

Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



Instituto Politécnico
de Coimbra

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PATOLOGIA PLAQUETAR POR
METODOLOGIAS DE AGREGOMETRIA E CITOMETRIA DE FLUXO**
- ANÁLISE RETROSPECTIVA DE UM GRUPO DE DOENTES

DALILA FERREIRA MARQUES PATRÍCIO

2017

Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Letícia Ribeiro, Directora do serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e co-orientação da Dra Teresa Seara Seivas, Especialista em ImunoHemoterapia

Agradecimentos Esta dissertação de mestrado surge no decurso de uma vontade de ir um pouco mais além na aprendizagem e crescimento profissionais e paixão pela área do estudo da plaqueta, “o pó do sangue” ou «piastrine» como as designou Bizzozzero. Como tal, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

À Doutora Leticia Ribeiro por me ter concedido a oportunidade de realizar este trabalho no Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE.

Ao Mestre Rogério pelo apoio incondicional e por acreditar que seria capaz, mesmo quando eu duvidei.

À Mestre Ana Teresa pela ajuda na formatação do documento.

Em especial à Dra Teresa Sevivas pela orientação e partilha desta paixão pelo estudo das patologias plaquetares, e à Dra Margarida Coucelo pela disponibilidade, entusiasmo e pelo estímulo constantes.

Sem esquecer a minha família, a quem “roubei tempo” para me dedicar a este projecto.

“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”,

Steve Jobs

Júri

Doutor Armando José Cerejo Caseiro

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Doutora Catarina Isabel Batista Geraldès

Professora Associada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Doutora Maria Letícia Ribeiro

Directora do serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Resumo

Introdução: As patologias hereditárias da plaqueta são um grupo diagnóstico heterogéneo, de difícil caracterização cuja avaliação passa pela realização de uma história clínica criteriosa, testes globais e testes específicos como a agregação plaquetar e citometria de fluxo, entre outros.

Objectivo: Avaliar retrospectivamente, num grupo de doentes com suspeita de disfunção plaquetar, os resultados obtidos nos estudos de agregação plaquetar (LTA) e citometria de fluxo (CF) e analisar a sua mais-valia para o diagnóstico de patologias da plaqueta.

Material e Métodos: Estudaram-se 68 propósitos (46 adultos; 22 crianças) e 12 familiares, pertencentes a 8 famílias, referenciados por história hemorrágica, trombocitopenia ou estudos familiares. Avaliação da clínica hemorrágica efectuada através do score ISTH-BAT. Testes globais: hemograma, esfregaço de sangue periférico, PFA; Testes específicos: LTA e CF.

Resultados: O "score" hemorrágico da população estudada foi em média de 2,24 (0-8), sendo que 61% apresentavam score hemorrágico baixo (≥ 3). Dos doentes estudados 14 tinham macrotrombocitopenia (VPM > 9,7 fL), 10 tinham PFA prolongado, 7 doentes apresentavam LTA alterada, 5 apresentavam alterações na CF, maioritariamente de activação. Neste grupo a CF permitiu identificar 2 indivíduos com alteração na activação plaquetar e PFA normal. No grupo com contagem normal de plaquetas, 54% tinham PFA prolongado. A LTA estava alterada em 22 indivíduos e 63% apresentavam resposta diminuída a 2 ou mais agonistas. Por CF, foi possível identificar alterações em 20,6% dos estudos, sendo que a maioria destes tinha PFA prolongado à semelhança do observado por agregação plaquetar. O grau de concordância entre as duas técnicas, foi maior no grupo com trombocitopenia (k Cohen 0.595 vs 0.215)

Foi possível classificar os propósitos em grandes grupos de diagnóstico. No grupo com trombocitopenia estas técnicas identificaram 5 indivíduos com provável SPD/Defeito de sinalização e 2 com provável défice de receptores α -adrenérgicos. No grupo com contagem de plaquetas normais, 9 foram classificados como provável SPD/Defeito de sinalização, 2 com provável défice de receptores α -adrenérgicos, 1 com provável Trombastenia de Glanzmann variante e 1 com provável SBS monoalélico.

Discussão/Conclusão: A utilização das 2 técnicas permitiu aumentar a capacidade de obter uma suspeita diagnóstica, tendo sido classificados 52% dos indivíduos estudados em grandes grupos de diagnóstico. De futuro, a correlação de estudos funcionais juntamente com conhecimento das alterações moleculares subjacentes às patologias da plaqueta permitirá uma melhor caracterização destas doenças de difícil diagnóstico.

Palavras-Chave

Patologia hereditária da plaqueta; testes função plaquetar; LTA, CF

Abstract **Introduction:** Inherited platelet disorders are a heterogeneous diagnostic group, which is difficult to characterize and is evaluated by a careful clinical history, global tests and specific tests such as platelet aggregation and flow cytometry, among others.

Purpose: To evaluate, in a group of patients with suspected platelet dysfunction, the results obtained in the platelet aggregation (LTA) and flow cytometry (CF) studies and to analyze their added value for the diagnosis of platelet pathologies.

Material and Methods: We studied 68 purposes (46 adults, 22 children) and 12 family members, belonging to 8 families, referred by hemorrhagic history, thrombocytopenia or family studies. Evaluation of the hemorrhagic clinic performed through the ISTH-BAT score. Global tests: CBC counts, peripheral blood smear, Platelet Function Analyzer (PFA); Specific tests: LTA and CF.

Results: The average hemorrhagic score of the studied population was 2.24 (0-8), and 61% had a low hemorrhagic score (≥ 3). Fourteen of the patients studied had macrothrombocytopenia (MPV > 9.7 fL), 10 had prolonged PFA, 7 patients had abnormal LTA, 5 presented abnormal CF, mostly in activation. In this group CF allowed to identify 2 individuals with alteration in platelet activation and normal PFA. In the group with normal platelet count, 54% had prolonged PFA. The LTA was abnormal in 22 individuals and 63% had a diminished response to 2 or more agonists. By CF, it was possible to identify abnormalities in 21% of the studies, most of which had prolonged PFA similar to that observed by platelet aggregation. The degree of agreement between the two techniques was higher in the group with thrombocytopenia (k Cohen 0.595 vs 0.215)

It was possible to classify the purposes into large diagnostic groups. In the group with thrombocytopenia, these techniques identified 5 individuals with probable Storage Pool Disease (SPD) / Signaling Defect and 2 with a probable α -adrenergic receptor deficiency. In the group with normal platelet counts, 9 were classified as probable SPD / Signaling defect, 2 with probable α -adrenergic receptor deficiency, 1 with probable Glanzmann variant thrombasthenia, and 1 with probable monoallelic Bernard Soulier Syndrome (SBS).

Discussion / Conclusion: The use of the two techniques allowed to increase the capacity to obtain a diagnostic suspicion, with the classification of 52% of the studied individuals in large diagnostic groups. In the future, the correlation of functional studies together with knowledge of the molecular defects underlying platelet disorders will allow a better characterization of these difficult diagnosis diseases.

Keywords Inherited Platelet disorders; platelet function tests; LTA, CF

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
Plaquetas - origem e estrutura	1
Produção e distribuição das plaquetas.....	1
Plaqueta – estrutura complexa	1
Plaquetas e Hemostase - fases de formação do coágulo	3
Fases de formação do coágulo	3
Adesão	4
Activação.....	5
Secreção	8
Agregação plaquetar	9
Actividade procoagulante.....	9
Retracção do coágulo	10
Patologia plaquetar	10
Patologia adquirida	10
Patologia hereditária	12
Trombocitopenias.....	12
Disfunção plaquetar- defeitos de adesão	14
Disfunção plaquetar - Defeitos da agregação.....	15
Disfunção plaquetar - Defeitos de secreção/sinalização	15
Deficiências da actividade procoagulante.....	16
Diagnóstico de Patologia Plaquetar	20
História Clínica e medicamentosa	21
Bleeding Assessement Tool (BAT)	21
Testes de rastreio	21
Contagem de Plaquetas e Esfregaço de Sangue periférico	21
Testes de rastreio da função plaquetar	22
Tempo de sangria	22
PFA – 100®.....	22
Outros equipamentos de Point of Care Test (POCT)	23
Testes específicos	23
Agregometria de transmissão de luz (LTA)	23
Lumiagregometria	25
Agregação Plaquetar em Sangue Total.....	25
Citometria de Fluxo	26
Microscopia electrónica de transmissão	27
Outros testes usados no estudo da função plaquetar	27
Estudo molecular	27
Tratamento	28
OBJECTIVO	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	30

Doentes e Controlos.....	30
Doentes.....	30
Controlos.....	30
Estudos de PFA e agregação	30
Estudos de Citometria de Fluxo	31
Avaliação da capacidade Funcional da GPIIb-IIIa (PAC-1)	32
Estudos de ativação plaquetária (avaliação basal e pós estimulação)	32
Teste de captação e libertação de mepacrina.....	32
Análise de dados	32
RESULTADOS	33
Caracterização da população.....	33
Testes de avaliação global (testes de rastreio)	34
Hemograma - número e volume plaquetar médio	34
PFA	34
Testes de avaliação específicos: Agregação plaquetar e Citometria de Fluxo da Plaqueta ..	34
Doentes com Trombocitopenia	34
Doentes com contagem normal de Plaquetas	36
Comparação dos resultados obtidos nos testes de avaliação específicos	38
Classificação dos doentes em grandes grupos diagnósticos	39
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plaqueta - Estrutura e organelos .	2
Figura 2. A formação do trombo em situações de fluxo com taxas médias/elevadas de cisalhamento.	4
Figura 3. Principais interações receptor-ligando que levam à transdução de sinal para o interior da plaqueta onde se incluem os mecanismos de transdução de sinal através da GPIIb-IIIa	7
Figura 4. Representação esquemática das respostas plaquetares normais e das alterações nas patologias congénitas da função plaquetar.	16
Figura 5. Diagrama do traçado/curva típica de agregometria de leitura turbidimétrica.	25
Figura 6. Score hemorrágico nos doentes em estudo.	33
Figura 7 - Resultados de Agregação Plaquetar em doentes com trombocitopenia- Distribuição dos resultados por agonista	35
Figura 8 - Resultados de Citometria de Fluxo em doentes com trombocitopenia - Distribuição dos resultados por teste	36
Figura 9 - Resultados de Agregação Plaquetar em doentes com contagem plaquetar normal - Distribuição dos resultados por agonista	37
Figura 10 -Resultados da agregação plaquetar em doentes com nº Plaquetas normal..	37
Figura 11- Resultados de Citometria de Fluxo em doentes com nº Plaquetas Normal - Distribuição dos resultados por teste	38
Figura 12. Diagnósticos nos doentes estudados.	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Receptores Glicoproteicos da Membrana da Plaqueta.	2
Tabela 2. Constituintes dos grânulos plaquetares	3
Tabela 3. Fármacos que interferem com a função plaquetar	11
Tabela 4 . Alimentos e plantas que interferem com a função plaquetar.	11
Tabela 5. Características gerais das principais trombocitopenias hereditárias	13
Tabela 6. Patologias hereditárias da função plaquetar por defeitos de recetores de membrana	17
Tabela 7. Patologias hereditárias da função plaquetar por defeitos de Secreção(A) e	18
Tabela 8. Painel de agonistas Plaquetares	26
Tabela 9 - Alterações observadas no uso conjunto das duas metodologias.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

c-MPL	Receptor da trombopoietina
SCA	Sistema Canicular Aberto
STD	Sistema Tubular Denso
GP	Glicoproteína
FvW	Factor de von Willebrand
CD	Cluster de Diferenciação
ADP	Adenosina Difosfato
TXA2	Tromboxano A2
PAR1	Protease Activable receptor 1
PAR4	Protease Activable receptor 4
P2Y12, P2Y1	Receptor purinérgico de ADP
AC	Adenilciclase
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
G	Receptor de proteína G
IP3	Inositol Trifosfato
DAG	Diacilglicerol
PKC	Proteína Cinase C
Cinase ROS	Cinase de Espécies Reactivas de Oxigénio
U46619	Análogo do Tromboxano
EPI	Epinefrina
FCγ-RIIA	Receptor de IgG humana de baixa afinidade
PLA2	Fosfolipase A2
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfato
AA	Ácido Araquidónico
MAP Cinase	Proteína Cinase activada por mitógenos
12-HETE	Ácido 12 hidróxieicosatretranoico
COX-1	Enzima Ciclooxygenase 1
RGD	Ácido Arginilglicilaspartico
kDa	Kilo Dalton Unidade de massa atómica
Rap 1b	GTPase da família RAS
PS	Fosfatidilserina
PMP	Micropartículas Derivadas de Plaquetas
FT	Factor Tecidual
PTI	Púrpura Trombocitopénica Idiopática
TG	Tromboastenia de Glanzman
AINES	Anti Inflamatórios Não Esteróides
VPM	Volume Plaquetar Médio
MYH9	Miosin Heavy Chain 9/cadeia pesada de miosina 9 (não muscular)
WAS	Wiskott-Aldrich
SBS	Síndrome de Bernard Soulier
PFA-100®	Platelet Function Analyzer
ESP	Esfregaço de Sangue Periférico
SPD	Storage Pool Disease
BAT	Bleeding Assesment Tool
DvW	Doença de von willebrand

PDW	Índice de distribuição das Plaquetas (<i>Platelet Distribution With</i>)
ISTH	International Society on Thrombosis and Hemostasis
TS	Tempo de Sangria
TO	Tempo de Oclusão
Hct	Hematócrito
LTA	Agregometria de Transmissão de Luz
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
TRAP	Thrombin Receptor activable Peptide
PMA	Phorbol 12-myristate 13 Acetate
PF4	Factor Plaquetar 4
NGS	Next Generation Sequencing (Sequenciação Massiva Paralela)
DDAVP	Fármaco sintético análogo da vasopressina
FVIIa	Factor VII activado
COL/EPI	Colagénio/Epinefrina
COL/ADP	Colagénio/ADP
s	segundos
M	Molar
min	minutos
g	Força centrífuga
ml	mililitro
μM	Micra molar

INTRODUÇÃO

Plaquetas - origem e estrutura

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados de megacariócito que se originam na medula óssea e são lançadas na corrente sanguínea onde se mantêm em circulação durante 7-10 dias, em concentrações que variam entre $150-400 \times 10^9/L$. Em repouso apresentam forma discóide, com diâmetro 2-4 μm e volume plaquetar médio de aproximadamente 7 ± 4.8 fL (1). A sua principal função está relacionada com a hemostase, mas também estão envolvidas numa variedade de respostas fisiopatológicas, incluindo respostas imunes, inflamação, angiogénese, regeneração de tecidos e metastização tumoral (2).

Produção e distribuição das plaquetas

As plaquetas são produzidas na medula óssea, por células precursoras, os megacariócitos que se tornam poliplóides por endomitose. A trombopoietina é o principal regulador do processo de maturação do megacariócito, e tem como receptor o c-MPL expresso na superfície das plaquetas e megacariócitos, que sinaliza através de factores de transcrição e de Cinases da família de JAK-STAT. O modelo actual defende que a produção das plaquetas resulta da extensão, pelos megacariócitos diferenciados, de prolongamentos citoplasmáticos nos vasos sinusóides, denominados proplaquetas, que são libertados directamente para a corrente sanguínea (3). Durante este processo, as plaquetas herdaram uma série de elementos estruturais distintos. Anomalias neste processo podem resultar na diminuição do número de plaquetas (trombocitopenia) e levar a aumento do risco de hemorragia(4)

Plaqueta – estrutura complexa

A plaqueta é constituída por uma membrana plasmática onde se encontram ancorados vários receptores (Tabela 1), que comunica para o seu interior através de invaginações que constituem o Sistema Canicular Aberto (SCA). Próximo e paralelo ao SCA encontra-se o Sistema Tubular Denso (STD), onde está armazenado Ca^{2+} e enzimas implicadas na activação plaquetar. A plaqueta possui um citoesqueleto constituído por microfilamentos de actina e um anel de microtúbulos que mantem a forma discóide. Na matriz citoplasmática encontram-se um conjunto de organelos: grânulos alfa, grânulos densos, lisossomas e mitocôndrias (Fig. 1) (5). Armazenados no interior dos grânulos encontram-se proteínas adesivas e factores da coagulação (Tabela 2)(6)

Tabela 1. Receptores Glicoproteicos da Membrana da Plaqueta. Estes receptores participam na adesão e na iniciação da agregação através da união a ligandos específicos
Adaptado de (5) Frishma GA. Clin Lab Sci 2015

Nomenclatura	Ligando	Cluster	Principais características
GP Ia-IIa (Integrina $\alpha 2\beta 1$)	Colagénio	CD29, CD49b	Avidez dependente da ligação do colagénio à GPVI
Integrina $\text{cv}\beta 1$	Vitronectina		
Integrina $\alpha 5\beta 1$	Laminina	CD29, CD49e	
Integrina $\alpha 6\beta 1$	Fibronectina	CD29, CD49f	
GP VI	Colagénio		Principal receptor do colagénio, inicia a activação, libertação dos agonistas que aumentam a avides das integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 11\beta 3$
GP Ib-IX-V	FvW e trombina ligam GP Ib α , trombina cliva "site" GP V	CD42a, CD42b, CD42c, CD42d	GP Ib-IX-V é um complexo 2:2:2:1 de GP Ib α , GP Ib β , GPIX e GPV. 25 000 cópias na superfície da plaqueta em repouso, 5-10% na membrana dos grânulos e α algumas na membrana do SCA. Após activação 50% das GP Ib α /GP Ib β são removidas da membrana
GP IIb-IIIa (Integrina $\alpha 11\beta 3$)	Fibrinogénio e FvW	CD41, CD61	GP IIb-IIIa encontra-se distribuída na superfície da membrana, no SCCS e na membrana dos grânulos α .

Abreviaturas (Siglas em inglês): GP Glicoproteína, CD Cluster differentiation, SCA Sistema Canicular Aberto; SCCS-surface-connected canalicular system

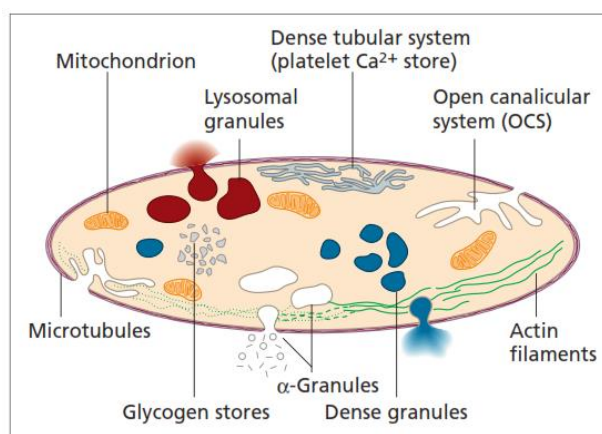


Figura 1. Plaqueta - Estrutura e organelos . A figura representa os elementos chave da estrutura da plaqueta, que incluem o sistema canicular aberto (OCS), o sistema tubular denso (DTS), microtúbulos de actina e microfilamentos, mitocondria, reservas de glicogénio, grânulos densos, lisossomas e grânulos alfa. Abreviaturas (Siglas em inglês): OCS – Open canalicular System; DTS – Dense Tubular System, Adaptado de (7) *Postgraduate Haematology* (5th Edition). Oxford: Blackwell, 2005

Tabela 2. Constituintes dos grânulos plaquetares

	Proteínas adesivas	Fatores de crescimento	Fatores de coagulação e inibidores
Grânulos alfa	Fibrinogenio Fibronectina FvW Trombospondina Vitronectina P-selectina(CD62P)	PF4 PDGF TGFβ	FV FXI HMWK PAI-1 α ₂ antiplasmina
Grânulos densos	Constituintes não proteicos ADP ATP Ca ²⁺ Serotonina Magnésio Pirofosfato		
Lisossomas	Acidos Hidrolases Catepsina D e E LAMP-1 LAMP2 CD63		

Abreviaturas (Siglas em inglês): ADP -adenosina difostado, ATP - Adenosina Trifosfato, PF4 - Factor Plaquetar 4, PDGF – Fator Plaquetar Derivado das Plaquetas TGFβ – Fator de Crescimento Transformador β, HMWK – Quininogénio de Alto Peso Molecular, PAI-1 – Inibidor do Plasminogénio Tipo 1, FvW- Fator von Willebrand, LAMP – Proteína Lisossomal Associada à Membrana 1, LAMP -2 –Proteína Lisossomal Associada à Membrana 2, CD63- granulofisina Adaptado de (6)

Plaquetas e Hemostase - fases de formação do coágulo

Em condições normais as plaquetas circulam sem interagir entre si ou com outras células. A interrupção da continuidade do revestimento do endotélio vascular expõe constituintes da matriz subendotelial que alteram este estado da plaqueta levando-a a interagir com a parede vascular. Nesta interação, a plaqueta liga-se às proteínas adesivas do subendotélio estende-se sobre a superfície da lesão, activa-se e agrega, segregando os conteúdos granulares e expondo a superfície procoagulante, que actua como base catalítica, onde ocorrem as reacções da coagulação e a consolidação do tampão hemostático no local da lesão(8)

Fases de formação do coágulo

A formação do trombo plaquetar compreende uma sequência de respostas que se iniciam com a adesão das plaquetas às estruturas subendoteliais expostas, como o colagénio e o fator de von Willebrand (FvW) que levam à sua activação que por sua vez induz a libertação dos conteúdos dos grânulos e a síntese de compostos do metabolismo dos eicosanoides, que irão recrutar novas plaquetas para o trombo em formação. A agregação das plaquetas provoca, entre outros efeitos, o crescimento do trombo e a sua posterior consolidação, mediada pelo aparecimento de actividade procoagulante na superfície da plaqueta. (Fig 2).

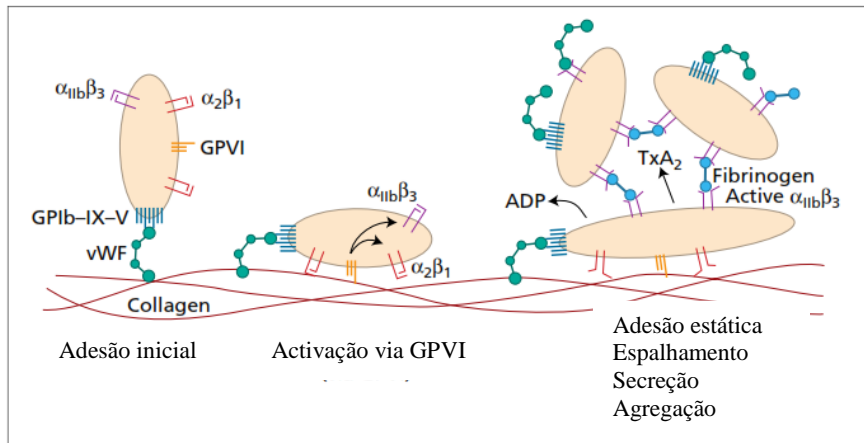


Figura 2. A formação do trombo em situações de fluxo com taxas médias/elevadas de cisalhamento. As plaquetas são inicialmente capturadas pelo FvW immobilizado no colagénio do subendotélio. As plaquetas são activadas, pelo colagénio, através da GVI levando ao aumento da afinidade das integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GP IIb-IIIa) e $\alpha_2\beta_1$ (GPIa-IIa) pelo Fibrinogénio/FvW e colagénio respectivamente. Este evento medeia a adesão estável e através de nova activação de GVI e também da libertação de ADP e TXA₂, potencia o processo de activação. A formação da superfície pró coagulante também suporta a formação de trombina. O FvW e o fibrinogénio, em combinação com o ADP, TXA₂ e trombina medeiam a formação do trombo (agregação) e estabilização (retracção do coágulo). O espalhamento das plaquetas também permite a estabilização do trombo no subendotélio. Adaptado (7) *Postgraduate Haematology* (5th Edition). Oxford: Blackwell, 2005)

Adesão

Quando ocorre lesão vascular, as plaquetas ligam-se a proteínas adesivas expostas no subendotélio (colagénio de vários tipos, fator de von Willebrand, laminina, fibronectina e trombospondina são os principais constituintes) através de receptores específicos (tabela 1). A fixação inicial das plaquetas ao subendotélio vascular é um passo crítico essencial para hemostase, ocorre em condições de fluxo sanguíneo de elevada tensão de cisalhamento “high shear stress” e está condicionada por factores reológicos como ocorre na circulação arterial. Nestas condições a exposição do subendotélio vascular induz a ligação imediata da GP Ib-IX ao FvW que recobre as fibras de colagénio da lesão. A ligação é estabilizada por 2 receptores de colagénio: GP VI e integrina $\alpha_2\beta_1$ (GPIa-IIa). A acção sinérgica da GP VI e GP Ib-IX activam o GP IIb-IIIa que liga fibrinogénio e fibronectina no local da lesão.

Estas interações permitem que a velocidade de circulação das plaquetas diminua o suficiente para que tenham lugar outras interacções de união a outros pares receptor-ligando, que produzem uma adesão estática. Em particular, a interacção colagénio e GPVI induz uma alteração conformacional, com activação das integrinas GPIIb-IIIa e GP Ia/IIa. O FvW e o colagénio estabelecem ligações fortes com GPIIb-IIIa e GP Ia/IIa respectivamente ancorando as plaquetas no local da lesão. O recrutamento de outras plaquetas ocorre através de uma interacção plaqueta-plaqueta que é mediada pelo Fibrinogénio e pelo seu recetor GP IIb-IIIa (Fig 2).

A adesão e ligação das plaquetas ao colagénio e a trombina gerada no local da lesão vascular iniciam a activação(7)(8) (9).

Activação

Durante o processo de activação, as plaquetas expressam as proteínas da membrana interna e libertam proteínas adesivas, factores da coagulação e factores de crescimento. Algumas destas proteínas facilitam a comunicação das plaquetas com os leucócitos e células endoteliais. Assim, as plaquetas desempenham um papel importante na resposta inflamatória e proliferativa e têm um papel essencial na remodelação tecidual e no processo de cicatrização. As plaquetas activadas libertam para o meio extracelular compostos solúveis (ADP, serotonina, tromboxano A₂, epinefrina, etc.) que vão actuar como agonistas de outras plaquetas induzindo o recrutamento de mais plaquetas. A resposta plaquetar aos agonistas depende de mecanismos de sinalização desencadeados por estímulo, activador ou inibidor, de receptores da superfície membranar (8) (9).

Os principais tipos de receptores que medeiam a activação plaquetar podem ser divididos em 2 grandes grupos: receptores ligados a Tirosina Cinase e receptores ligados a proteína G. Os receptores de agonistas solúveis pertencem ao 2º grupo:

Receptores de trombina

A trombina é um dos agonistas mais potentes e interage com as plaquetas “in vivo” onde constitui um elo de ligação entre a activação plaquetar e a cascata da coagulação. A concentração necessária para activar as plaquetas é muito menor do que a necessária à activação dos mecanismos da coagulação. Nas plaquetas humanas a trombina tem como receptores o PAR 1 e PAR 4, pertencentes à família dos receptores PAR (Protease Activated Receptor) e são constituídos por sete domínios transmembranares ligados a proteínas G. O PAR1 é o mais importante por apresentar maior expressão, na superfície da membrana o número de cópias é de 2000 e na membrana intracelular que está em conexão com a superfície existe mais 40% que são externalizadas aquando da activação(9)(10).

Receptores de ADP

Os nucleótidos de adenina desempenham um papel crucial na hemóstase e na trombose. Considerado um agonista fraco, o ADP é um cofator necessário e amplificador da resposta plaquetar induzida por baixas concentrações de outros agonistas (TXA₂, trombina, colagénio) e possui receptores na superfície do tipo purinérgico, P₂Y₁₂ e P₂Y₁. O ATP tem como receptor P₂x₁. Estruturalmente apresentam sete domínios membranares unidos a proteína G (Fig 4). O P₂x₁ actua como canal de iões responsável pela entrada rápida de cálcio no citosol. O receptor P₂Y₁ está associado a Gq α , através da qual sinaliza a activação da fosfolipase C (PLC) e a libertação de cálcio a partir dos depósitos intracelulares. Quando estimulado por ADP, o receptor P₂Y₁₂, associado a Gi₂, medeia a inibição de Adenilciclase (AC) que faz baixar os níveis de AMPc. Estão descritos défices congénitos deste receptor associados a tendência hemorrágica. A agregação completa só ocorre com estimulação conjunta dos dois tipos de

receptores. Foram desenvolvidos fármacos inibidores do receptor P2Y₁₂, para tratamento antitrombótico, sendo os mais utilizados a ticlopidina e clopidogrel (9)(10)

Receptores de Tromboxano A₂

O tromboxano A₂ (TXA₂) é um autacoide com propriedades proagregantes e vasoconstritoras. O seu receptor está distribuído em vários tipos celulares, pertence ao grupo dos receptores com sete domínios membranares unidos a proteína G, possui duas isoformas (α e β), sendo α a de maior expressão, a sinalização faz-se por ligação a proteínas G_q e G_{12/13}. A sinalização através da G_q associa-se à activação da PLC e geração de trifosfato inositol (IP₃) e Diacetilglicerol (DAG) que aumentam o cálcio no citosol e activam a Proteína Cinase C (PKC). A sinalização por G_{12/13}, permite a activação da Cinase ROS e subsequente fosforilação da cadeia ligeira de miosina que pode conduzir à reorganização do citoesqueleto e sinalização (inside-out) do receptor GPIIb-IIIa. É possível bloquear a agregação sinalizada pelo receptor de TXA₂, mas não a mudança de forma, através da utilização de U46619 (análogo do TXA₂). Mutações neste receptor estão associadas a hemorragias leves e diminuição de resposta a vários agonistas com excepção da trombina(9)(10)

Receptores α_2 adrenérgicos

A epinefrina (EPI) é um agonista fraco, incapaz de induzir quer a alteração de forma por si mesmo, quer activação directa ou agregação da GPIIb-IIIa. A sinalização pela epinefrina é feita pelos receptores α_2 adrenérgicos que se encontram associados à proteína G_s, a expressão destes receptores varia em resposta a factores fisiológicos ou farmacológicos.

Mecanismos de Transdução de Sinal

A maioria dos agonistas plaquetares fisiológicos (colagénio, trombina, ADP, TXA₂, etc) não consegue atravessar a membrana plasmática, pelo que existem mecanismos e estratégias para que o sinal extracelular unido ao respectivo receptor seja transmitido ao interior da célula e produza uma resposta funcional. Um conjunto de sinais e mecanismos bioquímicos complexos e criteriosamente coordenados conhecidos como mecanismos de sinalização ou transdução de sinal leva cabo este objectivo (Fig.3 e 4). São vários os elementos que contribuem para este processo: receptores unidos a proteínas G, receptores-integrinas e receptores FC γ –RIIA; moléculas efetoras intracelulares como a Fosfolipase C (PLC) e Fosfolipase A₂ (PLC A₂) ou a Adenilciclase (AC) que produzem substâncias que actuam como mensageiros secundários para a transmissão do sinal subsequente. Sob acção da PLC, o fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP₂) dá lugar à formação de trifosfato inositol PIP₃ e DAG. O DAG activa os processos de fosforilação da PKC e o PIP₃ favorece a libertação do cálcio para o citoplasma a partir do Sistema tubular Denso (STD), desta forma são postos em marcha os mecanismos dependentes de cálcio; activação da PLC₂ que liberta ácido araquidónico a partir dos fosfolípidos e dá lugar à síntese de TXA₂ e eicosanoides. A actividade da AC e

consequente produção de AMPc é regulada pelas proteínas G. A função das plaquetas pode ser inibida pelo aumento de AMPc e bloqueio da mobilização do cálcio. Este é o mecanismo de inibição plaquetar usado pela prostaciclina endotelial. Na transdução de sinal as fosforilações de proteínas intracelulares em aminoácidos específicos serina/treonina e/ou tirosina e a existência de interconexões entre as respectivas vias de fosforilação demonstra o grau de complexidade deste mecanismo e permite um maior controlo dos distintos aspectos regulados por fosforilação, como é o caso da activação do receptor GPIIb-IIIa, da agregação, secreção e síntese de eicosanóides(9)(10).

Síntese de eicosanóides

Os eicosanóides são derivados de ácidos gordos com 20 átomos de carbono, os mais importantes fisiologicamente são os derivados do AA, que nas plaquetas dão lugar à síntese de TXA2 e nas células endoteliais de prostaciclina, para além destes originam também pequenas quantidades de prostaglandinas. A etapa inicial da síntese de eicosanóides na plaqueta é a libertação de AA, pela Fosfolipase A2 citosólica (cPLA2), a partir dos fosfolípidos da membrana. A actividade da cPLA2 é regulada por aumento do cálcio no citosol e por fosforilação de MAPCinases. O AA livre é rapidamente metabolizado a TXA2, principal metabolito desta via, e a prostaglandinas, por acção das enzimas: lipooxigenase plaquetária 12-HETE, ciclooxigenase-1 (COX-1) e tromboxano sintetase(9)(10).

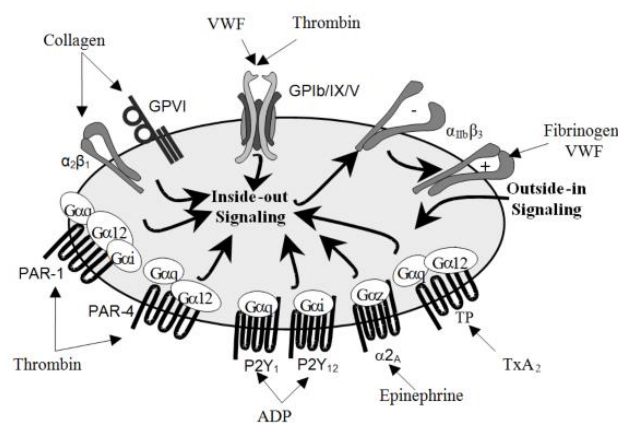


Figura 3. Principais interações receptor-ligando que levam à transdução de sinal para o interior da plaqueta onde se incluem os mecanismos de transdução de sinal através da GPIIb-IIIa . Na plaqueta em repouso este receptor apresenta uma conformação fechada, incapaz de unir-se ao fibrinogénio. Após ligação de um agonista ao seu receptor, produzem-se uma série de sinalizações conhecidas como *inside-out* que induzem uma alteração conformacional da GP IIb-IIIa que lhe permite unir-se ao fibrinogénio e agregar com outras plaquetas. Na sequência da agregação, com origem na integrina ($\alpha_{IIb}\beta_3$), ocorre outra transdução de sinais designada *outside-in* que reforça a activação e reorganização do citoesqueleto Adaptado de (11) Rivera J et al. 2009

Sinalização pela GPIIb-IIIa

A GPIIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) é específica da plaqueta e pertence à família das integrinas. O número de cópias por plaqueta é de 50.000-120.000, 80% na membrana e os restantes 20% em invaginações ou nos grânulos α . Liga-se a proteínas com sequência RGD (FvW, Fibrinogénio, fibronectina e vitronectina). Estruturalmente é um heterodímero composto pelas GPIIb (α_{IIb}) GPIIIa (β_3) ligadas de forma covalente. A subunidade α_{IIb} é formada por uma subunidade extracelular 125 kDa ligada a outra subunidade mais pequena (25 kDa) que inclui o domínio transmembranar e pequeno domínio citoplasmático. A subunidade (β_3) é formada por uma única cadeia de 95 kDa e grande domínio extracitoplasmático, uma sequência transmembranar e uma cadeia citoplasmática. Estas características permitem que este receptor participe na transmissão bidireccional de sinais entre ambas as faces, interna e externa, da membrana.

Na plaqueta em repouso este receptor apresenta uma forma inactiva, incapaz de unir-se às proteínas adesivas solúveis. Durante a activação plaquetar sofre alteração conformacional, o que lhe permite unir-se aos seus ligandos adesivos. Os mecanismos bioquímicos responsáveis por esta alteração são designados por sinalização *inside-out* do receptor, por outro lado a ligação do fibrinogénio à conformação activa do receptor leva a outro conjunto de mecanismos bioquímicos em direcção inversa denominada sinalização *outside-in*, que reforça a agregação (Fig 3). Embora não se conheçam completamente os mecanismos que levam à alteração conformacional, estes parecem estar relacionados com a fosforilação mediada pela PKC, e estudos *in vitro* indicam que a GPIIb-IIIa é substrato da fosforilação em tirosina(11).

A importância deste receptor é evidenciada por patologia tanto hemorrágica como trombótica. No primeiro caso os doentes com Trombastenia de Glazmann apresentam défice quantitativo ou qualitativo deste receptor e manifestam sintomatologia hemorrágica. Relativamente à patologia trombótica foram desenvolvidos anticorpos inibidores deste receptor: abciximab, tirofiban e eptifibatide, com efeito antitrombótico nos doentes com síndrome coronário agudo(9).

Reorganização do citoesqueleto

Outra das etapas iniciais da activação é a reorganização do citoesqueleto que resulta da polimerização rápida da actina e leva à ligação da GPIIb-IIIa a proteínas estruturais e outras moléculas de sinalização no citoesqueleto reorganizado. A ancoragem do receptor ao citoesqueleto regula as suas propriedades adesivas e estabiliza a ligação ao fibrinogénio(9).

Secreção

A libertação de uma variedade de substâncias que estimulam ou inibem as plaquetas ou outras células sanguíneas e vasculares é outra importante função das plaquetas e que pode modificar o trombo de forma covalente e afectar as suas propriedades mecânicas, bem como a regulação da coagulação para além de contribuir para fenómenos de adesão celular e modular do crescimento das células da parede vascular. A maior parte destas substâncias, é segregada

activa e selectivamente a partir das plaquetas e armazenada em grânulos pré-formados ou sintetizados de novo a partir de fosfolípidos da membrana.

A secreção plaquetar é desencadeada por uma variedade de agonistas fortes, tais como a trombina. A indução da secreção por agonistas fracos (por exemplo, ADP) ocorre quando as plaquetas são colocadas em contacto directo, como ocorre durante a agregação. O mecanismo secretor final é claramente dependente do tromboxano A₂ (TXA₂) gerado como consequência da libertação de ácido Araquidónico (9)(10).

Agregação plaquetar

A propagação e formação de agregados é mediada pela GP IIb-IIIa e a sua ligação ao fibrinogénio e outras proteínas adesivas como o FvW e a fibronectina, que suportam a agregação. A activação desta integrina está relacionada com elevação do Ca²⁺, activação da PKC, da Cinase fosfatidil inositol 3 e de Rap 1b (regulador bidireccional de receptores de adesão), mas o mecanismo pelo qual ocorre está pouco esclarecido. Estudos recentes demonstram a importância da Talina (proteína de ligação ao citoesqueleto) para regulação da afinidade deste receptor. De acordo com estudos experimentais, verificou-se não haver formação de trombo, em ratos modificados geneticamente para não expressarem GP IIb-IIIa. A ocupância deste receptor é essencial para a resposta na agregação medida no agregómetro e estas observações serviram de base ao desenvolvimento de antagonistas para a GP IIb-IIIa (9)(10).

Actividade procoagulante

A contribuição das plaquetas para a hemostase não depende exclusivamente das funções adesivas e coesivas mediadas por receptores de membrana. As plaquetas activadas oferecem uma superfície de fosfolipídica essencial para a activação dos mecanismos da coagulação e alteram a assimetria da membrana expondo Fosfatidilserina (PS), através de um mecanismo mediado por uma enzima “flipase”, o que permite a ligação de factores da coagulação e formação dos complexos tenase e protrombinase, essenciais para o processo da coagulação(8)(9).

Microparticulas

A perturbação do mecanismo que suporta a assimetria entre as duas camadas fosfolipídicas da membrana celular origina a formação pequenas vesículas da membrana plasmática designadas Micropartículas Derivadas de Plaquetas (PMP). Nos últimos anos tem sido reconhecida a sua importância em várias funções biológicas, sendo que a melhor caracterizada é a sua participação na coagulação sanguínea, proporcionando uma fonte de factor de tecidual (TF), bem como superfícies carregadas negativamente onde pode ocorrer a formação de complexos de factores da coagulação. A avaliação deste parâmetro tem sido utilizada para tentar compreender a diferença de fenótipo hemorrágico nas PTI (7)(8)

Retracção do coágulo

As plaquetas são os elementos fulcrais da retracção do coágulo, onde a GP IIb-IIIa desempenha um papel fundamental ao ligar os polímeros de fibrina da superfície aos filamentos de actina citoplasmáticos e induzir um conjunto de sinais que permitem activar um complexo de proteínas intracelulares, que ligam actina e por fim a miosina, que serve como motor do processo de retracção. A retracção do coágulo está comprometida nos indivíduos com TG(7)

A contribuição da plaqueta para os mecanismos da hemostase está directamente relacionada com a formação do tampão hemostático primário, a secreção de substâncias necessárias ao recrutamento de novas plaquetas, provisão de uma superfície procoagulante onde ocorra a coagulação, a libertação de promotores da reparação endotelial e reparação da arquitectura vascular. A interrupção de qualquer destes eventos e processos bioquímicos atrás descritos dão lugar a uma patologia/disfunção plaquetar que pode ser congénita ou adquirida(12).

Patologia plaquetar

A alteração do número das plaquetas, da sua função ou ambos dará lugar a patologias plaquetares quantitativas e/ou qualitativas de origem congénita ou adquirida. A função hemostática das plaquetas pode estar comprometida por alterações adquiridas ou congénitas, que afectem a sua produção/destruição ou a expressão/funcionalidade dos vários elementos envolvidos na fisiologia e que podem levar a uma diátese hemorrágica.

Patologia adquirida

A patologia adquirida da plaqueta está essencialmente relacionada com alterações da função plaquetar e surge associada com medicações, determinados procedimentos (bypass cardiopulmonar, oxigenação por membrana extracorporal), doença hepática, doença renal e doença hematológica. Existe referência na literatura a um número crescente de fármacos (>100), alimentos e suplementos que podem inibir a função plaquetar (Tabelas 3 e 4)(13)(14). Muitos fármacos alteram a função plaquetar, alguns usados com intuito terapêutico e outros tendo esta característica como efeito secundário. Dos primeiros os mais usados são a aspirina e os anti-inflamatórios não esteróides (AINES) que actuam por inibição da COX-1, a aspirina de forma irreversível, os AINES de forma reversível e incluem-se ambos no grupo de fármacos associado a complicações hemorrágicas(15).

Tabela 3. Fármacos que interferem com a função plaquetar *Adaptado de (14)*

Fármacos
<i>I. Risco hemorrágico associado</i>
Inibidores da Ciclooxygenase COX - 1
Aspirina, Ibuprofeno, naproxeno, indometacina, diclofenac, ketorolac, etc
Tienopiridinas
Clopidogrel, Prasurel
Inibidores do receptor GPIIb-IIIa
Abciximab, tirofiban e eptifibatide
Dipiridamol
Cilostazol
Antibióticos beta-lactâmicos
Inibidor Selectivo de Recaptação de Serotonina (iSRS ou SSRI)
Dextrano
Alcool
<i>II. Risco hemorrágico não demonstrado</i>
Bloqueadores de canal de cálcio
Anestésicos gerais e locais
Betabloqueantes
Antidepressivos tricíclicos
Nitratos

Abreviaturas (Siglas em inglês): COX-1 – Ciclooxygenase 1, SSRI – Inibidores Selectivos da Recaptação da Serotonina

Tabela 4 . Alimentos e plantas que interferem com a função plaquetar. A lista apresentada representa apenas parte dos muitos alimentos e plantas que podem interferir com a função plaquetar de *Adaptado de (15) e (14)*

Alimentos
Ginkgo <i>biloba</i>
Alho, Cebola,
Mirtilo
Gengibre, Cravo, Cominhos, Curcuma
Dong Quai
Matricária
Ginseng asiático, americano, siberiano
Ulmeira
Fenacho (Feno Grego)
Óleo de peixe
Álcool
Cafeína
Vitaminas C e E
Tamarindo
Salgueiro
Cogumelos chineses (<i>Auricularia polytricha</i>)

Patologia hereditária

A patologia hereditária da plaqueta constitui um grupo heterogéneo de alterações que podem afetar a produção, morfologia e função das plaquetas e pode estar relacionada com a diminuição do número de plaquetas (trombocitopenia) e/ou alterações funcionais, cujo grau de gravidade determina as manifestações clínicas. Indivíduos com doenças hereditárias da função plaquetar apresentam sintomatologia hemorrágica de características cutâneo-mucosas ao longo da vida, normalmente detectadas após trauma ou procedimentos invasivos, sendo que nas formas mais graves as manifestações podem ocorrer na infância. A etiologia deste grupo de patologias é bastante heterogénea e pode ter como causa alterações nos receptores de superfície da membrana, nas vias de sinalização, na formação e secreção dos grânulos, reorganização do citoesqueleto e expressão da actividade procoagulante(16) (Tabela 5) .

Trombocitopenias

A trombocitopenia, diminuição no número de plaquetas circulantes, definida como contagem do número de plaquetas inferior a $150 \times 10^9/L$, pode ter como causas: alterações nos mecanismos de produção, aumento de sequestração esplénica, ou destruição periférica, sendo esta última a causa mais comum. O diagnóstico diferencial varia com a idade de aparecimento, gravidade e características clínicas e ainda com a presença ou ausência de outras anomalias hematológicas(17).

Na presença de uma trombocitopenia é importante avaliar o volume plaquetar médio (VPM) de modo a determinar se estamos perante uma macrotrombocitopenia ($VPM > 9.7$ fL) ou a uma trombocitopenia com tamanho plaquetar normal (8.2-9.7 fL).

Doentes com Macrotrombocitopenia, partilham características clínicas e laboratoriais comuns com outras patologias plaquetares adquiridas e são muitas vezes erradamente diagnosticados como Purpura Trombocitopenica Idiópatica (PTI), sendo essencial fazer essa distinção cujo diagnóstico diferencial varia com a idade de aparecimento, gravidade e características clínicas e ainda com a presença ou ausência de outras anomalias hematológicas(17). As trombocitopenias podem estar associadas a outras doenças congénitos e podem ser divididas em síndromicas ou não síndromicas (Tabela 5)

Tabela 5. Características gerais das principais trombocitopenias hereditárias . Adaptado de (18)

Tamanho plaquetar	Nome	Herança Genética	Gene	Fenótipo clínico e laboratorial
Normal	Trombocitopenia Amegacariocítica congênita	AR	<i>C-MPL</i>	Trombocitopenia neonatal muito severa, amegacariocítica; evolução a anemia aplásica na infância
	Trombocitopenia com sinostose radio-cubital	AD	<i>HOXA11</i>	Trombocitopenia neonatal moderada a severa; megacariócitos reduzidos/ausentes Sinostose do rádio e cúbito com/sem outras alterações esqueléticas; provável perda de audição neurosensorial
	Trombocitopenia com ausência de rádio	AR	<i>Não conhecido Poderia ser c-MPL</i>	Trombocitopenia neonatal central severa que melhora com a idade; ausência bilateral do rádio com/sem anormalidades cardíacas, ou do esqueleto
	Síndrome familiar com predisposição a leucemia mieloblástica aguda	AD	<i>RUNX1</i>	Defeito da função plaquetar "aspirina-like" Evolução a síndrome mielodisplásico, leucemia mieloblástica aguda ou tumor sólido
	Trombocitopenia ligada ao cromossoma 10	AD	<i>ANKRD26</i>	Tendência hemorrágica leve, associada a situações de elevado <i>stress</i> hemostático Megacariócitos pequenos e hipolobulados
Grande	Síndrome de Bernard-Soulier	AR	<i>GPIBA, GPIBB, GP9</i>	Ver tabela 6
	Doença de von Willebrand tipo plaquetar	AD	<i>GPIBA</i>	Ver tabela 6
	Síndrome de DiGeorge/velocardiofacial	AD De novo	<i>TBX1/GPIBA</i>	Trombocitopenia moderada Anomalias cardíacas, insuficiência de paratiróides e timo, atraso cognitivo, dismorfia facial
	Trombocitopenia mediterrânea	AD	<i>GPIBA, GPIBB, outros</i>	Trombocitopenia moderada (70-150X10 ⁹ /L) assintomática
	Síndrome da plaqueta cinzenta	AD	<i>NBEAL2</i>	Ver tabela 7
	Síndromes de MYH9 (May-Hegglin, Sebastian, Fechtner, Epstein)	AD	<i>MYH-9</i>	Trombocitopenia moderada (20-130X10 ⁹ /L). Diátese hemorrágica moderada Inclusões neutrofilicas (corpos de Dohle), perda da audição, nefrite, cataratas
	Síndrome de Paris-Trousseau/Jacobsen	AD	<i>Fli-1, Ets-1</i>	Malformações cardíacas e faciais, atraso mental, grânulos plaquetares gigantes

Pequeno	Síndrome de Wiskott-Aldrich	Ligada a X	WAS	Trombocitopenia severa ($5-50 \times 10^9/L$) Imunodeficiência, eczema (1º ano), transtornos linfoproliferativos e autoimunes.
	Trombocitopenia ligada ao cromossoma X	Ligada a X	WAS	Forma leve de Wiskott-Aldrich. Possível imunodeficiência moderada.

Abreviaturas (Siglas em inglês): AR – Autossômico Recessivo; AD - Autossômico Dominante

Disfunção plaquetar- defeitos de adesão

As alterações da função plaquetar podem classificar-se ainda de acordo com o elemento funcional afectado, associado ou não com trombocitopenia. Podem dividir-se em defeitos de adesão, defeitos de secreção/sinalização, deficiências da actividade procoagulante (Fig 4).

Síndrome Bernard Soulier (SBS)

Patologia autossômica recessiva, caracterizada por Macrotrombocitopenia moderada ou grave e plaquetas disfuncionais. Tem como base a deficiência parcial ou completa do receptor GP Ib-IX-V ou a sua disfunção (Fig 4). Laboratorialmente caracteriza-se por apresentar tempo de sangria e valores de PFA-100® prolongados, ligeira trombocitopenia com plaquetas de tamanho aumentado e resposta reduzida ou ausente ao agonista ristocetina nas provas de agregação plaquetar como característica típica. A deficiência do receptor pode ser demonstrada por citometria de fluxo utilizando o anticorpos monoclonais anti-CD42a, CD42b e CD42c, que permite determinar a diminuição ou ausência de receptores glicoproteicos do complexo Ib/IX/V (tabela 6).

Tratando-se de uma macrotrombocitopenia, deve fazer-se o diagnóstico diferencial com outras macrotrombocitopenias congénitas e Trombocitopenia Imune (PTI). O reconhecimento da PTI faz-se pela magnitude da trombocitopenia de início abrupto e presença de anisocitose plaquetar. As técnicas de agregação não são viáveis na maioria dos casos devido à trombocitopenia que dificulta a obtenção de plasma rico em plaquetas. Finalmente o tratamento habitual da PTI (corticóides, imunoglobulina ou esplenectomia) não melhora a contagem de plaquetas no caso do SBS(16).

Défices da Glicoproteínas Ia-IIa, IV, e VI e outros receptores

Anomalias na ligação ao colagénio são o elemento comum neste grupo de défices de glicoproteínas.

Estão descritos casos de deficiência de GPIa-IIa e de GP VI associados a diátese hemorrágica, por resposta diminuída ao colagénio”. O diagnóstico baseia-se na alteração/ausência de resposta ao colagénio por agregação plaquetar(9).

Doença de von willebrand tipo Plaquetar

Disfunção plaquetar rara de transmissão autossômica dominante, devida a mutações no gene *GPIBA*. Estas alterações moleculares com ganho de função traduzem-se num aumento de afinidade do recetor GP Ib-IX-V para o FvW, patente na resposta à ristocetina mesmo a baixas concentrações e na perda de Multímeros de alto Peso Molecular do FvW (Tabela 6). Apresenta fenótipo clínico e laboratorial similar à Doença von willebrand 2B, com a qual se faz diagnóstico diferencial(16).

Disfunção plaquetar - Defeitos da agregação

Trombastenia de Glanzman

A Trombastenia de Glanzman é uma patologia grave de transmissão autossômica recessiva que se caracteriza pela deficiência ou disfunção do complexo GPIIb-IIIa (Fig 5), codificado pelos genes *alphaIIb* e $\beta 3$. Com número e morfologia plaquetar normal, esta patologia tem como pilares de diagnóstico a agregação plaquetar e a citometria de fluxo. O tempo de sangria e o PFA-100® apresentam-se prolongados. O complexo GPIIb-IIIa, uma vez activado, é imprescindível à ligação ao fibrinogénio, pelo que, indivíduos com esta patologia não agregam com os agonistas clássicos: ácido araquidónico, ADP, colagénio e epinefrina mas apresentam resposta normal à ristocetina, uma vez que o complexo GP Ib-IX-V que liga ao FvW está intacto. A citometria fluxo permite confirmar o diagnóstico através da diminuição ou ausência de marcação para o CD41(GPIIb) e CD61(GPIIIa), com níveis normais de CD42 (GP Ib), ou diminuição/ausência de marcação para PAC1 após activação plaquetar no caso de deficiência qualitativa do receptor (Tabela 6). Doentes com Trombastenia de Glanzman apresentam clínica hemorrágica moderada a grave que melhora com a idade, indistinguível de outras patologias que cursam com plaquetas normais em número e morfologia, como é o caso dos defeitos de secreção(16).

Disfunção plaquetar - Defeitos de secreção/sinalização

O grupo de defeitos de secreção/sinalização plaquetar subdivide-se em 2 subgrupos, de acordo com a fisiopatologia: i) diminuição ou ausência de material de secreção genericamente designada doenças de armazenamento ou *Storage Pool Disease* (SPD); ii) alteração dos mecanismos de secreção e/ou sinalização. O primeiro grupo inclui os defeitos de grânulos densos e de grânulos alfa plaquetares, designados δ -SPD e α -SPD respectivamente. A deficiência dos grânulos α cujo síndrome da plaqueta cinzenta é o mais característico apresenta plaquetas gigantes e agranuladas e a clínica hemorrágica é leve e associada à gravidade da trombocitopenia. As SPD apresentam uma grande variabilidade de respostas na agregação e que nalguns casos pode ser normal. As alterações dos grânulos podem ser caracterizadas por microscopia electrónica ou luminometria. Deficiências na expressão de proteínas granulares podem ser detectadas por Citometria de fluxo (Tabela 7).

As alterações de sinalização podem estar associadas com defeitos de enzimas implicadas na transdução de sinal: Cinases, Ciclooxygenases, Lipases, proteínas G, etc. Os indivíduos afectados apresentam diátese hemorrágica moderada e alterações na activação, secreção e agregação induzidas por agonistas fracos, são patologias difíceis de diagnosticar, no entanto a combinação de técnicas de activação plaquetar por citometria de fluxo e agregação plaquetar podem levar a esta suspeita diagnóstica quando excluídas as causas mais comuns de disfunção plaquetar(19).

Deficiências da actividade procoagulante

As deficiências de actividade procoagulante são extremamente raras e podem suspeitar-se em indivíduos com história hemorrágica, com número plaquetas normal e sem alterações nos estudos de agregação. Alterações na expressão da Fosfatidilserina (PS) na membrana fosfolipídica plaquetar estão na base das nas Síndromes de Scott e Stormorken. Na Síndrome de Scott ocorre uma externalização deficiente da PS, durante a activação plaquetar, que leva a uma actividade procoagulante diminuída e conseqüente diminuição da activação local da coagulação. A externalização de PS aumentada ocorre na Síndrome Stormorken apresentando um aumento da actividade procoagulante que paradoxalmente não se associa com risco trombótico, e cujos indivíduos afectados têm tendência hemorrágica moderada (Tabela 7)(18). O diagnóstico pode ser feito pela avaliação da Anexina V por CF.

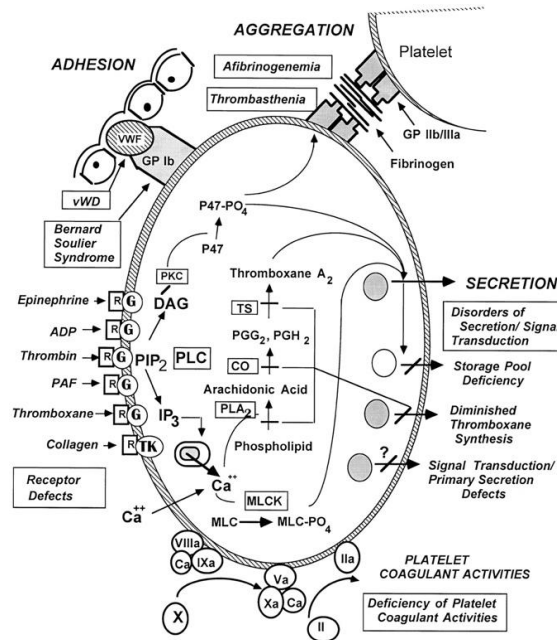


Figura 4. Representação esquemática das respostas plaquetares normais e das alterações nas patologias congénitas da função plaquetar. Abreviaturas (Siglas em inglês): AC, adenylyl cyclase; CO, cyclooxygenase; DAG, diacylglycerol; G, GTP-binding protein; IP3, inositoltrisphosphate; MLC, myosin light chain; MLCK, myosin light chain kinase; PIP2, phosphatidylinositol bisphosphate; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; PLA2, phospholipase A2; TK, tyrosine kinase; TS, thromboxane synthase; VWF, von Willebrand factor; VWD, von Willebrand disease. Rao Adaptado de (19)

Tabela 6. Patologias hereditárias da função plaquetar por defeitos de recetores de membrana Adaptado de (18)

Recetor	Denominação	Fenótipo clínico e laboratorial	Herança Genética	Genes
Ib/IX/V	Síndrome de Bernard- Soulier (SBS)	Trombocitopenia moderada a severa e plaquetas gigantes. PFA – 100@ >300s. Ausência de LTA com ristocetina, não corrigível com plasma normal e LTA normal com outros agonistas. Defeito de adesão ao FvW. Ausência ou diminuição da GPs Ib α , Ib β e IX por citometria de fluxo (SBS clássico). Em homocigóticos clínica hemorrágica moderada a grave desde a infância (epistáxis, púrpura, sangramento gengival, menorragia). Sangramento excessivamente grave em situações de risco (partos, cirurgia, intervenções dentárias, ingestão de aspirina). Heterocigóticos assintomáticos.	AR	<i>GPIBA</i> <i>GPIBB</i> <i>GP9</i>
Ib/IX/V	Doença de von Willebrand tipo plaquetar (DvW-TP)	Macrotrombocitopenia mais moderada do que em SBS. Adesão ao FvW anormalmente alta, agregados plaquetares em esfregaço de sangue periférico. Hiperagregação com doses baixas de ristocetina. Agregação de plaquetas lavadas induzidas em crioprecipitado (não em DvW). Ausência de multímeros de FvW de alto peso molecular (como DvW 2B). Expressão normal ou moderadamente reduzida de GPs Ib α por citometria de fluxo. Sintomatologia hemorrágica cutâneo-mucosa ou sangramento pós cirurgia.	AD	<i>GPIBA</i>
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Trombastenia de Glanzmann (TG)	Contagem e morfologia plaquetar normal. PFA – 100@ >300 LTA ausente ou severamente reduzida com todos os agonistas (ADP, TxA2, ADP, trombina, colagénio). LTA normal com ristocetina ou 2ª onda reduzida. Ausência ou diminuição de GPs IIb e IIIa demonstrável por citometria de fluxo: Tipo I <5%; Tipo II 10-20%; TG. Variante de $\alpha_{IIb}\beta_3$ não funcional >50%. Retração do coágulo ausente ou severamente reduzida. Clínica hemorrágica semelhante à SBS.	AR	<i>ITGA2</i> <i>B</i> <i>ITGB3</i>
P2Y12	-	Contagem e morfologia plaquetar normal. Alteração conformacional com ADP normal. LTA severamente diminuída com ADP. Com outros agonistas normal ou 2ªonda reduzida. Ausência de inibição com ADP da síntese de AMPc induzida com PGE1. Sem clínica hemorrágica espontânea ou muito moderada. Sangramento anormal associado a ingestão de antiagregantes, intervenções dentárias ou outras situações de risco hemorrágico.	AR	<i>P2RY1</i> <i>2</i>

TxA2-R (TPα)	-	Contagem e morfologia plaquetar normal. LTA severamente diminuída com ácido araquidónico ou análogos de TxA2 como U46619 ou STA2. Com outros agonistas normal ou 2ª onda reduzida. Sem clínica hemorrágica espontânea ou muito moderada. Sangramento anormal associado a ingestão de antiagregantes, intervenções dentárias ou outras situações de risco hemorrágico	AR	TBXA2 R
GPVI	-	Contagem e morfologia plaquetar normal. LTA severamente diminuída com colagénio e normal com outros agonistas. Defeito de ativação por colagénio e agonistas de GPVI como convulxina. Sem clínica hemorrágica espontânea ou muito moderada. Sangramento anormal associado a ingestão de antiagregantes, intervenções dentárias ou outras situações de risco hemorrágico	AR	GP6

Abreviaturas (Siglas em inglês): AR – Autosossomico Recessivo AD – Autosossomico Dominante

Tabela 7. Patologias hereditárias da função plaquetar por defeitos de Secreção(A) e Sinalização(B) Adaptado de (18)

A – Defeitos de Secreção

Defeito	Denominação	Fenótipo clínico e laboratorial	Herança Genética	Genes
Grânulos α e δ	Défice de grânulos idiopático	Contagem plaquetas Normal ou ligeiramente diminuído. Deficiência de grânulos δ e/ou α por microscopia electrónica. LTA reduzida e/ou ausência com agonistas débeis/ baixas doses (ADP, EPI e Colagénio). Défice de libertação de proteínas granulares por CF Clínica hemorrágica ausente ou muito moderada e normalmente associada a situações de elevado risco hemorrágico.	AR/AD	
Grânulos α	Síndrome da Plaqueta Cinzenta	Trombocitopenia moderada (30-100 x10 ⁹ /L) Plaquetas gigantes e acinzentadas. LTA normal ou reduzida com agonistas débeis/ baixas doses (ADP, EPI e Colagénio) e trombina. Deficiência selectiva de GPVI e resposta ao colagénio em alguns doentes Deficiência de proteínas α-granulares em ensaios bioquímicos (β – TG e PDGF, etc.) Deficiência de grânulos α demonstrável por Microscopia Electrónica Mielofibrose precoce, esplenomegalia ocasional clínica hemorrágica leve, normalmente associada a situações de risco (antiagregantes, cirurgia, parto, traumas)	AR/AD	NBEAL 2

	Síndrome de QUEBEC	Trombocitopenia moderada (100 x10 ⁹ /L) LTA ausente ou reduzida com EPI e normal com os outros agonistas. Deficiência de actividade procoagulante. Aumento da actividade fibrinolítica. Deficiência de proteínas α-granulares por CF (CD 62P, Factor V) Clínica hemorrágica cutâneo-mucosa e visceral e Resposta ao tratamento com antibibrinólíticos e sem resposta a transfusão de plaquetas.	AD	PLAU
Grânulos	Síndrome de Hermansky-Pudlack (SHP)	Contagem e morfologia plaquetar normal. Deficiência selectiva de grânulos δ demonstrável por Microscopia Electrónica LTA reduzida e/ou ausência de 2ªonda com agonistas débeis/ baixas doses (ADP, EPI e Colagénio). Deficiência de captação de serotonina marcada radioactivamente e de captação de mepacrina e libertação de CD63 por CF. Albinismo oculo-cutâneo, acumulação de material ceróide tipo lipofusina no sistema mononuclear fagocítico.	AR	HPS1→ HPS8
	Síndrome Chediak-Higashi (SCH)	Contagem e morfologia plaquetar normal. Deficiência selectiva de grânulos δ por Microscopia Electrónica LTA reduzida e/ou ausência de 2ªonda com agonistas débeis/ baixas doses (ADP, EPI e Colagénio). Deficiência de captação de serotonina marcada radioactivamente e de captação de mepacrina e libertação de CD63 por CF. Albinismo oculo-cutâneo, grânulos lisossomais gigantes.	AR	LYST
	Síndrome Griscelli	Contagem e morfologia plaquetar normal. Deficiência de grânulos δ como nos SHP e SCH Albinismo, defeitos neurológicos, linfocitose, função citotóxica diminuída de células NK e linfócitos T.	AR	RAB27, MYO5A , MLPH

B – Defeitos de Sinalização

Defeito	Denominação	Fenótipo clínico e laboratorial	Herança genética	Genes
Transmissão de sinais de ativação	Défice de enzimas das vias de TxA2	Contagem e morfologia plaquetar normal. Ocasionalmente trombocitopenia moderada. LTA seletivamente reduzida com ácido araquidónico e normal com análogos de TxA2 como U46619. Reduzida com agonistas débeis/baixas doses (ADP, epinefrina, colagénio). Defeito de produção de TxA2 no soro. Clínica hemorrágica ausente ou moderada e normalmente associada a situações de risco hemorrágico alto.	AR/AD	PTGS1, TBXS

	Défice de proteínas G (Gi, Gq, Gs)	Contagem e morfologia plaquetar normal. Hiperfunção de Gs pode associar-se a discreta macrotrombocitopenia e transtornos neurológicos. LTA e secreção reduzida em resposta a múltiplos agonistas solúveis. Clínica hemorrágica moderada e normalmente associada a situações de risco hemorrágico alto.	Nc	Instabilidade de ARNm de Gq, Gi, Gs GNAS1 que codifica Gs
	Défice de Fosfolipase Cβ, Proteína cinase C-θ Lipooxigenase -12	Contagem e morfologia plaquetar normal ou trombocitopenia moderada. Defeito de LTA, secreção e ativação em resposta a múltiplos agonistas solúveis. Clínica hemorrágica moderada e normalmente associada a situações de risco hemorrágico alto.	Nc	Fatores de transcrição CFFA2, GATA-1
Atividade procoagulante	Síndrome de Scott	Contagem e morfologia plaquetar normal. Diminuição da agregação de micropartículas e de expressão plaquetar de anexina V pós-ativação demonstrável por citometria de fluxo. Formação e retração do coágulo anormal. Sangramento significativo em situações de risco (parto, intervenções dentárias).	AR	ABCA1, TEMEM16F
	Síndrome de Stormorken	Aumento anormal da criação de micropartículas e de expressão plaquetar de anexina V pós-ativação, demonstrável por citometria de fluxo. Formação e retração anormal do coágulo. Sangramento significativo em situações de risco (parto, intervenções dentárias)	Nc	Nc

Diagnóstico de Patologia Plaquetar

Classicamente, o diagnóstico das patologias da plaqueta é orientado por uma abordagem morfológica em termos de número e tamanho e de estudos funcionais, mais complexos, para determinação do mecanismo afectado.

O estudo destas patologias, deve ser orientado por algoritmos de estudo com diferentes níveis de complexidade. Inicia-se com o hemograma, avaliação morfológica e testes de rastreio como o PFA-100® e prossegue com testes mais específicos e não disponíveis em todos os laboratórios. Testes como agregação plaquetar, citometria de fluxo e estudos moleculares que permitem uma sequência na aproximação à avaliação quer da trombocitopenia, quer das anomalias funcionais e genéticas(20). Dos testes disponíveis para estudo da função plaquetar o recomendado para o diagnóstico destas patologias é a agregometria(21). No entanto a fraca standardização dos testes da função plaquetar e falta de consensos relativamente à definição de critérios mínimos têm dificultado o diagnóstico, já por si só de elevada complexidade (22)(23).

Para o propósito deste trabalho, as patologias hereditárias da plaqueta foram agrupadas em:

- 1) trombocitopenias hereditárias, em que as alterações resultam numa diminuição do número de plaquetas na corrente sanguínea;
- 2) patologias da função plaquetar, alterações que condicionam disfunção plaquetar (por vezes associada com diminuição do número).

História Clínica e medicamentosa

A investigação laboratorial de patologia plaquetar é um processo em vários passos, que se inicia com uma história clínica detalhada que inclua revisão da medicação recente, bem como o uso de suplementos e alimentos que possam influenciar a função plaquetar. A avaliação clínica deve incluir história de hemorragia pessoal e familiar (em especial manifestações não explicadas: equimoses extensas, epistaxis, menorragia e complicações hemorrágicas no parto, associadas a cirurgia e extracções dentárias). No exame físico devem registar-se para além dos sintomas hemorrágicos sugestivos de patologia plaquetar, potenciais alterações com características sindrómicas (perda de audição, cataratas, dismorfismos ósseos, cardíacos e da face, atraso mental e alterações da pigmentação da pele).

Bleeding Assessment Tool (BAT)

Devido ao facto de a valorização dos sintomas hemorrágicos ser subjectiva, foi criada uma ferramenta, o BAT (*Bleeding Assessment Tool*), inicialmente desenvolvida para o diagnóstico da Doença de vonWillebrand, constituída por um questionário *standardizado* com questões sobre sintomas hemorrágicos, sendo a gravidade de cada sintoma contabilizada através de um “score” de 0 a 3 (24)(25) (26). Este questionário foi também adaptado à população pediátrica (PBQ - *Pediatric Bleeding Questionnaire*) (27) e está actualmente em desenvolvimento/validação uma adaptação desta ferramenta para o diagnóstico das patologias plaquetares (número e função). Estudos recentes tentaram estabelecer o “score hemorrágico” como preditor de patologia hemorrágica plaquetar no entanto sem sucesso. Contudo, recomenda-se a sua inclusão nas estratégias de diagnóstico destas patologias hemorrágicas(26).

Testes de rastreio

Sempre que os sintomas hemorrágicos não forem completamente explicados pela avaliação laboratorial “*standard*” da coagulação, fibrinólise ou despiste de Doença de von Willebrand (DvW), a investigação deverá direccionar-se para o estudo de patologia plaquetar. Este estudo inicia-se com a avaliação do número e tamanho das plaquetas efectuada em contadores automáticos(20).

Contagem de Plaquetas e Esfregaço de Sangue periférico

O diagnóstico laboratorial inicia-se com testes de rastreio: hemograma e esfregaço de sangue periférico que permitem avaliar o número e morfologia plaquetares. Os parâmetros plaquetares (Volume Plaquetar Médio - VPM; e Grau de Anisocitose Plaquetar-PDW) podem ser um elemento importante. Os contadores automáticos, em situações de macrotrombocitopenia e microtrombocitopenia fornecem um valor de VPM não muito exacto, nesta situação a observação do esfregaço de sangue periférico permite informação adicional. Aspectos como o

tamanho, o número e granularidade das plaquetas e a presença de agregados serão elementos importantes no diagnóstico. A observação de inclusões nos leucócitos (corpos de Döhle) ou alterações da morfologia eritrócitária (presença de estomatócitos) pode fazer suspeitar de patologias específicas: *MYH9 related disorders* e *GATA-1 related thrombocytopenia* respectivamente(18).

Testes de rastreio da função plaquetar

O tempo de sangria e o PFA -100® têm sido utilizados para o rastreio da função plaquetar. No entanto, a sua utilidade no diagnóstico é matéria de discussão e a ultima Guidance do comité para o diagnóstico das patologias plaquetares da ISTH considera que devem ser opcionais, não os incluindo no seu algoritmo de estudo(20).

Tempo de sangria

O tempo de sangria (TS) foi o primeiro teste “in vivo” da função plaquetar, modificado várias vezes na tentativa de aumentar a sua fraca reprodutibilidade. Consiste no registo do tempo que demora a parar o sangramento produzido por uma pequena incisão de dimensões standardizadas infligida, por um dispositivo automático, na pele do antebraço ou lóbulo da orelha. Valores inferiores a 10 min são considerados normais. Tempos de sangria prolongados são encontrados nas formas severas da patologia da plaqueta, bem como na DvW e nas alterações vasculares. É um teste simples de avaliação da hemostase natural, incluindo a contribuição do vaso sanguíneo, que embora seja clinicamente útil apresenta desvantagens: invasivo, com baixa reprodutibilidade, demorado e pouco sensível a formas ligeiras de disfunção plaquetar. O seu uso tem sido a pouco e pouco abandonado e substituído pelo uso do PFA-100®, teste mais reprodutível e menos invasivo e por isso adequado a populações pediátricas.

PFA – 100®

Equipamento controlado por um microprocessador que permite uma avaliação quantitativa da hemostase primária, em condições de elevada tensão de cisalhamento. Usa cartuchos com uma membrana de celulose com orifício central (147 µm), revestida por Colagénio/Epinefrina ou Colagénio/ADP. Nestas condições de elevada tensão de cisalhamento (5000 a 6000/s) e em resposta aos agonistas da membrana, ocorre formação de agregados plaquetares que provocam diminuição do fluxo e finalmente a oclusão da abertura central da membrana que é registada como tempo de oclusão (TO), num tempo máximo de leitura 300s. As variáveis que afetam este teste são comuns à função plaquetar: número de plaquetas ($<80 \times 10^9/\mu\text{l}$ hematócrito (Hct $<30\%$), medicação (aspirina, AINE's, etc.), dieta alimentar e grupo sanguíneo ABO. O tempo de oclusão parece ser maioritariamente determinado pela agregação mediada pelo recetor GPIIb-IIIa e pelas interações do FvW com a GP Ib e /ou GPIIb-IIIa, o que justifica

a sua principal aplicação clínica no diagnóstico e monitorização da DvW e na identificação de alterações adquiridas ou congénitas da função plaquetar, em especial defeitos major de receptores de adesão (SBS) e agregação (TG), monitorização de terapia antiagregante e avaliação do risco hemorrágico pré cirúrgico. Em contrapartida, outros receptores que participam na adesão e/ou agregação têm uma importância secundária ou reduzida nas condições de fluxo sanguíneo monitorizado pelo PFA-100, razão pela qual o teste pode ser pouco sensível a alterações da secreção/sinalização (28).

Em comparação com TS este mostrou ser mais sensível, em especial para a DvW e défices plaquetares(29). A mais valia do PFA para o diagnóstico das patologias da função plaquetar é assunto de debate e existem artigos que não recomendam o seu uso na abordagem ao diagnóstico destas patologias, muito embora como já referido permita despistar/excluir situações de patologia severa o que pode ser interessante em determinadas situações(20).

Considerado um teste “point of care” (POCT), foi recentemente lançada uma actualização deste equipamento, o Innovance PFA-200®, concebido para permitir a monitorização de tratamento com inibidores do P2Y12 (cartucho Innovance P2Y em que a membrana está revestida por ADP, prostaglandina E1 e cálcio). A sua utilização para o diagnóstico de défice de receptor P2Y12 carece de investigação(30).

Outros equipamentos de Point of Care Test (POCT)

Existem no mercado outros equipamentos POCT cuja aplicabilidade, está essencialmente ligada à monitorização de terapêutica antiagregante e que podem agrupar-se de acordo com as suas características: i) medem a adesão e agregação em condições de elevada tensão de cisalhamento, à semelhança do PFA-100®, como é o caso do IMPACT® Cone and Plate(let) Analyser; ii) avaliam a agregação, como o Verify Now® e Platelet Works®; ii) medem a formação e elasticidade do coágulo, Rotem® e TEG®. O desenvolvimento do teste TEG® Platelet Mapping System™, teve por objectivo tornar a tromboelastografia sensível às alterações relacionadas com os receptores de ADP e TXA2 tendo demonstrado um boa sensibilidade aos fármacos e ser sensível à disfunção severa em crianças sujeitas a oxigenação por membrana extracorporeal (30) (31).

Testes específicos

Quando os testes de rastreio apresentam alterações, ou quando normais e a história clínica é muito sugestiva, o estudo é direccionado para a execução de testes específicos.

Agregometria de transmissão de luz (LTA)

Em 1962, Born e O’Brien descrevem um método de agregação em plasma rico em plaquetas, utilizando como agonista ADP, que veio revolucionar a análise da função plaquetar. A agregação plaquetar é ainda hoje considerada a técnica “gold standard” para o diagnóstico das

patologias da função plaquetar. Nos agregómetros actuais o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é colocado numa cuvete, sob agitação a 37°C, sob uma fonte de luz e um foto detector. Após a adição de um agonista e à medida que as plaquetas se activam e agregam ocorre uma variação na luz transmitida. Esta é registada sob a forma de curva de agregação e reflecte a capacidade de resposta das plaquetas ao respectivo agonista avaliando a respectiva via de activação (Fig 5). A adição de um painel de agonistas como o colagénio, ADP, Trombina ou em sua substituição o TRAP (thrombin receptor activating peptide), Epinefrina, Ristocetina e Ácido Araquidónico em várias concentrações induz activação, mudança de forma e agregação que são registados como curvas de agregação que, nos equipamentos mais recentes, são tratadas informaticamente por “software” específico, ao contrário do que acontece nos equipamentos mais antigos, onde as curvas são registadas em papel num registador acoplado ao agregómetro. São vários os parâmetros medidos e incluem a taxa de inclinação ou de agregação (% / min) e a amplitude máxima ou percentagem de agregação(%) medida após um determinado período de tempo, normalmente 3-5 min podendo em determinadas situações estender-se até aos 10min (32).

A técnica é afectada por um conjunto de variáveis: punção/colheita, anticoagulante, nº plaquetas no PRP e contaminação com eritrócitos, PH e temperatura. Relativamente ao número de plaquetas no PRP existem opiniões divergentes quanto à necessidade de efectuar ajuste, com trabalhos a defenderem o ajuste para valores de 250×10^9 /fL plaquetas (33) e outros a não encontrarem diferenças nos resultados(34), actualmente não é recomendado o ajuste (32). Outra das questões que se levanta é a falta de controlos comerciais para esta técnica, assim habitualmente, estes estudos são efectuados em paralelo numa amostra de um individuo normal (Controlo), colhida e processada nas mesmas condições da amostra do doente. Os agonistas e respectivas concentrações a utilizar têm sido matéria de estudo e debate, os Guidelines 2011 (14) propõem um painel com dois níveis: Painel Básico (ADP, Colagénio, Ristocetina, EPI e AA) e Painel Extra (TRAP, PMA, U46619 (análogo do TXA2), que pode ser adaptado à realidade dos centros de diagnóstico, como a proposta da Tabela 8. Consoante o padrão de respostas poderemos suspeitar de determinada anomalia/patologia(14).

Esta metodologia é demorada, pouco standardizada e requer grandes volumes de amostra.

Com o intuito de minimizar estas limitações e estabelecer consensos têm sido efectuados esforços no sentido da uniformização dos procedimentos, com várias entidades a publicar recentemente *guidelines* de standardização (32)(35). A capacidade de diagnóstico desta metodologia tem sido objecto de vários trabalhos, Hayward no trabalho publicado em 2009 sobre a utilidade diagnóstica da LTA para despiste de patologia plaquetar em doentes referidos por suspeita de doença hemorrágica, descreve uma associação entre o número agonistas com respostas alteradas por LTA e a presença de patologia, a probabilidade de detetar patologia era maior para os que apresentavam resposta diminuída a 2 ou mais agonistas (21)(36).

Lumiagregometria

A técnica de agregometria pode ser combinada com a luminescência – luminometria para a medição da reacção de libertação dos nucleótidos (ATP e ADP) dos grânulos densos. Resumidamente, a adição do reagente luciferin-luciferase em simultâneo com um agonista, promove a libertação do ATP dos grânulos densos que reage com a luciferina-luciferase resultando na emissão de luz que é quantificada relativamente a um padrão. O registo da resposta é feito em simultâneo com a agregação. Está indicada para o diagnóstico das patologias secreção/sinalização, em especial dos grânulos densos(37).

Agregação Plaquetar em Sangue Total

A agregação pode também ser avaliada em sangue total, por método de impedância. O recente desenvolvimento do equipamento Multiplate®, no qual se associa a secreção parece ser promissor, no entanto a sua aplicação ao estudo das patologias plaquetares ainda não está validado, mantendo-o o seu uso essencialmente na monitorização da terapia antiagregante.

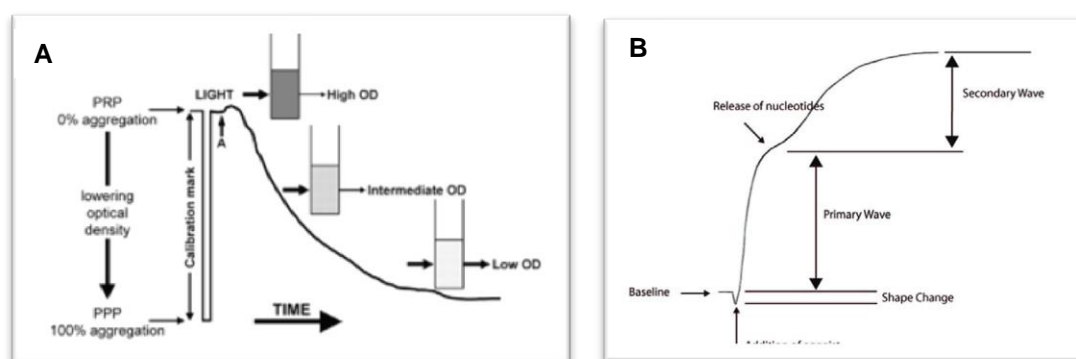


Figura 5. Diagrama do traçado/curva típica de agregometria de leitura turbidimétrica.

A) O PRP nativo tem uma elevada densidade óptica (OD) e representa o 0% de agregação. Na sequência da adição de agonista (A), as plaquetas agregam permitindo a passagem de mais luz através da suspensão de plaquetas e resultando na redução da densidade óptica. O PPP autólogo fornece a leitura de densidade óptica equivalente a 100% de agregação, conforme indicado pela marca de calibração. O aumento transitório na densidade óptica que é observado após a adição do agonista é atribuído ao fenómeno de *shape change* ou alteração de forma da plaqueta.

B) À medida que as plaquetas agregam, em resposta à adição de um agonista exógeno, a amostra torna-se mais límpida devido ao aumento na agregação das plaquetas traduzido como a resposta primária a um agonista exógeno (1ª onda de agregação), seguido por uma resposta secundária à libertação do conteúdo dos grânulos densos (2ª onda de agregação), este é o comportamento típico de agonistas fracos ADP e EPI, no entanto esta resposta bifásica pode ser mascarada se forem usadas concentrações elevadas de agonista. Adaptado de Gibbins (38) e (39)

Tabela 8. Painel de agonistas Plaquetares

Adaptado de (37)

Agonista	Concentração inicial	Intervalo de concentrações	Alvo
<u>Painel básico</u>			
ADP	2 - 2,5 μ M	0,5 - 20 μ M	P2Y ₁ e P2Y ₁₂
Epinefrina	5 μ M	0,5 - 10 μ M	Recetores adrenérgicos
Colagénio (tipol)	1 - 2 μ g/mL	1,0 - 5,0 μ g/mL	GP VI e α 2 β 1
Ácido araquidónico	1 mM	0,5 - 2,0 mM	Síntese de Tromboxano A2
Ristocetina	1,2 mg/mL	1,0 - 1,5 mg/mL	FvW / GP Ib
	0,5 mg/mL	0,5 - 0,7 mg/mL	
<u>Painel extra</u>			
TRAP	10 μ M	10 - 100 μ M	PAR - 1

Abreviaturas (Siglas em inglês): TRAP – Peptídeo activado pela trombina PAR – Recetor 1 da protease ativada

Citometria de Fluxo

A introdução da citometria de fluxo ao estudo da plaqueta, por Michelson em 1996(40), constituiu uma ferramenta poderosa e sensível e veio permitir uma abordagem ao estudo da função plaquetar mesmo em situações em que outras técnicas apresentavam limitações, como por exemplo amostras pediátricas de volume reduzido e/ ou amostras com trombocitopenia. No entanto o facto de exigir equipamentos sofisticados e dispendiosos, anticorpos monoclonais disponíveis e pessoal especializado dificulta o seu uso generalizado. A citometria de fluxo permite a análise da capacidade funcional das plaquetas de forma individual e a medição da expressão de marcadores de activação nas plaquetas individuais, bem como a quantificação de associados entre plaquetas e outras células de sangue leucócitos-plaqueta.. A mais valia desta técnica é a determinação da expressão das glicoproteínas e receptores pela densidade de cópias. Esta técnica é usada para confirmar a deficiência de GP e outros receptores em situações de patologia. Permite ainda avaliar a função das plaquetas através da sua capacidade para desgranularem (teste da mepacrina e CD63), expressarem marcadores de activação como a P-selectina (CD62P) e a alteração conformacional da GPIIb-IIIa (PAC-1) e exposição dos fosfolípidos de carga negativa para avaliação da actividade procoagulante da plaqueta (Anexina V).

Os testes de citometria de fluxo mais vulgarmente usados são a quantificação da expressão de receptores de plaquetas GP basal permitindo quantificar deficiências de GP IIb-IIIa na trombostenia de Glanzmann e de GP Ib/IX/V na síndrome de Bernard-Soulier. A avaliação da composição de grânulos das plaquetas pelo teste da mepacrina descrito por Wall et al., 1985, permite medir a captação e libertação de mepacrina pelos grânulos densos. A utilização conjunta desta técnica com o CD63 que avalia o número de grânulos, permite detetar incapacidade na secreção do conteúdo e/ou deficiências quantitativas dos grânulos densos, cujas alterações estão na base das δ -SPD, considerado o grupo de patologias plaquetares mais frequentes (34)(41). Existem estudos que referem uma exposição superficial diminuída de CD62p (P-selectina) em doentes com α -SPD(42).

A alteração da conformação da GP GPIIb-IIIa, em resposta à activação plaquetar e permite a sua ligação ao fibrinogénio, pode ser detetada com utilização do anticorpo PAC-1 que

reconhece a sua conformação activa. A ligação do anticorpo PAC-1 à GP GPIIb-IIIa reflete a capacidade das plaquetas se ligarem ao fibrinogénio e está comprometida na TG e nas SPD.

A análise das plaquetas por citometria fluxo, considerada uma ferramenta poderosa na investigação e diagnóstico, apresenta no entanto algumas desvantagens. A maior limitação relaciona-se com o facto dos testes não serem feitos em condições de “high shear stress” e por isso não reflectem as respostas fisiológicas de adesão, activação e agregação.

Do ponto de vista técnico a necessidade de processamento rápido e cuidado da amostra e acesso imediato a um citómetro tornam-na uma técnica exigente. Do ponto de vista mecânico a sua limitação reside no facto de avaliar as plaquetas de forma individual e portanto avalia activação independente da agregação ou da formação de TXA₂(43).

Neste contexto, o uso desta técnica como complementar da Agregometria pode ser uma mais valia e tornar o diagnóstico mais fácil e eficaz em especial para caracterização de situações de suspeita de patologia dos grânulos densos(44).

Microscopia electrónica de transmissão

Esta técnica laboriosa e complexa, só está disponível em laboratórios especializados, no entanto é considerada técnica complementar de diagnóstico para alterações da ultraestrutura e do número ou conteúdo dos grânulos densos (41)

Outros testes usados no estudo da função plaquetar

Doseamentos do PF4 (Factor Plaquetar 4), β -tromboglobulina, e da P-Selectina solúvel, doseamentos dos metabolitos do TXA₂ no plasma e na urina, entre outros, permitem caracterizar determinadas alterações.

Estudo molecular

Considerado o ultimo passo no diagnóstico das IPD, o estudo molecular está actualmente dependente da orientação diagnóstica obtida pelas alterações encontradas nos testes funcionais, que apontem para os genes afectados que são conhecidos (genes candidatos). No entanto, o desenvolvimento da sequenciação massiva paralela (NGS – Next Generation Sequencing) está a mudar esta abordagem através do estudo de amplos painéis de genes e permitirá num futuro próximo elucidar muitas alterações até agora desconhecidas (45) (46).

Apesar de todas as técnicas disponíveis nem sempre se consegue identificar uma patologia específica. Para além de se descartar ou excluir patologia plaquetar grave em indivíduos com história hemorrágica sugestiva em muitos casos só é possível incluir os doentes em grandes grupos de diagnóstico.

Tratamento

A importância de um diagnóstico adequado destas patologias relaciona-se com as opções de tratamento que varia conforme as patologias e as situações clínicas de desafio hemostático.

A maioria dos doentes com patologia plaquetar hereditária não necessita de terapia regular, só requiere tratamento clínico na sequência de lesão ou trauma, quando sujeitos a procedimentos cirúrgicos ou durante episódios hemorrágicos. A transfusão de plaquetas, que ocupa um lugar de destaque em situações de urgência, não está indicada na TG, pelo risco de desenvolvimento de anticorpos contra o complexo GPIIb-IIIa. O uso de FVIIa está aprovado para tratamento nesta patologia. A aplicação de medidas de compressão no local é recomendada para pequenas feridas, hemorragias das gengivas e do nariz (gengivorragias e epistaxis). As opções farmacológicas incluem, agentes hemostáticos tópicos (esponjas de gelatina, selantes de fibrina e agentes antifibrinolíticos como o ácido tranexâmico), desmopressina (DDAVP), FVIIa e contraceptivos orais para controlo da hemorragia relacionada com perdas menstruais na mulher. (16).

OBJECTIVO

A complexidade da fisiologia plaquetar patente na heterogeneidade das patologias hereditárias da plaqueta e respetivas manifestações clínicas, dificultam o diagnóstico exacto e atempado dos pacientes com estas patologias. A caracterização destas patologias encontra-se limitada pela variabilidade e baixa especificidade dos testes mais comuns da função plaquetar, e ainda pelo acesso limitado ao estudo molecular e à falta de centros de referência especializados para o estudo destas patologias.

- Efectuar uma reavaliação da tendência hemorrágica dos doentes incluídos neste - estudo, através do uso de uma escala quantitativa comum - questionário standardizado (BAT)
- Analisar os resultados obtidos nos estudos de função plaquetar, agregometria e citometria de fluxo e avaliar se a sua utilização conjunta é uma mais valia para chegar a um diagnóstico e/ou excluir patologia

MATERIAL E MÉTODOS

Doentes e Controlos

Doentes

Este estudo incidiu sobre um grupo de doentes enviados à consulta de Hemostase e Imunohemoterapia do Serviço de Hematologia do CHUC, para esclarecimento de tendência hemorrágica durante um período de 6 anos (2009 e 2014). A avaliação inicial destes doentes permitiu despistar patologias adquiridas ou défices congénitos da coagulação bem como Doença de vonWillebrand, ficando assim por esclarecer a suspeita de patologia da função plaquetar.

As amostras dos indivíduos estudados foram colhidas na Consulta, próximo do laboratório no caso dos adultos e nos pediátricos as amostras foram enviadas por transporte interno, à TA.

Trata-se de uma avaliação retrospectiva dos resultados obtidos para os estudos da função plaquetar por agregação plaquetar e Citometria de fluxo efectuados na Unidade de Trombose e Hemostase e orientados segundo um algoritmo de investigação(47).

As histórias clínicas do grupo de doentes foram revistas e com base no BAT (*Bleeding Assesment Tool*) foi atribuído um “score” hemorrágico. Os dados registados foram analisados de modo a estabelecer uma avaliação quantitativa da severidade da sintomatologia hemorrágica.

Controlos

Amostras controlo de indivíduos normais foram obtidas a partir de elementos voluntários do laboratório, em simultâneo com as amostras dos doentes, aos quais foi efectuado uma pequena história clínica e medicamentosa com resultados negativos (sem sintomatologia hemorrágica, não se encontravam sob terapêutica de longo termo e não tinham tomado fármacos inibidores da função plaquetar nos últimos 10 dias).

Estas foram sujeitas às mesmas condições de transporte e processamento das amostras dos doentes.

Estudos de PFA e agregação

O teste de rastreio PFA-100® efectuou-se de acordo com as instruções do fornecedor. Resumidamente, após homogeneização da amostra por inversão 5-6x, foram pipetados 800 µml de sangue total para cada um dos cartuchos COL/EPI e COL/ADP e registado o tempo de oclusão. Para valorização dos resultados utilizou-se um Intervalo de normalidade ajustado ao grupo sanguíneo, Colagénio/Epinefrina: Grupo 0 (98 – 170 s); Grupo A/B/AB (91-155 s); Colagénio/ADP: Grupo 0 (74 – 104s); Grupo A/B/AB (59-101s)

Os resultados foram usados para dirigir o estudo: história hemorrágica pouco sugestiva com valores de PFA normais – estudo terminado, nos casos em apesar da história ser pouco sugestiva os valores de PFA estavam prolongados – avançou-se para estudos.

Para o estudo de agregação, foram colhidos aproximadamente 13.5 ml de sangue periférico em citrato de sódio 3.2% (0.109 M) com dispositivo de sistema de vácuo. Nas situações em que não foi possível obter esse volume, no caso das crianças, foram aceites volumes menores. Tendo o estudo de agregação sido realizado para apenas alguns agonistas e em concentrações específicas mais informativas para o esclarecimento da situação do doente.

As amostras (doente e controlo) foram colocadas em repouso por um período de 30-45 min e posteriormente centrifugadas a 150 g durante 10-15 min, à temperatura ambiente. Efectuou-se a transferência, com pipeta plástica, dos 2 terços superiores do plasma de cada tubo para tubo de centrifuga 15 ml “Falcon®”. Do plasma rico em plaquetas obtido, foi retirado aproximadamente 0,5ml para efectuar contagem do nº de plaquetas no contador automático CellDyn Sapphire ABBOT®.

Os testes de agregação foram efectuados, a 37°C, no agregómetro CRONOLOG® Dual Aggro-Meter. O plasma pobre em plaquetas (PPP) autólogo foi utilizado para ajustar o zero (a escala) antes da adição de cada agonista. Volumes de 450 µml de PRP foram pipetados em cuvetes de vidro siliconizadas, às quais foram adicionados os seguintes agonistas: Ristocetina 1,25 mg/ml, Colagénio 2ug/ml, ADP 10 e 5 µM, EPI 10 e 5 M, AA 1.6 e 0.5 µM e TRAP 25 µM. Registou-se o *baseline* antes da adição dos agonistas e as respectivas curvas de resposta em papel no registador Amersham Pharmacia Biotech acoplado ao agregómetro, por um período de 5 min. Não foi realizado ajuste do número de plaquetas do PRP.

As curvas foram avaliadas qualitativamente por comparação com o controlo do dia efectuado nas mesmas condições, e a resposta ao agonista classificada como normal, diminuída ou ausente. Nos casos em que o volume de PRP era limitante utilizaram-se os agonistas mais informativos para a suspeita inicial.

Estudos de Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo (CF) é uma técnica que mede e analisa, simultaneamente, múltiplas características físicas de partículas de forma individual, geralmente células, à medida que fluem num fluxo de fluido através de um feixe de luz. Resumidamente, as células individuais em suspensão são marcadas com um anticorpo monoclonal conjugado fluorescente (mAb) e, em seguida, passadas através de uma câmara de fluxo através do feixe concentrado de um laser. Depois de a luz laser activar o fluoróforo no comprimento de onda de excitação, detectores processam a fluorescência emitida e propriedades de dispersão da luz de cada célula. A intensidade da luz emitida é directamente proporcional à densidade de antigénio.

Para os estudos de CF, foram colhidos cerca de 3 ml de sangue periférico em citrato nos adultos e 1 mL para estudos em crianças. As amostras controlo foram sujeitas às mesmas condições de colheita, transporte e processamento.

Os estudos de CF foram realizados nos citômetros FACSCalibur® (Becton Dickinson) ou FC500® (Beckman coulter) em sangue total e a identificação das plaquetas fez-se pela característica de dispersão de luz *side-scatter* e pela positividade anti-CD42b conjugado com FITC. Para cada estudo foram avaliados 10 000 eventos..

Avaliação da capacidade Funcional da GPIIb-IIIa (PAC-1)

No ensaio PAC 1, os agonistas usados e respectivas concentrações foram TRAP (25 µM) e ADP (10 µM). O sangue total foi diluído em solução salina (1:10) e foi adicionado anti- PAC 1 mAbs ao tubo de polipropileno. As amostras foram deixadas em repouso durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente, e novamente suspensas em solução salina, antes da aquisição no citómetro. A percentagem de plaquetas positivas para PAC1 FITC foi avaliada ao nível Basal e após estimulação induzida com os agonistas.

Estudos de ativação plaquetária (avaliação basal e pós estimulação)

Nos ensaios de activação para avaliação da P-selectina (CD62P) e o CD63 (grânulos densos), foram adicionados os agonistas: AA, TRAP6, EPI e ADP a uma concentração final de 0,1 mM, 5 uM e 25 uM, 20 uM e 5 uM, respectivamente. Resumidamente, o sangue total foi diluído em solução salina (1:10) e foram adicionados anti-CD42b-FITC e anti-CD62P-PE ou anti-CD63-PE e mAbs ao tubo de polipropileno. As amostras foram deixadas em repouso durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente, e novamente suspensas em solução salina, antes da aquisição no citómetro. Os resultados para CD62P e CD63 foram expressos como percentagem.

Teste de captação e libertação de mepacrina.

Para o ensaio de captação e libertação de mepacrina, foi diluído sangue total a 1:10 com solução salina e incubou-se com 40 uM mepacrina durante 20 minutos, no escuro à temperatura ambiente (teste de absorção); para o teste de libertação, foi adicionado TRAP6 30 uM ao tubo. As amostras foram novamente suspensas em solução salina e analisadas no citómetro. O resultado foi considerado normal quando o rácio do índice médio fluorescência (IFM) entre a absorção e libertação de mepacrina foi maior do que 1,5.

Análise de dados

Os resultados foram colocados numa base dados em *Microsoft Excell*, onde foram tratados. Para a análise estatística dos dados recorreu-se a medidas de tendência central e na avaliação do grau de concordância entre as metodologias LTA e CF fez-se uso do K de Cohen. Critérios de valorização da concordância: $k < 0$ sem concordância; $0 < k < 0.20$ suficiente; $0.20 < k < 0.40$ moderada; $0.40 < k < 0.60$ boa e $k > 0.80$ muito boa.

RESULTADOS

Caracterização da população

Foram estudados 68 propósitos, 46 adultos e 22 crianças (idade <18 anos). Dos adultos, 28 eram do sexo masculino e 40 do sexo feminino, com média de idade de 43 anos (19-77). No grupo de crianças 9 eram do sexo feminino e 13 do sexo masculino, com média de idade de 10 anos (1-18). Foram ainda estudados 12 familiares pertencentes a 8 famílias. A média de idade na população estudada (n=80) foi de 32 anos (1-77).

Em 71 indivíduos (52 adultos e 19 crianças) foi efectuada a avaliação da sintomatologia hemorrágica através do score de *Rodeghiero et al* (24). O score hemorrágico na população adulta foi em média de 2,26 (0-8) e na população pediátrica de 1,7 (0-5). No global a média do score hemorrágico da população estudada foi de 2,24 (0-8), sendo que 61% (42/71) apresentavam score baixo (<3) (Fig 6).

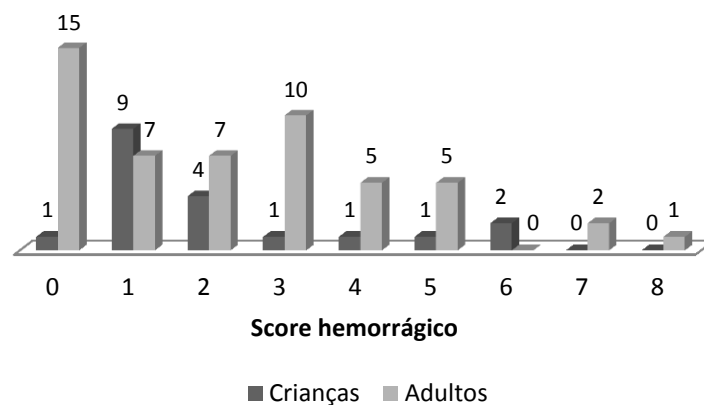


Figura 6. Score hemorrágico nos doentes em estudo (n=71).

Testes de avaliação global (testes de rastreio)

Hemograma - número e volume plaquetar médio

Dos 80 indivíduos estudados, 60 tinham número de plaquetas normal, 19 trombocitopenia ($PLT < 150 \times 10^9/L$) e 1 apresentava ligeira trombocitose ($PLT > 400 \times 10^9/L$). No grupo de doentes com trombocitopenia o volume plaquetar médio foi de 11,5 fL (7,0-17), sendo que 14 tinham macrotrombocitopenia ($VPM > 9,7$ fL).

A observação do esfregaço de sangue periférico não revelou alterações morfológicas sugestivas de patologias sindrómicas.

PFA

O teste de PFA foi efectuado em 77 indivíduos, 70 doentes e 7 familiares. Em 3 doentes não foi efectuado PFA por número de plaquetas $< 80 \times 10^9/L$. No total 54,5% (42/77) tinham o PFA prolongado.

Testes de avaliação específicos: Agregação plaquetar e Citometria de Fluxo da Plaqueta

Tendo em conta os resultados dos testes de avaliação plaquetar globais, os doentes foram agrupados considerando em: i) doentes com trombocitopenia e ii) doentes com contagem plaquetar normal. Para cada grupo os doentes foram subdivididos de acordo com o resultado do PFA.

Doentes com Trombocitopenia

Foram estudados 14 propósitos todos com macrotrombocitopenia ($VPM > 9,7$ fL) e 5 familiares. Dos 16 indivíduos em que se efectuou o PFA, 10 tinham PFA prolongado (62,5%) e 6 PFA normal (37,5%).

Neste grupo, foram efectuados 15 estudos de agregação plaquetar e CF em simultâneo e 4 de CF isolados.

Da análise dos resultados da agregação plaquetar ($n=15$), não foram detectadas alterações em 53,3% (8/15) doentes. Todos os doentes com PFA normal ($n=4$) apresentavam agregações normais, bem como o doente em que não foi feito o PFA (Figura 7).

No grupo de doentes com PFA prolongado ($n=10$), 3 não apresentavam alterações na agregação plaquetar. Neste grupo a alteração mais comum foi a diminuição de resposta à epinefrina (7/10), seguida da diminuição de resposta ao colagénio observada em 5/10 dos doentes estudados. Um doente apresentou diminuição da resposta ao agonista mais forte,

TRAP6. Nos doentes que apresentavam agregação plaquetar alterada, todos com PFA prolongado, 72% (5/7) apresentavam resposta diminuída a 2 ou mais agonistas (**Fig. 7**).

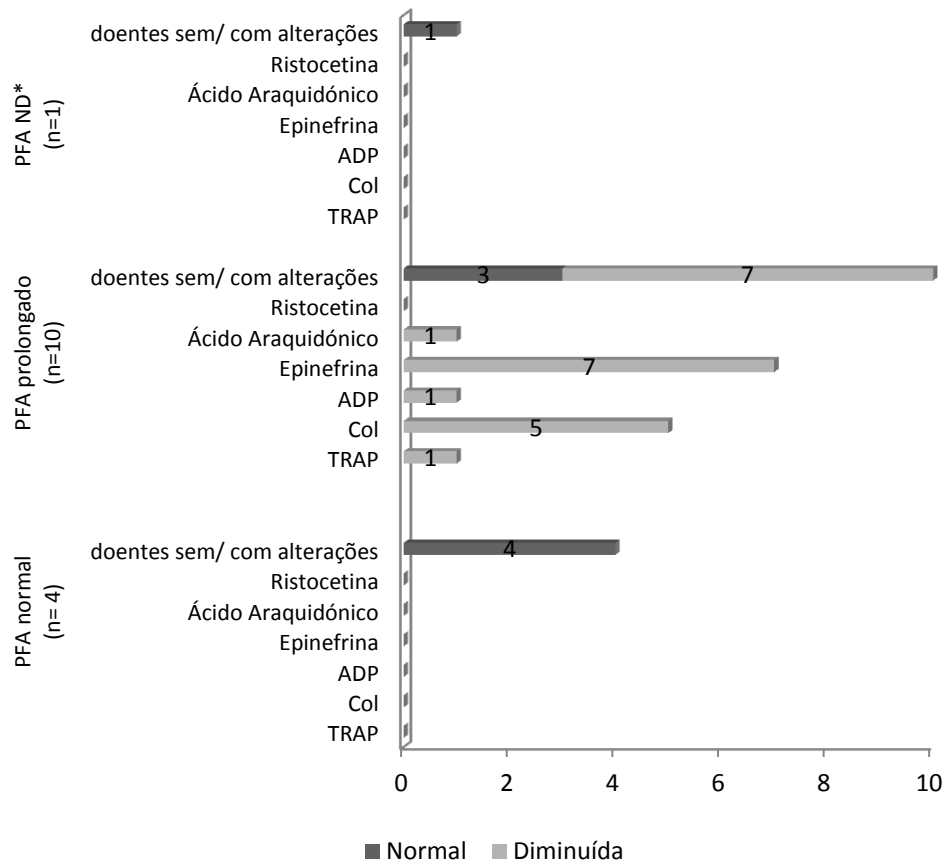


Figura 7 - Resultados de Agregação Plaquetar em doentes com trombocitopenia- Distribuição dos resultados por agonista

O estudo por citometria de fluxo (CF) foi normal em 52,6% (10/19) dos doentes (**Fig. 8**). Apresentavam alterações por CF 50% dos doentes com PFA prolongado (5/10) e 33,3% (2/6) dos doentes com PFA normal. Nos doentes com PFA normal a CF revelou alterações na activação plaquetar, com diminuição de CD62P e CD63 em resposta aos agonistas. Nos doentes com PFA prolongado para além das alterações de activação plaquetar (mais frequentes) observaram-se alterações nos testes mais específicos: mepacrina e ligação do PAC1. Em 21,1% (4/19) dos doentes observou-se uma diminuição do número de glicoproteína Ia, todos com, PFA alterado.

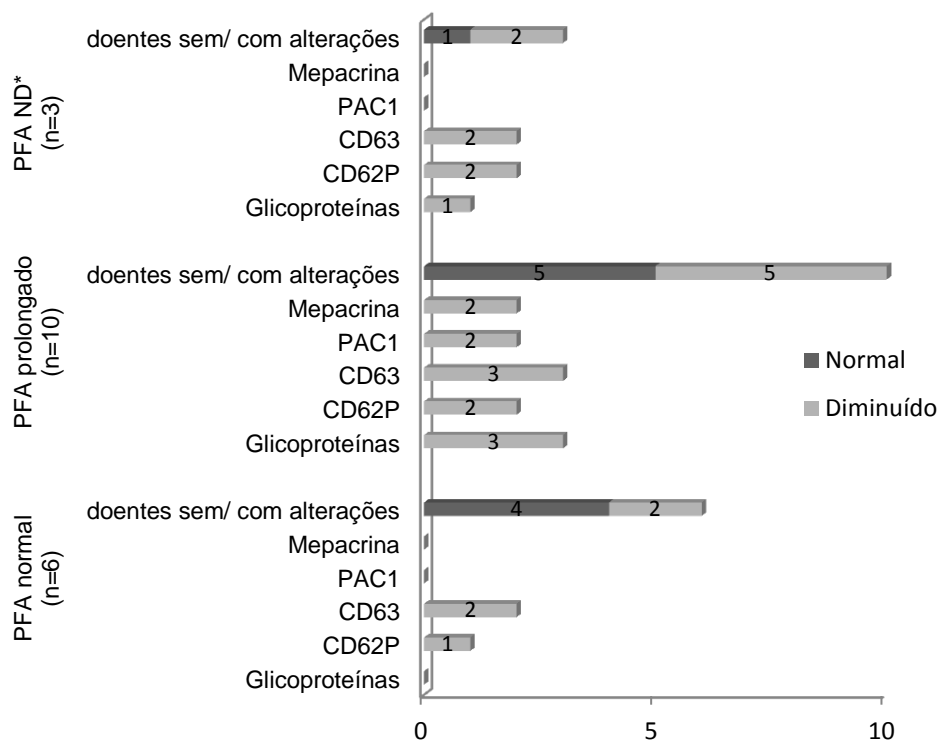


Figura 8 - Resultados de Citometria de Fluxo em doentes com trombocitopenia - Distribuição dos resultados por teste

Doentes com contagem normal de Plaquetas

Foram estudados 61 indivíduos, 54 propósitos e 7 familiares. Em 54,1% (33/61) o PFA estava prolongado e os restantes apresentavam PFA normal (28/61).

Neste grupo, foram efectuados 51 estudos de estudos de agregação plaquetar e CF em simultâneo, 7 de CF isolados e 3 de agregação isolados.

Dos 54 doentes estudados por agregação plaquetar 50% tinham PFA prolongado (Fig 9). O grupo com PFA prolongado apresentava mais alterações do que o grupo com PFA normal (48,1% vs 33,3%), sendo que a alteração mais comum foi a diminuição de resposta à Epinefrina (11/27), ao ADP (8/27) e ao colagénio (7/27). Um doente apresentou diminuição da resposta ao agonista ao TRAP e um resposta diminuída à ristocetina (**Fig. 9**).

No grupo com PFA normal a alteração mais comum foi a diminuição de resposta à epinefrina (9/27), seguida da diminuição de resposta ao ADP (2/27) (**Fig. 9**). Um doente apresentou diminuição da resposta ao agonista ácido araquidónico.

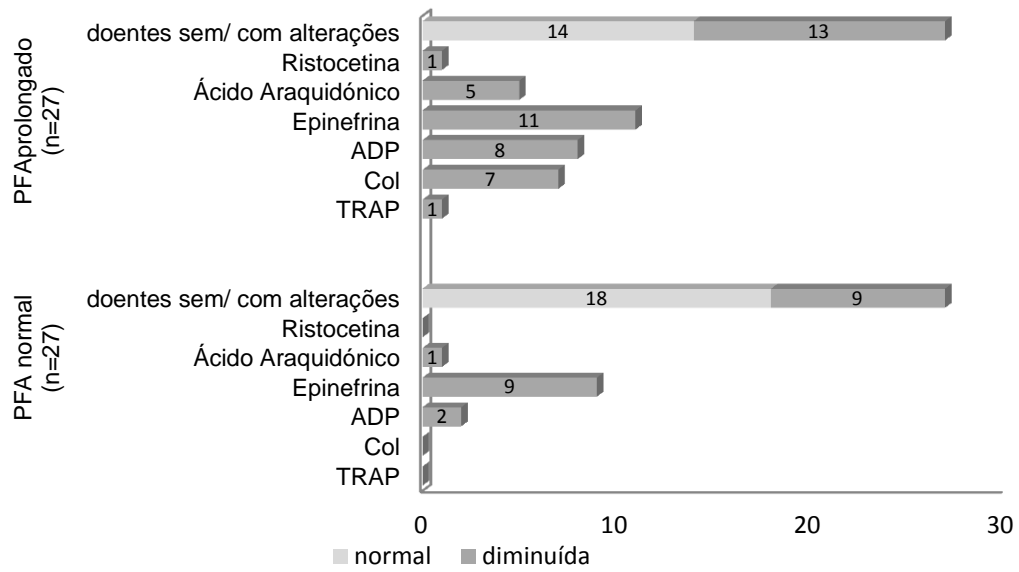


Figura 9 - Resultados de Agregação Plaquetar em doentes com contagem plaquetar normal - Distribuição dos resultados por agonista

Dos 22 doentes com agregação plaquetar alterada, 14 apresentavam resposta diminuída a 2 ou mais agonistas. Destes 11 tinham PFA prolongado (**Fig. 10 A e B**).

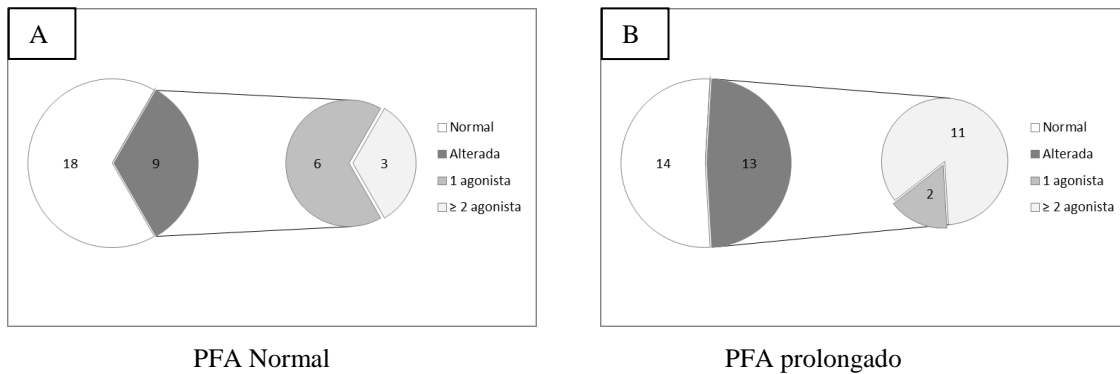


Figura 10 - Resultados da agregação plaquetar em doentes com nº Plaquetas normal. .A) Grupo de doentes com resultados do PFA Normal B) Grupo de doentes com resultados do PFA prolongado. Distribuição de acordo com a classificação: agregação Normal ou Alterada. Resultados da agregação Alterada subdivididos de acordo com o nº agonistas com resposta diminuída.

Nos 58 doentes estudados por CF, o número de alterações foi ligeiramente maior no grupo dos doentes com PFA prolongado (24% vs 19%) (**Fig. 11**).

Em ambos os grupos as alterações de activação plaquetar foram o achado mais comum, nomeadamente a diminuição de CD62P em resposta aos agonistas. Em 5 doentes observou-se diminuição de resposta do PAC-1 e 3 tinham teste da Mepacrina negativo.

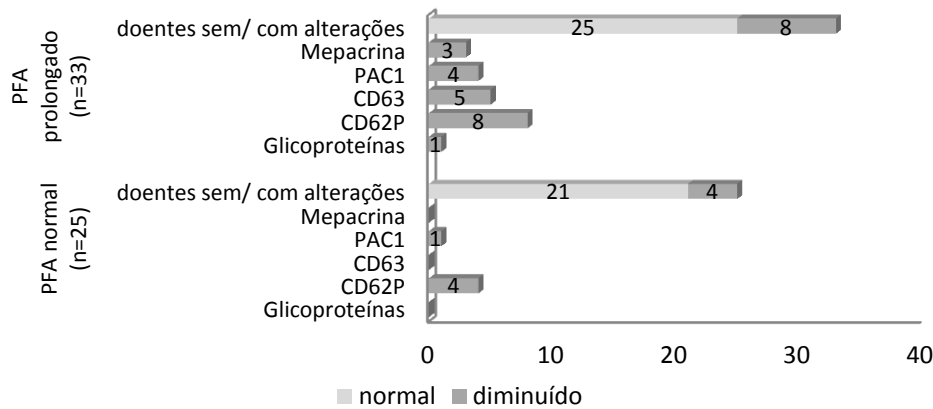


Figura 11- Resultados de Citometria de Fluxo em doentes com nº Plaquetas Normal - Distribuição dos resultados por teste

Comparação dos resultados obtidos nos testes de avaliação específicos

Em 65 doentes o estudo plaquetar foi efectuado por agregação plaquetar e citometria de fluxo em simultâneo (n= 15 trombocitopenia; n= 51 contagem de plaquetas normal) (Tabela 9).

No grupo de doentes com trombocitopenia, 46,7% (7/15) apresentavam resultados normais pelas 2 metodologias, 13,3% (2/15) alteradas apenas por LTA e 6,7% (1/15) alteradas apenas por CF. Os resultados estavam alterados por ambas as metodologias em 33% (5/15) dos doentes.

No grupo de doentes com contagem plaquetar normal, 50,9% (26/51) apresentavam resultados normais pelas duas metodologias, 27,5% (14/51) alterados apenas por LTA e 7,8% (4/51) apenas por CF. Em 13,7% (7/51) os resultados eram alterados pelas duas metodologias.

A avaliação da concordância dos resultados obtidos pelas duas metodologias LTA e CF, foi efectuado através da utilização do teste k de Cohen's. No grupo com trombocitopenia, em 80% (12/15) dos casos as duas metodologias eram concordantes e com valor de k= 0.595 (IC 95%: 0.189-1.000) indicativo de grau de concordância moderado. No grupo com nº Plaquetas Normal, a percentagem de concordância foi de 64,71% (33/65) revelando um grau de concordância menor (K = 0.215) (IC 95%: -0.036-467) (Fig.12).

Avaliação do score hemorrágico nos diferentes grupos

Tabela 9 - Alterações observadas no uso conjunto das duas metodologias

Doentes com trombocitopenia		Doentes com contagem Plaquetar Normal	
		Citometria Fluxo	
n=15		Normal	Alterada
Agregação Plaquetar	Normal	7	1
	Alterada	2	5

Doentes com contagem Plaquetar Normal		Citometria Fluxo	
n=51		Normal	Alterada
Agregação plaquetar	Normal	26	4
	Alterada	14	7

Classificação dos doentes em grandes grupos diagnósticos

No grupo de doentes com trombocitopenia (n=19) os doentes foram classificados nos seguintes grupos de diagnóstico: Macrotrombocitopenia familiar (n=7; 3 famílias), macrotrombocitopenia não especificada (n=5), suspeita de *Storage Pool Disease/* Defeito de Sinalização (n=5) e suspeita de défice de receptores α -adrenérgicos (n=2) (**Fig. 12-A**).

No grupo de doentes com contagem plaquetar normal, em 46 não se encontraram alterações diagnósticas, 9 foram classificados de *Storage Pool Disease/* Defeito de Sinalização, 2 com suspeita de défice de receptores α -adrenérgicos, 1 com suspeita de Trombastenia de Glanzmann variante e 1 com suspeita de Síndrome de Bernard Soulier monoalélica (**Fig. 12-B**).

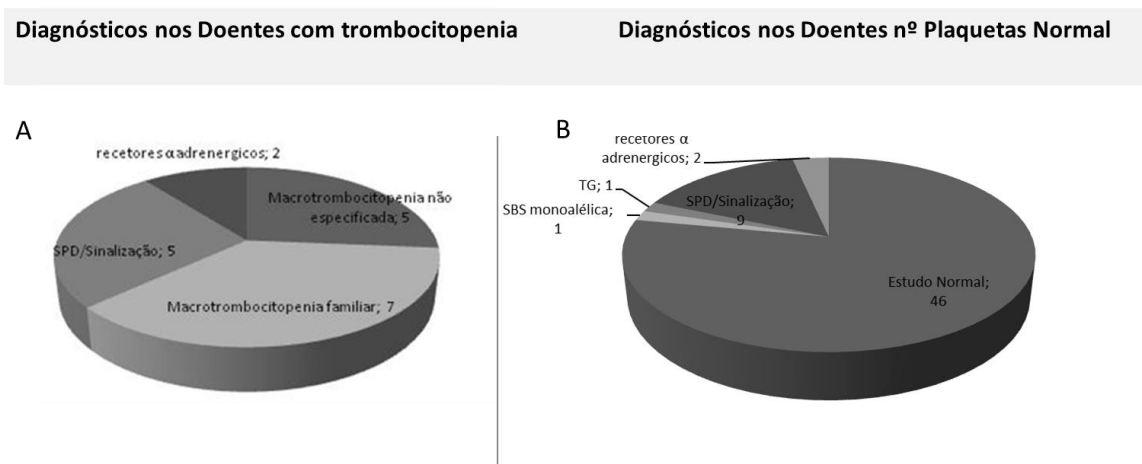


Figura 12. Diagnósticos nos doentes estudados.

A) Grupo doentes com trombocitopenia. B) Grupo doentes com n^o Plaquetas Normal

DISCUSSÃO

As patologias hereditárias da plaqueta são um grupo diagnóstico heterogéneo, de difícil caracterização, apenas possível por testes laboratoriais específicos disponíveis em poucos laboratórios. A correcta avaliação destas patologias passa pela realização de uma história clínica criteriosa com pontuação de um score hemorrágico, testes globais (hemograma, observação do esfregaço de sangue periférico, PFA) e por testes mais específicos como a agregação plaquetar e citometria de fluxo, entre outros (14)(48).

Este trabalho, de natureza retrospectiva, teve como objectivo avaliar os resultados obtidos nos estudos de agregação plaquetar e citometria de fluxo e analisar a sua mais-valia para o diagnóstico de patologias da plaqueta. O estudo incluiu 68 propósitos (46 adultos e 22 crianças) e 12 familiares pertencentes a 8 famílias. Em média, o “score” hemorrágico da população estudada foi de 2,24 (0-8), em que 61% (42/71) apresentavam score baixo (<3). No nosso estudo os resultados da avaliação deste parâmetro mostraram um score <3 em mais de metade da população, e a média era mais baixa na população pediátrica, provavelmente como reflexo da falta de desafios hemostáticos até à altura do estudo(27).

Dos 80 indivíduos estudados, 61 tinham número de plaquetas normal e 19 apresentavam trombocitopenia e nenhum apresentava alterações morfológicas no esfregaço de sangue periférico.

Em 77 indivíduos foi efectuado o teste de PFA para avaliação global de alterações da função plaquetar, tendo sido prolongado em 54,5% (42/77) dos casos. Este teste, apesar de já não ser recomendado para diagnóstico da função plaquetar (20), continua a ser um teste útil para avaliação da função plaquetar, em especial das formas mais graves de disfunção plaquetar e também nas crianças, em que o volume de amostra é um aspecto limitante(47). Por outro lado, este teste também não está recomendado para doentes com plaquetas < $80 \times 10^9/L$ (28). Não obstante do resultado do PFA normal em cerca de metade dos indivíduos, prosseguiu-se para testes específicos de avaliação da função plaquetar tendo em conta a história clínica pessoal ou familiar.

Para a avaliação dos resultados dos estudos de agregação plaquetar e citometria de fluxo os doentes foram agrupados em: i) doentes com trombocitopenia e ii) doentes com contagem plaquetar normal, sub-divididos de acordo com o resultado do PFA.

Foi avaliado um grupo de 14 propósitos com trombocitopenia, todos com macrotrombocitopenia (VPM >9,7 fL). Neste grupo, dos 6 indivíduos com PFA normal, 4 fizeram agregação que não revelou alterações, no entanto, por CF 2 tinham alterações no teste de activação plaquetar (CD62P, CD63). Por outro lado nos doentes com PFA prolongado

(n=10), 7 apresentavam alterações por agregação plaquetar, todos com diminuição da resposta à epinefrina, 5 na resposta ao colagénio, 3 dos quais com alteração em ambos. A avaliação destes doentes por CF revelou alterações em 5/10 verificando-se sobretudo alterações nos testes de activação e quantificação de glicoproteínas de membrana plaquetar (3/10).

Neste grupo, independentemente do valor PFA, o teste de agregação plaquetar, se avaliado isoladamente, teria identificado 7/15 indivíduos e a CF 6/15, em que 5/15 apresentavam alterações em ambos os testes. Utilizando uma abordagem de técnica única poderiam ter ficado 3 (20%) indivíduos por identificar (Fig.12).

No grupo de 54 propósitos com contagem normal de plaquetas, a percentagem de estudos com alterações na agregação foi superior naqueles que apresentavam PFA prolongado (48%). No grupo com PFA prolongado, a maioria (85%) apresentava alterações com 2 ou mais agonistas, o que é indicativo da concordância entre o prolongamento do PFA e distúrbios plaquetares mais acentuados. Hayward et al 2008, no seu trabalho sobre a utilidade diagnóstica da agregometria para o despiste de patologia plaquetar encontra uma maior probabilidade de associação a doenças quando existe alteração/diminuição de resposta a 2 ou mais agonistas(21). Dos indivíduos com PFA normal, 33% (9/27) apresentavam alterações na agregação, a maioria com alterações apenas em 1 agonista, nomeadamente na resposta à epinefrina. No entanto, 3 tinham alterações em 2 ou mais agonistas (2 Epi+ ADP, 1 Epi+AA) cujas alterações o teste de PFA não permitiu identificar.

Por CF, em 20,6% (12/58) dos estudos foi possível identificar alterações, sendo que a maioria destes encontra-se no grupo de PFA prolongado (24% vs 16%). Em 4/25 estudos de PFA normal, foram identificadas alterações por CF, todos com alteração de expressão/libertação de CD62P. Estes dados reflectem a capacidade da CF analisar alterações ao nível da libertação de grânulos, alterações estas frustes que não se refletem em testes mais globais como o PFA. Já no grupo com PFA prolongado, as alterações por CF foram não só ao nível dos grânulos alfa (CD62P), mas também envolvendo os grânulos densos (CD63, mepacrina) e ligação à GP IIb/IIIa (PAC1). Neste grupo, independentemente do valor PFA, o teste de agregação plaquetar, se avaliado isoladamente, teria identificado 21/51 indivíduos e a CF 11/51, em que 7/51 apresentavam alterações em ambos os testes. Utilizando uma abordagem de técnica única poderiam ter ficado 18 indivíduos por identificar, sendo que a agregação *per se* permitiria colocar hipótese diagnóstica em 14 deles, revelando uma maior capacidade diagnóstica no grupo de indivíduos com plaquetas normais (Fig.12).

Por agregação plaquetar a diminuição de resposta à epinefrina, um agonista fraco, foi a alteração mais frequente, o que está de acordo com a variabilidade inter-individual do número de receptores α -adrenérgicos na membrana da plaqueta (21) (37). Por CF, as alterações de activação em resposta a agonistas foram as mais frequentes.

De um modo global, a utilização das 2 técnicas permitiu aumentar a capacidade de obter uma suspeita diagnóstica. Neste estudo, a CF mostra uma capacidade diagnóstica muito

semelhante à da agregação em indivíduos com trombocitopenia, o que sugere que uma abordagem inicial por CF poderá ser uma opção a considerar neste grupo de doentes. Por outro lado, em indivíduos com plaquetas normais, a agregação mostrou ter maior capacidade em identificar alterações(23). Em conjunto, estes resultados deverão ser tidos em conta no algoritmo laboratorial de estudo destas patologias, particularmente em situações que o volume de amostra e número de plaquetas poderão ser limitantes no número de testes a realizar, bem como na população pediátrica.

Tendo em conta os resultados dos testes de agregação plaquetar e CF foi possível classificar os propósitos em grandes grupos de diagnóstico. No grupo que apresentava trombocitopenia estas técnicas identificaram 5 indivíduos com provável SPD/Defeito de sinalização e 2 indivíduos com provável défice de receptores α -adrenérgicos. No grupo com contagem de plaquetas normais, 9 foram classificados como provável SPD/Defeito de sinalização, 2 com provável défice de receptores α -adrenérgicos, 1 com provável Trombastenia de Glanzmann variante e 1 com provável SBS monoalélico.

A inclusão dos indivíduos em grandes grupos diagnósticos foi possível em 52% dos casos estudados. Quer no grupo com trombocitopenia, quer no grupo de indivíduos com plaquetas normais, o diagnóstico de suspeita de SPD/Sinalização foi a suspeita diagnóstica mais frequente, resultados que estão em concordância com os publicados na literatura (41). A utilização de testes funcionais adicionais tais como a lumiagregometria tem-se revelado particularmente útil na confirmação diagnóstica deste sub-grupo de patologias hereditárias da plaqueta (22) (37).

Neste estudo, que teve como fio condutor uma avaliação clínica exaustiva e uma abordagem laboratorial onde se incluem testes específicos, não disponíveis em todos os laboratórios, ficaram por classificar 48% dos indivíduos. Neste sentido, e tendo em conta o crescente conhecimento das alterações moleculares subjacentes às patologias da plaqueta, uma abordagem que inclua as novas tecnologias de sequenciação massiva será uma mais valia no estudo destas patologias. Não obstante, previsivelmente, pelo menos no futuro próximo, os estudos funcionais continuarão a ser insubstituíveis na caracterização destas doenças e no estabelecimento da correlação genótipo-“lesão plaquetar”.

CONCLUSÃO

As patologias hereditárias da plaqueta são um grupo diagnóstico heterogéneo, de difícil caracterização cuja avaliação passa pela realização de uma história clínica criteriosa com pontuação de um *score* hemorrágico, testes globais (hemograma, observação do esfregaço de sangue periférico, PFA) e por testes mais específicos como a agregação plaquetar e citometria de fluxo, entre outros.

Este trabalho, de natureza retrospectiva, incluiu 68 propósitos e 12 familiares, teve como objectivo analisar os resultados obtidos nos estudos PFA, agregação plaquetar e citometria de fluxo e avaliar a sua mais-valia para o diagnóstico de patologias da plaqueta.

No grupo de indivíduos com trombocitopenia, a CF permitiu identificar 2 indivíduos com alteração na activação plaquetar e PFA normal. Neste grupo, utilizando uma abordagem de técnica única teriam ficado 20% de indivíduos por identificar.

No grupo com contagem normal de plaquetas, a maioria (85%) de indivíduos com PFA prolongado apresentava alterações de agregação com 2 ou mais agonistas, o que é indicativo de uma boa correlação entre os testes. Por CF, foi possível identificar alterações em 20,6% dos estudos, sendo que a maioria destes tinha PFA prolongado, à semelhança do observado por agregação plaquetar. No entanto, em indivíduos com PFA normal, a CF permitiu identificar alterações em ambos os grupos, relacionando-se com a sua sensibilidade para detecção de alterações frustes ao nível da libertação de grânulos(44).

De um modo global, a utilização das 2 técnicas permitiu aumentar a capacidade de obter uma suspeita diagnóstica, tendo sido classificados 52% dos indivíduos estudados em grandes grupos de diagnóstico.

De futuro, a correlação de estudos funcionais juntamente com conhecimento das alterações moleculares subjacentes às patologias da plaqueta permitirá uma melhor caracterização destas doenças de difícil diagnóstico(20)(45)(46).

BIBLIOGRAFIA

1. Shapiro AD. Platelet function disorders 1. *Haemophilia*. 2000;6(Suppl. 1):120–7.
2. Varon D. Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses. *J Thromb Haemost*. 2015;13(Suppl. 1):40–6.
3. Italiano JE. Unraveling Mechanisms that Control Platelet Production. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39:15–24.
4. Patel SR, Hartwig JH, Jr JEI. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3348–54.
5. Fritsma GA. Platelet Structure and Function. *Clinical Lab Sci*. 2015;25(2):125–31.
6. Ghumlas A, Gader A. The Blood Platelet: An Intriguing Cell. *J Applied Hematol*. 2013;(2):1–12.
7. Hoffbran A. The vascular function of platelets. In: *Postgraduate Hematology*. 5th ed. Blackwell Publishing; 2005.
8. Hoffman R. The molecular basis for platelet function. In: *Hematology: Basic principles and practice*. 4 th. Churchill Livingstone; 2005.
9. I Curso formação continuada Trombosis y Hemostasia SETH. In: *Trombosis y Hemostasia*. 2007th ed. Grupo acción médica SA; 2007. p. 1–33.
10. Hoffman R. The molecular basis of platelet activation. In: *Hematology: Basic principles and practice*. 4 th. Churchill Livingstone; 2005.
11. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente García V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. 2009;94(5):700–11.
12. Shapiro AD. Trastornos de la función plaquetaria. *Trat la Hemofilia*. 2008;(19).
13. Fugh-Berman A. Herb-drug interactions. *Lancet*. 2000;355:134–8.
14. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol*. 2011;(July):30–44.
15. Konkle BA. Acquired Disorders of Platelet Function. *Hematol Ash*. 2011;391–6.
16. Diz-ku R. Inherited platelet disorders including Glanzmann thrombasthenia and Bernard-Soulier syndrome. *Hematol Ash*. 2013;(Table 2):268–75.
17. Robertson J. Quantitative Platelet Disorders. In: Lilicrap D, editor. *Practical Hemostasis and Thrombosis*. 2 th Editi. Wiley-Blackwell; 2009.
18. Almela M, Guiu I, Vicente Garcia RJ. Patología congénita de la plaqueta: diagnóstico integrado y repercusiones sobre el funcionalismo. In: *LIV Reunión Nacioanla de la SEHH Simposios*. p. 239–47.
19. Rao AK. Inherited defects in platelet signaling mechanisms. *J Thromb Haemost*. 2003;1:671–81.
20. Gresele P, Harrison P, Gachet C, Hayward C, Kenny D, Mezzano D, et al. Diagnosis of inherited platelet function disorders: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2015;13(2):314–22.
21. Hayward CPM, Liu Y, Moffat KA. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry : results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *J Thromb Haemost*. 2009;2100(December 2008):676–84.
22. Hayward CPM. Diagnostic evaluation of platelet function disorders. *Blood Rev [Internet]*. Elsevier Ltd; 2011;25(4):169–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2011.03.004>
23. Hayward CPM, Moffat KA, Plumhoff E, Cott EM Van. Approaches to investigating common bleeding disorders : An evaluation of North American coagulation laboratory practices. In: *American Journal of Hematology*. 2012. p. 45–50.
24. Rodeghiero F, Tosetto A, Castaman G. How to estimate bleeding risk in mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost*. 2007;5(SUPPL. 1):157–66.
25. Tosetto A. Bleeding Assessment Tools: Limits and Advantages for the Diagnosis and Prognosis of Inherited Bleeding Disorders. *Semin Thromb Hemost*. 2016;42(5):463–70.
26. Toseto A CG. Bleeders, bleeding rates, and bleeding score. *J Thromb Haemost*. 2013;11(Suppl. 1):142–50.
27. Brien SHO. An update on pediatric bleeding disorders : Bleeding scores, benign joint hypermobility , and platelet function testing in the evaluation of the child with bleeding symptoms. *Am J Hematol*. 2012;87:40–4.

28. Hayward CPM, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK. Platelet function analyzer (PFA)-100® closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost.* 2006;4(2):312–9.
29. Priora R. Platelet function tests : a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015;133–48.
30. Ranuci, editor. *POCT for Severe Hemorrhage A Manual for Diagnosis and Treatment* Springer 2016 [Internet]. 2016. Available from: <http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-319-24795-3#page-1>
31. Lindahl TL, Ramström S. Methods for evaluation of platelet function. *Transfus Apher Sci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;41(2):121–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2009.07.015>
32. Cattaneo M, Cerletti C, Nurden P, Pugliano MT. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry : a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC / ISTH. *J Thromb Haemost.* 2013;11(July):1183–9.
33. Hayward CPM. An evaluation of methods for determining reference intervals for light transmission platelet Aggregation tests on samples with normal or reduced platelet counts. *Thromb e Haemost.* 2008;100(1):134–45.
34. Dawood BB. Reference curves for aggregation and ATP secretion to aid diagnosis of platelet-based bleeding disorders: Effect of inhibition of ADP and thromboxane A₂ pathways. *Platelets.* 2007;18(5):329–45.
35. Zhou L, Schmaier AH. Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma Description of Procedures With the Aim to Develop Standards in the Field. *Coagul Transfus Med.* 2005;172–83.
36. Diagnosis of suspected platelet function disorders results of a worldwide survey JTH2014.
37. Dawood BB, Lowe GC, Lordkipanidze M, Bem D, Daly ME, Makris M, et al. Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. *Blood J Am Soc Hematol.* 2012;120(25):5041–50.
38. Gibbins JM, Mahaut-smith MP. Platelets and Megakaryocytes [Internet]. Gibbins JM, Mahaut-smith MP, editors. Humana Press Inc.; 2012. 215-224 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-307-3>
39. practical-haemostasis [Internet]. Available from: http://www.practical-haemostasis.com/Platelets/platelet_function_testing_lta.html
40. Michelson AD. Flow Cytometry: A clinical Test of Platelet Function. *Blood J Am Soc Hematol* [Internet]. 1996;87(12):4925–36. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/87/12/4925?sso-checked=true>
41. Hayward CPM, Moffat KA, Spitzer E, Timleck M, Plumhoff E, Israels SJ, et al. Results of an external proficiency testing exercise on platelet dense-granule deficiency testing by whole mount electron microscopy. *Am J Clin Pathol.* 2009;131(5):671–5.
42. Rubak P, Nissen PH, Kristensen SD, Hvas A-M. Investigation of platelet function and platelet disorders using flow cytometry. *Platelets* [Internet]. Informa UK Ltd; 2016;27(1):66–74. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09537104.2015.1032919>
43. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, Furman MI. Evaluation of Platelet Function by Flow Cytometry. *Methods.* 2000;270:259–70.
44. Cai H, Mullier F, Frotscher B, Briquel ME, Toussaint M, Massin F, et al. Usefulness of flow cytometric mepacrine uptake/release combined with CD63 assay in diagnosis of patients with suspected platelet dense granule disorder. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(3):282–91.
45. Lowe GC. Genotyping and phenotyping of platelet function disorders. *J Thromb Haemost.* 2013;11(suppl. 1):351–63.
46. Leo VC, Morgan N V, Bem D, Jones ML, Lowe GC, Lordkipanidz M. Use of next-generation sequencing and candidate gene analysis to identify underlying defects in patients with inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost.* 2015;13:643–50.
47. Israels SJ, Kahr WHA, Blanchette VS, Luban NLC, Rivard GE, Rand ML. Platelet Disorders in Children : A Diagnostic Approach. *Pediatr Blood Cancer.* 2011;56(September 2010):975–83.
48. Israels SJ. Laboratory testing for platelet function disorders. *Int J Lab Hematol.* 2015;37(suppl. 1):18–24.