-se uma representação gráfica da distribuição e do volume das plaquetas, dados pelos parâmetros MPV e PDW (Figura 7).

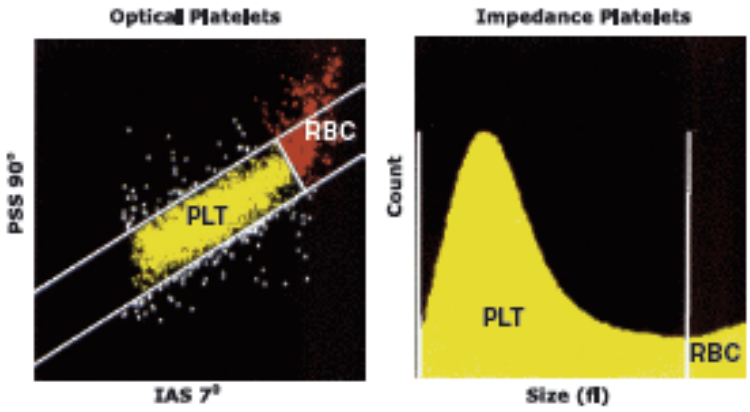

Figura 7 – Representações gráficas da contagem de plaquetas pelo CELL-DYN® Sapphire por metodologia óptica (à esquerda) e por impedância eléctrica (à direita). No gráfico da metodologia óptica faz-se a intercepção da intensidade dos feixes de luz (captados pelos sensores) dispersos nos ângulos 7º (eixo das abcissas) e 90º (eixo das ordenadas), cuja correlação define uma região na qual as plaquetas se devem encontrar, representada por uma espécie de caixa inclinada e entre um limite superior e inferior; a nuvem amarela representa as plaquetas; a nuvem vermelha representa os reticulócitos; os pontos brancos representam "restos celulares". No gráfico da metodologia por impedância eléctrica, o eixo das ordenadas representa a contagem relativa de plaquetas e o eixo das abcissas representa o volume (em fL). (Briggs et al., 2007)

Capítulo 2 Objectivo

O objectivo geral deste estudo é a avaliação do novo parâmetro plaquetar do CELL-DYN® Sapphire, que fornece a percentagem de plaquetas reticuladas – %rP –, como método indirecto de determinação da actividade trombopoiética da medula óssea, em substituição ou complemento do medulograma.

Os objectivos específicos são: (1) determinação do intervalo de valores de referência para o parâmetro %rP; (2) verificar se na determinação do parâmetro %rP há interferência dos reticulócitos; (3) determinar se a PTI primária se associa a uma elevada percentagem de plaquetas reticuladas; (4) analisar a %rP como parâmetro de diferenciação entre a trombocitopenia por hiperdestruição, ou sequestração periférica, e por hipoprodução medular; (5) avaliar a variabilidade do MPV e do PDW na PTI primária.

Capítulo 3 Material e Métodos

3.1 – População em estudo

Foram processadas anonimamente 139 amostras de sangue periférico de indivíduos adultos, obtidas no Laboratório de Hematologia do Hospital Geral do Centro Hospitalar de Coimbra-EPE, entre Abril e Julho de 2010. Foram definidos 4 grupos: grupo normal (Normal), grupo Anemia Hemolítica Auto-Imune (AHAI), grupo Púrpura Trombocitopénica Imune Primária (PTI), e grupo trombocitopenia induzida por quimioterapia em doentes não hemato-oncológicos (Quimio).

Foram processadas para o estudo 76 amostras do grupo Normal, 18 do grupo AHAI, 34 do grupo PTI, uma das quais com síndrome de Evans (PTI em associação com AHAI) e 11 do grupo Quimio.

3.2 – Amostras de sangue periférico

As amostras de sangue periférico estavam colhidas em tubos com ácido etilenodiaminotetracético tripotássico (EDTA K_3 – *ethylenediaminetetraacetic acid tripotassic*) a 1,2 mg/mL.

3.3 – Selecção de amostras

A partir do *software* de base de dados Clinidata XXI 4.0 (MaxData Copyright©) foram obtidas as informações clínicas sumárias referentes às amostras com trombocitopenia, de modo a possibilitar a sua introdução num dos grupos em estudo. As amostras com AHAI eram da consulta de Hematologia e foram escolhidas por, na maioria dos casos, apresentarem reticulocitose. As amostras controlo (inseridas no

grupo Normal) foram colhidas a indivíduos voluntários sem história medicamentosa recente.

3.4 – Contagem das plaquetas

A contagem de plaquetas foi efectuada no analisador hematológico automático CELL-DYN® Sapphire, através da metodologia óptica (PLTo), seguindo o teste CBC+RETC [L] que efectua a contagem de todos os constituintes do sangue. O tubo com a amostra é colocado no aparelho onde é furado por uma agulha e através da qual são pipetados 36.25µL para o copo de diluição RBC/PLT. Aqui, é acrescentado diluente de solução tampão salina (10.48mL) – DILUENT/SHEATH (Abbott Diagnostics Division, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064, USA) – obtendo-se uma diluição final de 1:290. De seguida são pipetados 500µL desta amostra diluída e posteriormente injectados na câmara com o sistema óptico, onde cada célula atravessa isoladamente um feixe de luz (laser) e é analisada a um comprimento de onda de 488nm. A contagem de plaquetas é feita por medição da dispersão do feixe, em dois ângulos 7º e 90º, que é captada pelos sensores díodo externo e PMT 2, respectivamente, e convertida em sinais eléctricos que serão analisados pelo computador do aparelho, determinando o valor do parâmetro PLTo e as respectivas representações gráficas.

3.5 – Determinação dos índices plaquetares MPV e PDW

O CELL-DYN® Sapphire determina os parâmetros MPV e PDW através da metodologia por impedância eléctrica no teste referido anteriormente (CBC+RETC [L]). São pipetados 100µL da amostra diluída na solução tampão salina

DILUENT/SHEATH (1:290) presente no copo de diluição RBC/PLT e transferidos para a câmara de pré-análise (com um eléctrodo interno negativo) do sistema de impedância eléctrica. Cada célula da amostra vai passar através de um orifício para a câmara pós-análise (que contém um eléctrodo interno positivo) e a sua passagem gera um impulso eléctrico que será detectado e analisado pelo aparelho. O número de impulsos eléctricos indica a quantidade de plaquetas que passam através desse orifício e a amplitude dos impulsos é proporcional ao volume das células.

3.6 – Análise das plaquetas reticuladas

A contagem de plaquetas reticuladas é um novo parâmetro plaquetar do CELL-DYN® Sapphire – %rP –, que expressa, em percentagem, a quantidade de plaquetas reticuladas da amostra relativamente ao número total de plaquetas. Este procedimento utiliza metodologia óptica, recorrendo ao teste RBC+PLT [L]. É pipetado um volume de 225µL da amostra diluída em solução tampão salina DILUENT/SHEATH (1:290), do copo de diluição RBC/PLT, e transferido para o copo de diluição RETC, ao qual será adicionado 0.67mL de fluorocromo CD4K-530 (RETICULOCYTE REAGENT; Abbott Diagnostics Division, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064, USA), obtendo-se uma diluição final de 1:1160. De seguida são pipetados 500µL desta amostra diluída com o fluorocromo, que são transferidos para a câmara com sistema óptico. O foco de luz laser embate em cada célula da amostra injectada, sendo captada a sua dispersão nos ângulos de 7º e 90º e também a emissão de fluorescência FL1 (proveniente do CD4K-530) pelos sensores díodo externo, PMT 2 e PMT 1, respectivamente. Os sinais eléctricos gerados a partir destes sensores são processados pelo aparelho que calcula o valor do parâmetro %rP.

3.7 – Análise dos reticulócitos

A contagem de reticulócitos é fornecida pelo parâmetro %Ret do CELL-DYN® Sapphire. É utilizada a metodologia óptica com o teste RBC+PLT [L]. Um volume de 225µL da amostra diluída em solução tampão salina DILUENT/SHEATH (1:290), contida no copo de diluição RBC/PLT, é pipetado e transferido para o copo de diluição RETC, ao qual são acrescentados 0.67mL de fluorocromo CD4K-530 (RETICULOCYTE REAGENT; Abbott Diagnostics Division, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL 60064, USA), numa diluição final de 1:1160. Posteriormente, são pipetados e transferidos para a câmara com sistema óptico 500µL desta amostra diluída com o fluorocromo. O foco de luz laser incide em cada célula da amostra injectada e é captada a dispersão no ângulo de 7º e também a fluorescência FL1 (proveniente do CD4K-530) pelos sensores díodo externo e PMT 1, respectivamente. O valor do parâmetro %Ret é fornecido por processamento dos sinais eléctricos gerados a partir destes sensores.

3.8 – Controlo de Qualidade

No início das tarefas diárias foi efectuado um Controlo de Qualidade Interno para avaliação da precisão das contagens no CELL-DYN® Sapphire e mensalmente o equipamento processa um Controlo de Qualidade Externo (UKNEQAS – *United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for General Haematology*) para avaliação da exactidão.

3.9 – Organização de dados

Os dados obtidos foram organizados e arquivados, de forma anónima, numa base de dados usando o *software* Microsoft® Office Exel 2003 (Microsoft Office Professional Edition 2003, Microsoft Corporation Copyright© 1985-2003).

3.10 – Análise Estatística

A análise estatística foi efectuada com base no *software* StatView 5.0 (StatView for Windows, SAS Institute Inc. Copyright© 1992-1998), recorrendo-se a medidas de tendência central (mediana, média, desvio padrão, máximo e mínimo), testes de regressão simples, testes Paramétricos (*t*-Student) e testes Não-Paramétricos (Qui-quadrado, χ^2). As diferenças entre as médias dos grupos foram consideradas estatisticamente significativas para valores $p<0,05$.

Capítulo 4 Resultados

4.1 – Intervalo de valores de referência para o parâmetro %rP

A partir da percentagem de plaquetas reticuladas do grupo Normal calculou-se a média e desvio padrão (1.632 ± 0.985%), o que nos permitiu obter um intervalo de valores de referência para o parâmetro %rP em indivíduos adultos: 0.65–2.62%.

No grupo Normal não há diferença entre as médias da %Ret (1.740 ± 0.605%) e da %rP (1.632 ± 0.985%), com t=0.958 e p=0.3411, e verifica-se uma correlação fraca entre estes dois parâmetros (r=0.308; p=0.0068).

4.2 – Percentagem de plaquetas reticuladas

Tabela V – Contagem total de plaquetas, percentagem de plaquetas reticuladas e percentagem de reticulócitos nos grupos de estudo. A coluna da direita mostra as diferenças de médias entre a percentagem de plaquetas reticuladas e a percentagem de reticulócitos dentro de cada grupo.

Grupo (n)	Contagem de plaquetas ($x10^9$/L)	Plaquetas reticuladas (%)	Reticulócitos (%)	Diferença de médias (%)
Normal (76)	260.842 ± 54.588 (158 – 411)	1.632 ± 0.985 (0 – 4.100)	1.740 ± 0.605 (0.795 – 4.730)	0.108
PTI (34)	56.606 ± 40.407 (1.750 – 133)	6.435 ± 3.584 (2.690 – 14.400)	2.728 ± 2.888 (0.952 – 18.000)	3.707
AHAI (18)	299.889 ± 174.597 (101 – 788)	2.012 ± 1.130 (0.602 – 5.270)	8.603 ± 11.932 (1.130 – 42.200)	6.591
Quimio (11)	111.036 ± 32.192 (39.1 – 149)	2.649 ± 1.382 (0.437 – 5.040)	1.885 ± 0.944 (0.184 – 4.070)	0.764

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (mínimo-máximo).

Foram analisadas a contagem de plaquetas (metodologia óptica) e a percentagem de plaquetas reticuladas (percentagem do total de plaquetas) em 34

amostras do grupo PTI primária, uma patologia representativa de trombocitopenia de causa hiperdestrutiva; em 11 do grupo Quimio, com trombocitopenia de causa hipoprodutiva; em 18 com AHAI, uma doença auto-imune que se caracteriza pela destruição periférica de eritrócitos; e em 76 do grupo Normal (Tabela V). O tratamento estatístico dos valores da percentagem de plaquetas reticuladas dos vários grupos está representado graficamente na Figura 8.

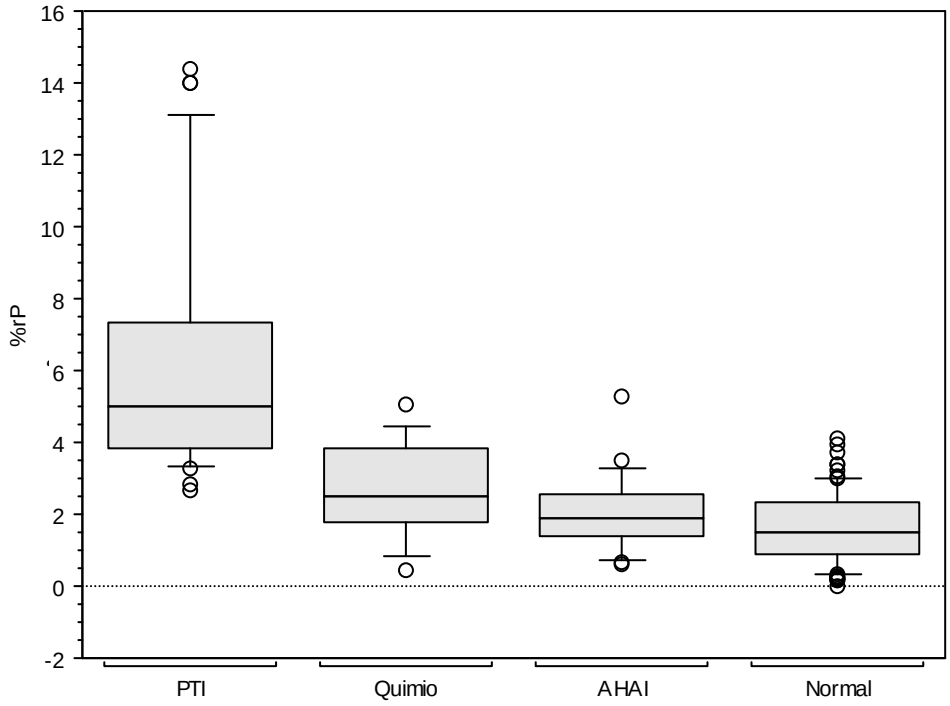

Figura 8 – Percentagem de plaquetas reticuladas (%rP) para cada um dos grupos diagnósticos: PTI, Quimio, AHAI e Normal. Os valores da mediana são, respectivamente, 5.025%, 2.51%, 1.875% e 1.52%. AHAI: Anemia Hemolítica Auto-Imune; PTI: Púrpura Trombocitopénica Imune; Quimio: trombocitopenia induzida por quimioterapia.

4.2.1 – Grupo com PTI

O grupo com PTI primária apresenta elevada percentagem de rP (6.435 ± 3.584%), com uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Normal (1.632 ± 0.985%, t=7.680 e p<0,001); ao grupo AHAI (2.012 ± 1.130%, t=4.324 e

p=0.005 e ao grupo Quimio (2.649 ± 1.382%, *t*=3.223 e *p*=0.091). Há uma correlação entre a %rP e a contagem de plaquetas na PTI (Figura 9), com *r*=0.418, e com significado estatístico (*p*=0.0139). As médias da %Ret (2.728 ± 2.888%) e da %rP (6.435 ± 3.584%) são significativamente diferentes (*t*=4.911; *p*<0,001) e não há correlação entre estes dois parâmetros, embora esta última observação não tenha significado estatístico (*r*=0.088; *p*=0.6222). Há uma associação entre a PTI e a percentagem elevada de plaquetas reticuladas (χ^2=68.742; *p*<0.0001).

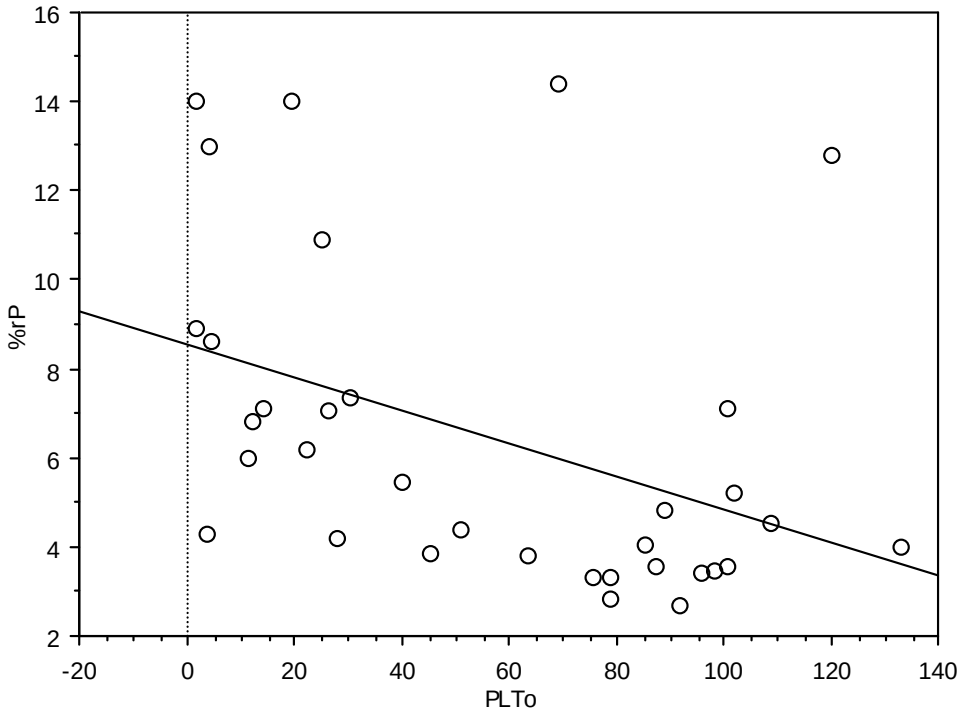

Figura 9 – Correlação entre a contagem de plaquetas (PLTo; x10^9/L) e a percentagem de plaquetas reticuladas (%rP) no grupo PTI. (*r*=0.418; *p*=0.0139).

4.2.2 – Grupo com trombocitopenia induzida por quimioterapia

O grupo Quimio (trombocitopenia por hipoplasia em situações não hemato-oncológicas) apresenta uma %rP (2.649 ± 1.382%) significativamente diferente do

grupo PTI (6.435 ± 3.584%), com t=3.223 e p=0.0091, mas não mostra diferenças significativas em relação ao Normal (1.632 ± 0.985%), (t=1.874; p=0.0904), e ao grupo AHAI (2.012 ± 1.130%), (t=0.873; p=0.4032). Há diferença entre a %Ret (1.885 ± 0.944%) e a %rP (2.649 ± 1.382%), com t=2.449 e p=0.0343, e uma correlação entre a %Ret e a %rP (r=0.663; p=0.0261).

4.2.3 – Grupo com AHAI

A %rP no grupo AHAI (2.012 ± 1.130%) não difere significativamente da %rP nos Normais (1.632 ± 0.985%), t=1.057 e p=0.3054, nem da %rP do grupo Quimio (2.649 ± 1.382%), t=0.873 e p=0.4032. No entanto, observa-se diferença relativamente à %rP do grupo PTI (6.435 ± 3.584%), t=4.324 e p=0.0005. Verificam-se diferenças significativas entre a média da %Ret (8.603 ± 11.932%) e da %rP (2.012 ± 1.130%) na AHAI, com t=2.424 e p=0.0268 e a correlação entre estas duas percentagens (r=0.393) é fraca, sem significado estatístico (p=0.1070).

4.3 – Determinação do MPV e PDW

Tabela VI – Valores dos parâmetros MPV e PDW nos grupos de estudo.

Grupo (n)	MPV (fL)	PDW (GSD)
Normal (76)	8.601 ± 1.107 (6.140 – 11.4)	16.492 ± 0.994 (13.800 – 20.400)
PTI (34)	11.427 ± 3.158 (6.280 – 18.600)	14.424 ± 4.670 (10.100 – 36.100)
AHAI (18)	8.608 ± 0.855 (6.980 – 10.500)	16.228 ± 0.481 (15.100 – 17.200)
Quimio (11)	10.068 ± 1.175 (8.600 – 12.100)	16.527 ± 1.135 (14.500 – 18.700)

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (mínimo-máximo).

4.3.1 – Grupo com PTI

Há uma forte correlação entre os valores do MPV e do PDW no grupo PTI (r=0.597; p=0.0002) (Figura 10). Relativamente ao MPV (11.427 ± 3.158fL), há uma diferença significativa não só com o MPV do grupo Normal (8.601 ± 1.107fL), com t=5.397 e p<0.0001, mas também com o MPV da AHAI (8.608 ± 0.855), em que t=3.267 e p=0.0045. Não há diferença estatística entre o MPV da PTI e o MPV da Quimio (10.068 ± 1.175fL), t=0.677 e p=0.5139. Quanto ao PDW (14.424 ± 4.670GSD), há diferenças quando comparado com o PDW do grupo Normal (16.492 ± 0.994GSD) e com o PDW da AHAI (16.228 ± 0.481GSD) [(t=2.584; p=0.0144) e (t=3.330; p=0.0040), respectivamente], mas não difere do PDW da Quimio (16.527 ± 1.135GSD), t=2.100 e p=0.620.

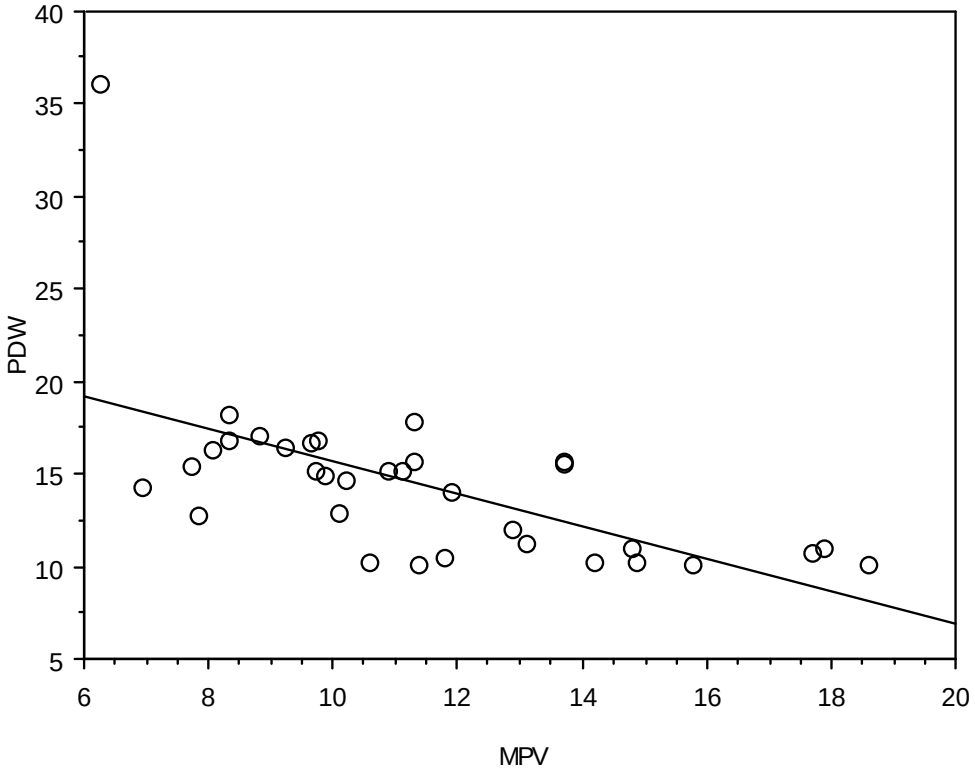

Figura 10 – Correlação entre os parâmetros PDW (GSD) e MPV (fL) no grupo PTI (r=0.597; p=0.0002).

4.3.2 – Grupo com trombocitopenia induzida por quimioterapia

O MPV do grupo Quimio (10.068 ± 1.175fL) difere do MPV Normal (8.601 ± 1.107fL) e do MPV do grupo AHAI (8.608 ± 0.855fL) [(t=3.653; p=0.0044) e (t=3.432; p=0.0064), respectivamente], mas não difere do MPV do grupo PTI (11.427 ± 3.158fL), t=0.677 e p=0.5139. O PDW grupo Quimio (16.527 ± 1.135GSD) não difere do PDW de nenhum dos outros grupos [Normal (t=0.164; p=0.8726), AHAI (t=0.739; p=0.4768) e PTI (t=2.100 e p=0.620)].

4.3.3 – Grupo com AHAI

O MPV do grupo AHAI (8.608 ± 0.855fL) não difere do MPV do grupo Normal (8.601 ± 1.107fL), t=0.682 e p=0.5042. No entanto, difere do MPV do grupo PTI (11.427 ± 3.158fL), t=3.267 e p=0.0045, e do MPV do grupo Quimio (10.068 ± 1.175fL), t=3.432 e p=0.064. Relativamente ao PDW (16.228 ± 0.481GSD), este difere do PDW do grupo PTI (14.424 ± 4.670GSD), t=3.330 e p=0.0040, mas não difere do PDW do grupo Normal (16.492 ± 0.994GSD), nem do PDW do grupo Quimio (16.527 ± 1.135GSD) [(t=1.212; p=0.2422) e (t=0.739; p=0.4768), respectivamente].

Capítulo 5 Discussão

A trombocitopenia é uma baixa contagem de plaquetas no sangue periférico que pode ter duas causas principais: hiperdestruição plaquetar periférica ou hipoprodução medular (Hilman et al., 2005).

A Púrpura Trombocitopénica Imune (PTI) é uma doença auto-imune que se caracteriza pela presença de auto-anticorpos direccionados contras as glicoproteínas das plaquetas, levando à sua destruição no sistema reticulo-endotelial (Hoffbrand et al., 2005). O medulograma é o melhor procedimento para estabelecer o diagnóstico diferencial da etiologia da trombocitopenia, por hiperdestruição ou por diminuição da produção (Hilman et al., 2005; Hoffbrand et al., 2005; Lichtman et al., 2006). No entanto, é um exame invasivo a que os médicos só recorrem nos casos em que persistem dúvidas sobre a situação patológica subjacente (Lichtman et al., 2006). A avaliação do número e/ou da percentagem de plaquetas reticuladas tem potencial para se tornar num parâmetro muito útil na elucidação etiológica da trombocitopenia e vem sendo objecto de estudo em vários laboratórios (Koike et al., 1998; Kurata et al., 2001; Monteagudo et al., 2008; Saxon et al., 1998).

As plaquetas são células do sangue periférico que resultam da fragmentação citoplasmática de megacariócitos na medula óssea, num processo denominado trombopoiese (Lichtman et al., 2006; Hoffbrand et al., 1993). As plaquetas, quando inactivas, apresentam uma forma discóide, com um volume entre 8,17-9,65fL, e uma estrutura celular capaz de promover a formação do trombo hemostático (Hoffbrand et al., 2005).

As plaquetas reticuladas são plaquetas recentemente libertadas da medula óssea, com maior actividade hemostática, maior volume, densidade e concentração de ácido ribonucleico (Hilman et al., 2005; Lichtman et al., 2006).

A Anemia Hemolítica Auto-Imune (AHAI) é uma patologia auto-imune em que há destruição periférica de eritrócitos, com consequente aumento da percentagem de reticulócitos (Lichtman et al., 2006). Foi investigada neste estudo para avaliar a interferência dos reticulócitos na avaliação da %rP.

A quimioterapia é um dos tratamentos usados em doentes com cancro, que acarreta como efeito secundário uma aplasia medular, que é uma diminuição drástica da hematopoiese na medula óssea, que afecta todas as linhagens celulares (Hilman et al., 2005; Lichtman et al., 2006). Neste estudo foram usadas amostras de doentes com trombocitopenia induzida por quimioterapia, com o objectivo de avaliar a percentagem de plaquetas reticuladas em situações de hipoprodução medular.

O CELL-DYN® Sapphire é um aparelho automático para contagem de células hematológicas que possibilita a contagem de plaquetas, através da metodologia óptica e metodologia por impedância eléctrica, e avalia os parâmetros plaquetares: PLTi, PLTo, MPV, PDW e PCT (Abbott Diagnostics Division, 2009). O novo parâmetro %rP, correspondente à percentagem de plaquetas reticuladas do total de plaquetas, foi o alvo de avaliação neste estudo.

Sendo um parâmetro novo, foi necessário estabelecer o intervalo da normalidade. Os valores de referência foram 0.65–2.62%. De notar que alguns indivíduos aparentemente saudáveis apresentaram valores %rP ligeiramente acima de 2,62% (máximo de 4,10%). Tal facto poderá ser devido uma situação hemorrágica recente, eventualmente fisiológica (Lichtman et al., 2006); o tabagismo nas mulheres tem sido indicado como causa de aumento da %rP (Butkiewicz et al. 2006).

A percentagem de plaquetas reticuladas no grupo PTI, medida pelo parâmetro %rP, está aumentada com uma diferença estatisticamente significativa, observando-se um aumento da %rP com a diminuição da contagem das plaquetas. Estes dados estão de

acordo com o publicado por outros autores (Koike et al., 1998; Kurata et al., 2001; Monteagudo et al., 2008; Saxon et al., 1998), embora os valores de referência de %rP sejam diferentes, provavelmente por ter sido utilizada outra metodologia. Na maioria dos estudos de quantificação das plaquetas reticuladas foi utilizado *Thiazole Orange* (TO) como fluorocromo marcador de RNA. O uso do TO tem algumas limitações, porque não faz uma marcação específica do RNA das plaquetas reticuladas. Uma outra limitação é o longo tempo de incubação que faz com que o TO entre nos grânulos densos das plaquetas e marque os nucleótidos livres, como a adenosina difosfato (ADP) e adenosina trifosfato (ATP), o que pode dar origem a falsos positivos, mesmo que sejam usados controlos para contornar esta limitação (Michelson, 1996). O CD4K-530 é altamente específico para o RNA, podendo ter grande aplicação em técnicas de citometria de fluxo (Lewis et al., 2006). Uma vez que se trata de um agente alquilante, apenas marca por intercalação nas cadeias dos ácidos nucleicos e não interfere com nucleótidos livres, o que faz do CD4K-530 um excelente marcador do RNA das plaquetas reticuladas.

É importante distinguir entre percentagem e contagem de plaquetas reticuladas (a contagem de plaquetas reticuladas não foi avaliada neste estudo). Kurata et al. (2001) mostraram que a %rP está aumentada na PTI, e que a contagem absoluta, mas não a percentagem, está diminuída em situações de hipoprodução. Esta observação pode ser explicada pela baixa actividade trombopoiética da medula óssea em condições de hipoprodução medular: são produzidas menos plaquetas, pelo que, em termos proporcionais, a percentagem de plaquetas reticuladas, na maioria dos casos, se encontra dentro dos valores normais. Na PTI primária a contagem de plaquetas reticuladas é elevada porque a medula está activa e como a contagem de plaquetas normais é baixa, devido à hiperdestruição periférica, a percentagem de plaquetas reticuladas é maior.

Dado que os reticulócitos, tal como as plaquetas reticuladas, têm um elevado conteúdo de RNA (Lichtman et al., 2006), poderia haver interferência dos reticulócitos na contagem das rP. Neste estudo verificamos que não há correlação entre os valores de %Ret e de %rP na PTI, o que mostra que a quantificação do RNA é distinta e que a %rP é um parâmetro fidedigno. No grupo AHAI há fraca correlação entre os valores de %Ret e %rP (embora sem significado estatístico). Dado que na AHAI há um aumento da actividade do baço para remover os eritrócitos revestidos de anticorpos (Lichtman et al., 2006), poderá haver também algum hiperesplenismo, com sequestração de plaquetas, que a medula compensa com um aumento de produção de eritrócitos e plaquetas. Mas tal não significa que a %rP esteja aumentada nesta patologia, uma vez que as médias da %rP na PTI e da %rP na AHAI são diferentes. Nos doentes sujeitos a quimioterapia há uma correlação entre os valores de %R e %rP, porque a hipoprodução medular afecta a trombopoiese e a eritropoiese.

A observação consistente de percentagens mais elevadas de plaquetas reticuladas na PTI primária é um forte indicador de que este parâmetro poderá vir a diminuir significativamente a necessidade de recorrer ao medulograma para distinguir a trombocitopenia por hiperdestruição, ou sequestração periférica, da trombocitopenia por hipoprodução medular.

A interpretação dos resultados obtidos pelos parâmetros MPV e PDW indica que, na PTI primária, o MPV está aumentado (também demonstrado por Kelton et al. (1979)) e o PDW está dentro dos valores normais. O MPV aumentado deve-se ao facto das plaquetas reticuladas, que estão aumentadas, terem maior volume, o que pode ser comprovado pela observação de megatrombócitos (plaquetas gigantes) no esfregaço de sangue periférico (dado não inserido nos resultados deste estudo). O PDW está dentro dos valores normais porque as plaquetas têm, uniformemente, um volume aumentado.

Na trombocitopenia induzida por quimioterapia, o MPV está aumentado porque há plaquetas normais e há algumas plaquetas reticuladas, de maior volume.

Capítulo 6 Conclusão

Foi encontrado o intervalo de valores de referência para o parâmetro %rP, usando o marcador CD4K-530 num equipamento CELL-DYN® Sapphire: 0.65–2.62%.

Na PTI verificam-se diferenças significativas, sem correlação, entre os valores de %rP e de %Ret, o que comprova que a quantificação de RNA das plaquetas reticuladas e dos reticulócitos é distinta.

Foi demonstrado que a percentagem de plaquetas reticuladas está aumentada na PTI primária, e é normal na AHAI e na trombocitopenias pós-quimioterapia. Os dados apresentados mostram uma forte associação entre a PTI e uma elevada percentagem de %rP.

O MPV está aumentado na PTI primária, enquanto que o PDW se apresenta dentro dos valores de normalidade, o que está de acordo com a presença, quase exclusiva, de megatrombócitos no esfregaço de sangue periférico.

Em conclusão: a %rP provou ser um parâmetro fiável para ser utilizado como teste complementar no diagnóstico diferencial entre trombocitopenias por hiperdestruição periférica e por hipoprodução medular, podendo, em alguns casos, substituir o medulograma, com vantagens por ser um meio mais rápido e menos invasivo da avaliação indirecta da actividade trombopoiética da medula óssea.

Referências bibliográficas

Abbott Diagnostics Division (2009). CELL-DYN Sapphire Operator's Manual. 9140426A Revision. Abbott Laboratories.

Bagchus W.M., Jeunink M.F., Rozing J. & D. Elema (1989). A monoclonal antibody against rat platelets. I. Tissue distribution in vitro and in vivo. Clinical & Experimental Immunology 75: 317-323.

Bowditch R.D., Tani P., Fong K.C. & R. McMillan (1996). Characterization of autoantigenic epitopes on platelet glycoprotein IIb/IIIa using random peptide libraries. Blood 88(12): 4579-4584.

Briggs C., Harrison P. & S.J. Machin (2007). Continuing developments with the automated platelet count. International Journal of Laboratory Hematology. 29: 77-91.

Bussel J.B., Kimberly R.P., Inman R.D., Schulman I., Cunningham-Rundles C., Cheung N., Smithwick E.M., O'Malley J., Baraundun S. & M.W Hilgartner (1983). Intravenous gammaglobulin treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 62(2): 480-486.

Butkiewicz A.M., Kemona-Chętnik I., Dymicka-Piekarska V., Matowicka-Karna J., Kemona H. & P. Radziwon (2006). Does smoking affect thrombocytopoiesis and platelet activation in women and men?. Advances in Medical Sciences. 51; 123-126.

Castro H.C., Ferreira B.L., Nagashima T., Schueler A., Rueff C., Camisasca D., Moreira G., Scovino G., Borges L., Leal M., Filgueira M., Paschoal P., Bernardo V., Bourguinhon S., Rodrigues C.R. & D.O. Santos (2006). Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 42(5): 321-332.

Cines D.B. & J.B. Bussel (2005). How I treat idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). Blood 106(7): 2244-2251.

Cines D.B., Bussel J.B., Liebman H.A. & E.T. Prak (2009). The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. Blood 113(26): 6511-6521.

Deckmyn H., Zhang J., Van Houtte E. & J. Vermylen (1994). Production and nucleotide sequence of an inhibitory human IgM autoantibody directed against platelet Glycoprotein Ia/IIa. Blood 84(6): 1968-1974.

Emmons R.V., Reid D.M., Cohen R.L., Meng G., Young N.S., Dunbar C.E. & N.R. Schulman (1996). Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. Blood 87(10): 4068-4071.

Fox S.I. (2002). Human Physiology. McGraw-Hill Companies, 728 pp.

Frederiksen H. & K. Schmidt (1999). The incidence of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in adults increases with age. Blood 94(3): 909-913.

Fujimoto T.T., Inoue M., Shimomura T. & K. Fujimura (2001). Involvement of Fcγ receptor polymorphism in the therapeutic response of idiopathic thrombocytopenic purpura. British Journal of Haematology 115:125-130.

Fujisawa K., O'Toole T.E., Tani P., Loftus J.C., Plow E.F., Ginsberg M.H. & R. McMillan (1991). Autoantibodies to the presumptive cytoplasmic domain of platelet Glycoprotein IIIa in patients with Chronic Immune Thrombocytopenic Purpura. Blood 77(10): 2207-2213.

Fujisawa K., Tani P., O'Toole T.E., Ginsberg M.H. & R. McMillan (1992). Different specificities of platelet-associated and plasma autoantibodies to platelet GPIIb-IIIa in patients with Chronic Immune Thrombocytopenic Purpura. Blood 79(6): 1441-1446.

Gernsheimer T. (2009). Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: mechanisms of pathogenesis. The Oncologist 14: 12-21.

Harst D., Jong D., Limpens J., Kluin P.M., Rozier Y., Ommen G.J.B. & A. Brand (1990). Clonal B-cell populations in patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. Blood 76(11): 2321-2326.

Hauch T.W. & W.F. Rosse (1977). Platelet-bound complement (C3) in immune thrombocytopenia. Blood 50(6): 1129-1136.

He R., Reid D.M., Jones C.E. & R. Schulman (1995). Extracellular epitopes of platelet Glycoprotein Ibα reactive with serum antibodies from patients with Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. Blood 86(10): 3789-3796.

He R., Reid D.M., Jones C.E., & R. Schulman (1994). Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. Blood 83(4): 1024-1032.

Hilman R., Ault K.A. & H.M. Rinder (2005). Hematology in clinical pactrice. McGraw-Hill Professional, 471 pp.

Hirayama Y., Sakamaki S., Matsunaga T., Kuga T., Kuroda H., Kusakabe T., Sasaki K., Fujikawa K., Kato J., Kogawa K., Koyama R. & Y. Niitsu (1998). Concentrations of Thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura, Aplastic Anemia, and Essential Thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells. Blood 92(1): 46-52.

Hoffbrand A.V. & J.E. Pettit (1993). Essential Haematology. Blackwell Science, 437 pp.

Hoffbrand A.V., Catovsky D. & E.G. Tuddenham (2005). Postgraduate Haematology. Blackwell Publishing, 1073 pp.

Hymes K., Nardi M., Leaf A. & S. Karpatkin (1993). Role of LeuCAM integrins and complement in platelet-monocyte rosette formation induced by immune complexes of human immunodeficiency virus-type 1-immune thrombocytopenic purpura patients. Blood 81(9): 2375-2380.

Karpatkin S. (1980). Autoimmune thrombocytopenic purpura. Blood 56(3): 329-343.

Karpatkin S., Fotino M., Gibofsky A. & Winchester R.J. (1979). Association of HLA-DRw2 with autoimmune thrombocytopenic purpura. The Journal of Clinical Investigation. 63: 1085-1088.

Kelton J.G., Neame P.B., Bishop J., Ali M., Gauldie J. & J. Hirsh (1979). The Direct Assay for Platelet-Associated IgG (PAIgG): Lack of Association Between Antibody Level and Platelet Size. Blood 53(1): 73-80.

Kiefel V., Santoso S., Weisheit M. & C. Müeller-Eckhardt (1987). Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Platelet Antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive Antibodies. Blood 70(6): 1722-1726.

Koike Y., Yoneyama A., Shirai J., Ishida T., Shoda E., Miyazaki K., Sunaga S., Horie R., Aoki K., Koike K., Ogata I., Tahara T., Kato T., Nakahara K., Kariya T. & M. Higashihara (1998). Evalution of Thrombopoiesis in Thrombocytopenic Disorders by Simultaneous Measurement of Reticulated Platelets of Whole Blood and Serum Thrombopoietin Concentrations. Journal of Thrombosis and Haemostasis 79: 1106-1110.

Kurata Y., Hayashi S., Kiyoi T., Kosugi S., Kashiwagi H., Honda S. & Y. Tomiyama (2001). Diagnostic Value of Tests for Reticulated Platelets, Plasma Glycocalicin, and Thrombopoietin Levels for Discriminating Between Hyperdestructive and Hypoplastic Thrombocytopenia. American Journal of Clinical Pathology 115: 656-664.

Kuter D. & R.D. Rosenberg (1995). The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. Blood 85(10): 2720-2730.

Kuwana M., Kaburaki J. & Y. Ikeda (1998). Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura: role in production of anti–platelet autoantibody. The Journal of Clinical Investigation 102(7): 1393-1402.

Kuwana M., Kaburaki J., Kitasato H., Kato M., Kawai S., Kawakami Y. & Y. Ikeda (2001). Immunodominant epitopes on glycoprotein IIb-IIIa recognized by autoreactive T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. Blood 98(1): 130-139.

Leeuwen E.F., Ven J.T., Engelfriet C.P. & Borne A.E. (1982). Specificity of autoantibodies in Autoimmune Thrombocytopenia. Blood 59(1): 23-26.

Lewis SM, Bain BJ & I. Bates (2006). Dacie and Lewis. Practical Haematology. Churchill Livingstone – Elsevier, 722 pp.

Li J., Xia Y. & D.J. Kuter (1999). Interaction of thrombopoietin with the platelet c-mpl receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics. British Journal of Haematology 106: 345-356.

Lichtman M.A., Beutler E., Seligsohn U., Kaushansky K. & T.O. Kipps (2006). Williams Hematology. McGraw-Hill Medical, 2297 pp.

Luiken G.A., McMillan R., Lightsey A.L., Gordon P., Zevely S., Schulman I., Gribble T.J. & R.L. Longmire (1977). Platelet-associated IgG in Immune Thrombocytopenic Purpura. Blood 50(2): 317-325.

Male D., Brostoff J., Roth D.B. & I. Roitt (2006). Immunology. Elsevier Health Sciences, 552 pp.

Maluf Junior P.T. (2007). Púrpura Trombocitopênica Imune: diagnóstico e tratamento. Pediatria (São Paulo) 29(3): 222-231.

Marín J.R. (2009). Citopenias autoinmunes corticorresitentes. Haematologica/edición española 94(1): 34-38.

Mckenna J.L., Pisciotta A.V. & J. Hinz (1962). Fluorescence of megakaryocytes in Idiopathic Thrombocytopenic Purpura (ITP) with fluorescent antiglobulin serum. Blood 19(6): 664-675.

McMillan R., Luiken G.A., Levy R., Yelenosky R. & R.L. Longmire (1978). Antibody against megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. Journal American Medical Association 239(23): 2460-2462.

McMillan R., Tani P. & D. Mason (1980). The demonstration of antibody binding to platelet-associated antigens in patients with immune thrombocytopenic purpura. Blood 56(6): 993-995.

McMillan R., Tani P., Millard F., Berchtold P., Renshaw L. & V.L. Woods (1987). Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. Blood 70(4): 1040-1045.

Michelson A.D. (1996). Flow Cytometry: A Clinical Test of Platelet Function. Blood 87(12): 4925-4936.

Monteagudo M., Amengual M.J., Muñoz L., Soler J.A., Roid I. & C. Tolosa (2008). Reticulated platelets as a screening test to identify trombocitopenia aetiology. Quarterly Journal of Medicine 101: 549-555.

Nakhoul I.N., Kozuch P. & M. Varma (2006). Management of adult idiopathic thrombocytopenic purpura. Clinical Advances in Hematology & Oncology 4(2): 136-144.

Nomura S., Matsuzaki T., Ozaki Y., Yamaoka M., Yoshimura C., Katsura K., Xie G.L., Kagawa H., Ishida T. & S. Fukuhara (1998). Clinical significance of HLA-DRB1*0410 in japanese patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. Blood 91(10): 3616-3622.

Olsson B., Ridell B., Carlsson L., Jacobsson S. & H. Wadenvik (2008). Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. Blood 112(4): 1078-1084.

Portielje J.E., Westendorp R.G., Kluin-Nelemans H.C. & A. Brand (2001). Morbidity and mortality in adults with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. Blood 87(9): 2549-2554.

Provan D., Stasi R., Newland A.C., Blanchette V.S., Bolton-Maggs P., Bussel J.B., Chong B.H., Cines D.B., Gernsheimer T.B., Godeau B., Grainger J., Greer I., Hunt B.J., Imbach P.A., Lyons G., McMillan R., Rodeghiero F., Sanz M.A., Tarantino M., Watson S., Young J & D.J. Kuter (2010). International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. Blood 115(2): 168-186.

Psaila B., Petrovic A., Page L.K., Menell J., Schonholz M. & J.B. Bussel (2009). Intracranial hemorrhage (ICH) in children with immune thrombocytopenia (ITP): study of 40 cases. Blood 114(23):4777-4783.

Roark J.H., Bussel J.B., Cines D.B. & Siegel D.L. (2002). Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation. Blood 100(4): 1388-1398.

Saxon B.R., Blanchette V.S., Butchart S., Lim-Yin J. & A.O. Poon (1998). Reticulated Platelet Counts in the Diagnosis of Acute Immune Thrombocytopenic Purpura. Journal of Pediatric Hematology/Oncology 20(1): 44-48.

Souza S.J., Sabbaga J., D'Amico E., Pasqualini R. & R. Brentani (1991). Anti-platelet autoantibody from ITP patients recognize an epitope in GPIIb/IIIa deduced by complementary hydropathy. Immunology 75: 17-22.

Sukati H., Watson H.G., Urbaniak S.J. & R.N. Barker (2007). Mapping helper T-cell epitopes on platelet membrane glycoprotein IIIa in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Blood 109(10): 4528-4538.

Szatkowski N.S., Kunicki T.J. & R.H. Aster (1986). Identification of Glycoprotein lb as a target for autoantibody in Idiopathic (Autoimmune) Thrombocytopenic Purpura. Blood 67(2): 310-315.

Wong G.C. & L.H. Lee (1998). A study of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) patients over a ten-year period. Annals Academy of Medicine Singapore 27(6): 789-793.

Woods V.L., Oh E.H., Mason D. & R. McMillan (1984). Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. Blood 63(2): 368-375.

Zeuner A., Signore M., Martinetti D., Bartucci M., Peschle C. & R. De Maria (2007). Chemotherapy-induced thrombocytopenia derives from the selective death of megakaryocyte progenitors and can be rescued by stem cell factor. Cancer Research 67(10): 4767-4773.