CAROLINE GABE

Detecção de autoanticorpos antiplaquetários na trombocitopenia imune em adultos

Versão Original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Vanderson Geraldo Rocha

São Paulo

2022

CAROLINE GABE

Detecção de autoanticorpos antiplaquetários na trombocitopenia imune em adultos

Versão Original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Vanderson Geraldo Rocha

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gabe, Caroline
Detecção de autoanticorpos antiplaquetários na trombocitopenia imune em adultos / Caroline Gabe. -- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.
Orientador: Vanderson Geraldo Rocha.

Descritores: 1.Trombocitopenia 2.Púrpura trombocitopênica 3.Autoanticorpos 4.Contagem de plaquetas 5.Complexo glicoproteico GPIIb-IIIa de plaquetas 6.Complexo glicoproteico GPIb-IX de plaquetas

USP/FM/DBD-226/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Gabe C. Detecção de autoanticorpos antiplaquetários na trombocitopenia imune em adultos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

Aprovado em: ___ de _____ de _____.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Vanderson Geraldo Rocha
Faculdade de Medicina / Universidade de São Paulo
Julgamento: _____

Profa. Dra. Carla Luana Dinardo
Fundação Pró-Sangue / Instituto de Medicina Tropical
Julgamento: _____

Profa. Dra. Fernanda Loureiro de Andrade Orsi
Hospital das Clínicas / Faculdade de Medicina / Universidade de São Paulo
Julgamento: _____

Profa. Dra. Carolina Bonet Bub
Hospital Albert Einstein
Julgamento: _____

RESUMO

Gabe C. Detecção de autoanticorpos antiplaquetários na trombocitopenia imune em adultos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

A trombocitopenia imune (PTI) segue sendo uma doença cujo diagnóstico é clínico e de exclusão, de forma que a identificação de um teste laboratorial confiável que possa auxiliar no diagnóstico da doença ainda é necessária. Os testes mais discutidos têm sido os métodos de detecção de autoanticorpos antiplaquetários, que são realizados de forma padronizada em apenas alguns laboratórios ao redor do mundo, nenhum deles na América Latina. Este estudo teve como objetivo validar um destes testes no laboratório de ImunoHematologia do serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e avaliar sua performance em uma população local de pacientes trombocitopênicos. O teste de captura direta de antígenos para a detecção de anticorpos antiglicoproteína Ib-IX (antiGPIb-IX) e antiglicoproteína IIb-IIIa (antiGPIIb-IIIa) foi aplicado seguindo recomendação publicada previamente inicialmente em amostras de 25 doadores saudáveis de plaquetas não trombocitopênicos para validação do método e definição de *cutoff*. Para avaliar a performance do teste, foram coletadas amostras de pacientes trombocitopênicos ($<100x10^9/L$) ou com diagnóstico prévio de PTI com qualquer contagem de plaquetas em acompanhamento no ambulatório de Trombose e Hemostasia do serviço de Hematologia. Os dados clínicos destes pacientes foram obtidos a partir da revisão de prontuários eletrônicos. Após padronização do teste, o *cutoff* definido foi de 0.26 para antiGPIIb-IIIa e 0.34 para antiGPIb-IX. Amostras de 152 pacientes (140 pacientes com PTI e 12 com trombocitopenia não imune) foram testadas, resultando em sensibilidade de 78% (IC 95%: 70-84) e especificidade de 50% (IC 95%: 21-79) com valor preditivo positivo (VPP) de 95% (IC 95%: 89-98) e valor preditivo negativo (VPN) de 16% (IC 95% 6-32). A distribuição dos resultados de absorbância foi heterogênea. Dentre as características clínicas analisadas, a contagem de plaquetas no momento da coleta apresentou correlação estatisticamente significativa com a positividade de autoanticorpos (OR 2.88; IC 95% 1.15 – 8.29; p=0.03). A utilização de critérios clínicos mais estritos para PTI (nadir de contagem plaquetária$<20x10^9/L$ e resposta prévia a corticóide e/ou Imunoglobulina) não resultou em melhora na performance do teste. Em conclusão, o teste de autoanticorpos antiplaquetários foi padronizado e aplicado com sensibilidade aceitável, porém a especificidade foi baixa. A baixa contagem de plaquetas

(<50x10^9/L) no momento da coleta para o teste foi associada à presença de autoanticorpos, sugerindo doença ativa.

Palavras-chave: Trombocitopenia. Púrpura trombocitopênica. Autoanticorpos. Contagem de plaquetas. Complexo glicoproteico GPIIb-IIIa de plaquetas. Complexo glicoproteico GPIb-IX de plaquetas.

ABSTRACT

Gabe C. Detection of antiplatelet autoantibodies in immune thrombocytopenia in adults [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

Immune thrombocytopenia (ITP) remains a clinical and exclusion diagnosis, so the identification of a reliable laboratory test to assist in the diagnosis of the disease is still needed. The most extensively discussed laboratory tests have been the antiplatelet autoantibody detection tests, which are performed in a standardized way in only a few laboratories around of the world, none of them in Latin America. This study aimed to validate one of these tests in the ImmunoHematology Laboratory from Hematology Service from Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) and to assess its performance in a local population of thrombocytopenic patients. The direct antigen capture assay for the detection of antiGPIb-IX and GPIIb-IIIa antibodies was applied following previous published recommendation initially on samples from 25 healthy non-thrombocytopenic platelet donors for method validation and cutoff definition. To assess the performance of the test, samples were collected from thrombocytopenic patients ($<100x10^9$/L) or patients with a previous diagnosis of ITP with any platelet count under follow-up at the Thrombosis and Hemostasis outpatient service. Clinical data were obtained from the review of medical records of those patients. After standardization of the test, the cutoff defined was 0.26 for antiGPIIb-IIIa and 0.34 for antiGPIb-IX. Samples from 152 patients (140 ITP patients and 12 nonimmune thrombocytopenia) were tested, resulting in a sensitivity of 78% (95% CI: 70-84) and specificity of 50% (95% CI: 21-79) with positive predictive value (PPV) of 95% (95% CI 89-98) and negative predictive value (NPV) of 16% (95% CI 6-32). The distribution of optical density (OD) results was skewed. Among the clinical characteristics analyzed, the platelet counts at the time of testing showed a statistically significant correlation with autoantibody positivity (OR 2.88; 95% CI 1.15 – 8.29; p=0.03). The use of strict clinical criteria for ITP (platelet count nadir$<20x10^9$/L and previous response to corticosteroids and/or Immunoglobulin) did not improve the test performance. In conclusion, the antiplatelet autoantibody testing was standardized and applied with an acceptable sensitivity, however the specificity was low. A low platelet count ($<50x10^9$/L) at the time of testing was associated with the presence of autoantibodies, suggesting active disease.

Keywords: Thrombocytopenia. Purpura, thrombocytopenic. Autoantibodies. Platelet count. Platelet glycoprotein GPIIb-IIIa complex. Platelet glycoprotein GPIb-IX complex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura das glicoproteínas plaquetárias e antígenos plaquetários humanos (HPA) expressados 17
Figura 2 – Destruição de plaquetas (P) induzida por anticorpos antiplaquetários na PTI. A Imunoglobulina liga-se no antígeno associado a plaqueta, resultando em fagocitose por macrófagos (M). As plaquetas recobertas por anticorpos [...]..... 18
Figura 3 – Técnica do teste PIFT (Teste de Imunofluorescência Plaquetária). As plaquetas são incubadas com anticorpo IgG anti-humano marcado com fluorocromo. A intensidade da fluorescência na superfície da plaqueta é analisada [...]. 25
Figura 4 – Versões "diretas" do MAIPA e do MACE (as plaquetas do paciente são testadas quanto à presença de autoanticorpos ligados à glicoproteína plaquetária) (A) No ensaio MAIPA, os anticorpos monoclonais anti-GP humanos [...] 27
Figura 5 – Etapas da técnica MACE: 1º dia (em azul): preparo da placa com IgG anti-mouse. 2º dia (em vermelho): adição do anticorpo monoclonal contra a GP a ser estudada. 3º dia (não contido na ilustração): acrescentado buffer de bloqueio [...]..... 32
Figura 6 – Resultado da leitura original da técnica MACE com diluição de anti-IgG humana marcada com peroxidase 1:5000. Os círculos amarelos indicam a absorbância dos controles positivos (0.943 e 0.731). Os círculos vermelhos indicam [...]..... 35
Figura 7 – A) foto abaixo representa o resultado dos dados originais da fluorescência dos controles positivos na placa da técnica MACE com diluição de anti-IgG humana marcada com peroxidase 1:7500; B) No resultado da leitura, os círculos [...]. 36
Figura 8 – Pacientes incluídos no estudo..... 39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Associação entre positividade de antiGPIIb-IIIa e contagem plaquetária na ocasião da coleta 45
Gráfico 2 – Associação entre positividade de antiGPIb-IX e contagem plaquetária na ocasião da coleta 47
Gráfico 3 – Distribuição dos valores de OD no grupo de pacientes com trombocitopenia não imune, PTI e PTI definitiva. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Determinação de *cutoffs* para antiGPIIb-IIIa e antiGPIb-IX 38
Tabela 2 – Características clínicas da população estudada 40
Tabela 3 – Positividade dos testes de autoanticorpos antiplaquetários 42
Tabela 4 – Valores médios de OD obtidos nos testes de autoanticorpos antiplaquetários..... 42
Tabela 5 – Performance dos testes de detecção de autoanticorpos plaquetários..... 43
Tabela 6 – Associação da presença de antiGPIIb-IIIa e características clínicas da população estudada..... 44
Tabela 7 – Associação da presença de antiGPIb-IX e características clínicas da população estudada..... 46
Tabela 8 – Associação da presença de antiGPIIb-IIIa e/ou antiGPIb-IX e características clínicas da população estudada 48
Tabela 9 – Associação da presença de antiGPIIb-IIIa e/ou antiGPIb-IX e características clínicas da população estudada. 49
Tabela 10 – Características demográficas do subgrupo de pacientes com “PTI definitiva”. ... 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD	Citrato ácido dextrose
ASH	Sociedade Americana de Hematologia
AUC	Área sob a curva
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
GP	Glicoproteínas plaquetárias
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPA	Antígenos plaquetários humanos
IC	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina G
IgIV	Imunoglobulina intravenosa
ISTH	Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MACE	Teste de ELISA modificado para captura de antígeno
MAIPA	Teste de imobilização específica do anticorpo monoclonal de antígenos plaquetários
MPHA	Ensaio passivo misto de hemaglutinação
OD	Densidade Óptica
OPD	Substrato de peroxidase
PIFT	Teste de imunofluorescência plaquetária
PRP	Plasma rico em plaquetas
PTI	Trombocitopenia imune
RIA	Radioimunoensaio
rpm	Rotações por minuto
Syk	Tirosina quinase do baço
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TPO	Trombopoetina
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
2 REVISÃO DE LITERATURA 16
2.1 TROMBOCITOPENIA IMUNE 16
2.1.1 Fisiopatologia 16
2.1.2 Epidemiologia 19
2.1.3 Quadro clínico 19
2.1.4 Diagnóstico 20
2.1.5 Tratamento 22
2.2 TESTES DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTIPLAQUETÁRIOS 24
3 OBJETIVOS 28
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL 28
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS 28
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS 29
4.1 DESENHO DO ESTUDO 29
4.2 SELEÇÃO DE PACIENTES 29
4.3 COLETA DAS AMOSTRAS 30
4.4 METODOLOGIA LABORATORIAL 30
4.4.1 Preparo dos lisados plaquetários 30
4.4.2 Técnica do MACE 31
4.5 ANÁLISE DE DADOS CLÍNICOS 33
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA 33
5 RESULTADOS 35
5.1 VALIDAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO TESTE 35
5.2 APLICAÇÃO DO TESTE NA POPULAÇÃO EM ESTUDO 38
5.3 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO EM ESTUDO 39
5.4 PERFORMANCE DO TESTE 41
5.4.1 Associação entre autoanticorpos e características clínicas na população com trombocitopenia imune 43
5.4.1.1 AntiGPIIb-IIIa 43
5.4.1.2 AntiGPIb-IX 45
5.4.1.3 Análise combinada – positividade para antiGPIIb-IIIa e/ou antiGPIb-IX 47
5.4.1.4 PTI Definitiva 49

5.4.1.5 Performance do teste no subgrupo PTI Definitiva 51
6 DISCUSSÃO 53
7 CONCLUSÕES 60
REFERÊNCIAS 61
APÊNDICE A – Questionário de Sangramentos - Conforme IBLS 69
APÊNDICE B – Interpretação do Questionário no Apêndice A – Adaptado do IBSL 71
APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 72

1 INTRODUÇÃO

A trombocitopenia imune (PTI) é a causa mais comum de trombocitopenia em indivíduos adultos assintomáticos e seu diagnóstico é clínico e de exclusão, já que não dispomos atualmente de ferramentas laboratoriais precisas que permitam confirmar o diagnóstico. A investigação dos pacientes trombocitopênicos tem como objetivo descartar causas não imunes, incluindo pseudotrombocitopenia, síndrome mielodisplásica, microangiopatias trombóticas, doença hepática, hiperesplenismo, medicamentos, abuso de etanol ou plaquetopenia familiar; e causas secundárias de PTI, como infecções, doenças autoimunes concomitantes ou distúrbios linfoproliferativos[1,2].

Utilizar ou não os testes de detecção de autoanticorpos plaquetários em PTI tem sido tema de discussão por mais de 40 anos. Os métodos de detecção de autoanticorpos que são glicoproteína-específicos claramente melhoraram a especificidade dos testes e são úteis para confirmar, mas não para excluir PTI, já que a sensibilidade é muito variável na literatura[3]. Uma revisão sistemática de estudos prospectivos evidenciou sensibilidade e especificidade do teste direto de detecção de autoanticorpos antiplaquetários em PTI de 53% e 93%, respectivamente[4]. No entanto, a população incluída nestes estudos foi heterogênea em relação à classificação, duração e gravidade da doença. Em outra publicação recente, Al-Samkari et al.[5] relataram uma sensibilidade significativamente maior (90%) em pacientes com PTI que preencheram os critérios diagnósticos estabelecidos pelas diretrizes da Sociedade Americana de Hematologia (ASH) 2011[6] no momento da avaliação clínica inicial, embora esses critérios sejam não específicos. Essa grande variabilidade na performance dos testes pode também ser explicada pelas características dos testes (anticorpos monoclonais utilizados, glicoproteínas testadas, número de plaquetas utilizado, *cutoff* considerado), além das características da população avaliada[3]. Apesar disso, dados recentemente publicados[7] demonstram que mesmo selecionando a população de aplicação do teste através de critérios clínicos estritos (resposta a corticoterapia ou Imunoglobulina intravenosa – IgIV), a performance do teste ainda não é suficiente para distinguir trombocitopenia imune de não imune. Em contrapartida, estes mesmos dados demonstram que o teste é útil para confirmar PTI quando observados valores mais altos de absorbância do teste.

Apesar das divergências, pesquisadores como Porcelijn et al.[8] advogam a favor destes testes como ferramenta indispensável para algoritmos mais personalizados de tratamento dos pacientes com PTI já que várias correlações clínicas foram cogitadas em estudos prévios, como a ausência de resposta a Rituximabe em pacientes com PTI sem autoanticorpos antiplaquetários

detectáveis[9] ou a possibilidade de associação entre anticorpos antiglicoproteínas IIb-IIIa com sangramentos mais graves[10] ou uma menor resposta a IgIV[11] e esplenectomia devido a interferência no mecanismo do ácido sialico e destruição plaquetária pelos hepatócitos em pacientes com anticorpos antiglicoproteína Ib-IX. Contudo, estes achados não foram replicados em outros estudos e seguem necessitando de mais evidências para confirmação[5,12].

O último *guideline* da ASH de PTI[2] indica que esses testes podem ser úteis, porém o diagnóstico da doença segue sendo clínico e de exclusão[1].

No presente estudo, pretendemos validar e padronizar o teste direto de captura de antígenos por método de ELISA (MACE)[13,14], seguindo as orientações do Subcomitê Científico de Imunologia Plaquetária do Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH)[15] e aplicá-lo na população de pacientes com trombocitopenia do ambulatório de Trombose e Hemostasia do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), avaliando a performance do teste nessa população e possíveis correlações com características clínicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As plaquetas são células anucleadas que desempenham um papel central na hemostasia primária, de forma que alterações plaquetárias quantitativas ou qualitativas podem ocasionar um maior risco hemorrágico. A trombocitopenia, definida como contagem de plaquetas na circulação sanguínea abaixo do valor normal (150 x 10^9/L), pode ser resultante de trombocitopoiese reduzida, destruição plaquetária aumentada, consumo ou distribuição anormal de plaquetas[16]. A destruição acelerada de plaquetas é a causa mais comum de plaquetopenia e pode ser decorrente de defeitos intracorpusculares ou anormalidades extracorpusculares. Os defeitos intracorpusculares são raros e demonstrados em algumas formas de plaquetopenia hereditária, como a síndrome de Wiskott-Aldrich[16].

Mais frequentemente, a destruição plaquetária é resultado de fatores extracorpusculares, sendo os mais comuns os fatores imunológicos. Infecções, vasculopatias relacionadas ao colágeno, doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico (LES), doenças linfoproliferativas e drogas estão entre as causas de destruição plaquetária de etiologia imunológica[16,17].

2.1 TROMBOCITOPENIA IMUNE

A PTI, anteriormente denominada Púrpura Trombocitopênica Imune, é uma patologia autoimune adquirida caracterizada por contagem plaquetária <100 x 10^9/L resultante de destruição e produção inadequada de plaquetas[2].

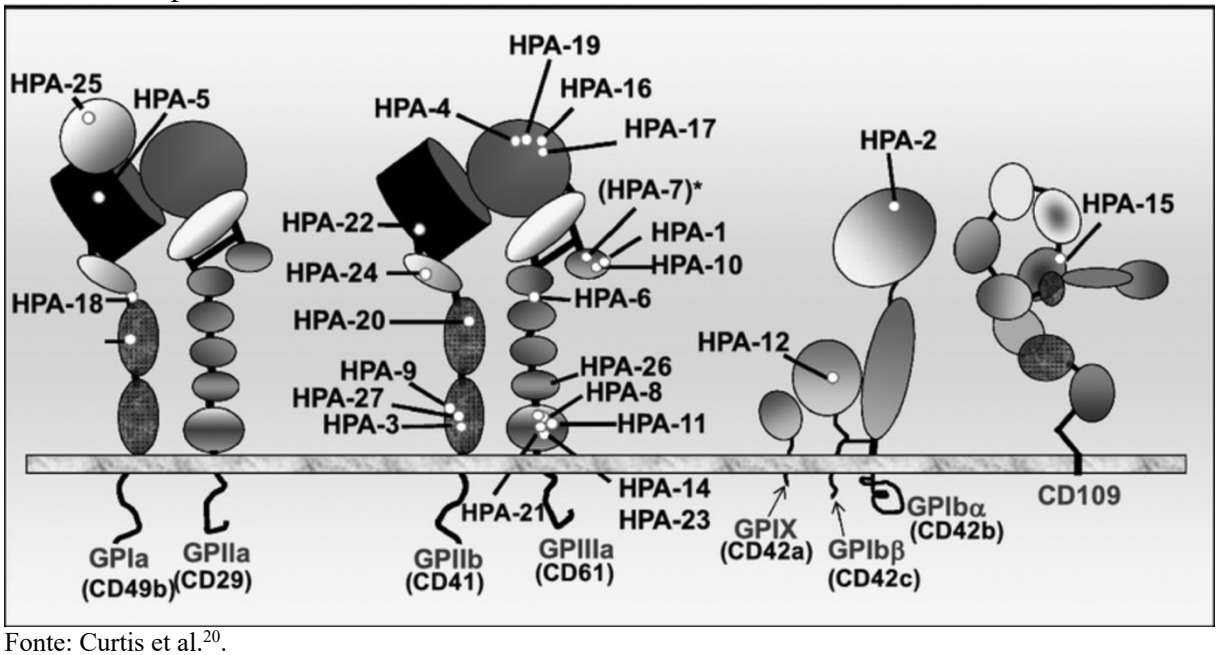
2.1.1 Fisiopatologia

A patogênese da doença ainda não está totalmente elucidada[18]. Em 1951, o pesquisador Harrington infundiu em si mesmo o plasma de um paciente com PTI e imediatamente desenvolveu uma plaquetopenia transitória[19]. Desde então, é amplamente aceito que a PTI é uma desordem em que as plaquetas opsonizadas por autoanticorpos são removidas da circulação sanguínea pelo sistema reticuloendotelial.

A predisposição para formação de autoanticorpos plaquetários nos pacientes com PTI pode ser decorrente de vários mecanismos diferentes, que parecem envolver anticorpos específicos contra a classe de imunoglobulina G (IgG), produzidos pelas células B dos pacientes e muitas vezes dirigidos contra glicoproteínas da superfície plaquetária.

Os antígenos plaquetários que estimulam a formação de autoanticorpos pelas células B são principalmente as glicoproteínas plaquetárias (GP) IIb-IIIa e GPIb-IX, conforme ilustradas na Figura 1.

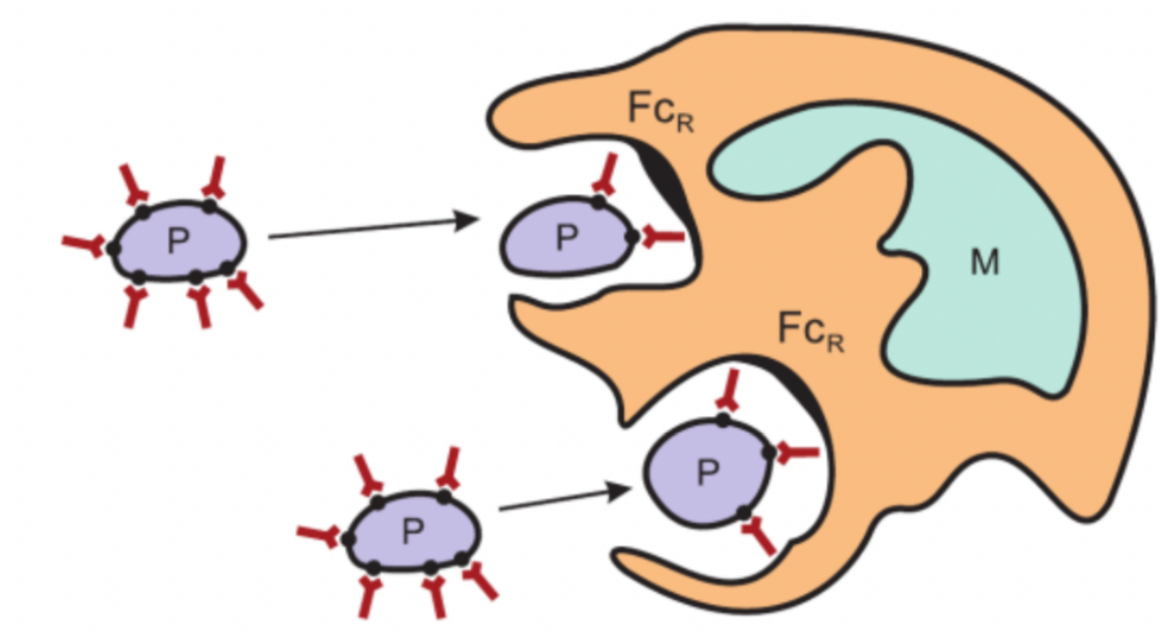
Figura 1 – Estrutura das glicoproteínas plaquetárias e antígenos plaquetários humanos (HPA) expressados



Fonte: Curtis et al.[20].

Estudos prévios avaliaram também a formação de anticorpos contra outras glicoproteínas como GPIa-IIa, GPIV e GPV, porém as duas primeiras parecem estar presentes apenas quando anticorpos contra GPIIb-IIIa e/ou GPIb-IX também são identificados[5,8]; já a GPV pode ser identificada isoladamente em cerca de 2.9-24% dos pacientes[3,21]. Os anticorpos antiGP causam destruição prematura de plaquetas via fagocitose mediada pelo receptor Fc (FcγR) por macrófagos no baço e outros tecidos reticuloendoteliais (Figura 2); a produção sustentada desses autoanticorpos depende da interação entre células B, células T e células apresentadoras de antígenos[22]. Os peptídeos das plaquetas fagocitadas podem ser processados e apresentados a células T específicas, que por sua vez estimulam as células B a produzirem autoanticorpos antiplaquetários adicionais[23]. Este processo, conhecido como *epitope spreading*, pode explicar por que os pacientes têm autoanticorpos circulantes direcionados a uma variedade de antígenos plaquetários. A destruição das plaquetas induzida por autoanticorpos na PTI também pode ser causada pela ativação do complemento e apoptose plaquetária[24-26].

Figura 2 – Destruição de plaquetas (P) induzida por anticorpos antiplaquetários na PTI. A Imunoglobulina liga-se no antígeno associado a plaqueta, resultando em fagocitose por macrófagos (M). As plaquetas recobertas por anticorpos antiplaquetários ligam-se aos macrófagos através dos repectores Fc (FcR).



Fonte: Liel et al.[27]

A produção de plaquetas também pode ser prejudicada na PTI. Essa possibilidade é corroborada por estudos utilizando plaquetas autólogas radiomarcadas que demonstram *turnover* plaquetário normal ou reduzido[28]; além de estudos clínicos que demonstraram consistentemente a capacidade dos agonistas do receptor de trombopoetina (TPO) de aumentar a contagem de plaquetas em pacientes com trombocitopenia grave[29,30].

Os megacariócitos também expressam receptores das glicoproteínas plaquetárias, o que os torna alvos dos autoanticorpos da PTI. Estudos in vitro demonstraram supressão do crescimento e maturação de megacariócitos após incubação com IgG de pacientes com PTI[31-33]. A presença de autoanticorpos na medula óssea de pacientes com PTI foi demonstrada recentemente em mais de 56% dos pacientes avaliados[34].

Além do efeito dos autoanticorpos, as células T citotóxicas de pacientes com PTI podem ter efeitos citolíticos diretos nas plaquetas[35]. Em alguns pacientes com PTI ativa, porém sem autoanticorpos plaquetários detectáveis, foram identificadas células T CD8 + capazes de induzir a lise plaquetária in vitro[36,37], diferentemente de células T CD8 + de pacientes em remissão, que não mostraram reatividade plaquetária significativa. No estudo de Vrbensky et al.[38], apesar de demonstrado o potencial citotóxico aumentado de células T CD8 + em uma amostra de

pacientes com PTI, não foi encontrada correlação entre esse potencial citotóxico e a presença ou ausência de anticorpos antiplaquetários.

Outro mecanismo de trombocitopenia na PTI é a destruição plaquetária não mediada por FcγR. Estudos prévios demonstraram que os autoanticorpos antiplaquetários causam a desialilação das glicoproteínas plaquetárias, levando ao reconhecimento e eliminação das plaquetas no fígado pelos receptores de Ashwell-Morell[39,40]. A desialilação mediada por anticorpos também pode prejudicar a produção de plaquetas[39].

O evento inicial da PTI nem sempre é claro, podendo ocorrer contribuição de fatores adquiridos e genéticos. Dois eventos adquiridos comumente citados como iniciadores da PTI são as infecções e as condições inflamatórias sistêmicas. Postula-se que as infecções iniciam e perpetuam o processo autoimune da PTI através do mimetismo molecular e da reatividade cruzada. Um antígeno de um agente infeccioso não efetivo pode ter uma estrutura molecular similar a um antígeno plaquetário e induzir a produção de um anticorpo de reação cruzada. Alternativamente, pode ocorrer degradação das glicoproteínas plaquetárias para expor epítopos crípticos que iniciam a resposta autoimune e a produção de anticorpos[18].

2.1.2 Epidemiologia

A incidência anual de PTI é estimada em 2 a 5 casos para cada 100 mil adultos na população em geral[41-44] e parece dobrar em pacientes com mais de 60 anos de idade. A prevalência geral de PTI em adultos foi estimada em 9.5 por 100 mil adultos e varia de 4.1 por 100 mil em idades mais jovens (19–24 anos) a 16 por 100 mil em grupos de idade mais avançada (55–64 anos)[43]. O predomínio da doença em mulheres jovens é menos aparente nas faixas etárias mais avançadas[17].

2.1.3 Quadro clínico

A apresentação clínica da PTI pode variar desde trombocitopenia assintomática até sangramentos graves e potencialmente fatais, de forma que o termo púrpura foi removido da denominação da doença, já que muitos pacientes podem não apresentar sangramentos[45]. A classificação da gravidade dos sangramentos é heterogênea na literatura e esforços vem sendo feitos na tentativa de padronizar suas definições[46]. Uma revisão sistemática de estudos prospectivos demonstrou que a incidência de sangramento grave (não-hemorragia intracraniana) foi de 9.6% para adultos (IC 95%, 4.1–17.1) e a incidência de hemorragia

intracraniana foi de 1.4% (IC 95%, 0.9–2.1)[47]. Fatores como contagem plaquetária (<20x10^9/L), sexo feminino e exposição a antiinflamatórios não esteroidais demonstraram associação a um maior risco de sangramento[48]. Já outro estudo recente identificou sexo masculino e pacientes politratados como fatores de risco para sangramentos graves em PTI[49]. Apesar da mortalidade estimada da doença ser 1.3 a 2.2 vezes maior do que a população em geral[50], em alguns casos pode decorrer de eventos adversos do tratamento e não da doença, de forma que infecção e sangramento parecem contribuir igualmente para a mortalidade[51]. A qualidade de vida também parece ser afetada ao menos parcialmente devido a esses efeitos adversos da terapêutica utilizada e a fadiga que muitas vezes ocorre de forma independente da contagem plaquetária[52].

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico de PTI é baseado inicialmente na exclusão de outras causas de trombocitopenia isolada através da história do paciente, exame físico, hemograma e avaliação de lâmina de sangue periférico. Se o tratamento for indicado, a contagem plaquetária em resposta ao tratamento também pode ser utilizada como informação útil para o diagnóstico, já que a resposta às opções terapêuticas de primeira linha favorece o diagnóstico de PTI[1] (contudo não permite excluir PTI secundária). O Quadro 1 traz um comparativo das recomendações mais recentes do *guideline* da ASH[2] e do Consenso Internacional de PTI[1] referentes a avaliação laboratorial básica de pacientes com suspeita de PTI, assim como testes adicionais que podem ser úteis. O diagnóstico pode ser desafiador e um período de acompanhamento clínico pode vir a ser necessário para exclusão (e acesso a resultados de exames laboratoriais que permitam excluir) das causas de trombocitopenia não imune. A identificação de PTI secundária é importante, pois permite direcionar o tratamento para a doença de base. Algumas das principais causas de trombocitopenia não imune e PTI secundária estão listadas no Quadro 2.

A doença pode ser considerada recém diagnosticada quando sua duração é menor que 3 meses, persistente até 12 meses e crônica quando a duração é maior de 12 meses[45].

Quadro 1 – Avaliação laboratorial para pacientes com suspeita de PTI

Guideline ASH 2019	**Consenso Internacional 2019**	
Avaliação básica	**Avaliação básica**	**Outros testes com utilidade potencial**
Hemograma completo e contagem de reticulócitos	Hemograma completo e contagem de reticulócitos	Autoanticorpos GP específicos
Avaliação de lâmina de sangue periférico	Avaliação de lâmina de sangue periférico	Anticorpos antifosfolípides[†]
Sorologia para HIV	Sorologia para HIV	Pesquisa de Helicobacter pylori[‡]
Sorologia para Hepatite C (HCV)	Sorologia para Hepatite C	Avaliação de medula óssea[§]
Outros testes conforme anormalidades no hemograma e na lâmina de sangue periférico[*]	Sorologia para Hepatite B (HBV)	Função tireoidiana e anticorpos anti-tireóide
	Quantificação de Imunoglobulinas	Anticorpos Antinucleares (FAN)
	Tipagem sanguínea (Rh)	Teste da Antiglobulina Direta (TAD)
		PCR viral para Epstein-Barr (EBV), Citomegalovírus (CMV) e Parvovírus

[*]Outras anormalidades além de trombocitopenia e anemia por deficiência de ferro; [†]Se quadro clínico sugestivo de Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide (SAAF); [‡]Para pacientes com PTI em certas localizações geográficas de alta prevalência (Ex. Ásia); [§]Pode ser indicada para pacientes que apresentam recaída após remissão, que não respondem a primeira linha de tratamento ou se outras anormalidades são detectadas no hemograma ou na morfologia do sangue periférico.
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase.
Fonte: elaborado pela autora com base em Provan et al.[1] e Neunert et al.[2].

Quadro 2 – Exemplos de causas de PTI secundária e trombocitopenia não imune.

PTI Secundária	Trombocitopenia Não Imune
Infecções (HIV, HCV, CMV, Helicobacter pylori)	Pseudotrombocitopenia
Doenças linfoproliferativas	Plaquetopenias hereditárias
Doenças auto-imunes (SAAF, LES, Evans)	Hiperesplenismo
Medicamentos*	Hepatopatia
Imunodeficiência comum variável	Microangiopatias Trombóticas
Imunodeficiência comum variável	Síndromes Mielodisplásicas
	Citotoxicidade por álcool ou outros medicamentos/ quimioterápicos

*Alguns medicamentos comprovadamente podem causar a formação de anticorpos antiplaquetários. Exemplos: Quinino, Penicilina, Rifampicina, Abciximab.
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana; HCV: Sorologia para Hepatite C; CMV: Citomegalovírus; SAAF: Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide; LES: Lúpus eritematoso sistêmico.
Fonte: elaborado pela autora com base em Provan et al.[1], Neunert et al.[2], Rodgers[14] e Arnold et al.[17].

2.1.5 Tratamento

A necessidade de tratamento para PTI depende da contagem plaquetária e das manifestações clínicas, de forma que as atuais diretrizes da ASH 2019[2] recomendam o tratamento para pacientes recém-diagnosticados com PTI que são assintomáticos ou apresentam sangramento mucocutâneo leve apenas se contagem de plaquetas inferior a 30×10^9 / L. Já o Consenso Internacional de PTI[1] sugere que o tratamento é raramente indicado quando contagem plaquetária >20 x 10^9/L na ausência de sangramento.

Sendo a prevenção de sangramentos um dos principais objetivos do tratamento de PTI, a avaliação do risco de sangramento faz-se importante, contudo, não dispomos de escores de sangramentos validados em adultos que nos permitam estimar esse risco[45,53,54], de forma que essa avaliação atualmente depende da contagem plaquetária e evolução clínica do paciente. De forma geral, a elevação da contagem plaquetária com qualquer terapia parece estar relacionada a uma melhora na qualidade de vida relacionada a saúde[55].

As opções terapêuticas incluem corticóide e IgIV como primeira linha de tratamento. No entanto, apesar de mais de 75% dos pacientes apresentarem resposta a corticóide, apenas 20 a 30% mantém resposta sustentada após a suspensão dessas medicações[56], de forma que a segunda linha de tratamento é necessária para 70 a 80% dos pacientes tratados inicialmente. Devido ao perfil de efeitos colaterais importantes do uso prolongado de corticóide, os guidelines

atuais sugerem limitar seu uso a um período máximo de 6 a 8 semanas, trocando para outra opção terapêutica se sem resposta ou corticodependente[1,2].

As opções de segunda linha de tratamento incluem esplenectomia, Rituximabe, agonistas do receptor de TPO e Fostamatinib. Após o diagnóstico de PTI, recomenda-se esperar pelo menos 12 meses antes de considerar a esplenectomia1, pois cerca de 20% dos pacientes podem atingir a remissão no primeiro ano da doença. Atualmente, diante da disponibilidade de tratamentos medicamentosos como os agonistas do receptor TPO, a esplenectomia vem sendo menos utilizada; no entanto, essa segue sendo uma opção terapêutica com alta taxa de resposta[57], com remissão completa da PTI em até 66% dos pacientes[58]. O tratamento com Rituximabe também é capaz de induzir resposta em cerca de 60%[59], contudo as remissões são duráveis em apenas 20-30% dos pacientes, com a maioria apresentando recaídas após 1-2 anos de tratamento[60,61].

Os agonistas do receptor TPO ligam-se e ativam o receptor c-Mpl em células-tronco hemopoiéticas e megacariócitos, levando ao aumento da produção de plaquetas. Em ensaios clínicos randomizados de fase III, as duas medicações inicialmente desenvolvidas dessa classe (Romiplostin e Eltrombopague) demonstraram resposta em 60-80% dos pacientes[30,62] e seu efeito costuma ser visto dentro de 2 semanas. As respostas são mantidas enquanto a medicação é continuada mesmo após uso prolongado, porém até 20-30% dos pacientes mantêm respostas duráveis de contagem de plaquetas mesmo após a interrupção dos medicamentos[63]. O Fostamatinibe, um inibidor da tirosina quinase do baço (Syk) que age bloqueando a destruição plaquetária secundária à fagocitose mediada por anticorpos é aprovado para o tratamento da PTI crônica com resposta insuficiente a pelo menos uma terapia anterior. Estudos mostraram uma taxa de resposta geral (contagem de plaquetas $\geq 50x10^9/L$) de 43%, contudo resposta estável (plaquetas $\geq 50x10^9/L$ por pelo menos 4 de 6 semanas) foi alcançada em apenas 18% dos pacientes[64,65].

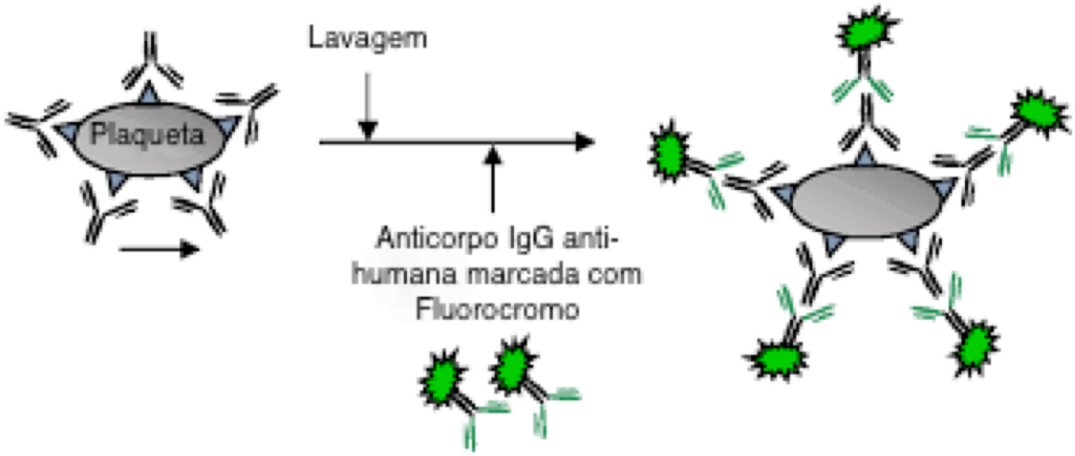
Outros medicamentos imunossupressores / imunomoduladores como Azatioprina, Dapsona, Danazol e Micofenolato de Mofetil[1] apresentam taxa de resposta variada e avaliada na literatura apenas através de estudos retrospectivos ou estudos prospectivos de braço único[1]. Um ensaio clínico randomizado recente sugere melhor resposta e menor risco de refratariedade no uso da combinação de corticóide com Micofenolato de Mofetil como primeira linha de tratamento para PTI[66].

2.2 TESTES DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTIPLAQUETÁRIOS

Existem três categorias de ensaios para detecção de anticorpos antiplaquetários. Nos primeiros testes utilizados para essa finalidade, chamados ensaios de primeira geração, a identificação de anticorpos era baseada na observação de efeitos secundários causados pela ligação dos anticorpos às plaquetas[67]. Nessa técnica, o desfecho é dependente da ativação plaquetária pelo soro testado, porém a maioria dos autoanticorpos e aloanticorpos não ativam plaquetas, sendo este método atualmente restrito à investigação de trombocitopenia induzida por heparina[67].

Os ensaios de segunda geração, desenvolvidos na década de 1970 a partir da disponibilidade de imunoglobulinas anti-humanas marcadas com radio ou imunofluorescência da classe IgG, IgM ou IgA, permitem a detecção de anticorpo ligado nas plaquetas do doador incubadas com soro do paciente (método indireto) ou diretamente na superfície das plaquetas do paciente (método direto). Inicialmente, foi considerado que um aumento de imunoglobulina na superfície plaquetária pudesse ter o mesmo significado que o teste da antiglobulina direta na anemia hemolítica autoimune[3,67,68]. Tais ensaios consistem em técnicas como radioimunoensaio (RIA), teste de imunofluorescência plaquetária (PIFT) e ensaio passivo misto de hemaglutinação (MPHA), as quais representaram um grande avanço nos métodos de detecção de anticorpos plaquetários, sendo mais confiáveis do que os testes de ativação plaquetária, contudo sua sensibilidade e especificidade ainda eram insuficientes, tendo utilidade diagnóstica limitada[69]. O PIFT por exemplo detecta autoanticorpos plaquetários em aproximadamente 70%-80% dos pacientes com PTI, com uma especificidade de aproximadamente 50%-60%[70-72], porém um resultado positivo não permite diferenciar trombocitopenia imune de trombocitopenia não imune, já que pode ocorrer a co-expressão do antígeno leucocitário humano (HLA) de classe I e FcγR IIa nas plaquetas causando dificuldades em distinguir anticorpos HLA de anticorpos contra HPA, além da possibilidade de ligação não específica de anticorpos, pela ligação de complexos imunes via receptor de plaquetas-IgG-Fcγ[69,73,74]. O teste está ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Técnica do teste PIFT (Teste de Imunofluorescência Plaquetária). As plaquetas são incubadas com anticorpo IgG anti-humano marcado com fluorocromo. A intensidade da fluorescência na superfície da plaqueta é analisada por citometria de fluxo.



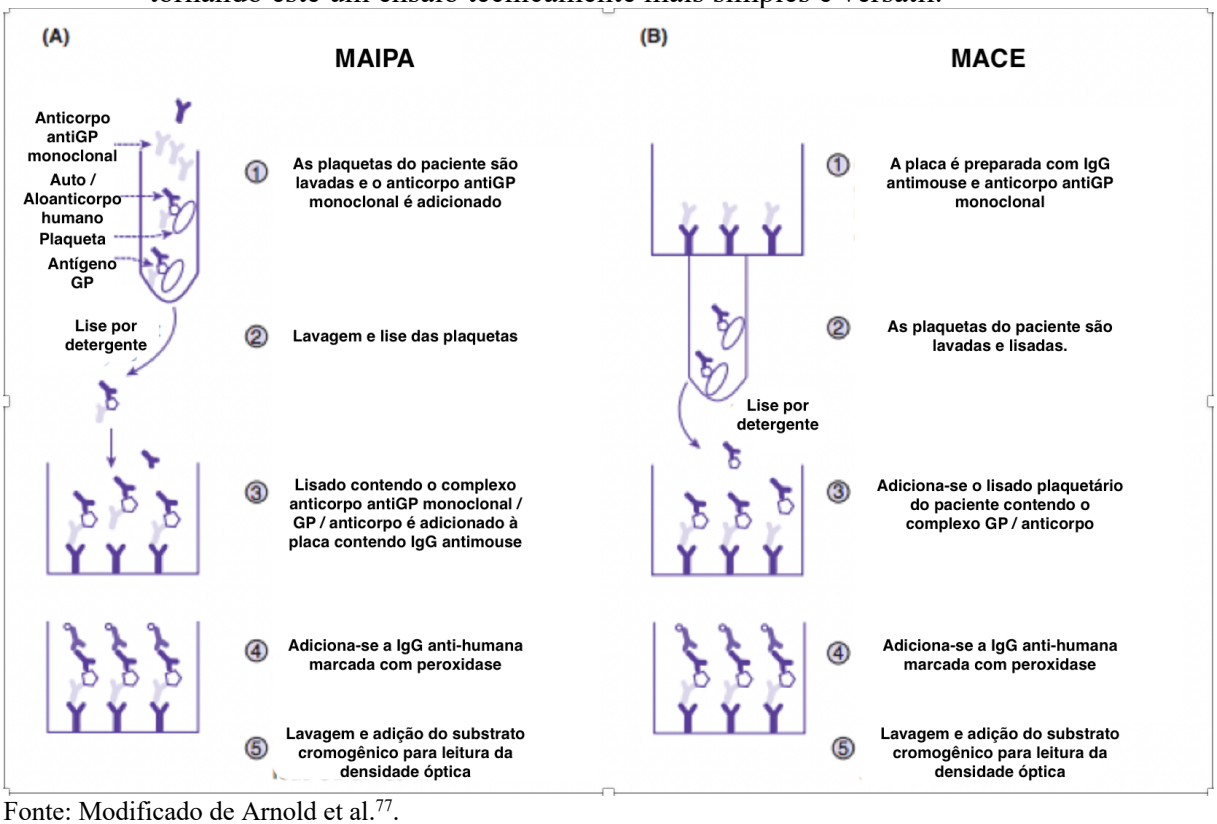
Fonte: Modificado de Matsuhashi et al.[75].

Os ensaios de terceira geração foram desenvolvidos a partir da observação de van Leeuwen et al. em 1982[76], que demonstrou que eluato de plaquetas de pacientes com PTI incubado com plaquetas de doadores saudáveis demonstrava resultado positivo no PIFT, porém quando incubado com plaquetas de pacientes com Trombastenia de Glanzmann (e portanto com deficiência da GPIIb-IIIa) o resultado era negativo, sugerindo que a GPIIb-IIIa fosse o alvo desses anticorpos[76]. Desde 1984, vários ensaios de terceira geração foram desenvolvidos objetivando identificar a proteína plaquetária alvo de anticorpos, através do uso de anticorpos monoclonais ou técnicas eletroforéticas. Esses ensaios podem ser divididos em três grupos: *immunoblotting*, imunoprecipitação e ensaios de captura de antígeno específico[77].

O *immunoblotting* é um teste indireto, que separa proteínas plaquetárias individuais, seguido pela ligação do autoanticorpo. Esta técnica apresenta vários problemas inerentes ao teste, já que frequentemente distorce os antígenos plaquetários devido a desnaturação das glicoproteínas, sendo raramente utilizada atualmente[78]. O ensaio de imunoprecipitação é uma técnica direta ou indireta, inicialmente utilizada por Tomiyama et al.[79], envolvendo a ligação das proteínas ao autoanticorpo seguida da separação das proteínas plaquetárias. Esta técnica oferece várias vantagens, como preservação dos antígenos plaquetários evitando o problema de impedimento estérico[78]. Além disso, não são necessários anticorpos monoclonais específicos, sendo um teste capaz de detectar sistemas de antígenos ainda não descritos. Trata-se de um ensaio mais útil para o estudo de anticorpos séricos contra aloantígenos plaquetários, tecnicamente difícil e que no passado exigiu o uso de radioisótopos, não sendo extensamente utilizado na investigação de PTI[68,80].

Os ensaios de captura de antígeno específico utilizam anticorpos monoclonais para "capturar" glicoproteínas plaquetárias específicas e incluem a imobilização específica do anticorpo monoclonal de antígenos plaquetários (MAIPA), o ensaio imunoenzimático (ELISA) com captura de antígeno (MACE) e o ensaio de imunobeads[78]. Em 1984, Woods et al. usaram um ensaio de poços de microtitulação no qual 5 das 56 amostras de plasma de pacientes com PTI reagiram contra GPIIb-IIIa[81] e 3 de 106 pacientes com PTI reagiram a GPIb[82]. Em 1987, Kiefel et al.[83] descreveram o MAIPA, que pode ser usado para estudar a presença de anticorpos ligados às plaquetas (direto) ou livre no plasma (indireto) do paciente. A partir daí diversas variações das técnicas foram descritas e passaram a ser utilizadas[13,15,84-89], permitindo uma melhor sensibilidade e especificidade quando comparados aos testes de primeira e segunda geração e aumentando dramaticamente a utilidade diagnóstica dos testes de detecção de autoanticorpos plaquetários. No entanto, alguns auto ou aloanticorpos podem compartilhar epítopos antigênicos com anticorpos monoclonais, resultando em impedimento estérico e resultados falso negativos nestes métodos. Para minimizar este problema, uma combinação de anticorpos monoclonais, com especificidades diferentes, deve ser usada em cada ensaio[77]. Outra desvantagem desses ensaios é que a detecção de novos autoantígenos plaquetários não é possível e a identidade da proteína alvo (e, portanto, o anticorpo monoclonal a ser usado no teste) deve ser conhecido antecipadamente, sendo necessária uma série de diferentes anticorpos monoclonais[77]. Além da investigação de trombocitopenia autoimune, estes ensaios podem ser adaptados para estudar doenças aloimunes com um painel de glicoproteínas plaquetárias de fenótipo conhecido ou trombocitopenia induzida por drogas por meio da demonstração de ligação dependente de drogas de anticorpos a glicoproteínas plaquetárias específicas[77]. Por serem técnicas que podem ter mais fácil execução e reprodutibilidade em laboratórios de imunologia plaquetária, MAIPA, MACE e suas variações são os métodos recomendados no relatório oficial do Subcomitê Científico de Imunologia Plaquetária da ISTH[15], que descreve uma abordagem padronizada para a implementação de testes de detecção de autoanticorpos plaquetários em ensaios clínicos de PTI. O MAIPA é provavelmente a técnica mais frequentemente utilizada, enquanto o MACE é um ensaio tecnicamente mais simples, no qual os anticorpos monoclonais direcionados às glicoproteínas plaquetárias interagem com amostras de plaquetas solubilizadas em detergente (lisado plaquetário), ao invés de com as plaquetas intactas como no MAIPA[77]. A Figura 4 mostra um esquema simplificado de ambas as técnicas.

Figura 4 – Versões "diretas" do MAIPA e do MACE (as plaquetas do paciente são testadas quanto à presença de autoanticorpos ligados à glicoproteína plaquetária) (A) No ensaio MAIPA, os anticorpos monoclonais antiGP são adicionados às plaquetas do paciente intactas lavadas antes da lise do complexo.(B) No ensaio de captura de antígeno, as plaquetas do paciente são lavadas, depois lisadas e só mais tarde é adicionado o anticorpo monoclonal antiGP. Ambos os ensaios se assemelham nos estágios finais (etapas 4 e 5). Uma vantagem relativa do ensaio de captura de antígeno é que o lisado de plaquetas pode ser armazenado e o ensaio realizado posteriormente usando qualquer anticorpo monoclonal antiGP de escolha, tornando este um ensaio tecnicamente mais simples e versátil.



Fonte: Modificado de Arnold et al.[77].

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Validar e padronizar o teste de captura de antígenos plaquetários, avaliando sua performance na população de pacientes com trombocitopenia do Ambulatório de Trombose e Hemostasia do Serviço de Hematologia do HCFMUSP.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

a) Definir sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do MACE nos pacientes analisados;
b) avaliar associação entre a presença de anticorpos antiplaquetários e características clínicas dos pacientes com trombocitopenia imune (idade, sexo, PTI primária ou secundária, presença de sangramentos graves, duração de doença, menor contagem plaquetária atingida, contagem de plaquetas na ocasião da coleta, uso prévio de corticoide, Rituximabe, agonistas de TPO ou outras medicações, esplenectomia prévia, número de linhas de tratamento realizadas);
c) definir sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do MACE em uma subpopulação de pacientes com PTI que apresentam nadir plaquetário inferior a 20 x 10^9/L e resposta prévia a corticoterapia ou IgIV[1,45,90](conforme reportado em prontuário eletrônico ou resposta definida como um aumento na contagem de plaquetas para 50 x 10^9 /L ou mais e o dobro da contagem prévia dentro de até 4 semanas do tratamento analisado)[2,7,45].

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Este é um estudo transversal, realizado através da coleta de amostras de sangue de pacientes trombocitopênicos e revisão de prontuários clínicos dos pacientes participantes.

4.2 SELEÇÃO DE PACIENTES

Foram convidados a participar do estudo os pacientes trombocitopênicos em acompanhamento no ambulatório de Trombose e Hemostasia do Serviço de Hematologia do HCFMUSP que compareceram para consulta médica entre Julho de 2019 e Março de 2020, de acordo com os seguintes critérios:

a) critérios de inclusão:
   - idade acima de 18 anos;
   - contagem de plaquetas real* abaixo de 100 x 10^9/L sem diagnóstico definido;
   - contagem de plaquetas real* abaixo de 100 x 10^9/L com qualquer diagnóstico;
   - diagnóstico prévio de PTI com qualquer contagem de plaquetas;
   - a plaquetopenia em pacientes avaliados no ambulatório de Trombose e Hemostasia do Serviço de Hematologia do HCFMUSP é inicialmente confirmada através de contagem realizada em ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) (BD Vacutainer®, EUA) e em citrato de sódio, além de contagem manual de plaquetas e avaliação de lâmina de sangue periférico, visando excluir plaquetopenia espúria;

b) critérios de exclusão:
   - contagem de plaquetas entre 100 - 150 x 10^9/L sem diagnóstico definido;
   - contagem de plaquetas entre 100 - 150 x 10^9/L com outro diagnóstico que não PTI;
   - presença de outras citopenias em hemograma (exceto se diagnóstico de anemia ferropriva associada a plaquetopenia ou Síndrome de Evans - PTI associada a anemia hemolítica autoimune);
   - plaquetopenia espúria / Pseudoplaquetopenia induzida por EDTA.

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Pacientes atendidos no ambulatório de Trombose e Hemostasia do Serviço de Hematologia do HCFMUSP entre o período de Julho de 2019 a Março de 2020 que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo. Os pacientes a serem incluídos no estudo eram avaliados quanto ao último hemograma para análise de preenchimento de critérios de inclusão e então abordados pela assistente de pesquisa no momento do comparecimento para coleta de novo hemograma que acontece rotineiramente imediatamente antes da consulta médica. Após esclarecimentos sobre a pesquisa, os pacientes que concordaram em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Apêndice C – para coleta de amostra e responderam ao questionário de sangramentos baseado em escala desenvolvida e validada para pacientes com PTI-IBSL ("ITP Bleeding Scale")[54]. Originalmente, esse questionário avalia 9 sítios anatômicos de sangramento através de história e dois deles também através de exame físico (pele e cavidade oral). Os sangramentos são classificados como ausente (0), leve (1) ou severo (2). Em nosso questionário, mantivemos a avaliação dos sítios que poderiam ser auto reportados pelo paciente (pele, cavidade oral, epistaxe, gastrointestinal, urinário, hemorragia subconjuntival e ginecológico), não dependendo da avaliação de exame físico, visando facilitar a coleta dos dados. O questionário presente no Apêndice A foi entregue aos pacientes pelo assistente de pesquisa. As respostas dos pacientes foram posteriormente analisadas pelo pesquisador responsável conforme o Apêndice B.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMUSP (CAAE – Plataforma Brasil: 79176017.6.0000.0065). Após assinatura do TCLE, uma amostra de 30mL de sangue total periférico em tubo falcon (Alfa, Brasil) previamente preparado com anticoagulante citrato ácido dextrose (ACD) 5mL era coletada por técnico de enfermagem responsável também pela coleta de hemograma de rotina que já seria realizado pelo paciente na data.

4.4 METODOLOGIA LABORATORIAL

4.4.1 Preparo dos lisados plaquetários

As amostras de sangue total dos pacientes coletadas em tubo falcon previamente preparado com ACD (1 parte de anticoagulante para 6 partes de sangue total) foram

armazenadas na bancada em temperatura ambiente pelo período de 24h com o objetivo de separação do plasma rico em plaquetas (PRP).

O PRP era então transferido para tubos de acrílico previamente identificados, os quais eram centrifugados por 8 minutos a 3900 rotações por minuto (rpm) para formação do pellet de plaquetas. Após a centrifugação e a formação do pellet realizava-se 3 lavagens, adicionando de 1 a 2 mL de PBS/ACD 0,1% e teofilina com pH 6.2 e centrifugando os tubos por 2 minutos a 3000 rpm. Antes da terceira lavagem, uma subamostra era separada para determinação do número total de plaquetas, através do uso do analisador hematológico Sysmex XN-550.

Após a contagem de plaquetas, era preparada uma suspensão de lisado plaquetário considerando uma concentração final de 300.000/uL plaquetas utilizando Buffer de lise contendo inibidores e Triton X 100 (concentração final 1%). O lisado plaquetário era então congelado em freezer -50ºC.

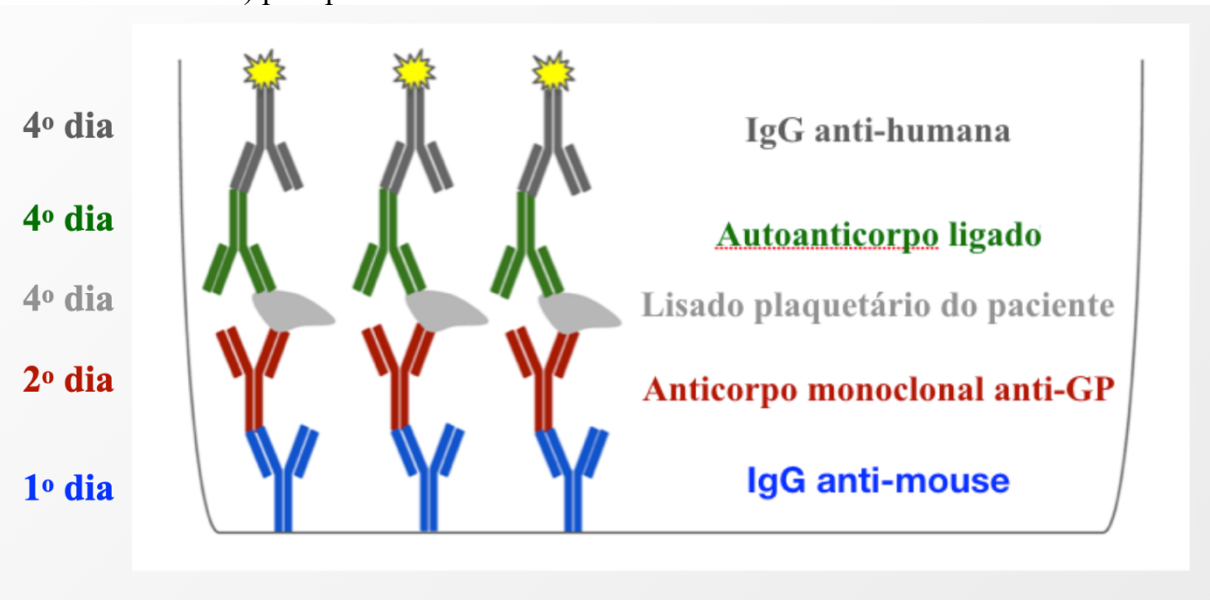
Para preparo dos controles negativos, cerca de 2 mL de amostra de plaquetas coletadas por aférese de doadores saudáveis e não plaquetopênicos da Fundação Pró-Sangue do tipo sanguíneo O eram submetidas as mesmas etapas descritas previamente para elaboração do lisado plaquetário.

Para preparo dos controles positivos, o mesmo PRP utilizado para preparo do controle negativo era incubado com 200uL de soro de paciente com Trombastenia de Glanzmann com presença de anticorpos antiGPIIb-IIIa identificado através da técnica de MAIPA indireto e confirmado através do teste PAK/Luminex (imunoensaio qualitativo para detecção e especificação de anticorpos contra antígenos localizados na GPIIb-IIIa, GPIb-IX, GPIa-IIa, GPIV e HLA classe I. As esferas Pak Lx são incubadas com uma amostra de soro em temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas para remoção de anticorpos não ligados. Em seguida, é adicionado um anticorpo IgG anti-humano conjugado. Após nova incubação em temperatura ambiente, a mistura de reação é diluída e analisada no instrumento Luminex[89]) durante 1 hora em temperatura ambiente, seguindo posteriormente os mesmos passos já descritos para preparo do lisado plaquetário.

4.4.2 Técnica do MACE

O ensaio é realizado em 4 dias consecutivos conforme representado na Figura 5:

Figura 5 – Etapas da técnica MACE: 1º dia (em azul): preparo da placa com IgG anti-mouse. 2º dia (em vermelho): adição do anticorpo monoclonal contra a GP a ser estudada. 3º dia (não contido na ilustração): acrescentado buffer de bloqueio. 4º dia: é adicionado o lisado plaquetário do paciente (em cinza claro) que pode conter autoanticorpo ligado a ele (em verde) e a IgG anti-humana (em cinza escuro + amarelo) para posterior leitura dos resultados.



Fonte: a autora.

No primeiro dia é realizada a preparação da placa de fundo reto (Thermo Scientific, USA). Em um tubo de acrílico dilui-se o IgG anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, USA) em solução de Buffer de Bicarbonato (Sigma, USA). Em cada poço são adicionados 100uL da mistura com uma concentração final de 1ug de IgG anti-mouse/poço. A placa é incubada a 4ºC "overnight".

No segundo dia, o líquido da placa é decantado e são realizadas 3 lavagens com Buffer de lavagem (100uL por poço). Em dois tubos de acrílico dilui-se os monoclonais específicos antiGPIIb-IIIa e antiGPIb-IX (Thermo Scientific, USA) com Buffer de Bicarbonato. Em cada poço são adicionados 100uL da diluição com uma concentração de monoclonal de 1ug/poço. A placa é novamente incubada a 4ºC "overnight".

No terceiro dia, o líquido da placa é decantado e adiciona-se 250uL de Buffer "de bloqueio" (Sigma, USA) em cada poço. A placa é novamente incubada a 4ºC "overnight".

No quarto dia, o líquido da placa é decantado e adiciona-se 50uL de amostra do lisado plaquetário a ser testado em cada poço. A placa é então incubada por duas horas em temperatura ambiente. Após o período de incubação os poços são lavados por três vezes com Buffer de lavagem. Em um tubo de acrílico é preparada a diluição da IgG anti-humana conjugada com peroxidase (Jackson ImmunoResearch, USA) com Buffer de bloqueio para uma diluição de

1:7500. A placa é incubada por uma hora em temperatura ambiente. Após incubação, o líquido é decantado e são realizadas 3 lavagens, 2 com Buffer de lavagem com tween (Sigma, USA) e 1 apenas com Buffer de lavagem. Em um reservatório "canaleta" adiciona-se água deionizada, pastilha de substrato de peroxidase (OPD) (Sigma, USA) e Peróxido de Hidrogênio 30% (Sigma, USA), adicionando posteriomente 100uL dessa solução em cada poço e incubando a placa em temperatura ambiente por 9 minutos ao abrigo da luz. Após essa incubação, adiciona-se 100uL de solução de parada – *stop solution* (Sigma, USA) em cada poço e realiza-se a leitura no espectofotômetro (BIOTEK ELX 800) com comprimento de onda 405x 490mm. Em cada teste é incluído um "branco" da reação, que se constitui em uma reação sem a presença da amostra, permitindo verificar a reatividade de fundo (*background*) da reação.

4.5 ANÁLISE DE DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos e laboratoriais de todos os participantes foram extraídos do prontuário eletrônico e inseridos em uma base de dados especificamente criada para este projeto. Os dados foram levantados respeitando a confidencialidade dos pacientes. A coleta foi exclusivamente realizada pelo pesquisador executante deste projeto. Foram coletados dados relativos à idade, sexo, diagnóstico do paciente (se PTI ou não imune), presença de causa secundária para PTI, duração de doença (considerando a data da primeira contagem plaquetária menor de 100 x 10^9/L), tratamentos realizados para PTI, menor contagem plaquetária atingida pelo paciente (nadir plaquetário), contagem de plaquetas na ocasião da realização do teste. Todos os dados foram conduzidos e analisados de forma anônima e os resultados decorrentes do estudo não permitem a identificação individual dos participantes.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações pareadas entre os subgrupos de pacientes foram realizadas pelos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis para variáveis contínuas e pelo qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher para variáveis categóricas. A associação entre os fatores foi analisada por meio de modelos de regressão logística.

O desempenho do teste diagnóstico foi avaliado por medidas usuais de precisão e validade (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e área sob a curva [AUC]).

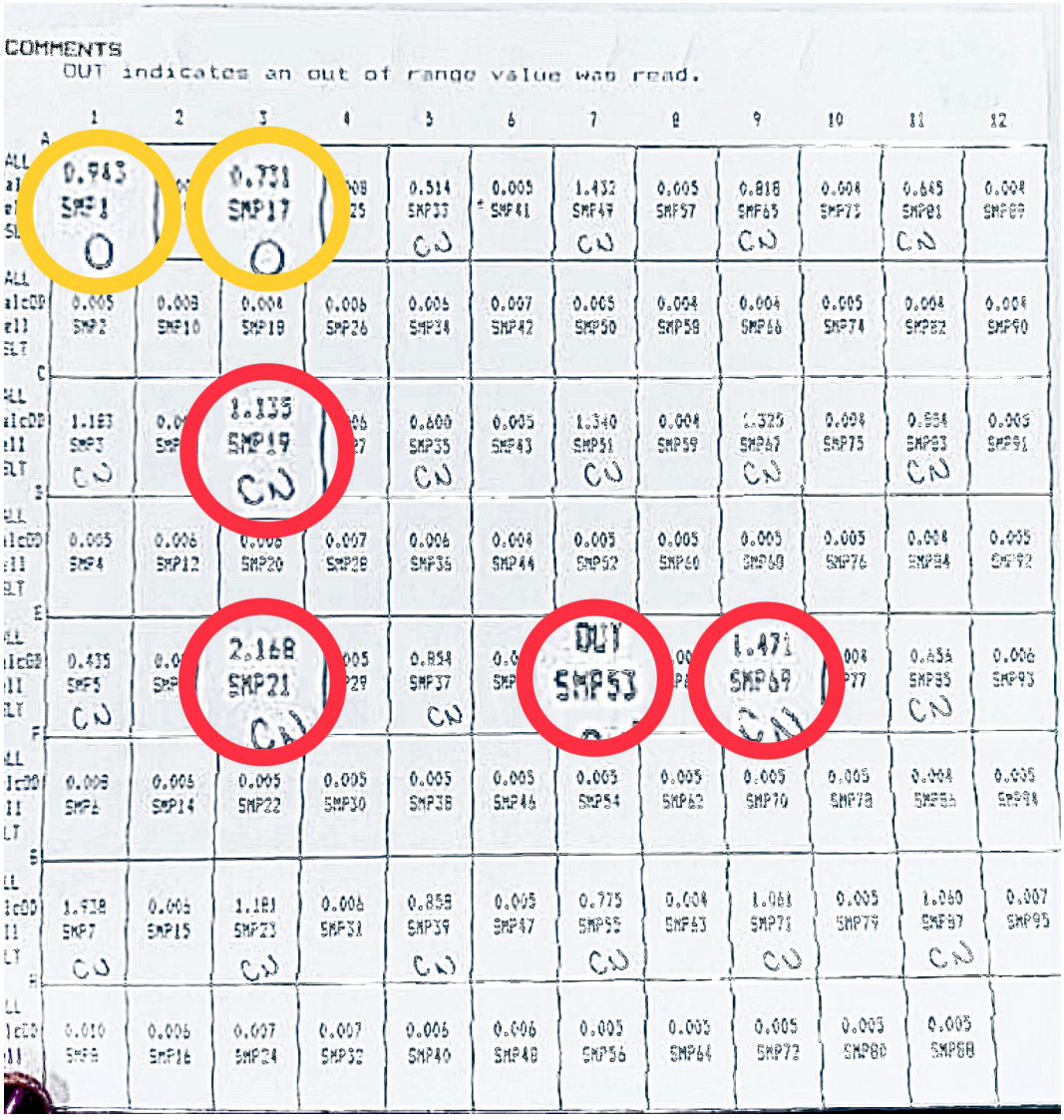
Todas as análises foram realizadas usando o pacote de software R versão v 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing; www.r-project.org) e um valor de p bilateral <0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 VALIDAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO TESTE

Para padronização do teste realizamos a titulação do conjugado de anti-IgG humana marcada com peroxidase através de diluições seriadas contra controles positivos e negativos, conforme as Figuras 6 e 7. Foi selecionada a concentração que permitiu melhor diferenciação entre amostras positivas e negativas.

Figura 6 – Resultado da leitura original da técnica MACE com diluição de anti-IgG humana marcada com peroxidase 1:5000. Os círculos amarelos indicam a absorbância dos controles positivos (0.943 e 0.731). Os círculos vermelhos indicam controles negativos com absorbância ainda maior que os controles positivos (1.135 até "out" - acima do limite de leitura), sugerindo uma titulação inadequada do anticorpo secundário.



Fonte: a autora.

Figura 7 – A) foto abaixo representa o resultado dos dados originais da fluorescência dos controles positivos na placa da técnica MACE com diluição de anti-IgG humana marcada com peroxidase 1:7500;

(continua)

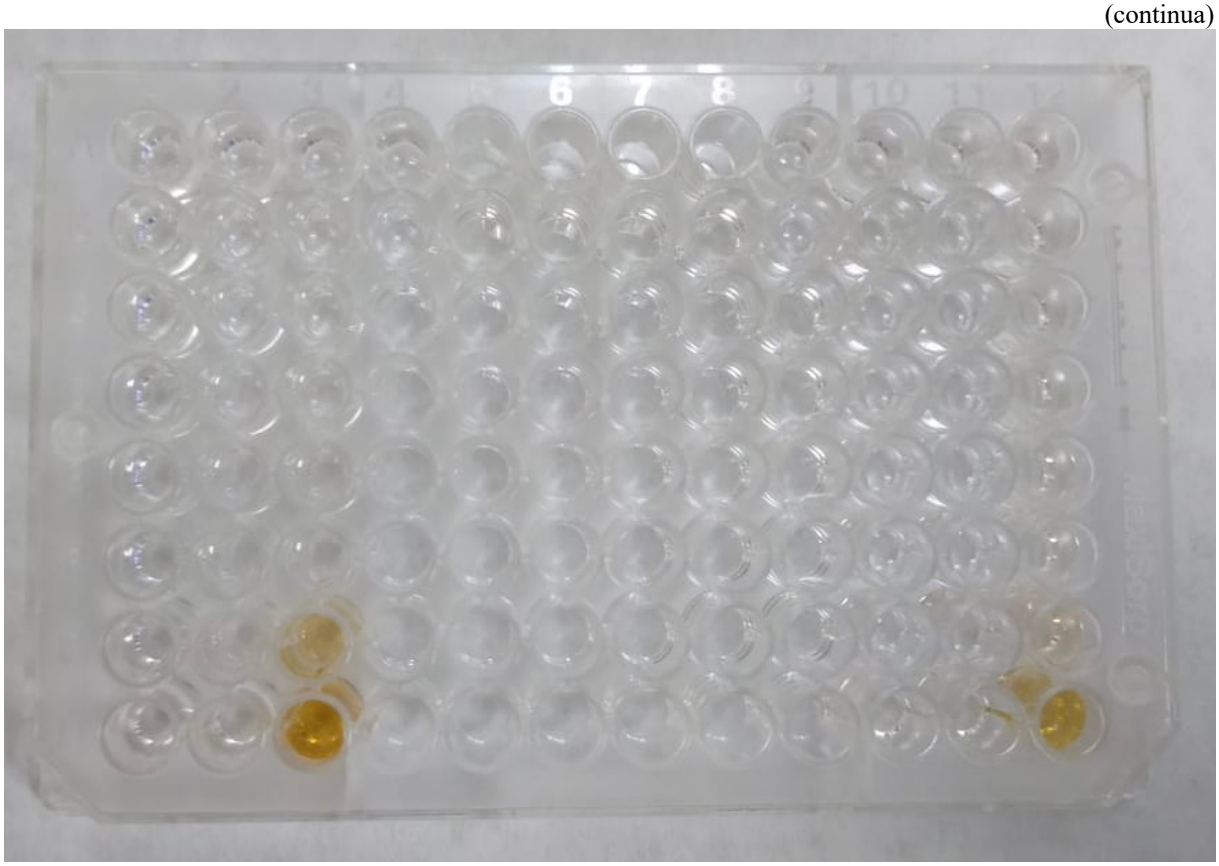


Figura 7 – B) No resultado da leitura, os círculos vermelhos indicam controles negativos com absorbância baixa (0.022-0.035), enquanto os círculos amarelos indicam os controles positivos com absorbância elevada (1.063 e 2.271), sugerindo adequação da titulação do anticorpo secundário.

(conclusão)

Fonte: a autora.

O anticorpo monoclonal antiCD41 utilizado para GPIIb-IIIa seguiu as "Recomendações para a implementação de testes de autoanticorpos plaquetários em ensaios clínicos de trombocitopenia imune"[13] (clone P2), porém para a GPIb-IX, devido a dificuldade de aquisição de monoclonais, foi utilizado o antiCD42 clone SZ2 (diferentemente dos sugeridos AP1, FMC25, TW-1, Beb-1).

O *cutoff* ou ponto de corte do teste foi calculado a partir da média e do desvio padrão (DP), sendo que para a determinação destes valores foram considerados os resultados

apresentados por 25 doadores de plaquetas por aférese saudáveis e não plaquetopênicos da Fundação Pró-Sangue testados em duplicata. Como duas destas amostras apresentaram resultado acima da média acrescida de dois DP, estas foram consideradas *outliers* extremos e excluídas da avaliação, restando amostras de 23 doadores. Como demonstrado na Tabela 1, a partir de uma absorbância média subtraída dos valores de "brancos" de 0.092 com DP de 0.083 para GPIIb-IIIa e 0.119 com DP de 0.112 para GPIb-IX, considerando a adição de dois DP, definimos o *cutoff* como 0.26 para GPIIb-IIIa e 0.34 para GPIb-IX, determinando como positivos os resultados com absorbância acima desse valor.

Tabela 1 – Determinação de *cutoffs* para antiGPIIb-IIIa e antiGPIb-IX

	AntiGPIIb-IIIa	**AntiGPIb-IX**
Absorbância média	0.092	0.119
Desvio Padrão (DP)	0.083	0.112
Absorbância média + 2 DP	0.258	0.343

Fonte: a autora.

5.2 APLICAÇÃO DO TESTE NA POPULAÇÃO EM ESTUDO

Seguindo as recomendações previamente mencionadas[15], todas as amostras foram coletadas utilizando como anticoagulante ACD, que é mais eficiente na preservação de plaquetas, evitando sua ativação.

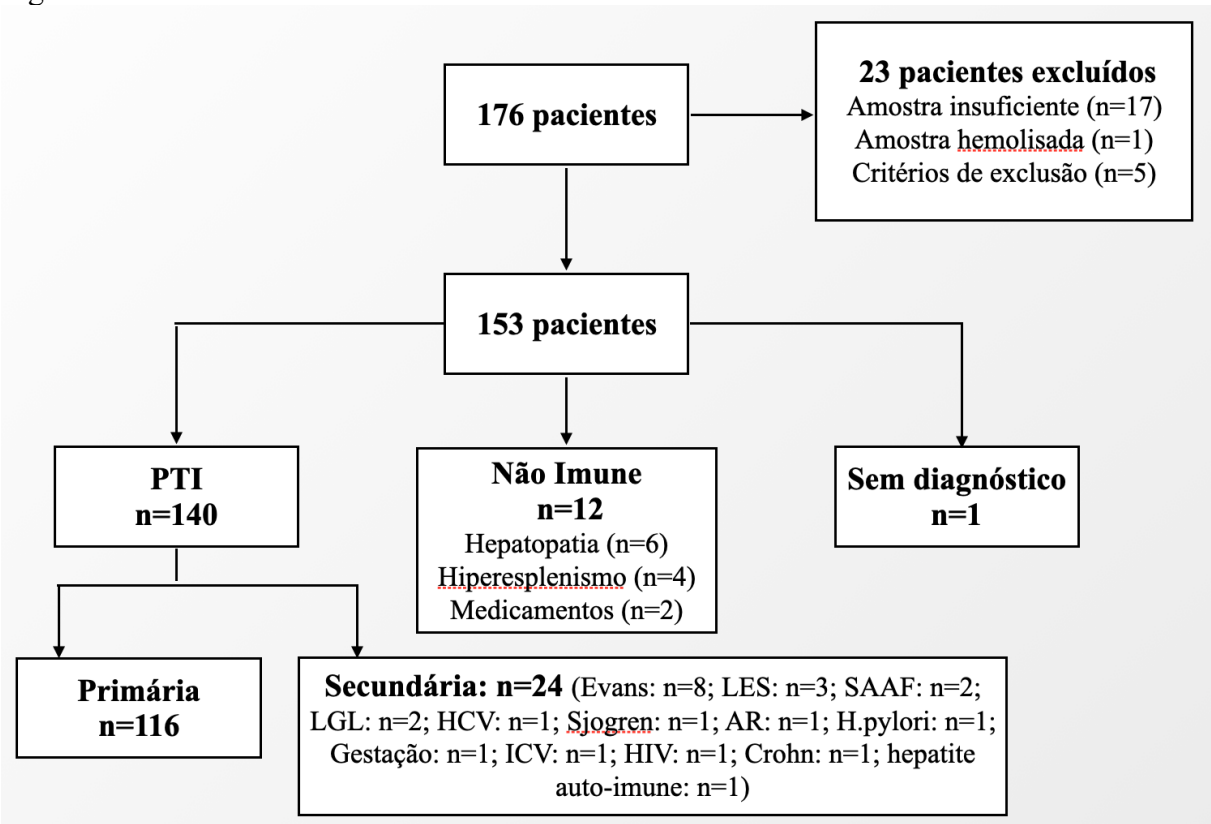
O volume de sangue total coletado inicialmente (30mL) também seguiu as referidas recomendações, porém após coleta das primeiras amostras, observamos que o volume de 20mL parecia ser suficiente para obtenção da quantidade de plaquetas necessárias para realização do teste, além de proporcionar maior conforto aos pacientes e maior agilidade na coleta. Possível interferência no resultado do teste devido ao menor volume de sangue total coletado foi posteriormente analisado, já que para pacientes extremamente plaquetopênicos (contagem abaixo de 5-10 x 10^9/L), mesmo o volume de 30mL pode não ser suficiente para a identificação de autoanticorpos[8,15].

Todas as amostras foram testadas em triplicata com obtenção de uma média dos valores encontrados para definição do resultado do teste.

5.3 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO EM ESTUDO

Durante o período do estudo, 176 pacientes aceitaram participar e tiveram amostras coletadas. Destes, 23 pacientes foram excluídos (Figura 8). Dos 153 pacientes restantes, 116 (75.8%) apresentavam trombocitopenia imune primária, 24 (15.7%) trombocitopenia imune secundária, 12 (7.8%) trombocitopenia não imune e um paciente não apresentava diagnóstico definido. As causas de trombocitopenia imune secundária e não imune estão listadas na Figura 8, a seguir.

Figura 8 – Pacientes incluídos no estudo.



Amostra insuficiente: pacientes com coleta difícil gerando volume de sangue total inferior ao necessário para realização do teste.
SAAF: Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide; LGL: Leucemia de células T-Large Granular; HCV: Vírus da Hepatite C; AR: Artrite Reumatóide; ICV: Imunodeficiência Comum Variável; HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana.
Fonte: a autora.

Como opções terapêuticas para PTI, além da primeira linha com corticoterapia e/ou IgIV, foi também identificado o tratamento com esplenectomia, Rituximabe, Azatioprina, Dapsona, Danazol, Micofenolato de Mofetil, Ciclosporina, Ciclofosfamida, Agonistas de TPO e Hidroxicloroquina (utilizada no serviço como opção terapêutica para pacientes que

apresentam anticorpos antifosfolípides). As características demográficas de cada subgrupo estão descritas na Tabela 2.

Ao estratificar a contagem plaquetária da população total, observamos que 49 pacientes (32.2%) apresentavam contagem abaixo de 50 x 10^9/L na ocasião da coleta (dentre os quais 14 apresentavam contagem menor ou igual a 20 x 10^9/L); 58 (38.1%) apresentavam contagem entre 50 e 100 x 10^9/L e 42 (27.6%) apresentavam contagem acima de 100 x 10^9/L (3 pacientes tiveram contagem indisponível na ocasião da coleta). No grupo de pacientes com PTI, 47 pacientes (33.5%) apresentaram contagem plaquetária menor que 50 x 10^9/L (sendo 14 com contagem menor ou igual a 20); 52 (37.1%) apresentaram contagem ente 50 e 100 x 10^9/L e 39 (27.8%) obtiveram contagem acima de 100 x 10^9/L (2 pacientes não possuíam contagem disponível na ocasião da coleta).

Em relação a linhas de tratamento para PTI utilizadas, 12 pacientes (8.5%) não necessitaram de tratamento; 74 (52.8%) necessitaram de 1 a 2 linhas; 32 (22.8%) utilizaram de 3 a 4 linhas e 22 (15.7%) receberam 5 ou mais linhas.

Tabela 2 – Características clínicas da população estudada

(continua)

	PTI n= 140	**PTI primária n= 116**	**PTI secundária n= 24**	**Trombocitopenia não imune n= 12**
Idade (anos; média; desvio padrão)	46.17 (17.9)	46.32 (18.3)	45.41 (16.5)	60 (19)
Sexo feminino (n; %)	106 (69.7%)	87 (75%)	19 (79.2%)	6 (50%)
Duração de doença (meses; mediana, variação)	71 (23-164)	71 (22-161)	74 (25-202)	67 (21-157)
Contagem plaquetária (x10^9/L) na data da coleta (mediana, variação)	63.5 (40.2-102)	58.7 (29.75-89.5)	87.7 (57.75-131)	72.1; (63.4-87.5)
Menor contagem (x10^9/L) plaquetária registrada (mediana, variação)	9.6 (4-18)	9.9 (4-18)	6.0 (3.55-17)	37.5 (20.5-54)
Pacientes com sangramento grau 2 (n, %)*	24/76 (31.5%)	21/64 (32.8%)	3 (25%)	3 (37.5%)
Patientes que receberam corticoterapia e/ou IgIV (n, %)	126/140 (90%)	105 (90.5%)	21 (87.5%)	4 (33.3%)
Patientes esplenectomizados (n, %)	28/139 (20.1%)	24/115 (20.8%)	4 (16.7%)	1 (8.3%)

Tabela 2 – Características clínicas da população estudada

(conclusão)

	PTI n= 140	**PTI primária n= 116**	**PTI secundária n= 24**	**Trombocitopenia não imune n= 12**
Pacientes que receberam Rituximabe (n, %)	8/138 (5.8%)	7/114 (6.1%)	1 (4.2%)	-
Patientes que receberam Azatioprina (n, %)	52/138 (37.6%)	37/114(32.4%)	15(62.5%)	2(16.6%)
Pacientes que receberam Dapsona (n, %)	51/138(36.9%)	47/114(41.2%)	4(16.6%)	1(8.3%)
Pacientes que receberam Danazol (n, %)	29/138(21%)	23/114(20.1%)	6(25%)	-
Pacientes que receberam Micofenolato de Mofetil (n, %)	22/139(15.8%)	18/115(15.6%)	4(16.6%)	-
Pacientes que receberam Ciclosporina (n, %)	13/138(9.4%)	9/114(7.8%)	4(16.6%)	-
Pacientes que receberam Ciclofosfamida (n, %)	2/138(1.4%)	1/114(0.8%)	1(4.1%)	-
Pacientes que receberam Hidroxicloroquina (n, %)	12/20(60%)	7/13(53%)	5/7(71.4%)	-
Pacientes que receberam Agonistas de TPO (n, %)	7/138(5%)	5/114(4.3)%	2(8.3%)	-
Número de linhas de tratamento prévias (média; desvio padrão)	2.5 (1.89)	2.38 (1.83)	2.75 (1.70)	-

*Dados disponíveis para um subgrupo de pacientes (PTI n=76; PTI primária n= 64; PTI secundária n= 12; não imune n=8)
#Resultados reportados entre os 20 pacientes que apresentavam anticorpos antifosfolípides.
Fonte: a autora.

5.4 PERFORMANCE DO TESTE

Dos 152 pacientes com diagnóstico disponível em prontuário eletrônico, o anticorpo direcionado contra GPIIb-IIIa resultou positivo em 114 pacientes (75%), dentre os quais 108 pacientes com PTI (77%) sendo 89 pacientes com PTI primária e 19 com PTI secundária.

O anticorpo direcionado contra GPIb-IX foi positivo em 82 pacientes com PTI (58.5%), dentre os quais 69 com PTI primária e 13 com PTI secundária. A positividade concomitante para ambos os anticorpos foi encontrada em 81 pacientes com PTI (57.8%) – 68 PTI primária e 13 PTI secundária. Um total de 20 pacientes com PTI primária apresentaram positividade apenas para antiGPIIb-IIIa e um paciente foi positivo apenas para antiGPIb-IX. No grupo de pacientes com PTI secundária, seis pacientes apresentaram positividade apenas para antiGPIIb-IIIa e nenhum apresentou positividade isolada para antiGPIb-IX. Dentre os pacientes com trombocitopenia não imune, seis apresentaram positividade para antiGPIIb-IIIa, sendo que cinco destes foram positivos também para antiGPIb-IX (um paciente foi positivo apenas para antiGPIIb-IIIa). Tais resultados estão representados na Tabela 3. O resultado médio de densidade óptica (OD) dentre os testes realizados está representado na Tabela 4. A diferença de valores de ODs encontrados não foi significativa na comparação entre trombocitopenia não imune e PTIs (p=0.078 para GPIIb-IIIa e p=0.138 para GPIb-IX), assim como entre PTIs primárias ou secundárias (p=0.230 para GPIIb-IIIa e p=0.811 para GPIb-IX).

Tabela 3 – Positividade dos testes de autoanticorpos antiplaquetários

	AntiGPIIb-IIIa	**AntiGPIb-IX**	**AntiGPIIb-IIIa + AntiGPIb-IX**	**AntiGPIIb-IIIa ou AntiGPIb-IX**
PTI Primária	89/116 (76.7%)	69/116 (59.4%)	68/116 (58.6%)	90/116 (77.5%)
PTI Secundária	19/24 (79.1%)	13/24 (54.1%)	13/24 (54.1%)	19/24 (79.1%)
Não imune	6/12 (50%)	5/12 (41.6%)	5/12 (41.6%)	6/12 (50%)

Fonte: a autora.

Tabela 4 – Valores médios de OD obtidos nos testes de autoanticorpos antiplaquetários

	AntiGPIIb-IIIa	**AntiGPIb-IX**
PTI primária	0.637	0.531
PTI secundária	0.789	0.554
Não imune	0.343	0.318

Fonte: a autora.

Quando avaliada a positividade para qualquer um dos autoanticorpos, a sensibilidade do teste foi de 78% (95% CI 70 - 84) e a especificidade de 50% (95% CI 21 - 79). O valor preditivo positivo (VPP) foi de 95% (95% CI 89 – 98) e o valor preditivo negativo (VPN) 16% (95% CI 6 – 32). A área sob a curva foi de 0.693. Mais detalhes do desempenho do teste diagnóstico estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Performance dos testes de detecção de autoanticorpos plaquetários

	AntiGPIIb-IIIa	**AntiGPIb-IX**	**AntiGPIIb-IIIa + AntiGPIb-IX**	**AntiGPIIb-IIIa ou AntiGPIb-IX**
Sensibilidade (95% CI)	77% (69-84)	59% (50-67)	58% (49-66)	78% (70-84)
Especificidade (95% CI)	50% (21-79)	58% (28-85)	58% (28-85)	50% (21-79)
Valor Preditivo Positivo (95% CI)	95% (89-98)	94% (87-98)	94% (87-98)	95% (89-98)
Valor Preditivo Negativo (95% CI)	16% (6-31)	11% (4-21)	11% (4-21)	16% (6-32)
Razão de Verossimilhança Positiva (95% CI)	1.54 (0.87-2.74)	1.41 (0.71-2.79	1.39 (0.70-2.75)	1.56 (0.88-2.76)
Razão de Verossimilhança Negativa (95% CI)	46 (0.24-0.87)	0.71 (0.42-1.19)	0.72 (0.43-1.21)	0.44 (0.23-0.84)
Área sob a curva	0.636	0.584	0.581	0.693

Fonte: a autora.

5.4.1 Associação entre autoanticorpos e características clínicas na população com trombocitopenia imune

5.4.1.1 AntiGPIIb-IIIa

Conforme listado na Tabela 6, critérios como idade, presença de PTI secundária ou sangramento grau 2 na ocasião da coleta não apresentaram correlação estatisticamente significativa com a presença de autoanticorpos contra GPIIb-IIIa.

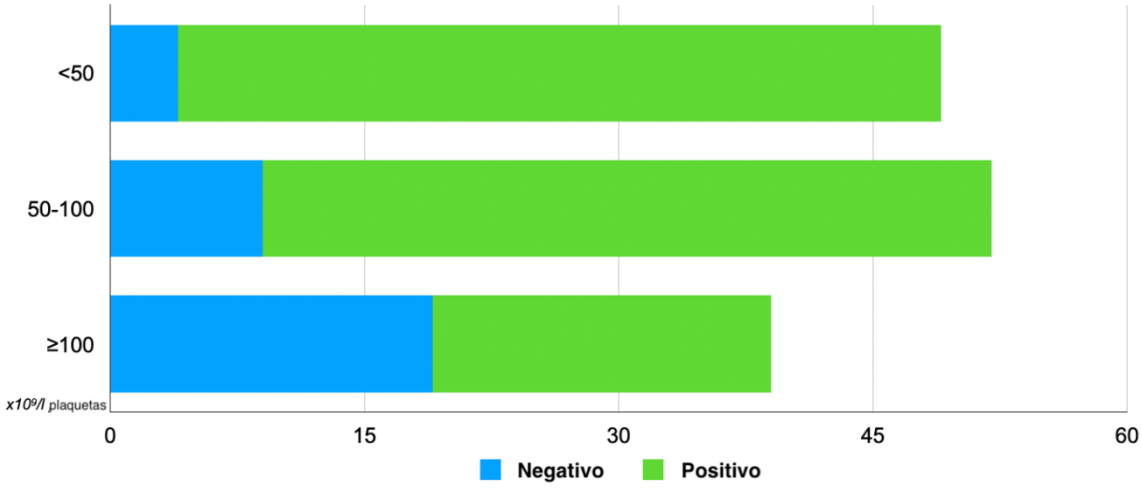
Tabela 6 – Associação da presença de antiGPIIb-IIIa e características clínicas da população estudada

	Teste Negativo (n=32)	Teste Positivo (n=108)	Valor de p
Idade (média, DP)	48.88(19.88)	45.37 (17.37)	0.334
Duração de doença (média, DP)	115.31 (134.96)	106.05 (104.48)	0.682
PTI secundária (%)	5 (15.6%)	19 (17.6%)	1.00
Uso prévio de corticoide (%)	29 (90.6%)	97 (89.8%)	1.00
Esplenectomia prévia (%)	4 (12.5%)	24 (22.2%)	0.339
Rituximabe prévio (%)	2 (6.2%)	6 (5.6%)	1.00
Sangramento grau 2 (%)	9 (39.1%)	15 (27.8%)	0.474
Menor contagem plaquetária registrada ($x10^9$/L) (média, DP)	17.4 (19.8)	13.1 (13.7)	0.168
Contagem plaquetária na ocasião da coleta ($x10^9$/L) (média, DP)	149.1 (102.8)	73.2 (61.8)	**<0.001**
Valor de OD antiGPIIb-IIIa (média, DP)	0.15 (0.06)	0.83 (0.65)	<0.001
Valor de OD antiGPIb-IX (média, DP)	0.18 (0.07)	0.64 (0.53)	<0.001
Número de linhas de tratamento utilizadas (média, DP)	1.91 (1.47)	2.6 (1.87)	**0.055**

Fonte: a autora.

O nadir plaquetário foi de 13.1x10^9/L nos pacientes positivos e 17.4x10^9/L nos pacientes negativos, resultando em um p=0.168. A contagem plaquetária na ocasião da coleta foi 73.2x10^9/L para pacientes com presença de anticorpos comparada com 149.1x10^9/L em pacientes sem autoanticorpos contra GPIIb-IIIa, o que resultou em uma associação com significância estatística (p<0.001) (Gráfico 1). Já o número médio de linhas de tratamento utilizados foi de 2.6 em pacientes anticorpos positivos e 1.91 em pacientes negativos, resultando em um valor de p=0.055.

Gráfico 1 – Associação entre positividade de antiGPIIb-IIIa e contagem plaquetária na ocasião da coleta



Fonte: a autora.

Dos 26 pacientes que apresentaram positividade isolada para antiGPIIb-IIIa, 20 apresentavam PTI primária; seis PTI secundária e um trombocitopenia não imune. Dentre eles, apenas três apresentaram resultado de OD acima da média de seus grupos (sendo eles dois pacientes com PTI primária (OD=1.90 e 0.90) e um com PTI secundária (OD=1.71)). Esse subgrupo de pacientes apresentou nadir plaquetário médio de $15.9x10^9$/L (DP=$16.9x10^9$/L) e contagem plaquetária média na ocasião da coleta de $97.1x10^9$/L (DP=$67.6x10^9$/L). Os pacientes receberam uma média de 2.23 linhas de tratamento para PTI (DP=2.23).

5.4.1.2 AntiGPIb-IX

Conforme listado na Tabela 7, critérios como idade, presença de PTI secundária ou sangramento grau 2 na ocasião da coleta também não apresentaram correlação estatisticamente significativa com a presença de autoanticorpos contra GPIb-IX.

A média de duração de doença nos pacientes com autoanticorpos positivos foi de 106.67 meses (DP=103.55) comparada com 110.28 meses (DP=123.25) no grupo com autoanticorpos negativos (p=0.852). O uso prévio de corticoide, Rituximabe e esplenectomia prévia também não evidenciou correlação estatisticamente significativa (p=0.689; p=1.00 e p=0.184 respectivamente).

Tabela 7 – Associação da presença de antiGPIb-IX e características clínicas da população estudada

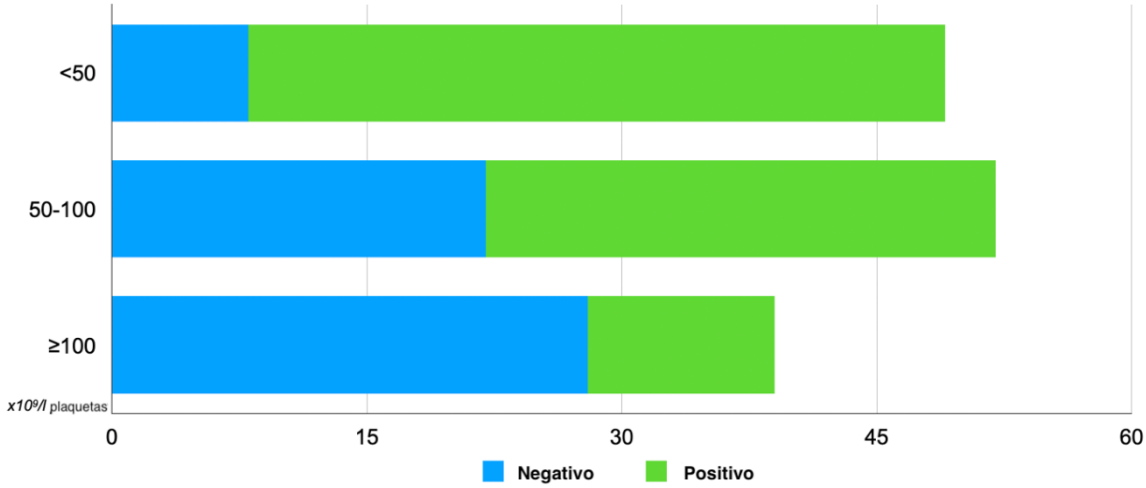
	Teste Negativo (n=58)	Teste Positivo (n=82)	Valor de p
Idade (média, DP)	46.02 (17.85)	46.28 (18.15)	0.932
Duração de doença (média, DP)	110.28 (123.25)	106.67 (103.55)	0.852
PTI secundária (%)	11 (19%)	13 (15.9%)	0.80
Uso prévio de corticoide e/ou IgIV (%)	51 (87.9%)	75 (91.5%)	0.689
Esplenectomia prévia (%)	8 (13.8%)	20 (24.4%)	0.184
Rituximabe prévio (%)	3 (5.2%)	5 (6.1%)	1.00
Sangramento grau 2 (%)	12 (31.6%)	12 (30.8%)	1.00
Menor contagem plaquetária atingida ($x10^9$/L) (média, DP)	16 (18.4)	12.7 (12.8)	0.224
Contagem plaquetária na ocasião da coleta ($x10^9$/L) (média, DP)	132 (95.3)	61.8 (49.7)	**<0.001**
Valor de OD antiGPIIbIIIa (média, DP)	0.30 (0.32)	0.94 (0.68)	<0.001
Valor de OD antiGPIbIX (média, DP)	0.21 (0.07)	0.77 (0.55)	<0.001
Número de linhas de tratamento utilizadas (média, DP)	2.02 (1.78)	2.74 (1.77)	**0.018**

Fonte: a autora.

O nadir plaquetário foi de 12.7x10^9/L nos pacientes positivos e 16x10^9/L nos pacientes negativos, resultando em um p=0.224. A contagem plaquetária na ocasião da coleta foi 61.8x10^9/L para pacientes com presença de anticorpos comparada com 132x10^9/L em pacientes sem autoanticorpos contra GPIb-IX, o que resultou em uma associação com significância estatística (p<0.001) (Gráfico 2). Diferentemente dos achados para anticorpos antiGPIIb-IIIa, o número médio de linhas de tratamento utilizados foi de 2.74 em pacientes anticorpos positivos e 2.02 em pacientes negativos, resultando em uma associação significativa com p=0.018.

O paciente que apresentou positividade isolada para antiGPIb-IX tem diagnóstico de PTI primária, com nadir plaquetário 24x10^9/L, contagem de plaquetas na ocasião da coleta de 82x10^9/L e OD=0.41 (abaixo da média de 0.53 para o grupo de PTI primária). O paciente havia recebido 2 linhas de tratamento para PTI (corticóide e Danazol).

Gráfico 2 – Associação entre positividade de antiGPIb-IX e contagem plaquetária na ocasião da coleta



Fonte: a autora.

5.4.1.3 Análise combinada – positividade para antiGPIIb-IIIa e/ou antiGPIb-IX

Quando analisada a positividade para qualquer um dos dois autoanticorpos (seja a positividade concomitante para ambos ou positividade isolada), conforme representado na Tabela 8, idade, presença de PTI secundária ou sangramento grau 2 na ocasião da coleta seguiram sem apresentar correlação estatisticamente significativa com a presença de autoanticorpos.

O volume de sangue total coletado para realização do teste foi de 30ml em apenas 13 pacientes com PTI (9.2%), porém a coleta desse volume não apresentou diferença estatitisticamente significativa na positividade do teste (p=0.791).

A média de duração de doença nos pacientes com autoanticorpos positivos foi de 106.12 meses (DP=104) comparada com 115.35 meses (DP=137.19) no grupo com autoanticorpos negativos (p=0.686). O uso prévio de corticoide, Rituximabe e esplenectomia prévia também não apresentaram correlação estatisticamente significativa (p=1.00; p=1.00 e p=0.387 respectivamente).

O nadir plaquetário foi de $13.2x10^9$/L nos pacientes positivos e $17.2x10^9$/L nos pacientes negativos, resultando em um p=0.206.

A contagem plaquetária na ocasião da coleta persistiu apresentando correlação significativa na análise combinada (p<0.001), com uma contagem média de 151 x 10^9/L nos pacientes com anticorpos negativos e 73 x 10^9/L para pacientes com anticorpos positivos.

Tabela 8 – Associação da presença de antiGPIIbIIIa e/ou antiGPIbIX e características clínicas da população estudada

	Teste Negativo (n=31)	Teste Positivo (n=109)	Valor de p
Idade (média, DP)	49.61 (19.76)	45.19 (17.39)	0.228
Duração de doença (média, DP)	115.35 (137.19)	106.12 (104)	0.686
PTI secundária (%)	5 (16.1%)	19 (17.4%)	1.00
Uso prévio de corticoide e/ou IgIV (%)	28 (90.3%)	98 (89.9%)	1.00
Esplenectomia prévia (%)	4 (12.9%)	24 (22%)	0.387
Rituximabe prévio (%)	2 (6.5%)	6 (5.5%)	1.00
Sangramento grau 2 (%)	9 (39.1%)	15 (27.8%)	0.474
Menor contagem plaquetária atingida ($x10^9$/L) (média, DP)	17.2 (20.1)	13.2 (13.7)	0.206
Contagem plaquetária na ocasião da coleta ($x10^9$/L) (média, DP)	151.3 (103)	73.3 (61.6)	**<0.001**
Valor de OD antiGPIIbIIIa (média, DP)	0.15 (0.06)	0.82 (0.65)	<0.001
Valor de OD antiGPIbIX (média, DP)	0.17 (0.06)	0.64 (0.52)	<0.001
Número de linhas de tratamento utilizadas (média, DP)	1.90 (1.49)	2.60 (1.86)	0.059

Fonte: a autora.

A média de linhas de tratamento prévio utilizadas pelos pacientes com PTI foi 1.90 (DP=1.49) para os pacientes negativos para autoanticorpos e 2.60 (DP=1.86) para os pacientes positivos, o que resultou em um valor de p=0.059. Ao realizar uma análise multivariada considerando contagem plaquetária na ocasião da coleta e o número de linhas de tratamento utilizadas, a contagem plaquetária na ocasião da coleta manteve a correlação estatisticamente significativa com a positividade dos autoanticorpos, sendo que a contagem <$50x10^9$/L apresentou OR 2.885 (95% CI 1.151-8.294) com p=0.032. O número de linhas de tratamento realizadas resultou em OR 1.259 (95% CI 0.994-1.643) com p=0.070.

A contagem plaquetária na ocasião da coleta não apresentou correlação com presença de sangramento grau 2 (p=0.564).

Tabela 9 – Associação da presença de antiGPIIbIIIa e/ou antiGPIbIX e características clínicas da população estudada.

	Teste Negativo (n=31)	Teste Positivo (n=109)	Valor de p
Idade (média, DP)	49.61 (19.76)	45.19 (17.39)	0.228
Duração de doença (média, DP)	115.35 (137.19)	106.12 (104)	0.686
PTI secundária (%)	5 (16.1%)	19 (17.4%)	1.00
Uso prévio de corticoide e/ou IgIV (%)	28 (90.3%)	98 (89.9%)	1.00
Esplenectomia prévia (%)	4 (12.9%)	24 (22%)	0.387
Rituximabe prévio (%)	2 (6.5%)	6 (5.5%)	1.00
Sangramento grau 2 (%)	9 (39.1%)	15 (27.8%)	0.474
Menor contagem plaquetária atingida ($x10^9$/L) (média, DP)	17.2 (20.1)	13.2 (13.7)	0.206
Contagem plaquetária na ocasião da coleta ($x10^9$/L) (média, DP)	151.3 (103)	73.3 (61.6)	**<0.001**
Valor de OD antiGPIIbIIIa (média, DP)	0.15 (0.06)	0.82 (0.65)	<0.001
Valor de OD antiGPIbIX (média, DP)	0.17 (0.06)	0.64 (0.52)	<0.001
Número de linhas de tratamento utilizadas (média, DP)	1.90 (1.49)	2.60 (1.86)	0.059

Fonte: a autora.

5.4.1.4 PTI Definitiva

Foram identificados um total de 89 pacientes com PTI que apresentaram resposta a corticóide e/ou IgIV e nadir plaquetário abaixo de $20x10^9$/L. Conforme sugerido previamente em literatura, este poderia ser considerado um subgrupo de pacientes que apresentam critérios clínicos mais estritos para a presença de trombocitopenia imune, tendo em vista a contagem plaquetária mais baixa e a resposta aos medicamentos de primeira linha[1,45,90]. Objetivando uma maior homogeneidade na avaliação do teste para pacientes com trombocitopenia imune, procedemos a análise específica deste subgrupo. As características clínicas dessa população quando comparada ao total de pacientes com PTI e pacientes com trombocitopenia não imune estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10 – Características demográficas do subgrupo de pacientes com “PTI definitiva”.

	PTI n= 140	**PTI Definitiva n= 89**	**Trombocitopenia não imune n= 12**
Idade (anos; média; desvio padrão)	46.17 (17.9)	48.35 (17.2)	60 (19)
Sexo feminino (n; %)	106 (69.7%)	69(77.5%)	6 (50%)
Duração de doença (meses; mediana,variação)	71 (23-164)	97 (21-174)	67 (21-157)
Contagem plaquetária ($x10^9$/L) na data da coleta (mediana, variação)	63.5 (40.2-102)	60.8 (33.5-124)	72.1; (63.4-87.5)
Menor contagem ($x10^9$/L) plaquetária registrada (mediana, variação)	9.6 (4-18)	7 (4-13)	37.5 (20.5-54)
Pacientes com sangramento grau 2 (n, %)*	24/76 (31.5%)	15/51 (29.4%)	3 (37.5%)
Patientes que receberam corticoterapia e/ou IgIV (n, %)	126/140 (90%)	89 (100%)	4 (33.3%)
Patientes esplenectomizados (n, %)	28/139 (20.1%)	23/89 (25.8%)	1 (8.3%)
Pacientes que receberam Rituximabe (n, %)	8/138 (5.8%)	2/89(2.24%)	-
Patientes que receberam Azatioprina (n, %)	52/138 (37.6%)	38/89(42.6%)	2(16.6%)
Pacientes que receberam Dapsona (n, %)	51/138(36.9%)	42/89(47.1%)	1(8.3%)
Pacientes que receberam Danazol (n, %)	29/138(21%)	24/89(26.9%)	-
Pacientes que receberam Micofenolato de Mofetil (n, %)	22/139(15.8%)	15/89(16.8%)	-
Pacientes que receberam Ciclosporina (n, %)	13/138(9.4%)	8/89(8.9%)	-
Pacientes que receberam Ciclofosfamida (n, %)	2/138(1.4%)	1/89	-
Pacientes que receberam Hidroxicloroquina (n, %)	12/20(60%)	8/13(61.5%)	-
Pacientes que receberam Agonistas de TPO (n, %)	7/138(5%)	3/89(3.3%)	-
Número de linhas de tratamento prévias (média; desvio padrão)	2.5 (1.89)	2.85 (1.71)	-
OD médio antiGPIIbIIIa	0.67(0.64)	0.75(0.72)	0.34(0.24)
OD médio antiGPIbIX	0.54(0.50)	0.55(0.53)	0.30(0.16)

Fonte: a autora.

5.4.1.5 Performance do teste no subgrupo PTI Definitiva

Na análise do grupo total de pacientes com PTI, preencher critérios para PTI definitiva não apresentou significância estatística para a positividade dos autoanticorpos (20 pacientes apresentaram anticorpos negativos – 66.7% do total de negativos do grupo de PTI – e 69 pacientes apresentaram autoanticorpos positivos – 65.7% do total de positivos do grupo de PTI - p=1.00).

Ao analisar a performance do teste para qualquer um dos dois autoanticorpos no subgrupo de pacientes com PTI definitiva encontramos uma sensibilidade de 77% com especificidade de 26%, VPP de 62% e VPN de 42% com área sob a curva de 0.51.

Quando comparados os valores médios de ODs encontrados no grupo de PTI definitiva com o grupo de PTI não definitiva, houve diferença estatisticamente significante apenas para antiGPIIb-IIIa (0.75 e 0.51 respectivamente; p=0.020). A distribuição dos valores de OD encontrados está ilustrada no Gráfico 3 (A/B), a seguir.

Gráfico 3 – Distribuição dos valores de OD no grupo de pacientes com trombocitopenia não imune, PTI e PTI definitiva.

(Continua)

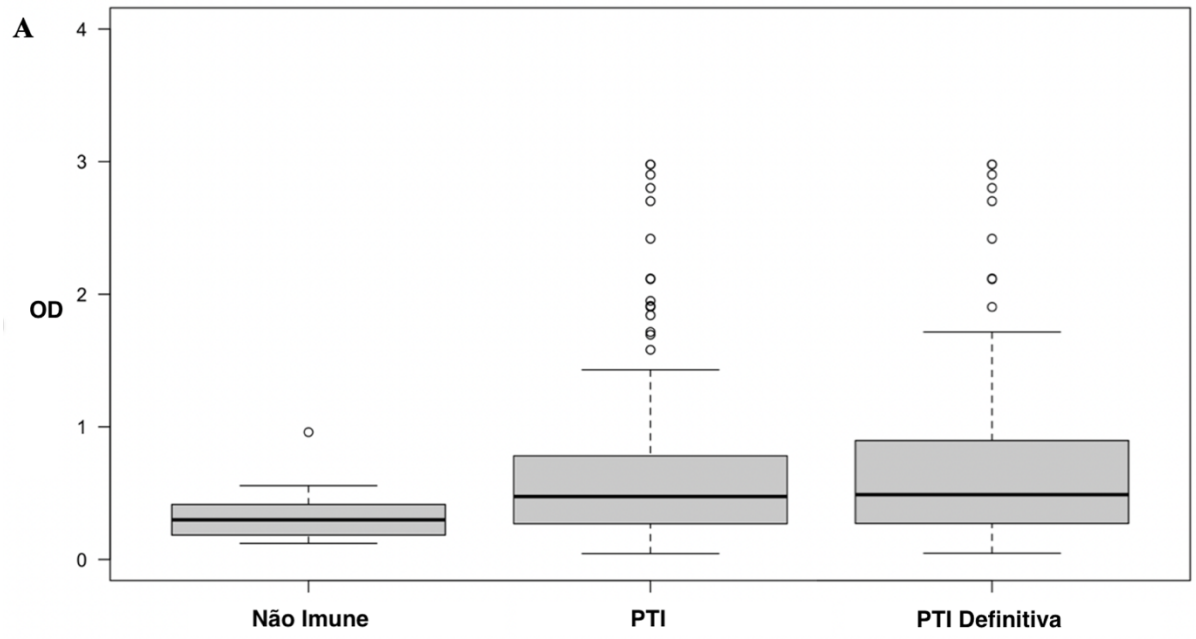
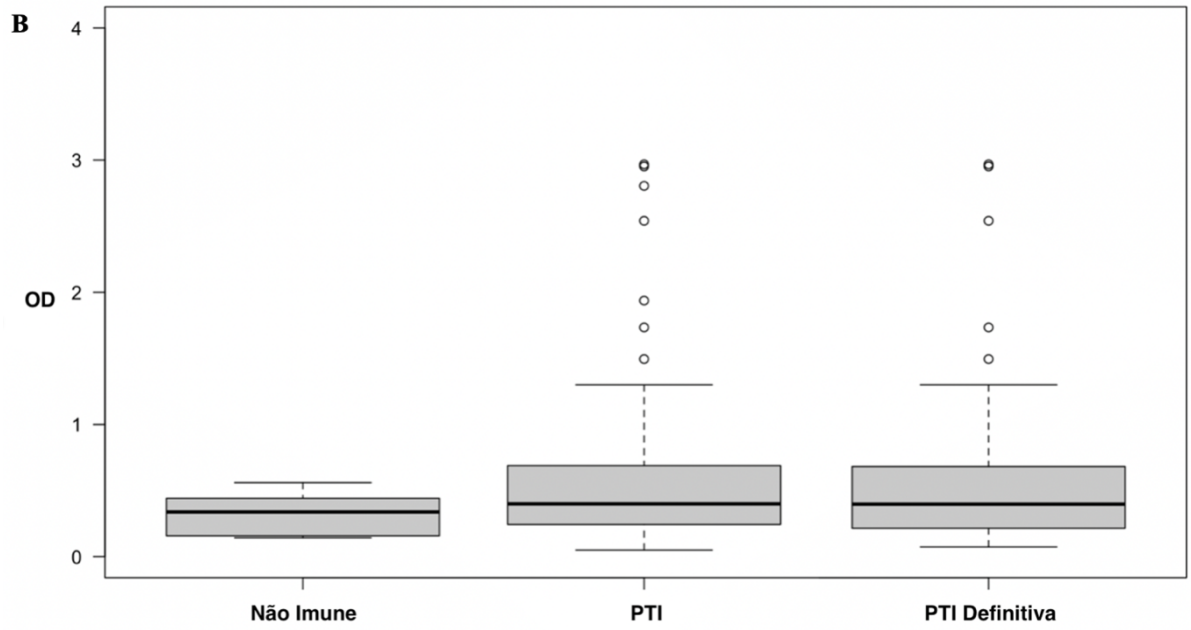


Gráfico 3 – Distribuição dos valores de OD no grupo de pacientes com trombocitopenia não imune, PTI e PTI definitiva.

(Conclusão)



Fonte: a autora.

6 DISCUSSÃO

Ainda atualmente o diagnóstico de PTI segue sendo um desafio por tratar-se de diagnóstico de exclusão. Dados do registro canadense de PTI mostraram que 36 de 295 (12.2%) pacientes inicialmente diagnosticados como PTI tiveram o diagnóstico modificado ao longo do acompanhamento, enquanto 10 de 319 (3.1%) dos pacientes inicialmente diagnosticados como outras causas de trombocitopenia acabaram sendo diagnosticados como PTI, o que resultou no achado de um em cada 7 pacientes com suspeita de PTI primária diagnosticado incorretamente durante o curso de sua doença[91], achados estes corroborados em outros estudos[8,92]. Mesmo para hematologistas experientes, o diagnóstico de PTI muitas vezes pode ocorrer inicialmente de forma equivocada[5,91], o que reforça a necessidade de estudos adicionais para desenvolvimento de um melhor algoritmo diagnóstico que incluam a utilização de testes laboratoriais.

A presença de mecanismo autoimune na fisiopatologia da doença gerou a procura por teste diagnóstico que permitisse a identificação desses autoanticorpos e motivou a utilização de diferentes técnicas de detecção de autoanticorpos antiplaquetários, as quais vem evoluindo ao longo dos anos. Contudo, mesmo em laboratórios com expertise em imunologia plaquetária, esses testes seguem tendo papel incerto na investigação diagnóstica de PTI, tendo em vista sua variada sensibilidade e especificidade entre os diferentes estudos[3,4]. Porcelijn et al.[3] sugere que a variação da performance do teste possa ocorrer por características intrínsecas do teste, como anticorpos monoclonais utilizados, as glicoproteínas que são testadas, o número de plaquetas presentes na amostra testada, o *cutoff* utilizado, assim como diferenças nas populações avaliadas. Buscando minimizar essa variabilidade, uma publicação do Subcomitê de Imunologia Plaquetária do ISTH sugere parâmetros para implementação desses testes[15].

No Brasil e mesmo na América Latina, desconhecemos a existência de laboratório de Imunologia Plaquetária que execute tais testes, de forma a colaborar para essa busca. O serviço de Trombose e Hemostasia da disciplina de Hematologia do HCFMUSP é um serviço de referência com ampla experiência no diagnóstico e tratamento de pacientes trombocitopênicos. A disciplina de Hematologia do HCFMUSP conta também com serviço de reconhecida experiência em ImunoHematologia de Eritrócitos, que vem recentemente padronizando técnicas de detecção de aloanticorpos plaquetários. Dessa forma, através deste trabalho, objetivamos padronizar o teste de detecção de autoanticorpos antiplaquetários e avaliar sua performance quando aplicado em uma parcela da população de pacientes trombocitopênicos acompanhados no serviço de Trombose e Hemostasia.

Dentre as diferentes técnicas de detecção de autoanticorpos já estabelecidas, optamos por utilizar o teste de captura de antígenos conforme executado na McMaster University (Hamilton, Ontário, Canadá). Essa técnica é muito semelhante a mais amplamente utilizada, denominada MAIPA, porém tem como principais diferenciais uma maior facilidade na execução, já que pode ser realizada no decorrer de 4 dias, dentre os quais apenas o último demanda uma maior carga horária; e a possiblidade de armazenamento de amostras, já que diferentemente do MAIPA, no qual a plaqueta íntegra interage com o anticorpo monoclonal, o que requer amostras frescas; utilizamos um lisado plaquetário que pode ser preparado e armazenado para testagem posterior. Dessa forma é possível otimizar a execução do teste para realização em até 30 pacientes em um único momento e as amostras armazenadas podem ser posteriormente testadas para outros alvos antigênicos.

Através da utilização da técnica do PIFT associado a técnica de captura de antígenos com método indireto, foi possível identificar a presença de anticorpo contra GPIIb-IIIa em soro de paciente portador de trombastenia de Glanzmann acompanhado também no serviço de Trombose e Hemostasia, que passou a ser utilizado como controle positivo para o teste direto de antiGPIIb-IIIa, contudo não dispúnhamos de controle positivo para GPIb-IX, o que é dificuldade comum nos laboratórios que já executam a técnica. Após a testagem dos primeiros pacientes, identificamos amostra com alto OD para antiGPIb-IX que passou então a ser utilizado como controle positivo.

Optamos por testar cada amostra de pacientes em triplicata, visando aumentar a confiabilidade do teste e observamos resultados semelhantes entre cada triplicata, o que demonstra a qualidade técnica da execução do teste. Conforme metodologia aprendida no laboratório de Imunologia Plaquetária da McMaster University, durante preparo do lisado plaquetário, quando não ocorre formação de *pellet* após a centrifugação inicial do plasma rico em plaquetas, não realizamos contagem plaquetária para ajuste de volume de detergente a ser utilizado e apenas adicionamos quantidade padrão de detergente de lise que permite obtenção de volume mínimo para realização do teste. O objetivo dessa metodologia é minimizar a perda de plaquetas no preparo do lisado em pacientes já com plaquetopenia importante na ocasião da coleta, visando evitar testes falso negativos decorrentes de ausência de plaquetas suficientes para testagem. A execução dessa técnica também se mostrou eficaz, já que mesmo pacientes com contagens plaquetárias menores que $5x10^9$/L com diagnóstico prévio de PTI tiveram autoanticorpos identificados. Da mesma forma, o volume de sangue total coletado de pacientes foi reduzido de 30ml para 20ml, sem que isso tenha acarretado testes negativos nos pacientes

com plaquetopenia importante. A alteração no volume coletado permite maior conforto para o paciente e agilidade na ocasião da coleta.

Ao estabelecer nosso próprio *cutoff* com amostras de doadores saudáveis não plaquetopênicos, conseguimos padronizar o teste conforme a realidade local. Optamos por utilizar 2 desvios padrão acrescidos da média, de forma que nosso *cutoff* ficou muito próximo do valor padronizado em outros centros (como por exemplo 0.21 na McMaster University). O estudo prévio de Vrbensky et al.[4] mostrou que mesmo o uso de 3 desvios padrão não tornou a técnica mais apurada. Já outra publicação recente sugere a utilização de OD> ou igual 2 vezes a mediana dos controles negativos[5]. Definimos *cutoffs* específicos para cada GP testada, diferentemente de centros que utilizam o mesmo *cutoff* para ambas as GPs.

Publicações prévias sugerem que o teste de detecção de autoanticorpos apresenta boa especificidade, permitindo confirmar PTI diante do teste positivo, porém sensibilidade muito variável mesmo quando utilizadas técnicas comparáveis[3], o que não permite excluir PTI diante de um teste negativo. A razão pela qual aproximadamente 50% dos pacientes não têm autoanticorpos detectáveis pode estar relacionada a heterogeneidade de alvos antigênicos e baixa avidez dos anticorpos plaquetários[4,69,75]. Em nosso estudo, a sensibilidade foi de 78%, estando de acordo com a literatura e sendo até mais alto do que a publicada na revisão sistemática de Vrbensky et al.[4] (53%). Contudo obtivemos uma baixa especificidade do teste validado (50%), provavelmente em decorrência do tamanho da amostra do grupo controle, que foi de apenas 12 pacientes, dentre os quais dois receberam tratamento com imunossupressão devido a suspeita de componente imune associado ao quadro, mais uma vez ressaltando a dificuldade em obter maior clareza da etiologia da plaquetopenia nesse grupo de pacientes. Por tratar-se de estudo realizado em único centro, com avaliação de população proveniente de serviço de referência em PTI, a maior parte dos pacientes em acompanhamento por trombocitopenia são mantidos no serviço pela impossibilidade de descartar a presença componente imune envolvido na etiologia da plaquetopenia, o que reforça ainda mais a ideia de que um teste com elevada sensibilidade que resulte negativo nos possibilitaria uma maior segurança para descartar o componente imune.

É possível também que existam características epidemiológicas diferentes entre as populações testadas, já que não dispomos de dados relativos as características específicas da população brasileira com PTI, assim como não há estudo realizando comparação entre características de populações em diferentes localizações geográficas.

Em publicação recente, Al-Samkari et al.[5] mostraram uma relação preditiva entre o número de autoanticorpos antiplaquetários positivos e a severidade da doença, utilizando os

critérios definidos pelo *guideline* ASH 2011[6] de severidade (pacientes que apresentam sangramentos clinicamente relevantes), e sugerindo que pacientes com PTI não severa tendem a não ter autoanticorpos contra glicoproteínas plaquetárias. Contudo sabemos que os critérios para definição de gravidade em PTI são imprecisos e conforme mencionado anteriormente, mesmo a definição de um sangramento clinicamente relevante é tópico em discussão[46]. Em nosso estudo, devido a dificuldade em estabelecer a severidade da doença conforme os critérios mencionados e tendo em vista o baixo grau de confiabilidade das informações coletadas de prontuários de forma retrospectiva, optamos por avaliar parâmetros como o nadir de contagem de plaquetas, o número de tratamentos para PTI realizados e a contagem de plaquetas no momento do teste. Encontramos uma correlação estatisticamente significativa entre a positividade dos autoanticorpos e a contagem de plaquetas no momento da coleta (OR 2.88; IC 95% 1.15 – 8.29; p=0.03) sugerindo doença ativa no momento do exame. Anteriormente, McMillan et al.[93] já haviam descrito uma associação entre gravidade da doença e positividade de autoanticorpos, classificando a gravidade com base em suas próprias categorias, que consideravam contagem de plaquetas e tratamentos anteriores. Outro estudo[87] também descreveu que pacientes positivos para anticorpos tinham maior probabilidade de piora clínica do que pacientes negativos para anticorpos.

Estudos que avaliam o impacto da positividade destes testes na resposta ao tratamento instituído para PTI ainda são limitados. Há evidência sugestiva de que a presença isolada de antiGPIb-IX poderia predizer resposta a corticóide ou IgIV[11], porém esse achado não se confirmou em estudos subsequentes[5,12]. Em nosso estudo, apenas um paciente apresentou anticorpo apenas contra GPIb-IX. Outros aspectos relacionados a correlação entre a presença de autoanticorpos e resposta a tratamentos, como a ausência de resposta a Rituximabe em pacientes com PTI sem autoanticorpos antiplaquetários detectáveis[9], não foram avaliados em nosso coorte tendo em vista o pequeno número de pacientes expostos a Rituximabe (n=8). A possibilidade de associação entre anticorpos antiGPIIb-IIIa com sangramentos mais graves[10] não foi demonstrada em nossa coorte (p=0.474). A possibilidade de menor resposta a IgIV e esplenectomia devido a interferência no mecanismo do ácido siálico e destruição plaquetária pelos hepatócitos em pacientes com anticorpos antiGPIb-IX[12] também não foi avaliada, já que não tínhamos como objetivo desse estudo reportar resposta às linhas de tratamento utilizadas, o que poderá ser contemplado em estudos futuros e de forma mais precisa através de estudos longitudinais. Convém também ressaltar que nossa coorte é heterogênea em termos de duração de doença e momento de coleta da amostra para teste. É importante considerar que o fato de alguns pacientes estarem em terapia ativa no momento do exame pode interferir no resultado

do teste, pois os glicocorticóides e outros imunossupressores demonstraram reduzir os níveis de autoanticorpos plaquetários[94,95]. Esse mesmo estudo previamente citado de Al-Samkari et al.[5] também demonstrou que o teste pode ser utilizado de forma confiável para confirmar a remissão clínica da doença, informação que também poderá ser corroborada em futuros estudos prospectivos.

Na maioria dos estudos 60-80% dos anticorpos reagem contra GPIIb-IIIa e 50% contra GPIb-IX. A maioria dos pacientes tem os dois, mas 10-40% reage contra apenas um autoanticorpo[3]. Nosso estudo mostrou resultados semelhantes, com 75% dos pacientes reagindo contra GPIIb-IIIa, 58.5% contra GPIb-IX e 17.7% contra apenas um anticorpo.

A distribuição dos valores de OD também foi tema de outra publicação desta autora em uma coorte diferente de pacientes mostrando uma distribuição assimétrica dos valores, pois a maioria dos pacientes com teste de autoanticorpo antiplaquetário positivo apresentou valores de OD baixos[7], semelhante aos achados desta coorte. No entanto, a avaliação do subgrupo de pacientes que apresentava OD mais elevado proporcionou uma melhora na especificidade do teste, as custas de piora importante na sensibilidade.

Nessa mesma publicação, foi também avaliada a performance do teste em uma subpopulação de pacientes que preenchia critérios mais estritos para diagnóstico clínico de PTI (nadir de contagem plaquetária menor que $20x10^9$/L e resposta prévia a corticóide e/ou IgIV, a exemplo do sugerido em estudos prévios[45,90]). Considerando que a heterogeneidade da população estudada é um dos motivos apresentados na literatura para um desempenho inadequado dos testes, procedemos a mesma análise nessa população, porém, apesar de não ter ocorrido alteração na sensibilidade do teste, a especificidade mostrou-se ainda mais reduzida.

Não pesquisamos outros alvos de anticorpos como GPIa-IIa, GPIV e GPV que possam ter relevância clínica na PTI, porém consideramos que isso teria pouco impacto em nossos resultados, já que autoanticorpos GPIa-IIa e GPIV parecem estar presentes apenas quando anticorpos contra GPIIb-IIIa e/ou GPIb-IX também são identificados[5,8]; já a GPV poderia ter mais significado por ter sido ser identificada isoladamente em cerca de 2.9-24% dos pacientes[3,21].

Optamos por não utilizar um cálculo de tamanho amostral pré-determinado e seguimos com uma amostra por conveniência, a qual foi limitada pelo início da pandemia do COVID19, quando os atendimentos ambulatoriais presenciais ficaram restritos a casos selecionados, o que motivou a interrupção de nossa coleta. Da mesma forma, a aquisição e o recebimento de reagentes foram diretamente afetados, causando atrasos no andamento do projeto. Não acreditamos que a conveniência da amostra represente um viés de seleção no presente estudo.

Como outras limitações do nosso estudo, os critérios de inclusão utilizados limitaram a população a pacientes com plaquetopenia isolada, excluindo pacientes com outras citopenias, porém reconhecemos que esses critérios podem ter reduzido o acesso a pacientes com trombocitopenia de causa não imune e consequentemente o grupo controle. Por tratar-se de centro de referência terciário, pode ocorrer um viés de seleção de pacientes, recebendo com mais frequência pacientes com trombocitopenia grave e que muitas vezes já iniciaram tratamento de primeira linha para PTI no momento do primeiro atendimento ambulatorial em outro local.

Este é um estudo retrospectivo e transversal, de forma que a positividade dos autoanticorpos não foi avaliada de forma prospectiva. *Epitope spreading*, definido como aumento no número de autoanticorpos positivos com o passar do tempo e presente em até 35% dos pacientes com PTI[5] não foi passível de avaliação, pois não fizemos testes de forma longitudinal, o que também não permite obter conclusões acerca da relação entre remissão de doença e negatividade dos testes de detecção de anticorpos.

A avaliação dos desfechos clínicos foi baseada na análise retrospectiva de dados de prontuário, que por vezes contém informações faltantes ou incompletas. Por este mesmo motivo, avaliamos manifestações hemorrágicas apenas através do questionário respondido no momento da coleta de dados, elaborado com base em ferramenta desenvolvida especificamente para avaliação de sangramentos em pacientes com PTI[54] e já utilizado em outros estudos prévios[91]. Contudo, em registros de pacientes com PTI, esse questionário costuma ser aplicado diretamente pelo pesquisador, visando esclarecer eventuais dúvidas dos pacientes nas respostas e evitar classificação inadequada dos sangramentos, além de incluir também a avaliação realizada pelo médico no momento do exame físico do paciente. Em nossa coorte, devido a limitação de disponibilidade dos pesquisadores, optamos por seguir com o questionário auto-aplicado, o que pode ter ocasionado em erros na classificação de manifestações hemorrágicas por parte dos pacientes.

A partir deste estudo inicial que permitiu a padronização de testes de detecção de autoanticorpos antiplaquetários seguindo as recomendações sugeridas por experts e com boa performance, pretendemos estabelecer um laboratório de referência em Imunologia Plaquetária que nos permita contribuir cientificamente na área. Futuramente poderemos desenvolver estudos prospectivos com maior número de pacientes no grupo controle para melhor avaliação da especificidade do teste, assim como observar a evolução dos pacientes e suas respostas aos tratamentos empregados, visando desenvolver algoritmo diagnóstico e terapêutico para PTI. Poderemos também acrescentar novos alvos de antígenos plaquetários em nossos testes e

realizar estudos adicionais para validação do método indireto, cujo papel segue sendo investigado na literatura.

7 CONCLUSÕES

a) Das recomendações do Subcomitê de Imunologia Plaquetária do ISTH: 1) coleta em ACD; 2) coleta de pelo menos 30ml; 3) método empregado; 4) utilização de anticorpos contra GPIIb-IIIa e GPIb-IX; 5) processamento centralizado e realização do teste em um único laboratório: preenchemos todos os critérios, exceto o volume de amostra que foi majoritariamente de 20ml por de agilidade na coleta e conforto para o paciente, porém sem prejuízo nos resultados em análise posterior;
b) o teste padronizado mostrou sensibilidade satisfatória (78%), porém baixa especificidade (50%), provavelmente decorrente do baixo número de pacientes no grupo controle;
c) a performance do teste em subgrupo de pacientes com critérios clínicos mais estritos para diagnóstico de PTI seguiu apresentando sensibilidade aceitável, porém especificidade ainda menor;
d) mostramos uma associação entre a positividade de anticorpos e a contagem de plaquetas no momento do teste e uma possível correlação com o número de tratamentos necessários para PTI, de modo que, como já sugerido por outros autores, o teste de detecção de autoanticorpos plaquetários poderia fazer parte de um algoritmo que permite maior precisão de diagnóstico e tratamento para pacientes com PTI.

REFERÊNCIAS

1. Provan D, et al. Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. Blood Adv. 2019 Nov;3(22):3780-817. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000812.

2. Neunert C, et al. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. Blood Adv. 2019 Dec;3(23):3829-66. Erratum: Blood Adv. 2020;4(2):252. doi: 10.1182/bloodadvances.2019001380.

3. Porcelijn L, et al. Evolution and Utility of Antiplatelet Autoantibody Testing in Patients with Immune Thrombocytopenia. Transfus Med Rev. 2020 Oct;34(4):258-69. doi: 10.1016/j.tmrv.2020.09.003.

4. Vrbensky JR, et al. The sensitivity and specificity of platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis of a diagnostic test. J Thromb Haemost. 2019 May;17(5):787-794. doi: 10.1111/jth.14419.

5. Al-Samkari H, et al. A modern reassessment of glycoprotein-specific direct platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia. Blood Adv. 2020 Jan;4(1):9-18. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000868.

6. Neunert C, et al. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. Blood. 2011 Apr;117(16):4190-207. doi: 10.1182/blood-2010-08-302984.

7. Gabe C, et al. Performance characteristics of platelet autoantibody testing for the diagnosis of immune thrombocytopenia using strict clinical criteria. Br J Haematol. 2021 Jul;194(2):439-43. doi: 10.1111/bjh.17566.

8. Porcelijn L, et al. Detection of platelet autoantibodies to identify immune thrombocytopenia: state of the art. Br J Haematol. 2018 Aug;182(3):423-426. doi: 10.1111/bjh.15404.

9. Porcelijn L, et al. Lack of detectable platelet autoantibodies is correlated with nonresponsiveness to rituximab treatment in ITP patients. Blood. 2017 Jun;129(25):3389-91. doi: 10.1182/blood-2016-11-751719.

10. Grimaldi D, et al. Antiplatelet antibodies detected by the MAIPA assay in newly diagnosed immune thrombocytopenia are associated with chronic outcome and higher risk of bleeding. Ann Hematol. 2014 Feb;93(2):309-15. doi: 10.1007/s00277-013-1855-5.

11. Peng J, et al. Association of autoantibody specificity and response to intravenous immunoglobulin G therapy in immune thrombocytopenia: a multicenter cohort study. J Thromb Haemost. 2014 Apr;12(4):497-504. doi: 10.1111/jth.12524.

12. Rogier T, et al. Antiplatelet Antibodies Do Not Predict the Response to Intravenous Immunoglobulins during Immune Thrombocytopenia. J Clin Med. 2020 Jun;9(6):1998. doi: 10.3390/jcm9061998.

13. Kelton JG. The serological investigation of patients with autoimmune thrombocytopenia. Thromb Haemost. 1995 Jul;74(1):228-33. doi: 10.1055/s-0038-1642682.

14. Warner MN, et al. A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol. 1999 Mar;104(3):442-7. doi: 10.1046/j.1365-2141.1999.01218.x.

15. Arnold DM, Santoso S, Greinacher A. Recommendations for the implementation of platelet autoantibody testing in clinical trials of immune thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2012 Apr;10(4):695-7. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04664.x.

16. Rodgers GM. Thrombocytopenia: pathophysiology and classification. In: Greer JP, et al., editors. Wintrobe's Clinical Hematology. 13th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. p. 1058-60.

17. Arnold DM, et al. Diseases of Platelet Number: Immune Thrombocytopenia, Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia, and Posttransfusion Purpura. In: Hoffman R, et al., editors. New York: Elsevier; 2018. p. 1944-54. doi: 10.1016/B978-0-323-35762-3.00131-1.

18. Cines DB, et al. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. Blood. 2009 Jun;113(26):6511-21. doi: 10.1182/blood-2009-01-129155.

19. Harrington WJ, et al. Immunologic mechanisms in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura. Ann Intern Med. 1953 Mar;38(3):433-69. doi: 10.7326/0003-4819-38-3-433.

20. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. Vox Sang. 2014 Feb;106(2):93-102. doi: 10.1111/vox.12085.

21. Vollenberg R, et al. Glycoprotein V is a relevant immune target in patients with immune thrombocytopenia. Haematologica. 2019 Jun;104(6):1237-43. doi: 10.3324/haematol.2018.211086.

22. Kuwana M, Okazaki Y, Ikeda Y. Splenic macrophages maintain the anti-platelet autoimmune response via uptake of opsonized platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. J Thromb Haemost. 2009 Feb;7(2):322-9. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03161.x.

23. Swinkels M, et al. Emerging Concepts in Immune Thrombocytopenia. Front Immunol. 2018 Apr;9:880. doi: 10.3389/fimmu.2018.00880.

24. Najaoui A, et al. Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). Eur J Haematol. 2012 Feb;88(2):167-74. doi: 10.1111/j.1600-0609.2011.01718.x.

25. Tsubakio T, et al. Complement activation in vitro by antiplatelet antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura. Br J Haematol. 1986 Jun;63(2):293-300. doi: 10.1111/j.1365-2141.1986.tb05552.x.

26. Peerschke EIB, et al. Complement activation on platelets correlates with a decrease in circulating immature platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. Br J Haematol. 2010 Feb;148(4):638-45. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07995.x.

27. Liel MS, Recht M, Calverley DC. Thrombocytopenia Caused by Immunologic Platelet Destruction. In: Greer JP, et al., editors. Wintrobe's Clinical Hematology. 13th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. p. 1061-76.

28. Stoll D, et al. Platelet Kinetics in Patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura and Moderate Thrombocytopenia. Blood. 1985 Mar;65(3):584-8. doi: 10.1182/blood.V65.3.584.584.

29. Kuter DJ, et al. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomized controlled trial. Lancet. 2008 Feb;371(9610):395-403. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60203-2.

30. Cheng G, et al. Eltrombopag for management of chronic immune thrombocytopenia (RAISE): a 6-month, randomized, phase 3 study. Lancet. 2011 Jan;377(9763):393-402. doi: 10.1016/s0140-6736(10)60959-2.

31. McMillan R, et al. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. Blood. 2004 Feb;103(4):1364-9. doi: 10.1182/blood-2003-08-2672.

32. Yang L, et al. Contributions of TRAIL-mediated megakaryocyte apoptosis to impaired megakaryocyte and platelet production in immune thrombocytopenia. Blood. 2010 Nov;116(20):4307-16. doi: 10.1182/blood-2010-02-267435.

33. Chang M, et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. Blood. 2003 Aug;102(3):887-95. doi: 10.1182/blood-2002-05-1475.

34. Shrestha S, et al. Platelet autoantibodies in the bone marrow of patients with immune thrombocytopenia. Blood Adv. 2020 Jul;4(13):2962-6. doi: 10.1182/bloodadvances.2020001846.

35. Vrbensky JR, et al. T cell–mediated autoimmunity in immune thrombocytopenia. Eur J Haematol. 2022 Jan;108(1):18-27. doi: 10.1111/ejh.13705.

36. Zhao C, et al. Increased cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity predominant in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura without platelet autoantibodies. Haematologica. 2008 Sep;93(9):1428-30. doi: 10.3324/haematol.12889.

37. Zhang F, et al. Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Eur J Haematol. 2006 May;76(5):427-31. doi: 10.1111/j.1600-0609.2005.00622.x.

38. Vrbensky JR, et al. Increased cytotoxic potential of CD8 + T cells in immune thrombocytopenia. British Journal of Hematology. 2008;188(5):e72-e76. Br J Haematol. 2020 Mar;188(5):e72-6. doi: 10.1111/bjh.16334.

39. Li J, et al. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. Nat Commun. 2015 Jul;6:7737. doi: 10.1038/ncomms8737.

40. Marini I, et al. Autoantibody-mediated desialylation impairs human thrombopoiesis and platelet lifespan. Haematologica. 2021 Jan;106(1):196-207. doi: 10.3324/haematol.2019.236117.

41. Abrahamson PE, et al. The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura among adults: A population-based study and literature review. Eur J Haematol. 2009 Aug;83(2):83-9. doi: 10.1111/j.1600-0609.2009.01247.x.

42. Schoonen WM, et al. Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the general practice research database. Br J Haematol. 2009 Apr;145(2):235-44. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07615.x.

43. Segal JB, Powe NR. Prevalence of Immune Thrombocytopenia: Analyses of Administrative Data. J Thromb Haemost. 2006 Nov;4(11):2377-83. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.02147.x.

44. Terrell DR, et al. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports. Am J Hematol. 2010 Mar;85(3):174-80. doi: 10.1002/ajh.21616.

45. Rodeghiero F, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. Blood. 2009 Mar;113(11):2386-93. doi: 10.1182/blood-2008-07-162503.

46. Sirotich E, et al. Definition of a critical bleed in patients with immune thrombocytopenia: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Immunology. J Thromb Haemost. 2021 Aug;19(8):2082-8. doi: 10.1111/jth.15368.

47. Neunert C, et al. Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: A systematic review. J Thromb Haemost. 2015 Mar;13(3):457-64. doi: 10.1111/jth.12813.

48. Piel-Julian ML, et al. Risk factors for bleeding, including platelet count threshold, in newly diagnosed immune thrombocytopenia adults. J Thromb Haemost. 2018 Sep;16(9):1830-42. doi: 10.1111/jth.14227.

49. Mithoowani S, et al. Management of major bleeds in patients with immune thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2020 Jul;18(7):1783-90. doi: 10.1111/jth.14809.

50. Frederiksen H, Maegbaek ML, Nørgaard M. Twenty-year mortality of adult patients with primary immune thrombocytopenia: a Danish population-based cohort study. Br J Haematol. 2014 Jul;166(2):260-7. doi: 10.1111/bjh.12869.

51. Portielje JEA, et al. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood. 2001 May;97(9):2549-54. doi: 10.1182/blood.V97.9.2549.

52. Cooper N, et al. Immune thrombocytopenia (ITP) World Impact Survey (iWISh): Patient and physician perceptions of diagnosis, signs and symptoms, and treatment. Am J Hematol. 2021 Feb;96(2):188-98. doi: 10.1002/ajh.26045.

53. Khellaf M, et al. Assessment of a therapeutic strategy for adults with severe autoimmune thrombocytopenic purpura based on a bleeding score rather than platelet count. Haematologica. 2005 Jun;90(6):829-32.

54. Page LK, et al. The immune thrombocytopenic purpura (ITP) bleeding score: assessment of bleeding in patients with ITP. Br J Haematol. 2007 Jul;138(2):245-8. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06635.x.

55. Kuter DJ, et al. Health-related quality of life in nonsplenectomized immune thrombocytopenia patients receiving romiplostim or medical standard of care. Am J Hematol. 2012 May;87(5):558-61. doi: 10.1002/ajh.23163.

56. Pizzuto J, Ambriz R. Therapeutic experience on 934 adults with idiopathic thrombocytopenic purpura: Multicentric Trial of the Cooperative Latin American group on Hemostasis and Thrombosis. Blood. 1984 Dec;64(6):1179-83. doi: 10.1182/blood.V64.6.1179.1179.

57. Chaturvedi S, Arnold DM, McCrae KR. Splenectomy for immune thrombocytopenia: down but not out. Blood. 2018 Mar;131(11):1172-82. doi: 10.1182/blood-2017-09-742353.

58. Kojouri K, et al. Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications. Blood. 2004 Nov;104(9):2623-34. doi: 10.1182/blood-2004-03-1168.

59. Arnold DM, et al. Systematic Review: Efficacy and Safety of Rituximab for Adults with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. Ann Intern Med. 2007 Jan;146(1):25-33. doi: 10.7326/0003-4819-146-1-200701020-00006.

60. Lucchini E, Zaja F, Bussel J. Rituximab in the treatment of immune thrombocytopenia: what is the role of this agent in 2019? Haematologica. 2019 Jun;104(6):1124-35. doi: 10.3324/haematol.2019.218883.

61. Patel VL, et al. Outcomes 5 years after response to rituximab therapy in children and adults with immune thrombocytopenia. Blood. 2012 Jun;119(25):5989-95. doi: 10.1182/blood-2011-11-393975.

62. Kuter DJ, et al. Romiplostim or Standard of Care in Patients with Immune Thrombocytopenia. N Engl J Med. 2010 Nov;363(20):1889-99. doi: 10.1056/NEJMoa1002625.

63. Ghadaki B, et al. Sustained remissions of immune thrombocytopenia associated with the use of thrombopoietin receptor agonists. Transfusion. 2013 Nov;53(11):2807-12. doi: 10.1111/trf.12139.

64. Bussel J, et al. Fostamatinib for the treatment of adult persistent and chronic immune thrombocytopenia: Results of two phase 3, randomized, placebo-controlled trials. Am J Hematol. 2018 Jul;93(7):921-30. doi: 10.1002/ajh.25125.

65. Bussel JB, et al. Long-term fostamatinib treatment of adults with immune thrombocytopenia during the phase 3 clinical trial program. Am J Hematol. 2019 May;94(5):546-53. doi: 10.1002/ajh.25444.

66. Bradbury CA, et al. Mycophenolate Mofetil for First-Line Treatment of Immune Thrombocytopenia. N Engl J Med. 2021 Sep;385(10):885-95. doi: 10.1056/NEJMoa2100596.

67. Kiefel V. Platelet antibodies in immune thrombocytopenia and related conditions. J Laboratory Medicine. 2020;44(5):273-84. doi: 10.1515/labmed-2020-0012.

68. Warner M, Kelton JG. Laboratory investigation of immune thrombocytopenia. J Clin Pathol. 1997 Jan;50(1):5-12. doi: 10.1136/jcp.50.1.5.

69. Porcelijn L, Huiskes E, de Haas M. Progress and development of platelet antibody detection. Transfus Apher Sci. 2020 Feb;59(1):102705. doi: 10.1016/j.transci.2019.102705.

70. Kelton JG, et al. A prospective comparison of four techniques for measuring platelet-associated IgG. Br J Haematol. 1989 Jan;71(1):97-105. doi: 10.1111/j.1365-2141.1989.tb06281.x.

71. Porcelijn L, et al. The diagnostic value of thrombopoietin level measurements in thrombocytopenia. Thromb Haemost. 1998 Jun;79(6):1101-1105. doi: 10.1055/s-0037-1615023.

72. von dem Borne, et al. A Simple Immunofluorescence Test for the Detection of Platelet Antibodies. Br J Haematol. 1978 Jun;39(2):195-207. doi: 10.1111/j.1365-2141.1978.tb01089.x.

73. Hagenström H, et al. Quantification of Platelet-Associated IgG for Differential Diagnosis of Patients with Thrombocytopenia. Thromb Haemost. 2000 Nov;84(5):779-83. doi: 10.1055/s-0037-1614115.

74. Helmerhorst FM, et al. Interference of IgG, IgG Aggregates and Immune Complexes in Tests for Platelet Autoantibodies. Br J Haematol. 1983 Nov;55(3):533-45. doi: 10.1111/j.1365-2141.1983.tb02168.x.

75. Matsuhashi M, Tsuno NH. Laboratory testing for the diagnosis of immune-mediated thrombocytopenia. An Blood. 2018 Sept;3:41. doi: 10.21037/aob.2018.09.02.

76. van Leeuwen EF, et al. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. Blood. 1982 Jan;59(1):23-6. doi: 10.1182/blood.V59.1.23.23.

77. Arnold DM, et al. Management of immune-mediated thrombocytopenia. In: Simon TL, et al., editors. Rossi's Principles of Transfusion Medicine. New York: John Wiley & Sons; 2016. p. 245-264. doi: 10.1002/9781119013020.ch21.

78. Kelton JG, Vrbensky JR, Arnold DM. How do we diagnose immune thrombocytopenia in 2018?. Hematology. 2018 Nov;2018(1):561-7. doi: 10.1182/asheducation-2018.1.561.

79. Tomiyama Y, et al. Demonstration of platelet antigens that bind platelet-associated autoantibodies in chronic ITP by direct immunoprecipitation procedure. Br J Haematol. 1990 May;75(1):92-8. doi: 10.1111/j.1365-2141.1990.tb02622.x.

80. McMillan R. Clinical Role of Antiplatelet Antibody Assays. Semin Thromb Hemost. 1995;21(1):37-45. doi: 10.1055/s-2007-1000377.

81. Woods VL, et al. Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. Blood. 1984 Feb;63(2):368-75. doi: 10.1182/blood.V63.2.368.368.

82. Woods VL, et al. Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. Blood. 1984 Jul;64(1):156-60. doi: 10.1182/blood.V64.1.156.156.

83. Kiefel V, et al. Monoclonal antibody--specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. Blood. 1987 Dec;70(6):1722-6. doi: 10.1182/blood.V70.6.1722.1722.

84. McMillan R, et al. Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. Blood. 1987 Oct;70(4):1040-15. doi: 10.1182/blood.V70.4.1040.1040.

85. Brighton TA, et al. Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. Blood. 1996 Jul;88(1):194-201. doi: 10.1182/blood.v88.1.194.194.

86. Campbell K, et al. A modified rapid monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen assay for the detection of human platelet antigen (HPA) antibodies: A multicentre evaluation. Vox Sang. 2007 Nov;93(4):289-97. doi: 10.1111/j.1423-0410.2007.00989.x.

87. Fabris F, et al. Platelet-associated autoantibodies as detected by a solid-phase modified antigen capture ELISA test (MACE) are a useful prognostic factor in idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood. 2004 Jun;103(12):4562-4. doi: 10.1182/blood-2003-09-3352.

88. Rockenbauer L, Eichelberger B, Panzer S. Comparison of the bead-based simultaneous analysis of specific platelet antibodies assay (SASPA) and Pak Lx Luminex technology with the monoclonal antibody immobilization of platelet antigens assay (MAIPA) to detect platelet alloantibodies. Clin Chem Lab Med. 2015 Oct;53(11):1779-83. doi: 10.1515/cclm-2014-1037.

89. Porcelijn L, et al. A new bead-based human platelet antigen antibodies detection assay versus the monoclonal antibody immobilization of platelet antigens assay. Transfusion. 2014 Jun;54(6):1486-92. doi: 10.1111/trf.12509.

90. Salib M, et al. Difficulties in establishing the diagnosis of immune thrombocytopenia: An agreement study. Am J Hematol. 2016 Aug;91(8):E327-9. doi: 10.1002/ajh.24404.

91. Arnold DM, et al. Misdiagnosis of primary immune thrombocytopenia and frequency of bleeding: lessons from the McMaster ITP Registry. Blood Adv. 2017 Nov;1(25):2414-2420. doi: 10.1182/bloodadvances.2017010942.

92. Bryant N, Watts R. Thrombocytopenic Syndromes Masquerading as Childhood Immune Thrombocytopenic Purpura. Clin Pediatr (Phila). 2011 Mar;50(3):225-30. doi: 10.1177/0009922810385676.

93. McMillan R, Wang L, Tani P. Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP). J Thromb Haemost. 2003 Mar;1(3):485-91. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00091.x.

94. Fujisawa K, et al. The effect of therapy on platelet-associated autoantibody in chronic immune thrombocytopenic purpura. Blood. 1993 Jun;81(11):2872-7. doi: 10.1182/blood.V81.11.2872.2872.

95. Berchtold P, Wenger M. Autoantibodies against platelet glycoproteins in autoimmune thrombocytopenic purpura: their clinical significance and response to treatment. Blood. 1993 Mar;81(5):1246-50. doi: 10.1182/blood.V81.5.1246.1246.

APÊNDICE A – Questionário de sangramentos - conforme IBLS[54]

Por favor, responda as questões abaixo:

1) Você apresentou sangramento na pele (manchas roxas de aparecimento espontâneo ou vários pontos vermelhos - petéquias) nas últimas 48 horas?
   ( ) Não
   ( ) Sim

   Se sim:
   ( ) 1-5 manchas roxas e/ou alguns pontos vermelhos
   ( ) Mais de 5 manchas roxas de mais de 2cm e/ou inúmeros pontos vermelhos

2) Você apresentou sangramento na cavidade oral (boca) nas últimas 48 horas?
   ( ) Não
   ( ) Sim

   Se sim:
   ( ) 1 bolha de sangue e/ou mais de 5 pontos vermelhos e/ou sangramento na gengiva por menos de 5 minutos
   ( ) Várias bolhas de sangue e/ou sangramento na gengiva por mais de 5 minutos

3) Você apresentou sangramento pelo nariz nas últimas 48 horas?
   ( ) Não
   ( ) Sim

   Se sim:
   ( ) Ao limpar o nariz e/ou com duração de menos de 5 minutos cada episódio
   ( ) Sangramento com duração de mais de 5 minutos por episódio

   4) Você apresentou sangramento nas fezes nas últimas 48 horas?
   ( ) Não
   ( ) Sim
   Se sim:
   ( ) Sangramento detectado por exames de fezes
   ( ) Presença de sangue vermelho vivo visível nas fezes

5) Você apresentou sangramento na urina nas últimas 48 horas?
   ( ) Não
   ( ) Sim

   Se sim:
   ( ) Sangramento detectado por exame de urina
   ( ) Sangramento visível na urina

6) Você apresentou hemorragia subconjuntival nas últimas 48 horas? (sangramento nos olhos)
   ( ) Não
   ( ) Sim

7) Você tem apresentado sangramentos vaginais fora do seu período menstrual ou sangramento menstrual mais intenso?

( ) Não
( ) Sim

Se sim:
( ) Pequenos escapes - sangramentos leves fora do período menstrual
( ) Sangramento intenso fora do período menstrual ou menstruação mais intensa que o esperado

APÊNDICE B – Interpretação do questionário no Apêndice A – adaptado do IBSL[54]

Sítio	Sangramento Grau 1	Sangramento Grau 2
Pele	1-5 equimoses e/ou algumas petéquias	Mais de 5 equimoses > 2cm e/ou petéquias difusas
Oral	1 bolha hemorrágica ou >5 petéquias e/ou sangramento gengival por < 5 minutos	Múltiplas bolhas hemorrágicas e/ou sangramento gengival por > 5 minutos
Epistaxe	Sangue ao assoar o nariz e/ou epistaxe < 5 minutos por episódio	Sangramento > 5 minutos por episódio
Gastrointestinal	Sangue oculto	Sangramento visível
Urinário	Microscópico	Macroscópico
Hemorragia Subconjuntival	Sim	-
Ginecológico	Escapes - fora do período normal	Sangramento > escape fora do período normal ou sangramento muito intenso

APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1. Estamos convidando você a participar desta pesquisa, que visa pesquisar anticorpos no seu sangue que possam ser responsáveis pela queda da contagem de plaquetas. Os resultados deste estudo poderão ajudar a entender o motivo da queda de plaquetas em outros pacientes como você, facilitando também o tratamento.
2. Caso você concorde em participar, será realizada coleta de 30 mL de seu sangue. O exame de sangue é realizado pela punção com agulha fina de uma veia de seu braço. Esta coleta é a mesma utilizada para realização de exames de sangue no geral. No sangue coletado serão pesquisados anticorpos.
3. O exame de sangue pode trazer desconforto ou dor leve no local da punção e tem como risco o aparecimento de hematoma e raramente infecção local. Você não terá despesas para participar do estudo.
4. Checaremos a evolução do seu caso através do sistema de informação hospitalar para coletar informações sobre o diagnóstico final da causa de sua alteração nas plaquetas e o tratamento usado. Caso existam informações faltantes no sistema hospitalar, será preciso passar estas informações por telefone ou meios eletrônicos.
5. Você não terá benefícios diretos neste estudo, porém os resultados deste estudo poderão ajudar no diagnóstico e tratamento de outras pessoas com um problema como o seu.
6. Se você optar por não participar do estudo, terá atendimento e acompanhamento médico normal neste ambulatório, como todos os demais pacientes.
7. Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas e receberá uma via do termo de consentimento. A principal investigadora é a Dra. Carla Luana Dinardo, que pode ser encontrada no endereço: Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, Prédio dos Ambulatórios, primeiro andar, serviço de ImunoHematologia, telefone (11) 4573 7516. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP - endereço: Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - 5º andar - Prédio da Administração - Cerqueira César - 05403-010 - São Paulo/SP . Telefones: (11) 2661-7585; 2661-1548; 2661-1549. E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br
8. Você pode retirar este consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo ao tratamento que lhe é oferecido na Instituição.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

1. Todas as informações obtidas serão guardadas em segredo, e seu nome não aparecerá em nenhum resultado nesta pesquisa.
2. Qualquer resultado que você desejar saber sobre a pesquisa, será informado.
3. Não há despesas pessoais para você caso decida participar. Também não há pagamento relacionado à sua participação.
4. As pessoas envolvidas na pesquisa se comprometem a utilizar todas as informações obtidas apenas para a pesquisa, não sendo utilizados para outros fins.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **"Detecção de autoanticorpos antiplaquetários"**. Eu discuti com os pesquisadores sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data__ /__ /__

Assinatura da testemunha Data__ /__ /__

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data__ /__ /__