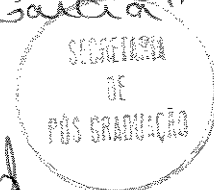


Este exemplar corresponde à redação final da tese
defendida pelo candidato "Concília Garcia"
e aprovada pela Comissão julgadora

21/03/89



Concília Garcia

Aspectos Imunológicos da Púrpura Trombocitopênica Idiopática em Crianças de 5 Meses a 14 Anos de Idade

Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - como um
dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências
Biológicas

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Campinas - SP

1989

G165a
10482/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Prof. Dr. Fawzi Dawood
Orientador

Aos meus pais

Agradecimentos

- Em primeiro lugar e com um carinho muito especial agradeço às crianças, sem as quais este trabalho não poderia ser realizado.
 - Ao Setor de Hematologia Infantil do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp pela colaboração.
 - Ao Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Unicamp, especialmente às pessoas de Maria Tereza e Maria Cecília Teori pela colaboração.
-
- À colega Maria Rita Zucato por ter acrescentado valiosíssimas observações ao trabalho e pelo companheirismo de tanto tempo.
 - Ao amigo André M. Morcillo por decifrar meus manuscritos e pelo incentivo constante.
 - Aos professores Dr. Marcos Garcia Costa, Dra. Marlene B. Serafim e Dra. Lucila Costallat Ricci pelas críticas e sugestões.

Índice

1	Introdução	1
1.1	Imunidade humoral	3
1.2	Imunidade celular	13
1.3	Complemento (C_3)	15
2	Material e métodos	17
2.1	Pacientes	17
2.2	Critérios de diagnóstico	18
2.3	Coleta do material	18
2.4	Quantificação de imunoglobulinas circulantes	18
2.5	Precipitação de imuno-complexos	19
2.6	Determinação de proteínas	20
2.7	Titulação de anticorpos não marcados	20
2.8	Determinação da quantidade de imunoglobulinas e C_3 no soro precipitado com polietileno-glicol 7%	20
2.9	Preparação de plaquetas	21
2.9.1	Plaquetas normais	21
2.9.2	Preparo da coluna com Sepharose 2-B	21
2.9.3	Purificação de plaqueta normal com Sepharose 2-B	21
2.9.4	Preparo das plaquetas normais	22
2.9.5	Contagem das plaquetas	22
2.10	Titulação de anticorpos marcados com FITC	22
2.11	Imunofluorescência da suspensão plaquetária	23
3	Resultados	24
3.1	Caracterização clínica dos pacientes	24
3.2	Alteração dos níveis de imunoglobulinas em pacientes com PTI	26
3.3	Anticorpos com especificidade anti-plaquetária nos soros dos pacientes com PTI	32
3.4	Imuno-complexos e C_3	33

4	Discussão	36
5	Resumo e Conclusões	42
6	Referências Bibliográficas	43

1 Introdução

Dagg & Lee (1980) descreveram a Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI) como uma doença caracterizada por plaquetopenia (número de plaquetas inferior a $100.000/mm^3$), aumento da produção de megacariócitos e diminuição da sobrevivência das plaquetas. Na forma aguda dessa doença, que ocorre principalmente em crianças depois de uma infecção viral, como, por exemplo, infecções do trato respiratório superior, a duração da mesma pode variar de poucos dias até 6 meses, quando 70 a 90% dos pacientes retornam suas contagens de plaquetas a níveis normais (200.000 a $400.000/mm^3$). Por outro lado, a forma crônica da doença se caracteriza pela persistência da plaquetopenia por mais de 6 meses (Nathan & Oski, 1981) e ocorre predominantemente em adultos, enquanto que a forma intermitente pode ocorrer tanto em crianças como em adultos, nos quais se observa alternância de doença com intervalos livres quando a contagem de plaquetas e sua sobrevivência se tornam normais. O padrão clínico da PTI pode variar de uma leve púrpura cutânea a uma hemorragia uterina, renal, gastro-intestinal, nasal ou bucal. Em casos severos, a hemorragia intra-cerebral é de alta periculosidade. À semelhança de outras hemorragias onde ocorre plaquetopenia, o tempo de coagulação é normal, mas o tempo de sangramento é prolongado e a retração do coágulo não ocorre.

Quanto à etiologia da PTI, existem evidências que indicam causas imunológicas dessa doença e que incluem as seguintes observações:

- Ocorre a plaquetopenia em neonatos de mães que sofrem da doença ocorre provavelmente devido à transferência de anticorpos maternos através da placenta.
- Observa-se a transferência temporária adotiva de PTI para indivíduos normais após a transfusão de plasma de um paciente afetado pela doença.
- Muitos pacientes com PTI respondem bem ao tratamento com corticosteróides, ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) ou esplenectomia.
- A demonstração de auto-anticorpos específicos anti-plaqueta em muitos casos já foi evidenciada.

- Observa-se a semelhança clínica dessa doença com o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e possível aparecimento de PTI meses ou anos antes do desenvolvimento de LES no indivíduo.
- Pacientes com Síndrome de Evans (anemia hemolítica autoimune com reação de Coombs positiva) freqüentemente apresentam episódios transitórios e recorrentes de PTI sugerindo assim uma etiologia autoimune. Frente a essas evidências da origem imunológica da PTI, a nomenclatura de Púrpura Trombocitopênica Autoimune (PTA) foi adotada (Karparkin, 1985), sendo ambos os termos aceitos.

Clinicamente, o termo plaquetopenia é usado quando a contagem de plaquetas é menor que $150 \times 10^9/l$. Entretanto, o sangramento só é comum em contagens menores que $60 \times 10^9/l$, sendo a hemorragia espontânea observada em contagens inferiores a $20 \times 10^9/l$.

A plaquetopenia, além de encontrada na PTI, também pode resultar de outras situações como deficiência da medula óssea na produção de plaquetas nas anemias aplásticas, síndromes de reconstituição da medula óssea de todos os tipos e em anemias megaloblásticas. A plaquetopenia pode ocorrer também, pela destruição de plaquetas da circulação ou pelo seu consumo excessivo. Tal destruição poderia ter uma base imunológica como as observadas nos casos de púrpura trombocitopênica autoimune, nas trombocitopenias de LES, alguns casos de leucemia linfóide crônica e em determinadas reações causadas por drogas. Nos casos onde a plaquetopenia ocorre devido ao excessivo consumo e destruição de plaquetas da circulação, números normais ou aumentados de megacariócitos são encontrados na medula óssea. Este ponto é muito importante na distinção da plaquetopenia deste tipo das de outras causadas pelo bloqueio da função da medula óssea, onde o número de megacariócitos encontra-se bastante diminuído.

A PTI foi primeiramente descrita por Werlhof em 1735 e posteriormente por Krause em 1883 que demonstrou a sua associação com plaquetopenia (Sacher, 1980). Neste artigo de Sacher (1980) foi também citada a introdução por terceiros, de uma falsa noção de que a plaquetopenia era um resultado da produção diminuída ou da morfologia alterada de megacariócitos. Ainda em 1950, o termo PTI continuava a se referir a uma

doença de etiologia desconhecida, associada com plaquetopenia e púrpura (Karparkin, 1980).

Posteriormente, Williams et alii (1977) demonstraram uma alta incidência de antecedentes virais na PTI aguda, o que sugeriu uma possível relação entre vírus e plaquetopenia. Em vista da PTI estar transitória, seu término poderia ser associado à recuperação do paciente da infecção viral. A plaquetopenia foi também descrita em várias doenças de etiologia viral, tais como mononucleose infecciosa, rubéola, varicela, caxumba, hepatite, infecções por citomegalovírus, assim como depois da vacinação contra o sarampo. Nessas infecções, o vírus estaria alterando a estrutura bioquímica da membrana plaquetária, tornando-as imunogênicas podendo induzir, desta forma, um estado de consumo plaquetário intravascular disseminado ou pela fixação de complemento ou, por outro lado, aumentando a aglutinação plaquetária (Sacher, 1980).

1.1 Imunidade humoral

Quanto à participação de fatores humorais na PTI, Harrington (1951) observou a presença de um fator humoral antiplaqueta através da transferência do plasma de um paciente com PTI, em si próprio e, conseqüentemente, desenvolveu a entidade clínica e o quadro laboratorial da doença. O mesmo autor observou que os recém-nascidos de mulheres com PTI demonstram, freqüentemente, diminuição transitória do número de plaquetas, o que sugere a transferência de um fator humoral antiplaqueta da mãe para o filho. Assim, Shulman et alii (1965) localizaram, em pacientes com PTI, este fator antiplaqueta na fração de gamaglobulina sérica. Hymes et alii (1980) observaram em pacientes com PTI e trombocitopenia que a IgG associada às plaquetas estava aumentada com relação a indivíduos normais. Estes autores identificaram o fator antiplaqueta como um anticorpo em forma de complexo imune, conseguiram a sua eluição e demonstraram através de ultracentrifugação em gradiente de sucrose, que tal fator migrava na região 7S. Do mesmo modo, Dixon & Rosse (1975) isolaram a IgG antiplaqueta em pacientes com PTI através de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose e filtração em Sephadex G-200.

Estudos realizados por McMillan et alii (1978) demonstraram a possibilidade de se estabelecer culturas de células de pacientes com PTI

e obter IgG antiplaqueta de seus sobrenadantes. Conseqüentemente, foi possível para estes autores demonstrarem que a IgG anteriormente isolada possuía a capacidade de se ligar às plaquetas e megacariócitos homólogos e autólogos. Este tipo de ligação, IgG-plaqueta, não era influenciada pela digestão prévia de IgG com pepsina, mostrando assim que a reação IgG-plaqueta ocorre através de Fab da molécula de IgG e que portanto, a molécula de IgG possuía atividade de anticorpo específico antiplaqueta (McMillan et alii, 1980).

A idéia da presença de um antígeno associado às plaquetas de pacientes com PTI foi primeiramente descrito por McMillan (1981). Tais estudos sugeriam 3 hipóteses para explicar a presença deste antígeno:

1. Haveria um antígeno estranho que teria aderência às plaquetas,
2. um autoantígeno poderia fazer parte da membrana plaquetária,
3. haveria um autoantígeno nativo que não faria parte da membrana plaquetária, mas, que poderia aderir fortemente à mesma.

A primeira hipótese representa uma situação normal, na qual o sistema imune induz uma resposta contra um antígeno estranho e a segunda e terceira hipóteses representam, respectivamente, uma doença autoimune verdadeira e um sistema imune anormal. McMillan et alii. (1978) têm demonstrado que os anticorpos (IgG) são capazes de reagir tanto com plaquetas quanto com seus precursores (megacariócitos), o que sugere a presença de uma estrutura alterada (antígeno) que faz parte da membrana destas células e conseqüentemente estes estudos reforçam a segunda hipótese.

Os estudos realizados por McMillan et alii (1974), em pacientes com PTI, utilizando técnicas de microscopia eletrônica e fagocitose *in vitro*, demonstraram fagocitose de plaquetas por células fagocíticas dos próprios pacientes. Estes estudos indicam que a destruição plaquetária periférica, em pacientes com PTI crônica, é um resultado da ligação do anticorpo ao antígeno associado à plaqueta com ou sem ativação do complemento.

Entretanto, foi evidenciado (Handin & Stossel, 1974) que a fagocitose pode ser desencadeada pela ligação de Fc da IgG (do complexo imune: plaqueta-antiplaqueta) ao seu receptor presente na célula fagocítica ou pela

ligação deste complexo antígeno-anticorpo, após ativação de complemento no receptor C₃b do macrófago.

A imunoglobulina (IgG) ligada a plaquetas tem sido demonstrada praticamente em todos os pacientes com PTI e na sua quantidade total se correlaciona bem com o tempo de permanência das plaquetas na circulação (Kernoff et alii, 1980) e conseqüentemente com a severidade da trombocitopenia (Dixon et alii, 1975), uma vez que quanto maior o número desses complexos, menor a sobrevida plaquetária.

O papel dos macrófagos na patogênese dessa doença foi evidenciado por Chaplin (1977), que observou o aumento dos receptores Fc e C₃b nessas células fagocíticas, que se tornam mais ávidas em indivíduos com infecções virais quando comparados a indivíduos normais, o que poderia explicar parcialmente a origem de trombocitopenia progressiva em pacientes com PTI.

Os anticorpos antiplaquetários circulantes ou associados a plaquetas têm sido revelados em pacientes com PTI através de técnicas imunológicas como ativação de complemento, de ensaios imunoenzimáticos e de radioimunoensaios. Uma correlação direta foi observada entre a quantidade de imunoglobulinas ligadas à plaqueta e a severidade da plaquetopenia nos pacientes com PTI. Embora níveis elevados desses anticorpos sejam encontrados na PTI, a sua quantidade não se correlaciona com a plaquetopenia.

O uso de plaquetas de pacientes com PTI para realizar essas técnicas, mostra algumas inconveniências, tais como a dificuldade de obter número suficiente de células, particularmente dos pacientes severamente plaquetopênicos, tempo prolongado envolvido no armazenamento das amostras plaquetárias e a baixa especificidade das reações empregadas (Kelton et alii, 1982).

A quantidade de imunoglobulina (IgG) associada às plaquetas pode ser avaliada através do teste de consumo de anti-imunoglobulina, pela reação da anti-IgG com plaquetas de pacientes, e pela determinação posterior de anti-IgG livre, utilizando-se o ensaio de inibição de ativação de complemento empregando hemácias cobertas com IgG humana (Shimm et alii, 1980; Goudemand, 1984; Cines et alii, 1985) ou ensaios imunoenzimáticos, onde uma matriz sólida coberta com IgG é usada (Leporrier et alii, 1979).

Contudo, estas técnicas são freqüentemente criticadas, em função

do uso de reagentes múltiplos, o que dificulta a reprodutibilidade dos resultados e muitas vezes interfere na especificidade das reações executadas como, por exemplo, a ocorrência de anticorpos naturais anti-hemácias de carneiro junto com o anticorpo usado na inibição de ativação de complemento. Por outro lado, ensaios diferentes foram descritos por Luiken et alii (1977) e Ljung et alii (1986), baseados no ensaio de Farr (Brownstone et alii, 1966), onde as plaquetas são rompidas para expor a IgG ligada e misturadas com anti-Fab de IgG. A quantidade de Fab livre é determinada pela sua reação com Fab ^{125}I e a precipitação com sulfato de amônio.

Geralmente, os testes de consumo de anti-IgG revelam uma boa correlação entre o número de plaquetas usadas no ensaio e a concentração de IgG aderente encontrada. Entretanto, estes testes são geralmente criticados, devido ao uso de uma curva padrão, utilizada para medir o consumo de anti-IgG pelas plaquetas. Tal curva é construída com base em reações semelhantes de anti-IgG em fase líquida e sabe-se que a IgG solúvel não reage com anti-IgG na mesma estequiometria da reação de anti-IgG com a IgG aderente à plaqueta. Assim, os valores obtidos em tais ensaios não podem ser considerados como precisos e sim como aproximações das quantidades verdadeiras de IgG fixadas à superfície plaquetária. Para determinação de anticorpos anti-plaqueta, métodos diretos de imuno-ligação têm sido usados. Neles, as quantidades consumidas de anti-IgG- ^{125}I (Cheung et alii, 1983; Kelton et alii, 1985; Ljung et alii, 1986) ou IgG-enzima são avaliadas pela reação desses reagentes com plaquetas de pacientes.

A quantificação de anticorpos anti-plaqueta também tem sido realizada através de técnicas diretas de ligação de conjugados fluorescentes como anti-IgG marcada (Sugiura et alii, 1980; van Leeuwen et alii, 1982; Lazarchick & Hall, 1986) e proteína A- ^{125}I (Shaw et alii, Axelson et alii, 1984; Panzer et alii, 1986; Conellan et alii, 1986), que se constitui em uma proteína estafilocócica que se liga especificamente com a fração Fc da IgG de mamíferos. Também são utilizadas nessas quantificações as técnicas de anticorpo monoclonal anti-IgG- ^{125}I (LoBuglio et alii, 1983), imunodifusão radial (Morse et alii, 1981) e formação de roseta com pérolas de poliacrilamida cobertas com anti-IgG (Pecze et alii 1984).

Embora métodos diretos de quantificação de anticorpo anti-plaqueta possam parecer mais precisos que métodos indiretos de consumo de anti-IgG, é a especificidade e sensibilidade dos reagentes que determinam a

precisão do método usado.

O método imunoenzimático (*enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA) tem sido usado também para quantificar imunoglobulinas aderentes às plaquetas de pacientes com PTI, onde anticorpos contra as diferentes classes de imunoglobulinas humanas são marcados com peroxidase (Nel & Stevens, 1980) e utilizados para reagirem com plaquetas aderidas em placas plásticas de microtitulação (Hedge et alii, 1985; Follea et alii, 1982; Winiarsky, 1985) ou tubos de poliestireno (Tsubakio et alii, 1981).

Estas reações são reveladas pela presença do substrato enzimático e sua intensidade determinada pelo espectrofotômetro. Deste modo, a quantidade de imunoglobulinas presentes nas plaquetas pode ser quantificada através do uso de uma curva padrão previamente estabelecida, empregando-se diferentes quantidades de imunoglobulinas adsorvidas em plaquetas normais.

Para estabelecer os controles (curvas padrão) nos métodos diretos de quantificação de imunoglobulina em plaquetas normais, é essencial lavarmos as células rigorosamente para diminuirmos o "*back ground*" (Kelton et alii, 1980) ou filtrar as mesmas em gel (Luiken et alii, 1977). Entretanto, certas condições de execução destes métodos tais como, uso de anticoagulante como EDTA, paraformaldeído ou armazenamento das plaquetas por um tempo relativamente longo à temperatura ambiente, podem interferir nas reações de determinação de imunoglobulinas aderidas às plaquetas (McMillan et alii, 1979).

Devido às dificuldades de obtenção de plaquetas de pacientes com PTI em número suficiente para a quantificação direta dos anticorpos anti-plaqueta, a maioria dos métodos acima descritos foram adaptados para serem usados na determinação indireta dos anticorpos circulantes anti-plaqueta. Nestes estudos, soros de pacientes são usados a fim de sensibilizar *in vitro* plaquetas de doadores alogênicos normais e determinar-se imunoglobulinas adsorvidas à superfície plaquetária. Deste modo, foi possível para Harrington (1951) obter 65% de reações positivas em soros de pacientes com PTI, utilizando o simples método de aglutinação de plaquetas normais.

Karpatkin et alii (1972) descreveram um fator anti-plaqueta encontrado no soro, como uma imunoglobulina 7S capaz de atravessar a placenta e que pode ser adsorvida às plaquetas humanas autólogas ou

homólogas podendo ser esta reação neutralizada com soro de coelho anti-IgG humana e não por soros anti-IgM, IgA ou IgD. O fator adsorvido às plaquetas foi eluído e seu peso molecular determinado como sendo de 150.000 daltons.

Em 1969, Karpatkin & Siskind desenvolveram um teste de imunoinjúria indireto para medir o tempo de coagulação em presença de soro de pacientes com PTI. Estes autores encontraram um fator que denominaram fator plaquetário 3 (FP₃), o qual é capaz de acelerar a cascata de coagulação de plasma rico em plaquetas (Karpatkin et alii, 1977). Com este método, os mesmos autores foram capazes de detectar anticorpo anti-plaqueta em aproximadamente 60-65% dos pacientes testados, confirmando assim o trabalho original de Harrington realizado pelo teste de aglutinação das plaquetas e o trabalho de Hauch & Rosse, 1977, realizado pelo teste de consumo de antiglobulina.

Técnicas recentes têm sido utilizadas para confirmar a presença de anticorpos séricos anti-plaquetários em pacientes com PTI, tais como: imunofluorescência (von dem Borne et alii, 1980; Veenhoven et alii, 1980), imunohistoquímica (Tate et alii, 1977; Vizcaíno & Diez-Ewald, 1983), radioimunoensaio (Freedman et alii, 1985), fluorimetria (Sugiura et alii, 1980) e ELISA (Gudino & Miller, 1981; Kahane et alii, 1981; Winiarsky & Holm, 1982; Fabris et alii, 1985; Winiarsky & Ekelund, 1986).

Rabasa et alii (1984), utilizando o método de nefelometria, estudaram os níveis séricos de imunoglobulinas em crianças com PTI e encontraram uma elevação significativa dos níveis de IgA, IgG e IgM no grupo de PTI crônica. No grupo de PTI aguda somente IgM estava significativamente elevada. Estes mesmos autores, quando compararam o total de PTI agudas e crônicas em relação ao grupo controle, encontraram um aumento significativo de IgA e IgM, mas não de IgG. Por outro lado também foi observada uma deficiência de IgA em 2,32% dos pacientes estudados.

Através do método de imunodifusão radial, Khalifa et alii (1976) demonstraram diminuição significativa dos níveis de IgG e IgA em crianças com PTI crônica e diminuição apenas de IgG em crianças com PTI aguda. Aumento significativo dos níveis de IgM foi observado por Khalifa somente em formas crônicas de PTI. Os resultados relatados por estes autores se assemelham aos resultados obtidos por Bailén et alii (1983) empregando o método de nefelometria. Neste trabalho, os níveis de IgG e IgM estavam

significativamente aumentados nos grupos de PTI aguda e crônica e não foram encontradas diferenças em relação aos níveis de IgA. Por outro lado, quando os autores compararam o total de pacientes, sem distinguir entre PTI aguda e crônica, com o grupo controle, foi demonstrada uma incidência de deficiência de IgA em 15,5% dos pacientes.

Em outros estudos com 35 pacientes adultos com PTI, realizados por de la Torre et alii (1982), utilizando o método de imunodifusão radial, foi observado um aumento do nível sérico de IgG em 24,2% dos pacientes e uma diminuição de IgA. Entretanto, não foi possível para Gandolfo et alii (1981) obter resultados semelhantes, estudando 44 pacientes adultos onde se encontrou uma redução significativa dos níveis séricos de IgA e valores estáveis de IgG e IgM. Os resultados controversos nos diferentes trabalhos realizados merecem esclarecimentos.

Trabalhos recentes demonstram que em muitos casos de PTI, o anticorpo é dirigido contra determinantes auto-antigênicos do complexo de glicoproteínas IIb-IIIa- Ca^{++} da membrana plaquetária (Woods et alii, 1982; Woods et alii, 1984). Este complexo requerido para agregação plaquetária está ausente em pacientes com trombastenia de Glanzman e é o sítio de antígenos plaqueta-específicos como $\text{PI}^{A1/a2}$ ou $\text{Zw}^{a/b}$ (Beardsley et alii, 1984). Entretanto, a ligação de soros e eluatos plaquetários de pacientes com PTI a plaquetas normais, mas não a plaquetas trombastênicas, foi também observada por van Leeuwen et alii (1982).

Em 15 de 16 pacientes, Varon & Karparkin (1983), utilizando um anticorpo monoclonal específico para GPIIb da membrana plaquetária, demonstraram ligação diminuída deste anticorpo a plaquetas desses pacientes. Este mesmo anticorpo mostrou reações positivas com plaquetas de pacientes em remissão, sugerindo que a ligação a GPIIb ou ao complexo GPIIb-GPIIIa- Ca^{++} era inibido por autoanticorpo anti-GPIIb ou anti-GPIIb-GPIIIa- Ca^{++} .

A utilização de anticorpos monoclonais anti-glicoproteína Ib da membrana plaquetária (Woods et alii, 1984), em estudos de PTI, permitiu demonstrar que os pacientes com a forma crônica possuem mais que um tipo de autoanticorpo dirigido contra diferentes glicoproteínas da membrana plaquetária. A glicoproteína Ib tem papel importante na adesão de plaquetas ao subendotélio vascular *in vivo*, na aglutinação plaquetária por ristocetina *in vitro* e na ligação de Fator VIII Antígeno (Ag) e está marcada-

mente diminuída em pacientes com síndrome de Bernard-Soulier (Nurden et alii, 1981).

Entretanto, estudos de Mason & McMillan (1984) mostram que a IgG obtida em cultura de linfócitos esplênicos de pacientes com PTI crônica e radiomarcada pode reagir com diferentes proteínas obtidas de plaquetas normais em papel de nitrocelulose após eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Do mesmo modo, Beardsley et alii (1984), utilizando anticorpo antiplaqueta purificado de soro de pacientes com PTI crônica através da técnica de cromatografia de afinidade, demonstraram que soros de 7 crianças (das 13 examinadas) continham anticorpos que reagiram com uma proteína de membrana plaquetária de peso molecular de 100.000 daltons, o que mostrou uma migração eletroforética equivalente a GPIIa. Evidências a favor do conceito de que os imuno-complexos não são responsáveis pela doença são:

- Classicamente, durante a gravidez, a IgG e não o imuno-complexo atravessa a placenta, resultando na transferência passiva de plaquetopenia neonatal;
- experimentos de infusão *in vivo*, de plasma de paciente com PTI têm demonstrado que o fator trombocitopênico se localiza na fração gamaglobulina 7S do soro;
- os linfócitos do baço de pacientes com PTI, são capazes de sintetizar anticorpos (IgG) em cultura e estes anticorpos se ligam especificamente a plaquetas normais lavadas, assim como a fragmentos F(ab)2 de anti-IgG (McMillan et alii, 1980);
- o anticorpo (IgG) em eluato de plaquetas contendo anticorpo ligado à sua superfície, migra na região 7S, em gradiente de sucrose (Hymes et alii, 1979);
- a atividade de anticorpo pode ser eluída em Sephadex G-200 e DEAE-celulose, na área onde IgG se encontra (Walsh et alii, 1984);
- o fragmento F(ab)2 preparado de soro antiplaqueta positivo de 5 de 7 pacientes com PTI reage com plaquetas normais enquanto o fragmento F(ab)'2 de soro de 10 pacientes com LES não é reativo (Endresen & Foerre, 1982).

Entretanto, Lurhuma et alii (1977) relataram a presença de imuno-complexos circulantes no soro de 48 (52%) de 72 pacientes com PTI, empregando métodos baseados no efeito inibidor do imuno-complexo sobre aglutinação de partículas de látex cobertas com IgG (fator reumatóide) ou C₁q. Quando o soro de 6 pacientes foi submetido à cromatografia de filtração em Sephadex G-200, IgG e DNA foram detectados em frações que correspondem a complexos antígeno-anticorpo.

Por outro lado, a presença de imuno-complexos circulantes foi confirmada por Trent et alii (1980) no soro de 36 entre 43 (84%) pacientes com PTI através do método de C₁q. Resultados semelhantes foram obtidos com pacientes trombocitopênicos com outras doenças não imunológicas, e nos dois grupos de pacientes (PTI e não PTI) foi observada uma relação inversa entre a contagem de plaquetas e a quantidade de imuno-complexo sérico. Estes autores sugerem que os receptores Fc plaquetários servem para clarear imuno-complexos da circulação periférica, considerando-se o nível sérico elevado em indivíduos trombocitopênicos desses imuno-complexos.

Walsh et alii (1984), empregando o método de precipitação com PEG, foram incapazes de demonstrar a presença de imuno-complexos no soro de 5 pacientes com PTI. Os autores sugerem neste trabalho que a ausência de imuno-complexos não descarta a presença de IgG específica contra antígenos plaquetários. Contudo, estes complexos representariam um epifenômeno, onde são desenvolvidos contra plaquetas ou outros antígenos celulares produzidos durante a destruição celular, anticorpos plaquetários específicos. Por outro lado, os níveis aumentados de imunoglobulinas, nas plaquetas de pacientes com PTI, pode ser também inespecífica se atribuídas a mecanismos não relacionados com a ligação clássica antígeno-anticorpo (Schulman et alii, 1982), visto que:

- os níveis de imunoglobulinas ligadas a plaquetas em pacientes com PTI são consideravelmente mais altos do que os mesmos observados em outras doenças imunológicas plaquetárias tais como púrpura isoimune ou púrpura imunológica induzida por droga. Entretanto, danos plaquetários podem ser atribuídos aos anticorpos isoimunes ou aos induzidos por drogas, uma vez que mais freqüentemente estes são ativadores de complemento;
- os níveis aumentados de imunoglobulinas ligadas às plaquetas têm

sido encontrados em pacientes com plaquetopenia de aparente natureza não imunológica (Mueller-Eckhardt et alii, 1980);

- curiosamente, o fenômeno dos níveis aumentados de imunoglobulinas ligadas às plaquetas é acompanhado também de níveis elevados de albumina (Kelton & Steeves, 1982) nos pacientes com PTI;
- durante a concentração de plaquetas, pacientes com PTI frequentemente mostram fragmentos plaquetários que se agrupam formando vesículas fechadas envolvendo a IgG sérica, o que pode elevar os níveis de IgG ligada a plaquetas. Embora tais vesículas plaquetárias não tenham sido encontradas durante a centrifugação a 1000 g, Zucker-Franlin & Karpatkin (1979) as encontraram em sedimentos centrifugados a 2700 g.

A distribuição proporcional das 4 sub-classes de IgG no soro e nas plaquetas de pacientes com PTI, observada por Hymes et alii (1980), Rosse et alii (1980) e Schulman et alii (1982), sugerem uma ligação inespecífica de IgG nas plaquetas, devida à injúria da membrana causada por auto-anticorpos que promoveriam a exposição de receptores para a fração Fc de IgG, que existiriam normalmente na membrana plaquetária. Assim, os níveis elevados de imunoglobulinas plaquetárias inespecíficas não implicariam em artefatos de técnica que podem acompanhar suas determinações *in vitro*, e poderiam representar o aspecto fisiopatológico da doença.

Por outro lado, van Leeuwen et alii (1982) observaram que imunoglobulinas em soros de pacientes com PTI são capazes de ligar-se a plaquetas normais sem requerimento de injúria prévia da sua membrana (sugestão de Hymes et alii, 1980), enquanto que eluatos obtidos de pacientes após a separação de imuno-complexos não mostram este tipo de ligação (Walsh et alii, 1984). Outras evidências do significado fisiopatológico de anticorpo ligado à plaqueta, em PTI, podem ser obtidas através da observação de que existe uma relação inversa entre contagem de plaquetas (Hymes et alii, 1979; Faig & Karpatkin, 1982; Winiarsky & Holm, 1982) ou sobrevida plaquetária e quantidade de IgG ligada à membrana.

1.2 Imunidade celular

Quanto à participação da imunidade celular na PTI, embora Piessens et alii (1970) tenham demonstrado que a incubação de linfócitos de pacientes com plaquetas autólogas ou alogeneicas (de outros pacientes) aumentava a resposta proliferativa dos linfócitos determinada pela incorporação de ^3H , a imunidade mediada por células nesta doença, ainda não está bem esclarecida. Resultados semelhantes ao mencionado foram obtidos também por outros autores como Wybran & Fudenberg (1972).

Atualmente, sabe-se que linfócitos sensibilizados, incubados com o antígeno específico, são capazes de liberar muitos fatores solúveis, entre os quais o fator inibidor de migração de macrófagos (MIF). Assim sendo, Morimoto et alii (1977) demonstraram o efeito inibidor de migração de leucócitos pela sua incubação com plaquetas autólogas em 6 pacientes com PTI, dentre 14 pacientes estudados. Recentemente, Borkowsky & Karpatkin (1984) investigaram a inibição de migração de leucócitos após a interação de plaquetas normais com linfócitos de pacientes com PTI. Neste trabalho, a inibição de migração foi significativamente acentuada quando comparada com a resposta de linfócitos de indivíduos normais, obtida em 12 experimentos diferentes. Os mesmos autores observaram uma relação inversa entre a contagem de plaquetas e a produção de linfocinas em pacientes com PTI. Curiosamente, o fator de transferência (Lawrence, 1969) obtido de um paciente com PTI em remissão foi capaz de converter a inibição de migração leucocitária observada em 3 pacientes com plaquetopenia severa, a uma resposta normal. Inversamente, o fator de transferência obtido de um paciente com plaquetopenia severa converteu uma resposta normal a uma inibição de migração leucocitária. Assim sendo, concluiu-se que linfócitos de pacientes com PTI já sensibilizados reconhecem antígenos plaquetários. Desse modo, a especificidade da reação antígeno - linfócito tem sido demonstrada nos pacientes com PTI. O fator de transferência foi capaz de modular esta resposta *in vitro* conforme acima descrito.

Em 1979, Quagliata & Karpatkin observaram uma resposta linfocitária proliferativa diminuída em sangue periférico de pacientes com PTI frente a mitógenos como a fitohemaglutinina e a concanavalina A, embora o número de células T, células B e células nulas fossem normais. Estes autores demonstraram também que o capuz linfocitário formado com anti-

IgG humana era diminuído em linfócitos obtidos de 7 pacientes, o que não ocorre com linfócitos lavados, sugerindo portanto a presença de um fator (s) bloqueador ou anticorpo(s) humoral que poderia ser responsável pela disfunção qualitativa da imunidade mediada por células nessa doença. Por outro lado, Lauria et alii (1981) observaram a diminuição de células Ts (supressora) no sangue periférico de pacientes adultos. Esta diminuição provavelmente ocorre pela presença de fatores bloqueadores que desaparecem durante o trabalho experimental requerido para formação de "capuz". Nestas condições, a enumeração de células Ts se torna normal sugerindo que estes fatores bloqueadores podem ser imuno-complexos (Trent et alii, 1980)

Zinberg et alii (1982), estudando a reação mista de linfócitos autólogos (auto-RML) em 11 pacientes com PTI, observaram que sete deles tinham auto-RML diminuídas, enquanto 4 tinham normal a aumentada. Todos os 7 pacientes com auto-RML diminuída tinham um fator sérico bloqueador que diminuía a auto-RML dos controles enquanto nenhum dos 4 pacientes com auto-RML normal a aumentada tinham este fator bloqueador. O fator bloqueador foi mostrado como sendo uma IgG em um dos pacientes estudados. Estes estudos reconhecem um defeito de imunoregulação em pacientes com PTI com respeito à interação célula B-célula T.

Muitos relatos têm indicado a existência de um desequilíbrio de célula T em PTI (Scott et alii, 1983; Shannon et alii, 1984). De acordo com estes relatos, a relação OKT4/OKT8 (normal 2:1) estava diminuída em 1/3 dos pacientes, embora os estados clínicos fossem variáveis. Entretanto, o desequilíbrio nas subpopulações de células T, caracterizado por diminuição da relação OKT4/OKT8, parecem atualmente não ter papel importante na patogênese da PTI (Mizutani et alii, 1985; Leone et alii, 1986). No entanto, o aumento destas células no sangue periférico e sua correlação com a contagem de plaquetas pode refletir uma anormalidade imunológica.

Paralelamente, Bertotto et alii (1984) utilizaram anticorpos monoclonais capazes de reconhecer células da linhagem T, a fim de determinar suas subpopulações, em 5 crianças com PTI crônica, comparadas com crianças normais. Verificaram que enquanto a relação de células OKT3+, OKT4+, OKT6+, OKT8+, OKT9+ era semelhante nos dois grupos, as crianças com PTI crônica tinham porcentagens significativamente altas de

células mononucleares com fenótipo de superfície OKT10+. Embora o antígeno T-10 não seja exclusivo da linhagem T, a presença deste antígeno em células mononucleares pode representar imaturidade fenotípica ou ativação de uma população de célula T.

1.3 Complemento (C_3)

Quanto à participação do complemento na PTI, em 1977, Hauch & Rosse relataram a presença de C_3 ligado a plaquetas em pacientes com PTI, empregando a técnica de consumo de anti-C. Nove entre 16 pacientes (56%) tinham quantidades elevadas de C_3 e IgG antiplaqueta, isto é, desses 9 pacientes nenhum demonstrou aumento de C_3 sem ter elevação de IgG antiplaqueta. Cines & Schreiber (1979), empregando o teste de Coombs radioativo, relataram níveis elevados de C_3 em 12 dentre os 21 pacientes estudados (57%). Entretanto, ao contrário dos estudos de Hauch anteriormente descritos, 3 pacientes tinham demonstrado elevação de C_3 e níveis normais de IgG antiplaqueta.

Em outros estudos, Myers et alii (1982), utilizando a técnica de imunofluorescência quantitativa, encontraram aumentos de C_3 em 15 dentre 24 pacientes estudados (63%), cinco dos quais demonstraram elevação de C_3 plaquetário e níveis normais de IgG antiplaqueta.

Outros autores, empregando o método ELISA (Nel & Stevens, 1980) ou a técnica de imunofluorescência semi-quantitativa (Veenhoven et alii, 1980; von dem Borne et alii, 1980), não encontraram evidências de elevação de C_3 plaquetário num total de 117 pacientes com PTI examinados.

Walsh et alii (1984), empregando radioimunoensaio e proteína A de estafilococo marcada com ^{125}I , encontraram valores elevados de C_3 em somente 6 de 23 pacientes (26%) testados. O significado fisiopatológico destes achados ainda está por ser esclarecido.

Através desta revisão da literatura sobre os aspectos imunológicos da Púrpura Trombocitopênica Idiopática, pode-se observar claramente que existem discrepâncias nos resultados obtidos por diferentes autores. Assim sendo, e com o objetivo de esclarecer o significado fisiopatológico desta doença em crianças, foram realizadas as seguintes pesquisas em pacientes com PTI:

1. Determinação dos níveis séricos de diferentes classes de imunoglobulinas.
 2. Estudo dos anticorpos séricos anti-plaqueta.
 3. Estudo de imuno-complexos e complemento, em especial (C_3).
-

2 Material e métodos

2.1 Pacientes

Foram estudados 28 pacientes com diagnóstico de Púrpura Trombocitopênica Idiopática, admitidos no Setor de Hematologia Infantil do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, no período de 10/12/84 a 11/11/85. A faixa etária destes pacientes variou de 5 meses a 14 anos, sendo 10 deles do sexo masculino e 18 do feminino (Tabela 1).

As 30 crianças estudadas como controle, não apresentavam qualquer queixa clínica, não faziam uso de qualquer tipo de medicação e tampouco apresentavam, ao exame físico, sinais de púrpura. Tratavam-se de pacientes admitidos para cirurgia eletiva no Hospital das Clínicas. A faixa etária desses controles variou dos 7 meses aos 14 anos, sendo 18 do sexo masculino e 12 do feminino (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição segundo o sexo e faixa etária dos 28 pacientes com Púrpura Trombocitopênica Idiopática e 30 controles (HC/UNICAMP, 1984/1985).

IDADE (anos)	SEXO			
	PACIENTES		CONTROLES	
	masc	fem	masc	fem
< 1	1	—	1	—
1 + 3	1	4	2	4
3 + 6	3	7	6	4
≥ 6	5	7	9	4
TOTAL	10	18	18	12

2.2 Critérios de diagnóstico

O diagnóstico de Púrpura Trombocitopênica Idiopática nas 28 crianças foi baseado nos critérios estabelecidos para essa doença (Karparkin, 1985) descritos a seguir:

- Plaquetopenia (número de plaquetas inferior a $150.000/mm^3$) devido ao aumento da destruição plaquetária, manifestada por plaquetopenia ou diminuição da sobrevida plaquetária.
- Medula óssea com número normal ou aumentado de megacariócitos e com presença de megacariócitos jovens.
- Exclusão de outras doenças clínicas primárias que são capazes de causar as alterações acima mencionadas: lúpus eritematoso sistêmico, linfomas, coagulação intravascular disseminada, hiperesplenismo, trombocitopenia induzida por droga.

Definiu-se como Púrpura Trombocitopênica Idiopática aguda, quando a contagem de plaquetas foi inferior a $150.000/mm^3$ e normalizou-se até 6 meses de evolução. Definiu-se como Púrpura Trombocitopênica Idiopática crônica quando o número de plaquetas permaneceu inferior a $150.000/mm^3$ por mais de 6 meses (Karparkin, 1985).

2.3 Coleta do material

Alíquotas de 10 ml de sangue dos pacientes ou dos controles foram coletadas em seringa plástica descartável, sem anticoagulante. O sangue foi transferido para um frasco de vidro e mantido à temperatura ambiente até a retração do coágulo. Após a separação do soro por centrifugação, alíquotas de 1 ml de soro foram distribuídas em frascos de vidro e armazenadas a $-70^{\circ}C$ até o momento do uso.

2.4 Quantificação de imunoglobulinas circulantes

Para quantificar as imunoglobulinas séricas, foi utilizado o método de imunodifusão radial (Mancini et alii, 1965) segundo normas do fabricante (Laboratório Hoechst-Behring). Desta forma, alíquotas de 5 microlitros de

soro padrão, soro controle ou soro de pacientes com PTI foram colocados em placas de imunodifusão radial (Behring Nor-Partigen, W. Germany) contendo anti-IgG, anti-IgM ou anti-IgA em concentrações cujo limite de dosagem era 2,50 a 37,7 g/l para IgG, 0,32 a 4,83 g/l para IgM e 0,42 a 6,34 g/l para IgA. Após a incubação durante 2 dias para IgG e IgA e 5 dias para IgM à temperatura ambiente, o diâmetro dos halos de precipitação foi medido com régua apropriada. As amostras de soros padrão com concentrações conhecidas de IgG (660, 1200 e 2550 mg%), de IgM (55, 90 e 316 mg%) e de IgA (132, 235 e 520 mg%) foram utilizadas para construção de uma curva padrão onde o diâmetro do halo de precipitação em milímetros foi colocado na ordenada e o valor da concentração de imunoglobulinas em mg% foi colocado na abscissa conforme demonstrado na Figura 2, em Resultados.

A concentração de cada amostra foi determinada através da curva padrão, encontrando-se a concentração correspondente através da medida do diâmetro formado pelas amostras examinadas nas placas de imunodifusão radial. Todos os testes foram realizados em duplicata.

2.5 Precipitação de imuno-complexos

Os imuno-complexos foram preparados pela técnica de precipitação de soro com polietileno-glicol (PEG) 7% (Sigma Chemical Company, St. Louis) segundo instruções descritas por Hasková et alii (1978) e modificadas por Walsh et alii (1984). Os soros de pacientes com PTI ou soros de indivíduos normais (controles) foram diluídos 1:20 em tampão borato de sódio 0,1 M, pH 7,4. Quantidades de 5 ml de soro diluído foram precipitadas com volumes iguais de polietileno-glicol (PEG) a 7% em salina fosfatada (PBS), gota a gota com agitação constante. Após a precipitação, a mistura foi deixada em repouso a 4°C durante 18 horas. O precipitado foi separado por centrifugação a 2500 g durante 15 minutos, lavado 2 vezes com PEG a 7% em PBS e redissolvido em 40 microlitros de PBS 0,01 M, pH 7,2-7,4. As proteínas, imunoglobulinas e C₃ foram determinados no precipitado conforme descrito a seguir.

2.6 Determinação de proteínas

A concentração das proteínas foi determinada empregando-se a reação de biureto, segundo o método de Weichselbaun (1946).

2.7 Titulação de anticorpos não marcados

A determinação do título de anticorpo foi realizada através da técnica de Ouchterlony (1958). Lâminas de microscopia (12x76 mm) foram recobertas com 3 ml de ágar a 1% em NaCl 0,15 M, formando uma camada de espessura homogênea. Após a solidificação do ágar, em cada lâmina foram feitos orifícios centrais que foram preenchidos com soro padrão contendo IgG, IgM e IgA ou C₃ nas concentrações de 100 e 500 microgramas. Os 6 orifícios externos foram preenchidos com soros anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA e anti-C₃ total e nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, para se verificar a melhor diluição do anti-soro a ser usada na quantificação de imunoglobulinas e C₃. As lâminas foram conservadas em câmara úmida, no refrigerador por 2 dias para IgG, IgA e C₃ e por 5 dias para IgM observando-se então a formação de linhas de precipitação. A seguir, as lâminas foram lavadas com salina 0,15 M a fim de se eliminar do gel as proteínas em excesso que não precipitaram. Após a lavagem com salina, as lâminas foram lavadas em água destilada por 1 hora, secas na estufa a 37°C e coradas com azul de Comassie.

2.8 Determinação da quantidade de imunoglobulinas e C₃ no soro precipitado com polietileno-glicol 7%

A quantidade de imunoglobulinas e C₃ no soro precipitado com PEG 7% (Sigma Chemical Company, St. Louis) foi determinada por imunodifusão radial em ágar, utilizando-se anti-soros anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA e anti-C₃ (Sigma Chemical Company, St. Louis) diluídos 1:20 segundo técnica descrita por Mancini et alii (1965).

Três concentrações diferentes de cada um desses soros (Hoechst/-Behring) foram utilizadas como padrão: 720, 1320 e 2600 mg% para IgG; 66, 168 e 316 mg% para IgM; 142, 270 e 502 mg% para IgA; 53, 90 e 183 mg% para C₃ conforme demonstrado na Figura 4, em Resultados.

2.9 Preparação de plaquetas

2.9.1 Plaquetas normais

Para o teste de imunofluorescência da suspensão plaquetária, a fim de verificar a presença de anticorpo anti-plaqueta, foi usado plasma rico em plaquetas (PRP) do grupo "O", colhido em bolsa de sangue contendo ACD (ácido cítrico, citrato, dextrose) como anticoagulante, e coletado de voluntários sadios pelo Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. As bolsas de sangue contendo PRP foram armazenadas à temperatura ambiente até o momento de uso, o que não ultrapassou 5 dias, visto ser a data limite para viabilidade celular.

2.9.2 Preparo da coluna com Sepharose 2-B

Baseado na técnica de Tangen et alii (1972), Sepharose 2-B (Pharmacia Fine Chemicals, Montreal) foi lavada 3 vezes com volume igual de acetona e então lavada com salina isotônica pH 7,0 usando um funil de Buchner com vácuo até a acetona evaporar-se completamente. Foi adicionado ao gel 10 ml de salina e a coluna montada em seringa plástica descartável de 20 ml. Um pequeno círculo de algodão serviu de filtro. O gel foi lavado com 75 ml de salina isotônica pH 7,0, antes do fracionamento das plaquetas.

2.9.3 Purificação de plaqueta normal com Sepharose 2-B

O plasma rico em plaqueta normal do grupo "O" foi centrifugado e o sobrenadante removido para ajustar a concentração plaquetária em 1000×10^9 /litro. O plasma rico em plaqueta (1 ml) foi aplicado na coluna de Sepharose 2-B e assim que a amostra penetrou totalmente no gel, foi adicionado 20 ml de salina e o material foi eluído num fluxo de 2 ml/minuto. Frações de 2 ml foram coletadas. As frações contendo plaquetas foram reunidas. Raríssimos leucócitos estavam presentes. O efluente foi deixado sedimentar durante 10 minutos e as plaquetas livres de hemácias foram removidas para outro tubo obtendo-se uma recuperação final de aproximadamente 65%. A morfologia das plaquetas era normal quando examinadas em microscopia comum. Toda a manipulação foi realizada com material plástico.

2.9.4 Preparo das plaquetas normais

O preparo das plaquetas normais utilizadas no teste de imunofluorescência para detecção de anticorpo anti-plaqueta foi baseado na técnica de von dem Borne et alii (1978). O plasma rico em plaquetas (PRP) de 5 doadores normais do grupo "O" purificados em colunas de Sepharose 2-B, foram reunidos em frascos plásticos, centrifugados a 2800 g durante 20 minutos a 20°C e lavados 3 vezes com PBS/EDTA pH 7,4. Em seguida, as plaquetas foram ressuspensas em 3 ml de paraformaldeído 1%, em PBS, durante 5 minutos à temperatura ambiente a fim de serem fixadas. Para retirar o excesso de paraformaldeído, após este procedimento, as plaquetas foram lavadas em PBS/EDTA contendo 1% de BSA e ressuspensas. O número de plaquetas foi ajustado para 10×10^8 /ml e usadas no mesmo dia do preparo.

2.9.5 Contagem das plaquetas

Esta técnica foi utilizada tanto para contagem de plaquetas dos pacientes com diagnóstico de púrpura, como para plaquetas normais utilizadas no teste de imunofluorescência. Da suspensão contendo plaquetas, diluída em oxalato de amônia 1%, foi determinado seu número segundo Brecher & Cronkite (1950). Para isso, primeiramente aspirou-se oxalato de amônia 1% com uma pipeta de Thomas de contagem de hemácias até a marca 0,5. A seguir, foi introduzido PRP mediante aspiração até que o nível de oxalato de amônia atingisse a marca 1. O volume de PRP foi, pois, de 0,5. Em seguida, completou-se com oxalato de amônia 1% até a marca 100 para obter-se uma diluição 1:200. Agitou-se a pipeta durante 3 minutos e depois de descartar as 2 primeiras gotas, encheu-se a câmara de Newbauer. Após sedimentação por 20 minutos, contou-se em microscópio de contraste de fase as plaquetas situadas em 5 quadrados centrais. Se N é o número de plaquetas contadas, $N \times 10.000$ é o número de plaquetas por milímetro cúbico.

2.10 Titulação de anticorpos marcados com FITC

A diluição ótima dos soros anti-IgG, anti-IgM e anti-IgA marcados com FITC (Sigma Chemical Company, USA) que foram utilizados no

teste de imunofluorescência para anticorpo anti-plaqueta, foi determinada por titulação com várias diluições destes anti-soros. Para isso, foram utilizados soros de pacientes com β -talassemia homozigótica que receberam transfusões múltiplas como controle positivo e soro AB normal como controle negativo, adsorvidos em plaquetas normais do grupo "O", fixadas em paraformaldeído 1%, em PBS. A diluição ótima dos soros anti-IgG, anti-IgM e anti-IgA marcados com FITC (Sigma Chemical Company, USA) foi de 1:20. Nesta diluição, todos os anti-soros evidenciaram fluorescência máxima com o soro de paciente com β -talassemia homozigótica contendo anticorpo anti-plaqueta, mas nenhuma fluorescência com o soro AB normal, para todos os reagentes testados.

2.11 Imunofluorescência da suspensão plaquetária

Com o objetivo de se detectar anticorpos anti-plaquetários segundo a técnica de von dem Borne (1978), alíquotas de 0,1 ml da suspensão de plaquetas normais (10×10^8 /ml), fixadas com paraformaldeído 1%, em PBS, foram incubadas com 0,1 ml de soro controle ou de paciente com PTI durante 30 minutos a 37°C. Após a incubação, as plaquetas foram lavadas 3 vezes com PBS/EDTA e incubadas com 0,1 ml de antiglobulina marcada com FITC diluída 1:20 em PBS contendo 0,2% de BSA durante 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas 2 vezes em PBS/EDTA e ressuspensas em glicerina-PBS (3:1) e em seguida montadas em lâminas de microscopia cobertas com lamínula, para ser examinada em microscópio de imunofluorescência (Carl Zeiss) com epi-iluminação. As plaquetas positivas mostraram um anel ou pontos fluorescentes como padrão. A reação de imunofluorescência foi considerada negativa quando menos que 5% das plaquetas eram fluorescentes e como positiva quando mais que 95% das plaquetas eram fluorescentes.

3 Resultados

3.1 Caracterização clínica dos pacientes

A caracterização clínica da população de 28 crianças foi realizada segundo critérios descritos em Material e Métodos. O diagnóstico definitivo revelou a existência de 14 formas agudas e 14 formas crônicas de PTI nessa população, com apenas 1 paciente possuindo antecedentes familiares da doença (Tabela 2). A ocorrência prévia de infecções virais em pacientes com PTI tem sido relacionada com modificações antigênicas de plaquetas. Este fato nos levou a pesquisar a ocorrência de infecções prévias na população estudada. Resultados apresentados na Tabela 3 demonstram a existência de 5 casos com infecções virais entre 8 pacientes com PTI aguda e 5 entre 12 pacientes com PTI crônica dos 20 pacientes analisados.

A contagem de plaquetas sangüíneas, um exame laboratorial importante e confirmativo dessa doença, foi realizada nos pacientes com PTI no momento do diagnóstico. Dados apresentados na Figura 1 revelam que contagens entre 60.000 a 120.000/ mm^3 foram mais freqüentes entre os pacientes com a forma aguda da púrpura e menos de 30.000/ mm^3 em pacientes com a forma crônica.

Tabela 2: Distribuição dos 28 pacientes com Púrpura Trombocitopênica Idiopática segundo a evidência de antecedentes familiares de Púrpura Trombocitopênica Idiopática (HC/UNICAMP, 1984/1985).

	n ^o de pacientes com PTI aguda	n ^o de pacientes com PTI crônica	total
com antecedentes	1	—	1
sem antecedentes	13	14	27
TOTAL	14	14	28

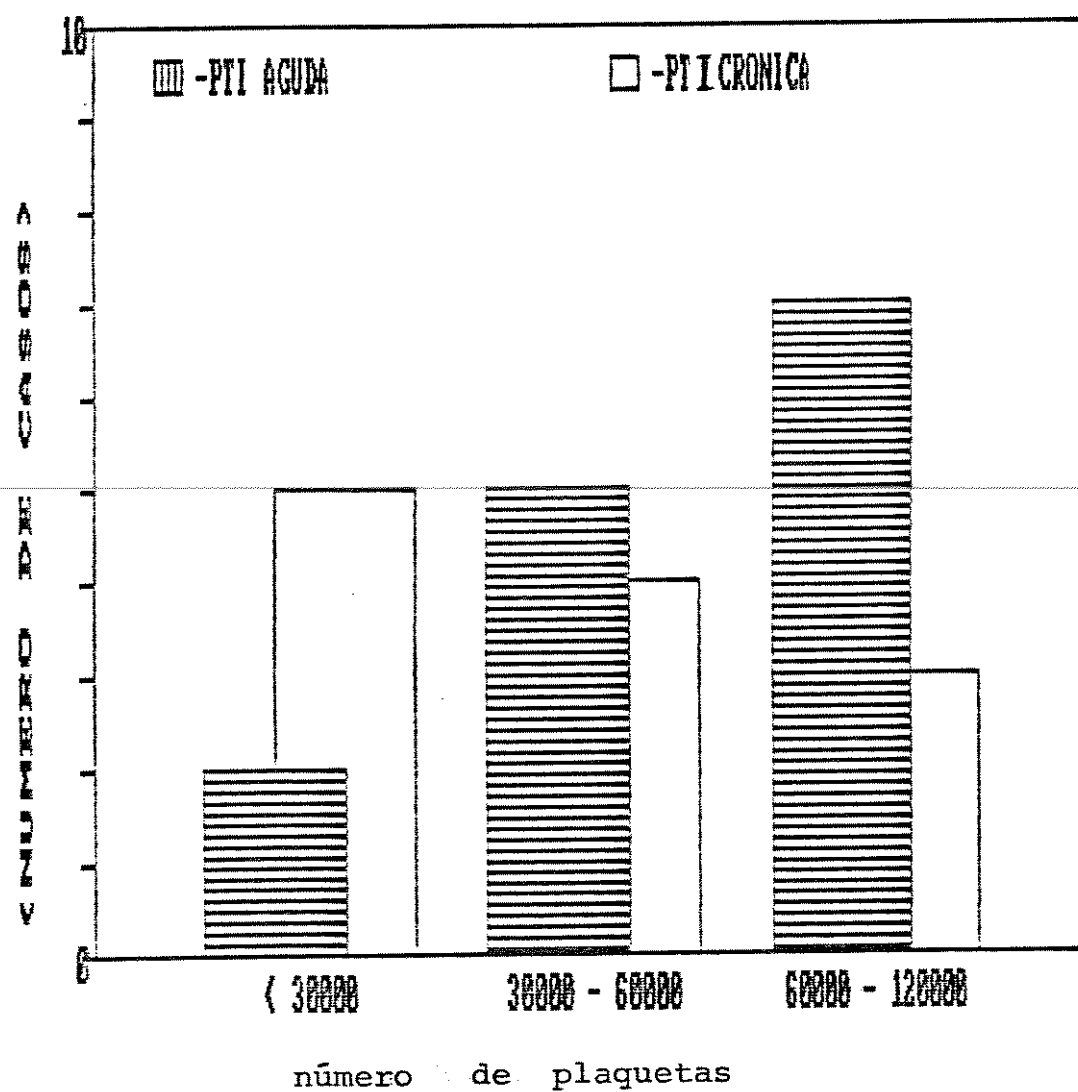


Figura 1: Contagem de plaquetas em 14 pacientes com PTI aguda e 12 pacientes com PTI crônica (HC/UNICAMP 1984/1985).

Tabela 3: Distribuição de 20 pacientes com Púrpura Trombocitopênica Idiopática, segundo a evidência de infecção prévia à instalação de Púrpura Trombocitopênica Idiopática (HC/UNICAMP, 1984/1985).

pacientes:	nº de pacientes com PTI aguda	nº de pacientes com PTI crônica	total
com infecção	5 (62,5)*	5 (41,7)	10
sem infecção	3 (37,5)	7 (58,3)	10
TOTAL	8	12	20

* Percentagem de casos

3.2 Alteração dos níveis de imunoglobulinas em pacientes com PTI

Com o objetivo de se quantificar as imunoglobulinas séricas dos pacientes, o método de imunodifusão radial segundo Mancini et alii, 1965, foi utilizado conforme descrito em Material e Métodos. A curva padrão das dosagens de imunoglobulinas circulantes encontra-se na Figura 2.

Os resultados obtidos quanto às dosagens de imunoglobulinas séricas de pacientes com PTI aguda, crônica e grupo controle, acham-se apresentados nas Tabelas 4, 5, 6 e 7 e na Figura 3. Pode-se verificar nas Tabelas 4 e 5, as concentrações individuais (mg/100 ml de soro) de IgG, IgM e IgA em 28 pacientes (Tabela 4) e em 30 indivíduos normais (Tabela 5). Os valores apresentados nessas tabelas representam médias de pelo menos 2 determinações por indivíduo. A média da concentração de imunoglobulinas séricas em pacientes e grupo controle, juntamente com o desvio padrão (DP) estão apresentadas na Tabela 6. A comparação desses valores nos casos crônicos e agudos da doença está demonstrada na Tabela 7.

Embora 11 pacientes (Tabela 4) tenham demonstrado concentrações de IgG menores que a média dos controles, a média da concentração de IgG por paciente (N=28) era $\pm 473,3$ mg% maior que o controle (1103,9 mg% - Tabela 6). Os resultados apresentados nesta tabela demonstram

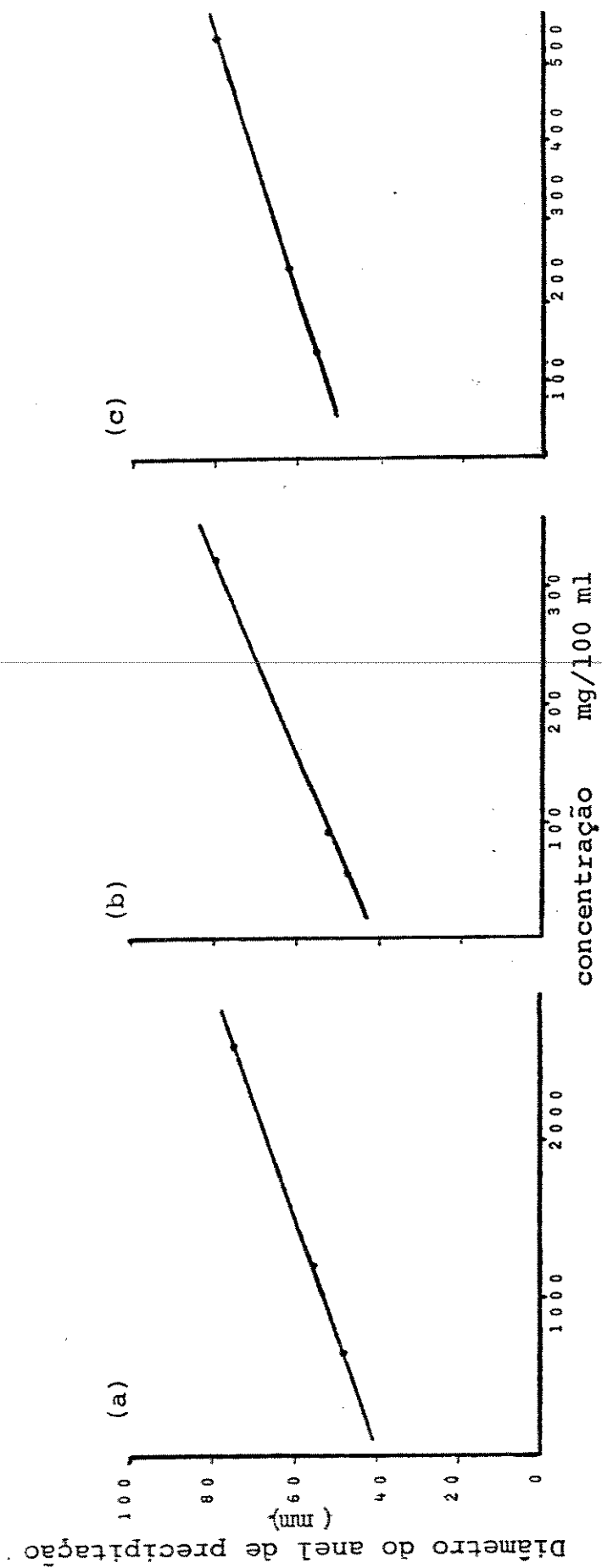


Figura 2:Curvas padrão das dosagens de imunoglobulinas circulantes: (a) IgG, (b) IgM e (c) IgA.

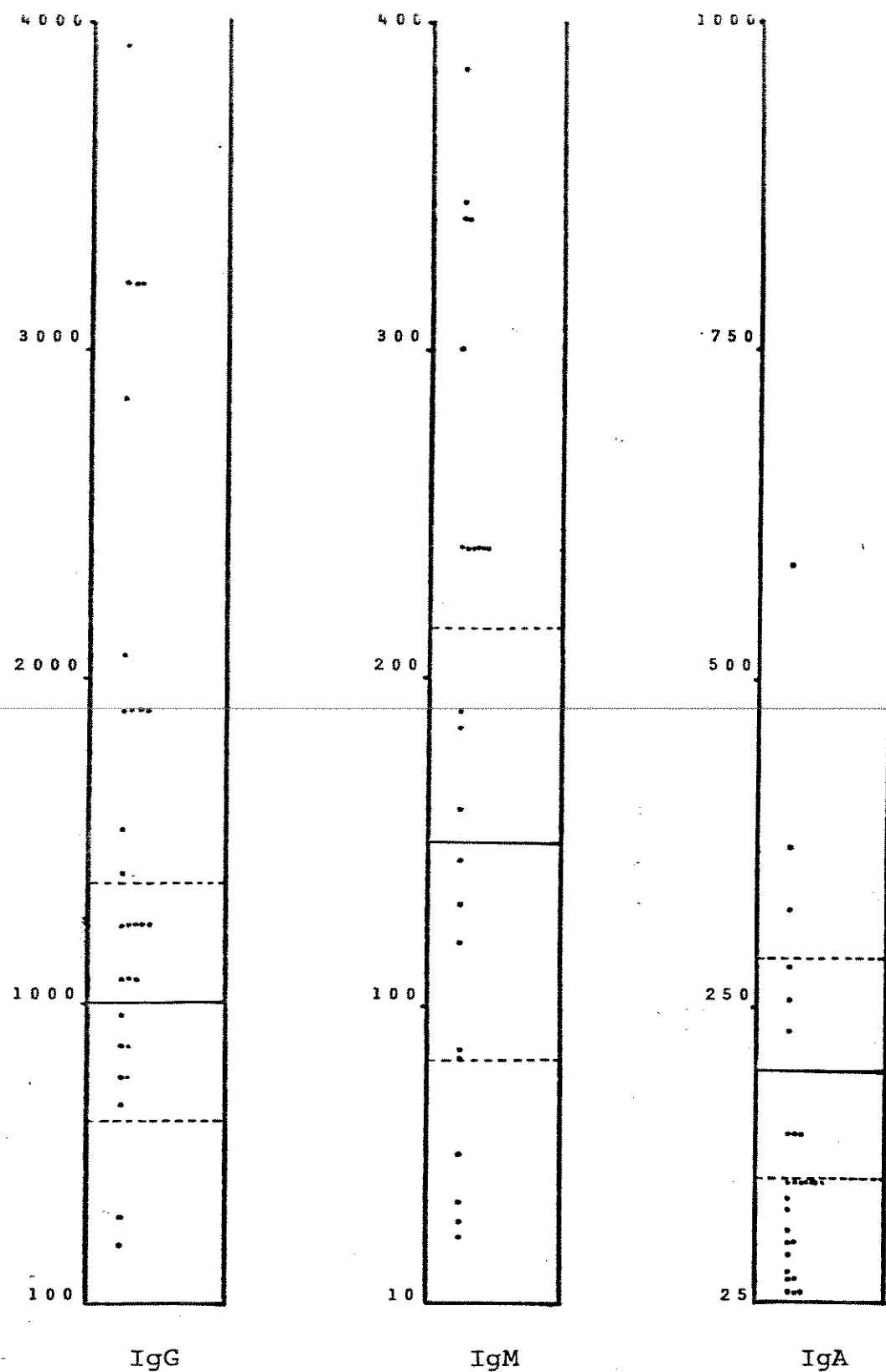


Figura 3. Níveis de imunoglobulinas séricas (IgG, IgM e IgA) em pacientes com Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI). Representação gráfica: média dos controles —; desvio padrão ---; concentração das imunoglobulinas nos diferentes pacientes (mg/100 ml).

Tabela 4: Média de 2 determinações de imunoglobulinas séricas (IgG, IgM e IgA) em 28 pacientes com Púrpura Trombocitopênica Idiopática (HC/UNICAMP, 1984/1985).

INDIVÍ DUOS	IDADE		SEXO	FORMA CLÍNICA	Concentração em mg/100 ml		
					IgG	IgM	IgA
1	1a	1m	M	aguda	780	300	33
2	8a		M	aguda	1535	131	154
3	1a	3m	F	aguda	290	55	33
4	11a		F	aguda	780	42	47
5		5m	M	aguda	360	32	33
6	2a	8m	F	aguda	1250	243	118
7	5a		M	aguda	1250	90	588
8	3a		F	aguda	1900	160	118
9	4a		M	aguda	880	146	70
10	3a		F	aguda	1900	243	118
11	5a		M	aguda	1090	191	105
12	2a		F	aguda	3204	NR	233
13	9a		F	aguda	3916	NR	326
14	8a		M	aguda	3204	NR	372
15	5a		F	crônica	980	35	60
16	9a		M	crônica	2080	88	78
17	6a		F	crônica	1400	390	91
18	2a		M	crônica	1250	243	118
19	7a		M	crônica	1090	124	154
20	4a		F	crônica	1900	243	118
21	3a		F	crônica	880	341	70
22	13a		F	crônica	700	243	42
23	5a		F	crônica	1090	184	154
24	6a		F	crônica	1900	339	118
25	3a		F	crônica	1250	339	42
26	13a		F	crônica	1250	243	118
27	14a		F	crônica	3204	NR	279
28	7a		M	crônica	2848	NR	256

NR = não realizado

Tabela 5: Média de 2 determinações de imunoglobulinas séricas (IgG, IgM e IgA) em 30 crianças normais (HC/UNICAMP, 1984/1985).

Indivíduos	IDADE	SEXO	Concentração em mg/100 ml		
			IgG	IgM	IgA
1	5a	M	1300	145	180
2	1a	M	720	76	100
3	14a	M	1850	200	330
4	11a	M	1600	160	310
5	3a	M	1100	120	160
6	4a	M	960	130	200
7	10a	M	1200	130	150
8	4a	M	1000	140	132
9	1a	M	880	74	110
10	5a	M	1100	94	130
11	7m	M	698	47	170
12	8a	M	880	86	180
13	10a	F	1350	180	150
14	10a	M	1750	180	125
15	9a	M	1550	70	250
16	6a	F	1000	180	200
17	10a	M	1200	100	370
18	5a	M	1050	160	150
19	4a	F	920	140	160
20	9a	M	920	200	300
21	3a	F	1300	120	100
22	3a	F	860	94	240
23	6a	F	1250	180	260
24	2a	F	850	112	130
25	2a	F	900	130	150
26	1a	F	450	95	104
27	2a	F	930	80	80
28	4a	F	1600	140	180
29	7a	F	930	120	185
30	7a	M	1020	100	230

Tabela 6: Média aritmética \pm desvio padrão da determinação de imunoglobulinas séricas (IgG, IgM e IgA) em 28 pacientes com Púrpura Trombocitopênica Idiopática comparados aos observados em 30 crianças normais, * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ (HC/UNICAMP, 1984/1985).

Diagnóstico	Concentração em mg/100 ml		
	IgG	IgM	IgA
Pacientes com PTI (N = 28)	1577,2* $\pm 932,5$	193,3* $\pm 107,9$	144,1** $\pm 124,7$
Indivíduos normais (N = 30)	1103,9 $\pm 323,2$	126,1 $\pm 41,1$	180,5 $\pm 76,2$

também que 7 pacientes apresentaram níveis de IgM menor que a média dos controles (126,1 mg%) mas, a média de IgM por paciente era 67,2 mg% maior que nos controles. Ao contrário dos achados sobre IgG e IgM podemos observar (Tabela 4) que os mesmos pacientes demonstraram IgA bastante diminuída em relação aos controles, com exceção de 4 pacientes com os níveis de sua imunoglobulina acima da média dos controles (180,5 mg% - Tabela 6).

Os dados apresentados na Tabela 6 foram obtidos pela análise global de todos os pacientes, independentemente da forma clínica da doença e mostram as médias de IgG, IgM e IgA. Pode-se observar, claramente, altas concentrações de IgG e IgM e baixos níveis de IgA nos pacientes quando comparados com indivíduos normais.

Em relação à IgA, no grupo de crianças com PTI, a média das concentrações séricas foi de 144,1 e o desvio padrão de 124,7 mg% (Tabela 4). Em apenas 2 pacientes os valores encontrados foram superiores à média dos controles mais 2 desvios padrão, como é mostrado nas Tabelas 4 e 6. No grupo de crianças sadias, a média e o desvio padrão das concentrações séricas de IgA foram respectivamente 180,5 e 76,2 mg% (Tabela 6).

Os resultados das concentrações séricas de IgG, IgM e IgA nos pacientes estratificados em PTI aguda e crônica, encontram-se resumidos

Tabela 7: Média aritmética \pm desvio padrão da determinação de imunoglobulinas séricas (IgG, IgM e IgA) em 14 pacientes com a forma aguda e 14 pacientes com a forma crônica de Púrpura Trombocitopênica Idiopática comparadas aos observados em 30 crianças normais, * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ (HC/UNICAMP, 1984/1985).

Diagnóstico	Número de indivíduos	Concentração em mg/100 ml		
		IgG	IgM	IgA
PTI AGUDA	14	1595,6* $\pm 1120,3$	148,5* $\pm 89,5$	167,7* $\pm 161,2$
PTI CRÔNICA	14	1558,7** $\pm 768,4$	234,3** $\pm 110,2$	121,3** $\pm 71,8$
CONTROLES	30	1103,9 $\pm 323,2$	126,1 $\pm 41,1$	180,5 $\pm 76,2$

na Tabela 7. Pode-se observar que as concentrações de IgG nos dois grupos são quase iguais, embora mostrem uma elevação de pelo menos 41,2% acima do controle. Embora o nível de IgM no grupo de pacientes com a forma aguda da doença se encontre 36,6% menor que no grupo com PTI crônica, ambos apresentam aumentos respectivos de 17,6% e 85,8% acima dos controles. O nível de IgA no grupo com a forma aguda mostra uma elevação de 38,2% acima do grupo com a forma crônica, apresentando os dois grupos um decréscimo de respectivamente 7,0% e 32,8% abaixo dos níveis observados nos indivíduos normais.

3.3 Anticorpos com especificidade anti-plaquetária nos soros dos pacientes com PTI

Com o objetivo de se verificar a presença de anticorpos anti-plaquetas em pacientes com PTI, o método de imunofluorescência segundo von dem Borne (1978) foi utilizado conforme descrito em Material e Métodos.

Os resultados obtidos acham-se resumidos na Tabela 8. Pode-se

Tabela 8: Reação de imunofluorescência dos soros dos 28 pacientes com Púrpura Trombocitopênica Idiopática adsorvidos em plaquetas normais e revelados com anti-imunoglobulinas marcadas com FITC (HC/UNICAMP, 1984/1985).

Anticorpos fluorescentes	Número de pacientes reativos	% dos casos posi- tivos na população
Anti-IgG	5	17,8
Anti-IgG e anti-IgM	12	42,9
Anti-IgG e anti-IgA	2	7,2
Anti-IgG, anti-IgM e anti-IgA	5	17,8
Anti-IgM	1	3,6
Anti-IgA	0	0,0
TOTAL	25	89,3

observar que 25 pacientes dos 28 examinados, demonstraram reações positivas em imunofluorescência contra pelo menos um anticorpo marcado, o que indica que 89,3% dos pacientes possuíam anticorpo contra componentes da membrana de plaquetas normais.

3.4 Imuno-complexos e C_3

Com a finalidade de se verificar a presença de imuno-complexos nos soros dos pacientes com PTL, o método de precipitação com polietileno-glicol (PEG) a 7% em PBS (Walsh et alii, 1984), foi realizado. A análise dos componentes do material assim precipitado de soro de pacientes e de indivíduos normais foi realizada pela técnica de imunodifusão radial segundo Mancini et alii (1965) conforme descrito em Material e Métodos. As curvas padrão das dosagens de C_3 e imunoglobulinas encontram-se na Figura 4 e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 9, cujos valores correspondem à média da concentração de proteína, imunoglobulinas e C_3 em pacientes e controles, juntamente com o desvio padrão (DP). Pode-se

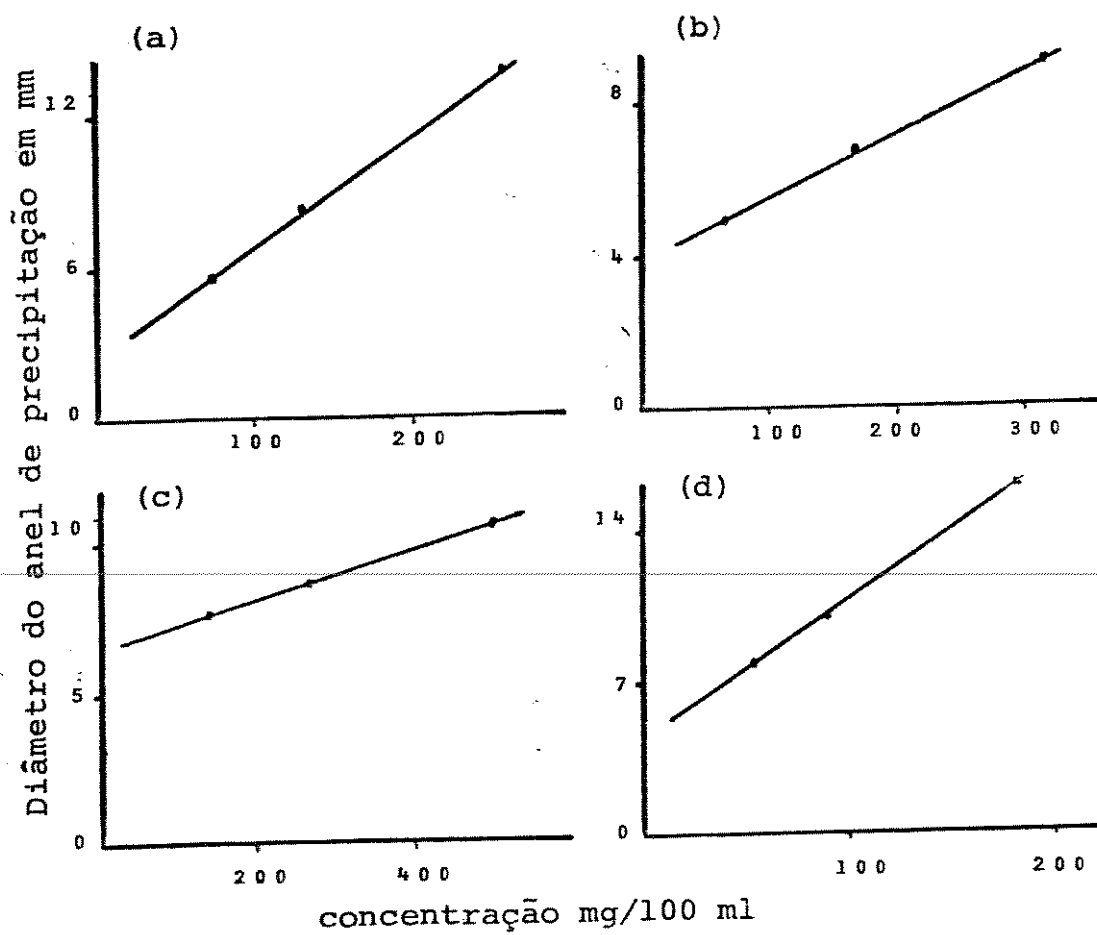


Figura 4. Curvas padrão das dosagens de imunoglobulinas (a - IgG, b - IgM e c - IgA) e C_3 (d), precipitadas com polietileno-glicol.

Tabela 9: Concentração de proteínas, imunoglobulinas e C₃ em imunocomplexos precipitados dos soros de pacientes (N = 28) e indivíduos normais (N = 30) (HC/UNICAMP, 1984/1985).

	Imuno- compl. mg/ml	IgG mg%	IgM mg%	IgA mg%	C ₃ mg%
PACIENTES	6,55 ±4,39	1401,9 ±434,5	177,2 ±92,6	294,3 ±121,3	64,8 ±29,6
CONTROLES	7,25 ±4,28	1638,5 ±509,3	195,3 ±119,6	340,4 ±140,7	66,1 ±32,1

observar claramente que a média da concentração de proteínas por paciente (N=28) era $\pm 0,7$ mg/ml menor que o controle (7,25 mg/ml). As médias das concentrações de IgG, IgM e IgA por paciente (N=28) eram de $\pm 236,6$, 18,1 e 46,1 mg% respectivamente menores que os controles 1638,5, 195,3 e 340,4 mg%. Quanto ao C₃, observa-se na mesma tabela que nos imunocomplexos precipitados dos soros, a média da concentração por paciente (N=28) era apenas 1,3 mg% menor que o controle (66,1 mg%).

4 Discussão

O presente trabalho mostra uma maior incidência da Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI), em crianças ocorrendo entre 2 a 6 anos de idade (Tabela 4). Este achado confirma resultados obtidos anteriormente por Lusher & Iyer (1977).

O predomínio do sexo feminino foi observado na população estudada de 28 crianças com PTI, embora alguns autores não tenham encontrado diferenças numéricas entre os dois sexos (Ortega et alii, 1977 e Nieves et alii, 1983). Uma das características dessa doença é a baixa contagem de plaquetas, o que foi também observado em nosso trabalho, onde 61,5% da população estudada demonstrou contagens inferiores a $60.000/mm^3$. Contagens abaixo de $30.000/mm^3$ foram verificadas nas formas crônicas e entre $60.000-120.000/mm^3$ nas formas agudas (Figura 2).

No grupo de pacientes analisado no presente estudo, foi evidenciado que 50% dos mesmos apresentaram a forma aguda da doença, recuperando a níveis normais suas contagens de plaquetas num período inferior a 6 meses. Este dado foi obtido uma vez que os pacientes foram acompanhados por um grande centro hematológico especializado, onde um maior número de pacientes com PTI crônica são encaminhados visto que a PTI crônica é mais dificilmente tratada e os pacientes não apresentam recuperação ou mesmo melhora clínica num período de 6 meses.

Quanto à etiologia da PTI, a infecção viral tem sido apontada como uma das causas dessa doença (Lusher & Zuelzer, 1966). De fato, em nossos estudos, 35,7% dos pacientes apresentaram antecedente de infecção viral, algumas semanas antes das manifestações clínicas de PTI (Tabela 3). Estes dados aproximam-se dos obtidos por Karparkin & Karparkin (1981), que relataram a existência de um histórico de infecção viral em mais que 50% dos pacientes examinados.

Embora alguns autores (McIntosh et alii, 1981) sugiram o envolvimento de fatores genéticos na etiologia da PTI, nossos dados demonstram a existência de apenas 1 paciente com antecedentes familiares na população estudada (Tabela 2).

Quanto à avaliação de imunoglobulinas séricas nas 28 crianças com PTI estudadas, demonstrou-se um aumento significativo nos níveis de IgG, tanto nas formas agudas como nas formas crônicas da doença (Tabela 5).

Embora estes dados sejam diferentes dos resultados obtidos por Khalifa et alii (1976), onde se observou níveis diminuídos de IgG, estes estão de acordo com dados obtidos em trabalhos recentes (Bailén et alii, 1983). Quanto às imunoglobulinas da classe IgM, encontrou-se uma elevação significativa na sua concentração, no grupo de pacientes pesquisados tanto em casos agudos como crônicos, sendo muito mais acentuada nas formas crônicas, o que está em concordância com os trabalhos de Khalifa et alii (1976) e Bailén et alii (1983). Entretanto, os níveis de IgA nesses pacientes eram baixos quando comparados com indivíduos normais, confirmando assim dados obtidos em outros trabalhos (Khalifa et alii, 1976 e Bailén et alii, 1983), sendo esta característica mais significativa em pacientes com PTI crônica. O nível aumentado de IgA encontrado por Rabasa et alii (1984) talvez possa ser atribuído ao fato da nefelometria ter sido a técnica utilizada. Embora estudos populacionais anteriores (Amman & Hong, 1970) tenham demonstrado uma incidência de deficiência de IgA entre 0,10% e 0,14%, a mesma incidência por nós na população aqui estudada, foi de 39,3%.

Os níveis de imunoglobulinas séricas (IgG, IgM, IgA), em crianças com PTI, comentados anteriormente, sugerem a existência de um estímulo ou desregulação na resposta imune humoral. Conclusões semelhantes foram relatadas por Rabasa et alii (1984). Entretanto, a alta incidência de PTI crônica com deficiência de IgA sérica, na população por nós estudada (39,3%, Tabelas 4 e 6)) encontra apoio no trabalho de Khalifa et alii (1976). Este fato tem sido apontado como um fator diagnóstico importante, isto é, a cronicidade desta doença pode ser determinada pela deficiência de IgA sérica. Na realidade, o que deve ser questionado é se essa deficiência é uma causa ou uma consequência da doença. Alguns autores sugerem a existência de uma deficiência de IgA em muitos dos familiares destes pacientes, o que leva a pensar que tal deficiência seja anterior à evolução de PTI e que seja um fator que predisponha o indivíduo a contrair a doença (de la Torre et alii, 1982), visto que baixos níveis de IgA são também encontrados em outras enfermidades autoimunes (Zuelzer et alii, 1970).

O elevado nível de IgG e IgM em pacientes com PTI pode ser explicado pela existência de um fator humoral que estimula células B a produzirem anticorpos que por sua vez se ligam às glicoproteínas plaquetárias. As plaquetas, assim sensibilizadas, ligam-se aos monócitos e aos macrófagos, particularmente no baço, causando um aumento da destruição plaquetária.

A avaliação de anticorpos anti-plaqueta pelo método de imunofluorescência mostrou uma reação positiva no soro de 89,3% dos pacientes com PTI ativa (Tabela 8), o que é compatível com os resultados obtidos por outros métodos (Sintnicolaas et alii, 1987; Freedman et alii, 1985; Fabris et alii, 1985). Os 3 casos onde a reação de imunofluorescência foi negativa podem ser explicados pela baixa sensibilidade do método na presença de pequena quantidade de anticorpo no soro. Estas reações negativas sugerem também, que outros mecanismos além de autoanticorpos estejam envolvidos na plaquetopenia que acompanha a PTI.

A presença de anticorpos séricos anti-plaqueta em pacientes com PTI tem sido publicada por muitos pesquisadores empregando grande variedade de técnicas, mas, a vantagem da técnica de imunofluorescência utilizada neste trabalho sobre as demais é que as plaquetas são submetidas a um manuseio mínimo por filtração em gel, enquanto que as repetidas lavagens necessárias em outras técnicas podem resultar na formação de agregados plaquetários e ligação inespecífica de imunoglobulina. A técnica de imunofluorescência permite a identificação microscópica específica de plaquetas, enquanto que os métodos de contagem plaquetária podem incluir outras células contaminantes, como por exemplo, linfócitos, especialmente quando a plaquetopenia é severa. Uma outra vantagem é que a natureza imunológica, isto é, classes e subclasses, dos anticorpos anti-plaqueta pode ser determinada simplesmente lançando mão de anti-imunoglobulinas marcadas com FITC (von dem Borne, 1978).

No presente trabalho, encontrou-se que as imunoglobulinas ligadas às plaquetas eram principalmente IgG associada com IgM (42,9%), IgG associada com IgA (7,2%), IgG com IgM e IgA (17,9%), IgG sozinho (17,9%) e IgM sozinho (3,6%), conforme demonstrado na Tabela 8, em Resultados.

Entretanto, não está claro como a imunofluorescência inespecífica é inibida pelo formaldeído usado nesta técnica. A fluorescência inespecífica de plaquetas é provavelmente causada pela ligação de imunoglobulinas normais à superfície plaquetária (Dixon et alii, 1975). Provavelmente, o paraformaldeído liga-se covalentemente aos grupos amino das proteínas da membrana, podendo causar um aumento na carga negativa inibindo então, a ligação não imune de imunoglobulinas. Uma possibilidade alternativa é que o paraformaldeído inative receptores Fc que estão presentes normalmente na superfície da plaqueta. Conforme Verheugt et alii (1977), a

fixação com paraformaldeído não impede a ligação de anticorpos. A capacidade das plaquetas fixadas ou não com paraformaldeído de adsorverem especificamente anticorpos anti-plaqueta mostrou-se inalterada.

A presença de anticorpos séricos em níveis aumentados não é restrita a pacientes com PTI, lúpus eritematoso sistêmico ou isoimunização. Uma alta incidência desses anticorpos é observada também em pacientes com mononucleose infecciosa (Veenhoven et alii, 1980) e um terço dos pacientes com septicemia possuem títulos elevados de anticorpos anti-plaqueta e uma baixa contagem de plaquetas que por definição é trombocitopenia imune (Kelton, 1985). Parece que os testes indiretos de detecção de anticorpos anti-plaqueta, em soro de pacientes, são de limitado valor diagnóstico. Entretanto, alguns aspectos são de importância prática. Os anticorpos podem ser caracterizados como IgG, IgM ou IgA. Os anticorpos IgG são capazes de atravessar a placenta e esta caracterização pode ser importante no manuseio de pacientes grávidas com PTI.

Uma distinção de isoanticorpos e autoanticorpos em PTI pode ser de importância diagnóstica, por exemplo em pacientes com plaquetopenia que tenham recebido transfusão sangüínea. Veenhoven et alii (1980) encontraram diferenças entre estes anticorpos com respeito à fixação de complemento e afinidade por plaquetas, na presença de ACD ou EDTA. O soro de pacientes que receberam transfusões múltiplas, fixam C₁q com mais eficácia. Este fato, embora possa ser aparentemente explicado por distúrbios imunológicos a nível de sub-classes de imunoglobulinas, requer maior avaliação principalmente a nível das alterações antigênicas plaquetárias. Além disso, anticorpos anti-plaqueta nos pacientes com PTI têm uma grande afinidade por plaquetas colhidas com EDTA enquanto isoanticorpos têm igual afinidade para plaquetas na presença de ACD ou EDTA.

A possibilidade da plaquetopenia estar relacionada com o clareamento de imuno-complexos pelo sistema mononuclear fagocitário, conforme sugerido por Trent et alii (1980), nos levou a realizar uma avaliação desses imuno-complexos. Cada paciente foi testado para a presença de imuno-complexos no soro pelo método de precipitação com PEG 7% e posterior identificação dos seus constituintes através de imunodifusão radial (Tabela 9). O teste de imuno-complexo circulante realizado com este método, foi negativo em todos os pacientes estudados, ou seja, os valores obtidos estiveram sempre abaixo da média dos controles. Estes resultados estão em

concordância com resultados obtidos por outros autores (Walsh et alii, 1984; Ercilla et alii, 1982) e em desacordo com outros (Lurhuma et alii, 1977; Clancy et alii, 1980) que usaram o método de C_1q que é muito mais sensível. O significado fisiopatológico dessas observações em pacientes com PTI permanece duvidoso. Esta discrepância pode ser devida à metodologia empregada que provavelmente revela complexos com características diferentes. É importante ressaltar que no trabalho de Lurhuma et alii (1977) foi encontrado uma alta incidência de antígenos de hepatite B em pacientes com PTI com imuno-complexos circulantes. Estes resultados são independentes da presença de um teste de imunofluorescência positivo para o anticorpo anti-plaqueta. Endresen & Forre (1982), demonstraram que soro de pacientes com PTI contém anticorpos com especificidade para antígenos da superfície plaquetária, isto é, os anticorpos se ligam às plaquetas com sua porção Fab, enquanto soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico contém imuno-complexos circulantes que reagem com receptores Fc da plaqueta através da porção Fc dos anticorpos. Estes resultados sugerem que o mecanismo de plaquetopenia pode ser diferente em PTI e em doenças com imuno-complexos circulantes.

O diagnóstico de PTI é, na maioria das vezes feito por exclusão. Um teste, *in vitro*, que apresente valor diagnóstico para esta doença seria um avanço valioso. No entanto, o grande número de métodos para se detectar anticorpos anti-plaqueta que já foram propostos sugere que nenhum deles seja inteiramente satisfatório. Muitos avanços sobre o conhecimento da PTI foram obtidos apenas nas últimas décadas. A etiologia da doença ainda não foi completamente elucidada, mas as peças deste quebra-cabeça estão se encaixando, com implicações importantes para o diagnóstico e tratamento.

Para melhor compreensão do significado fisiopatológico das deficiências imunes encontradas nesses pacientes, principalmente aumentos de imunoglobulinas, torna-se necessário estudar os fatores que regulam a produção de anticorpos como interleucina 1 (IL-1) e interleucina 2 (IL-2). Devido aos fatos bem documentados, de que as células T supressoras devem se diferenciar para serem funcionalmente competentes (Siegal & Siegal, 1977) e de que quantidades reduzidas de IL-1 e IL-2 poderiam produzir expansão deficiente dessa população celular com síntese de imunoglobulinas

descontrolada, são necessários mais estudos abordando esses aspectos para que a caracterização imunológica da PTI seja definitivamente esclarecida.

5 Resumo e Conclusões

Os níveis de imunoglobulinas séricas (IgG, IgM e IgA), anticorpos anti-plaqueta, imunocomplexos e o terceiro componente do complemento (C_3) foram estudados numa população de 28 pacientes com Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI), utilizando-se uma população de 30 indivíduos normais, como controle. Após essas determinações concluiu-se que:

1. Os dados obtidos demonstraram claramente alterações nos níveis das imunoglobulinas séricas dos pacientes, quando comparados com os controles. Os níveis de IgG e IgM se encontram 473,3 mg% e 67,2 mg% respectivamente maiores nos pacientes do que nos controles, enquanto IgA se acha diminuída em torno de 36,4 mg%. A análise estatística dos valores de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA dos pacientes, comparados com indivíduos normais, realizadas pelo teste t de Student demonstrou que esses valores são altamente significativos.
2. A maioria dos pacientes estudados (89,3%) possui anticorpos contra componentes normais da membrana paquetária, evidenciados pela reação de imunofluorescência.
3. A pesquisa de imuno-complexos precipitados do soro de pacientes evidenciou decréscimo na concentração de IgG, IgM, IgA e C_3 , quando comparadas com seus equivalentes em indivíduos controles.

6 Referências Bibliográficas

- AMMAN, A. J. & HONG, R. – Selective IgA deficiency and autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* 7(6):833-8, 1970.
- BAILÉN, A.; DE LA TORRE, S.; DURAN-SUAREZ, J. R.; MARTIN, A.; BOTELLA, C. & MALDONADO, J. – Comportamiento de las inmunoglobulinas séricas en la Púrpura Trombocitopênica Idiopática infantil. *Sangre* 28(3): 280-5, 1983.
- BEARDSLEY, D. S.; SPIEGEL, J. E.; JACOBS, M. M.; HANDIN, R. I. & LUX IV, S. E. – Platelet membrane glycoprotein IIIa contains target antigens that bind anti-platelet antibodies in immune thrombocytopenias. *J. Clin. Invest.* 74: 1701-7, 1984.
- BERTOTTO, A.; AMICI, A.; ARCANGELI, C. D. F.; FABIETTI, G.; BIANCHI, S. & VACCARO, R. – T-cell phenotypes in children with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *A.J.D.C.* 138: 1086, 1984.
- BORKOWSKY, W. & KARPATKIN, S. – Leukocyte migration inhibition of buffy coats from patients with autoimmune thrombocytopenic purpura when exposed to normal platelets: modulation for transfer factor. *Blood* 63(1): 83-7, 1984.
- BRECHER, G. & CRONKITE, E. P. – Morphology and enumeration of human blood platelets. *J. Appl. Physiol.* 3: 365, 1950.
- BROWNSTONE, A.; MITCHISON, N. A. & PITT-RIVERS, R. – Chemical and serological studies with synthetic immunological determinant 4-hydroxy-3-iodo-s-nitrophenylacetic acid (NIP) and related compounds. *Immunology* 10: 465, 1966.
- CHAPLIN, H. – Autoimmune hemolytic anemia. *Arch. Intern. Med.* 137: 346-51, 1977.
- CHEUNG, N. K. V.; McFALL, P. & SCHULMAN, I. – A microtiter solid-phase radioimmunoassay for platelet-associated immunoglobulin G. *J. Lab. Clin. Med.* 101(3): 392-400, 1983.
- CINES, D. B. & SCHREIBER, A. D. – Immune thrombocytopenia: use of a Coombs antiglobulin test to detect IgG and C₃ on platelets. *N. Engl. Med.* 300(3): 106-11, 1979.

- CINES, D. B.; WILSON, S. B.; TOMASKI, A. & SCHREIBER, A. D. – Platelet antibodies of the IgM class in immune thrombocytopenic purpura. *J. Clin. Invest.* 75: 1183-90, 1985.
- CLANCY, R.; TRENT, R.; DANIS, V. & DAVIDSON, R. – Autosensitization and immune complexes in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin. Exp. Immunol.* 39: 170-5, 1980.
- CONNELLAN, J. M.; QUINN, M. & WILEY, J. S. – The use of I¹²⁵ labelled staphylococcal protein A in the diagnosis of autoimmune thrombocytopenic purpura and other immune mediated thrombocytopenias. *Pathology* 18: 111-6, 1986.
- DAGG, J. & LEE, F. D. – The blood and bone marrow, in Muir's Textbook of Pathology, pg. 504-59, edited by J. R. Anderson C. B. E., 1980.
- DE LA TORRE, S.; DURAN-SUAREZ, J. R.; BAILÉN, A.; MARTIN, A.; BOTELLA, M. C. & MALDONADO, J. – Dosificación de inmunoglobulinas en la Púrpura Trombocitopênica Idiopática del adulto. *Sangre* 27(5): 919-22, 1982.
- DIXON, R. H. & ROSSE W. F. – Platelet antibody in autoimmune thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* 31: 129-34, 1975.
- DIXON, R.; ROSSE, W. & EBBERT, L. – Quantitative determination of antibody in idiopathic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. Med.* 292(5): 230-6, 1975.
- ENDRESEN, G. K. M. & FORRE, O. – Studies on the binding of immunoglobulins and immune complexes to the surface of human platelet: IgG molecules react with platelet Fc receptors with the CH3 domain. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 67: 33-9, 1982.
- ERCILLA, M. G.; BORCHE, L.; VIVES, J.; CASTILLO, R.; GELABERT, A. & ROZMAN, C. – Circulating immune complexes in immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Br. J. Haematol.* 52: 679-82, 1982.
- FABRIS, F.; CASONATO, A.; CROCIANI, E.; ZANCHETTA, R.; BUSOLO, F. & GIROLAMI, A. – A new ELISA method for the detection of serum bindable anti-platelet antibodies (SPBIG). *Clin. Chim. Acta* 146: 223-8, 1985.

- FAIG, D. & KARPATKIN, S. – Cumulative experience with a simplified solid-phase radioimmunoassay for the detection of bound anti-platelet IgG, serum auto, allo and drug-dependent antibodies. *Blood* 60(4): 807-13, 1982.
- FOLLEA, G.; MANDRAND, B. & DECHAVANNE, M. – Simultaneous enzymo-immunologic assays of platelet associated IgG, IgM and C₃. A useful tool in assessment of immune thrombocytopenias. *Thromb. Res.* 26(4): 249-58, 1982.
- FREEDMAN, J.; CHEONG, T. & GARVEY, M. B. – Use of the indirect platelet radioactive antiglobulin test with anti-IgG and anti-C₃ thrombocytopenias. *Am. J. Hematol.* 18: 297-305, 1985.
- GANDOLFO, G. M.; AFELTRA, A.; DE RUGGIERI, M. A. & ERNANDEZ, M. A. – Determination of serum immunoglobulins in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Haemat.* 66: 113-6, 1981.
- GOUDEMAND, J. – Purpura thrombopénique idiopathique. *La Presse Médicale* 13(26): 1621-6, 1984.
- GUDINO, M. & MILLER, W. V. – Application of the enzyme linked immunospecific assay (ELISA) for the detection of platelet antibodies. *Blood* 57(1): 32-7, 1981.
- HANDIN, N. R. I. & STOSSELL, T. P. – Phagocytosis of antibody coated platelets by human granulocytes. *N. Engl. J. Med.* 290: 989-93, 1974.
- HARRINGTON, W. J.; MINNICH, V.; HOLLINGSWORTH, J. W. & MOORE, C. V. – Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J. Lab. Clin. Med.* 38: 1-10, 1951.
- HASKOVÁ, V.; KASLÍK, J.; RIHA, I.; MATL, I. & ROVENSKY, J. – Simple method of circulating immune complex detection in human sera by polyethylene glycol precipitation. *Z. Immun. Forsch.* 154: 399-406, 1978.
- HAUCH, T. W. & ROSSE, W. F. – Platelet-bound complement (C₃) in immune thrombocytopenia. *Blood* 50(6): 1129-36, 1977.
- HEDGE, U. M.; BALL, S.; ZUIABLE, A. & ROTER, B. L. T. – Platelet associated immunoglobulins (PAIgG and PAIgM) in autoimmune

- thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* 59: 221-6, 1985.
- HIRSCHMAN, R. J. & SHULMAN, N. R. – The use of platelet serotonin release as a sensitive method for detecting anti-platelet antibodies and a plasma anti-platelet factor in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* 24: 793-802, 1973.
- HYMES, K.; SCHULMAN, S. & KARPATKIN, S. – A solid-phase radioimmunoassay for bound anti-platelet antibody. *J. Lab. Clin. Med.* 94(4): 639-48, 1979.
- HYMES, K.; SCHUR, P. H. & KARPATKIN, S. – Heavy-chain subclass of bound anti-platelet IgG in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood* 56(1): 84-7, 1980.
- KAHANE, S.; DVILANSKY, A.; ESTOK, L.; NATHAN, I.; ZOLOTOV, Z. & SAROV, I. – Detection of anti-platelet antibodies in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and in patients with rubella and herpes group viral infections. *Clin. Exp. Immunol.* 44: 49-56, 1981.
- KARPATKIN, M. & KARPATKIN, S. – Immune thrombocytopenia in children. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 3: 213-9, 1981.
- KARPATKIN, M.; SISKIND, G. W. & KARPATKIN, S. – The platelet factor 3 immunoinjury technique re-evaluated. Development of a rapid test for anti-platelet antibody. Detection in various clinical disorders including immunologic drug-induced and neonatal thrombocytopenias. *J. Lab. Clin. Med.* 89(2): 400-8, 1977.
- KARPATKIN, S. – Autoimmune Thrombocytopenic Purpura. *Blood* 56(3): 329-43, 1980.
- KARPATKIN, S. – Autoimmune Thrombocytopenic Purpura. *Seminars in Hematology* 22(4): 260-88, 1985.
- KARPATKIN, S. & SISKIND, G. W. – In vitro detection of platelet antibody in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and systemic lupus erythematosus. *Blood* 33: 795-812, 1969.
- KARPATKIN, S.; STRICK, N.; KARPATKIN, M. B. & SISKIND, G. W. – Cumulative experience in the detection of anti-platelet antibody in 234 patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, systemic lupus erythematosus and other clinical disorders. *Am. J. Med.* 52: 776-85, 1972.

- KELTON, J. G. – Advances in the diagnosis and management of ITP. *Hospital Practice* 20(6): 95-107, 1985.
- KELTON, J. G.; DENOMME, G.; LUCARELLI, A.; GARVEY, J.; POWERS, P. & CARTER, C. – Comparison of the measurement of surface or total platelet-associated IgG in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Am. J. Haematol.* 18: 1-5, 1985.
- KELTON, J. G.; GILES, A.; NEAME, P. B.; POWERS, P.; HAGEMAN, N. & HIRSH, J. – Comparison of two direct assays of platelet-associated IgG (PAIgG) in assessment of immune and non-immune thrombocytopenia. *Blood* 55: 424-9, 1980.
- KELTON, J. G.; POWERS, P. J. & CARTER, C. J. – A prospective study of the usefulness of the measurement of platelet-associated IgG for the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 60(4): 1050-3, 1982.
-
- KELTON, J. G. & STEEVES, K. – The amount of platelet-bound albumin parallels the amount of IgG on washed platelets from patients with immune thrombocytopenia. *Blood* 60(1): 882, 1982.
- KERNOFF, M. – Influence of the amount of platelet-bound IgG on platelet survival and site of sequestration in autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 55(5): 730-3, 1980.
- KERNOFF, L. M.; MALAN, E. & KOSSEW, B. – Platelet-bound IgG measurements in idiopathic thrombocytopenic purpura. *South Africa Medical J.* 57: 435-41, 1980.
- KHALIFA, A. S.; LUSHER, J. M.; CEJKA, J. & ZUELZER, W. W. – Immunoglobulins in idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Acta Haemat.* 56: 205-11, 1976.
- LAURIA, F.; MANTOVANI, V.; CATOVSKY, D.; GUARINI, A.; GOBBI, M.; GUGLIOTTA, L.; MIRONE, E. & TURA, S. – T-cell deficiency in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Scand. J. Haematol.* 26(2): 156-60, 1981.
- LAWRENCE, H. S. – Transfer factor. *Adv. Immunol.* 11: 195-266, 1969.
- LAZARCHICK, J. & HALL, S. A. – Platelet-associated IgG assay using flow cytometric analysis. *J. Immunol. Meth.* 87: 257-65, 1986.

- LEONE, G.; LARocca, L. M.; SCRIBANO, D.; STORTI, S.; CAPUTO, G. & LANDOLFI, R. – T-lymphocyte subsets and platelet-associated IgG in idiopathic thrombocytopenic purpura: effect of splenectomy. *Acta Haemat.* 75: 83-8, 1986.
- LEPORRIER, M.; DIGHIERO, G.; AUZEMERY, M. & BINET, J. L. – Detection and quantification of platelet-bound antibodies with immunoperoxidase. *Br. J. Haematol.* 42: 605-11, 1979.
- LIGHTSEY, A. L. Jr.; KOENIG, H. M. & McMILLAN, R. – Platelet-associated immunoglobulin G in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *J. Pediatrics* 94(2): 201-4, 1979.
- LJUNG, R.; NILSSON, I. M.; FROHM, B. & HOLMBERG, L. – Platelet-associated IgG in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura: measurements on intact and solubilized platelets and after gammaglobulin treatment. *Scand. J. Haematol.* 36: 402-7, 1986.
- LoBUGLIO, A. F.; COURT, W. S.; MAGLOTT, A. B. G. & SHAW, G. M. – Immune thrombocytopenic purpura. Use of a I^{125} labelled anti-human IgG monoclonal antibody to quantify platelet-bound IgG. *N. Engl. J. Med.* 309(8): 459-63, 1983.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. – Protein measurement with the folin fenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-75, 1951.
- LUIKEN, G. A.; McMILLAN, R.; LIGHTSEY, A. L.; GORDON, P.; ZEVELY, S.; SCHULMAN, I.; GRIBBLE, T. J. & LONGMIRE, R. L. – Platelet-associated IgG in immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 50(2): 317-25, 1977.
- LURHUMA, A. Z.; RICCOMI, H. & MASSON, P. L. – The occurrence of circulating immune complexes and viral antigens in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin. Exp. Immunol.* 28: 49-55, 1977.
- LUSHER, J. M. & IYER, G. – Idiopathic thrombocytopenic purpura in children. *Sem. Thromb. Hemost.* 3: 175-99, 1977.
- LUSHER, J. M. & ZUELZER, W. W. – Idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *J. Pediat.* 68: 1971, 1966.

- MANCINI, G.; CARBONARA, A. O. & HEREMANS, J. F. – Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2: 235-54, 1965.
- MASON, D. & McMILLAN, R. – Platelet antigens in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* 56: 529-34, 1984.
- McINTOSH, S.; JOHNSON, M. A. C.; HARTIGAN, P.; BAUMGARTNER, A. & DWYER, J. M. – Immunoregulatory abnormalities in children with thrombocytopenic purpura. *J. Pediatr.* 99(4): 525-30, 1981.
- McMILLAN, R. – Chronic idiopathic purpura. *N. Engl. J. Med.* 304(19): 1135-47, 1981.
- McMILLAN, R.; LONGMIRE, R. L.; TAVASSOLI, M.; ARMSTRONG, L. C. S. & YELENOSKY, R. – In vitro platelet phagocytosis by splenic leukocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* 290(5): 249-51, 1974.
- McMILLAN, R.; LUIKEN, G. A.; LEVY, R.; YELENOSKY, R. & LONGMIRE, R. L. – Antibody against megakariocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *JAMA* 239: 2460-2, 1978.
- McMILLAN, R.; TANI, P. & MASON, D. – A method that allows shipment of whole blood for the assay of platelet-associated IgG. *Blood* 54(5): 1201-2, 1979.
- McMILLAN, R.; TANI, P. & MASON, D. – The demonstration of antibody binding to platelet-associated antigens in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 56(6): 993-6, 1980.
- MIZUTANI, H.; KATAGIN, S.; UEJIMA, K.; OHNISHI, M.; TAMAKI, T.; KANAYAMA, Y.; TSUBAKIO, T.; KURATA, Y.; YONEZAWA, T. & TARUI, S. – T-cell abnormalities in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: the presence of OKT4 cells. *Scand. J. Haematol.* 35: 233-9, 1985.
- MORIMOTO, C.; ABE, T.; HARA, M. & HOMMA, M. – Cell-mediated immune response in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 8: 181-9, 1977.
- MORSE, B. S.; GIULIANI, D. & NUSSBAUM, M. – Quantitation of platelet-associated IgG by radial immunodiffusion. *Blood* 57(4): 809-11,

1981.

- MUELLER-ECKHARDT, C.; KAYSER, W.; MERSCH-BAUMER, K.; MUELLER-ECKHARDT, G.; BREIDENBACH, M.; KUGEL, H. G. & GRAUBNER, M. – The clinical significance of platelet-associated IgG: a study on 298 patients with various disorders. *Br. J. Haematol.* 46: 123-31, 1980.
- MYERS, T. J.; KIM, B. K.; STEINER, M. & BALDINI, M. – Platelet-associated complement C₃ in immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 59(5): 1023-8, 1982.
- NATHAN, D. G. & OSKI, F. A. – Hematology of infancy and childhood. W. B. Saunders Company, 1981.
- NEL, J. D. & STEVENS, K. – A new method for the simultaneous quantitation of platelet-bound immunoglobulin (IgG) and complement (C₃) employing an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedure. *Br. J. Haematol.* 44: 281-90, 1980.
- NIEVES, R. M. P.; JIMENEZ, E. F.; CARRILLO, J. M. H.; NAVARRETE, M. D.; QUESADA, E. C.; JIMENEZ, R. B.; MORA, L. A. B. & LOBO, J. F. S. – Púrpura Trombocitopênica Idiopática en niños. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 40(12): 711-7, 1983.
- NURDEN, A. T.; DUPNIS, D.; PIDARD, D.; KUNICKI, T. & CAEN, J. P. – Biochemistry and immunology of platelet membranes with reference to glycoprotein composition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 370: 72, 1981.
- ORTEGA, J. J.; SAENZ, A.; JAVIER, G. & TUSELL, J. – Púrpura trombopênica idiopática en la edad infantil. *Sangre* 22(2): 169-90, 1977.
- OUCHTERLONY, O. – Diffusion in gel. Methods for immunological analysis. *Progress in allergy* 5: 1, 1958.
- PANZER, S.; NIESSNER, H.; LECHNER, K.; DUDCZAK, R.; JAGER, U. & MAYR, W. R. – Platelet-associated immunoglobulins IgG, IgM, IgA and complement C_{3c} in chronic idiopathic autoimmune thrombocytopenia: relation to the sequestration pattern of ¹¹¹Indium labelled platelets. *Scand. J. Haematol.* 37: 97-102, 1986.

- PECZE, K.; PFLIEGLER, G.; DALMI, L.; KISS, A. & RAK, K. – Detection of platelet-associated IgG chronic immune thrombocytopenic purpura using antibody-coated polyacrylamide beads. *Blut* 48: 291-5, 1984.
- PIESSENS, W. F.; WYBRAN, J.; MANASTER, J. & STRIJCKMANS, P. A. – Lymphocyte transformation induced by autologous platelets in a case of thrombocytopenic purpura. *Blood* 36(4): 421-7, 1970.
- QUAGLIATA, F. & KARPATKIN, S. – Impaired lymphocyte transformation and capping in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood* 53(3): 341-9, 1979.
- RABASA, M.; ORTEGA, J. J.; ESPAÑOL, T. & ALONSO, J. L. – Cambios inmunológicos en las Púrpuras Trombocitopênicas Idiopáticas agudas y crônicas en el niño. *Sangre* 29(3): 267-72, 1984.
- ROSSE, W. F.; ADAMS, J. P. & YOUNT, W. J. – Subclasses of IgG antibodies in immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Br. J. Haematol.* 46: 109-14, 1980.
- SACHER, R. A. – Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Primary Care* 7(3): 439-49, 1980.
- SCOTT, C. S.; WHEELER, R.; FORD, P.; BYNOE, A. G. & ROBERTS, B. E. – T-lymphocytes subpopulations in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Scand. J. Haematol.* 30: 401-6, 1983.
- SHANNON, K. M.; BUCHANAN, G. R.; FINK, C. W. & STASTNY, P. – Lymphocyte populations in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *A.J.D.C.* 138: 64-5, 1984.
- SHAW, G. M.; AXELSON, J.; MAGLOTT, J. G. & LoBUGLIO, A. F. – Quantitation of platelet-bound IgG by I^{125} -staphylococcal protein A in immune thrombocytopenic purpura and other thrombocytopenic disorders. *Blood* 63(1): 154-61, 1984.
- SHIMM, D. S.; LOGUE, G. L. & ROSSE, W. F. – Recurrent thrombocytopenia following idiopathic thrombocytopenic purpura. *Arch. Intern. Med.* 140: 885-7, 1980.
- SHULMAN, N. R.; LEISSINGER, C. A. & HOTCHKISS, A. J. – The non-specific nature of platelet-associated IgG. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 95: 213-20, 1982.

- SHULMAN, N. R.; MARDER, V. J. & WEINRACH, R. S. – Similarities between known anti-platelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. Physiologic, serologic and isotopic studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 124: 499-542, 1965.
- SIEGAL, F. P. & SIEGAL, M. – Enhancements by irradiated T cells of human plasma cell production dissection of helper and supressor functions *in vitro*. *J. Immunol.* 118: 642, 1977.
- SINTNICOLAAS, K.; van der STENIJT, K. J. B.; van PUTTEN, W. L. J. & BOLHUIS, R. L. H. – A microplate ELISA for the detection of platelet alloantibodies: comparison with the platelet immunofluorescence test. *Br. J. Haematol.* 66: 363-7, 1987.
- SUGIURA, K.; STEINER, M. & BALDINI, M. G. – Platelet antibody in idiopathic thrombocytopenic purpura and other thrombocytopenias. *J. Lab. Clin. Med.* 96(4): 640-53, 1980.
- SVARCH, E.; ALMAGRO, D. & LAGARDA, M. – Púrpura Trombocitopênica Idiopática. *Sangre* 23(2): 149-56, 1978.
- TANGEN, O.; BERMAN, H. J. & MARLEY, P. – Gel filtration: a new technique for separation of blood platelets from plasma. *Adv. Exp. Med. Biol.* 34: 235-43, 1972.
- TATE, D. Y.; SORENSON, R. L.; GERRARD, J. M.; WHITE, J. G. & KRIVIT, W. – An immunoenzyme histochemical technique of platelet antibodies from the serum of patients with idiopathic (autoimmune) thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* 37: 265-75, 1977.
- TRENT, R. J.; CLANCY, R. L.; DANIS, V. & BASTEN, A. – Immune complexes in thrombocytopenic patients: cause or effect? *Br. J. Haematol.* 44: 645-54, 1980.
- TSUBAKIO, T.; KURATA, Y.; YONEZAWA, T. & KITANI, T. – Quantification of platelet-associated IgG with competitive solid-phase enzyme immunoassay. *Acta Haemat.* 66: 251-6, 1981.
- van LEEUWEN, E. F.; van der VAN, J. Th. M.; ENGELFRIET, C. P. & von dem BORNE, A. E. G. Kr. – Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 59(1): 23-6, 1982.

- van LEEUWEN, E. F.; von dem BORNE, A. E. G. Kr.; van der PLAS-VAN DALEN, C. & ENGELFRIET, C. P. – Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in children: detection of platelet autoantibodies by immunofluorescence. *Scand. J. Haematol.* 26: 285-91, 1981.
- VARON, D. & KARPATKIN, S. – A monoclonal anti-platelet antibody with decreased reactivity for autoimmune thrombocytopenic platelets. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 80: 6992-5, 1983.
- VEENHOVEN, W. A.; van der SCHANS, G. S. & NIEWEG, H. O. – Platelet antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin. Exp. Immunol.* 39: 645-51, 1980.
- VERHEUGHT, F. W. A.; BORNE, A. E. G. Kr. von dem; DÉCARY, F. & ENGELFRIET, C. P. – The detection of granulocyte alloantibodies by an indirect immunofluorescence test. *Br. J. Haematol.* 36: 533, 1977.
- VIZCAINO, G. J. & DIEZ-EWALD, M. – Autoimmune thrombocytopenic purpura. Comparison of three different methods for the detection of platelet antibodies. *Am. J. Hematol.* 14: 279-83, 1983.
- von dem BORNE, A. E. G. Kr. – Simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br. J. Haematol.* 39: 195-207, 1978.
- von dem BORNE, A. E. G. Kr.; HELMERHORST, F. M.; van LEEUWEN, E. F.; PEGELS, H. G.; von RIEZ, E. & ENGELFRIET, C. P. – Autoimmune thrombocytopenia: detection of platelet autoantibodies with the suspension immunofluorescence test. *Br. J. Haematol.* 45: 319-27, 1980.
- WALSH, C. M.; NARDI, M. A. & KARPATKIN, S. – On the mechanisms of thrombocytopenic purpura in sexually active homosexual men. *N. Engl. J. Med.* 311(10): 635-9, 1984.
- WEICHSELBAUM, T. E. – An accurate and rapid method for determination of protein in small amount of blood serum and plasma. *Amer. J. Clin. Path. Tech.* 10: 40, 1946.
- WILLIAMS, W. J.; BEUTLER, E.; ERSLER, A. J. & RUNDLES, R. W. – Hematology, 2nd edition. New York, McGraw-Hill Book Company, 1977.
- WINIARSKY, J. – Immunoglobulin binding to platelets. The effect of aggregated IgG. *Blut* 51: 259-66, 1985.

- WINIARSKY, J. & EKLUND, E. – Antibody binding to platelet antigens in acute and chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a platelet membrane ELISA for the detection of anti-platelet antibodies in serum. *Clin. Exp. Immunol.* 63: 459-65, 1986.
- WINIARSKY, J. & HOLM, G. – Platelet-associated immunoglobulins and complement in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin. Exp. Immunol.* 53: 201-7, 1982.
- WOODS, V. L.; KURATA, Y.; MONTGOMERY, R. R.; TANI, P.; MASON, D.; OH, E. H. & McMILLAN, R. – Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 64(1): 156-60, 1984.
- WOODS, V. L. Jr.; OH, E. H. & MASON, D. – Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 60: 192a, 1982.
- WOODS, V. L. Jr.; OH, E. H.; MASON, D. & McMILLAN, R. – Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. *Blood* 63(2): 368-75, 1984.
- WYBRAN, J. & FUDENBERG, H. H. – Cellular immunity to platelets in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 40(6): 856-61, 1972.
- ZINBERG, M.; FRANCUS, T.; WEKSLER, M. E.; SISKIND, G. W. & KARPATKIN, S. – Abnormal autologous mixed lymphocyte reaction in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood* 59(1): 148-51, 1982.
- ZUCKER-FRANKLIN, D. & KARPATKIN, S. – Red cell and platelet fragmentation in idiopathic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* 297: 517-23, 1979.
- ZUELZER, W. W.; MASTRANGELO, R.; POULIK, M. D.; PAGE, R. H. & THOMPSON, R. I. – Autoimmune hemolytic anemia. Natural history and viral-immunologic interaction in childhood. *Am. J. Med.* 49: 80, 1970.