

Vagner de Castro

***Estudo dos polimorfismos dos sistemas de
aloantígenos plaquetários humanos (HPA) em
doenças hemorrágicas e trombóticas***

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Orientador: Prof. Dr. Valder Roberval Arruda

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa



Campinas

2000

Vagner de Castro

***Estudo dos polimorfismos dos sistemas de
aloantígenos plaquetários humanos (HPA) em
doenças hemorrágicas e trombóticas***

Defesa de Tese de Doutorado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área
de Concentração Clínica Médica, da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de Doutor em
Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Valder Roberval Arruda

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa



Campinas

2000

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	C279e
V.	Ex 433 96
TOMBO BC/	433 96
PROC.	16-393101
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	09/01/01
N.º CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM-00153195-4

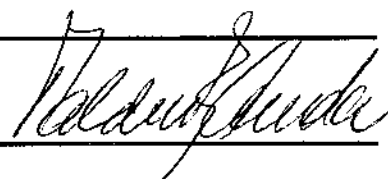
C279e Castro, Vagner de
Estudo dos polimorfismos dos sistemas de aloantígenos
plaquetários humanos (HPA) em doenças hemorrágicas e trombóticas /
Vagner de Castro. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador : Valder Roberval Arruda
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Hematologia. 2. Gene. 3. População. I. Valder Roberval
Arruda. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

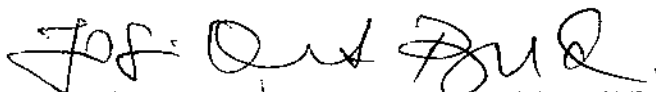
Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof.Dr. Valder Roberval Arruda

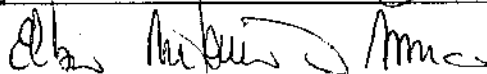


Membros:

1. Prof.Dr. José Orlando Bordin



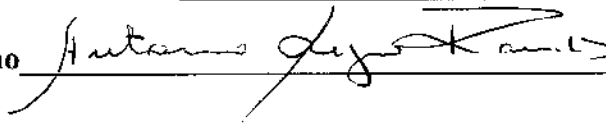
2. Prof.Dr. Élbio Antônio D'Amico



3. Profa. Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi



4. Prof.Dr. Antonio Sérgio Ramalho



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/08/00

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Banca Examinadora

Presidente:

Prof. Dr. Valder R. Arruda

Membros:

Prof. Dr. Élbio Antônio D'Amico

Prof. Dr. José Orlando Bordin

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Prof. Dr. Antônio Sérgio Ramalho

Suplentes:

Prof. Dr. Hélio Moraes de Souza

Profa. Dra. Aparecida Brenelli

Data: 25/08/2000

À Malu, pelo apoio incondicional, irrestrito e pela enorme paciência e companheirismo
Ao Rodrigo, pelas horas de minha ausência e por sua compreensão
Aos meus pais, pelo exemplo de vida e por terem acreditado em mim.

Ao Valder, que durante esses anos e no transcorrer desse trabalho foi não só orientador, mas foi e continuará sendo um grande amigo.

Ao Fernando, que com seu apoio, sua paciência e ponderação tem sido um grande exemplo para nós.

— À Sarita que sempre incentivou e apoiou nossas iniciativas.

Aos professores José Orlando Bordin, Elbio Antônio D'Amico, Joyce Maria Annichino-Bizzacchi e Antônio Sérgio Ramalho, por terem aceito o convite para a banca examinadora.

Aos professores Hélio Moraes de Souza e Aparecida Brenelli, pela disponibilidade e aceitação do convite como membros suplentes da banca examinadora.

Às amigas Carmen Bertuzzo e Marilda Gonçalves, por todo apoio e também por terem aceito a indicação para a banca examinadora.

À Sandrinha e Rosana, pelo apoio audiovisual nesse e em todos os trabalhos desenvolvidos no Hemocentro.

À Regina, por sua paciência, seu bom humor e seu apoio em todo o trabalho de secretaria, mesmo em momentos críticos.

À Andreinha e Elaine, cujo auxílio nos trabalhos experimentais foi fundamental.

À Tereza e à Lena, que prestaram orientação e apoio nos trabalhos nas bancadas do laboratório com muita paciência.

À Silvana Bordin, que me ajudou muito em especial na minha iniciação na Biologia Molecular.

À Ucha, à Deva, e à Moniquinha pelo auxílio em vários momentos desse trabalho.

Aos colegas do laboratório, cuja convivência tornou mais agradável o tempo que passei na bancada.

Ao Sr. Gerino, pela paciência e dedicação na montagem da impressão dessa tese.

Aos funcionários do SAME do CAISM, em especial à Rita e à Odete, pelo apoio na fase final desse trabalho.

Aos funcionários do Hemocentro e em especial à Silvana, Érika, Cláudia e Rose, por todo apoio e compreensão durante o período da tese.

À minha irmã Viviane, ao cunhadão Diga pelo incentivo e ao bebê que vem por aí.

À dona Zilna, que sempre torceu por nós e acreditou em nosso sucesso.

Aos pacientes e voluntários que, anonimamente, tornaram esse trabalho possível.

ADP	adenosina di-fosfato
ATP	adenosina tri-fosfato
AVC	acidente vascular cerebral
Ca²⁺	Cálcio bivalente
CD	“cluster differentiation”
cDNA	DNA codificante
DNA	“desoxyribonucleic acid”; ácido desoxirribonucleico
Gp	Glicoproteína
HLA	“human leucocyte antigen”; antígeno leucocitário humano
HPA	“human platelet antigen”; antígeno plaquetário humano
IAM	infarto agudo do miocárdio
IgG	imunoglobulina G
IgIV	imunoglobulina intra-venosa
IL	interleucina
kb	quilobase
LRG	“leucine rich glycoprotein”; glicoproteínas ricas em leucina
pb	pares de base
PCR	“polymerase chain reaction”; reação em cadeia da polimerase
PPT	púrpura pós-transfusional
PTAN	púrpura trombocitopênica aloimune neonatal
PTI	púrpura trombocitopênica idiopática
RFLP	“restriction fragment length polymorphism”
RGD	sequência arginina-glicina-asparagina
RNs	recém-nascidos
SNC	sistema nervoso central
SSP	“sequence specific primer”; alelo específico (PCR)
TPO	trombopoetina
TVP	trombose venosa profunda
VLA	“very late antigen”; antígeno de expressão tardia
VnR	“vitronectin receptor”; receptor da vitronectina
VNTR	“variable number of tandem repeats”; número variável sequências repetidas
vWF	fator de von Willebrand

Tabelas

Capítulo I

- Tabela 1: Glicoproteínas adesivas da membrana da plaqueta 34
- Tabela 2: Bases moleculares dos HPA 40
- Tabela 3: Frequência alélica dos sistemas HPA-1 a -5 em diferentes populações 42

Capítulo III

- Tabela 1: Frequência gênica e genotípica dos sistemas HPA-1 a 5 em Ameríndios, Caucasoídes e Negróides brasileiros 66

Capítulo IV

- Tabela 1: Dados clínicos e laboratoriais de recém-nascidos com plaquetopenia 83
- Tabela 2: Prevalência da incompatibilidade genotípica para os alelos HPA em plaquetopenia neonatal 84

Capítulo V

- Tabela 1: Dados clínicos e frequência alélica do sistema HPA-5 em pacientes com púrpura trombocitopênica imunológica (PTI) 90

Capítulo VI

- Tabela 1: Distribuição dos alelos do sistema HPA-I entre pacientes com infarto miocárdico, doença arterial sistêmica, trombose venosa e controles 101

Figuras

Capítulo II

- Figura 1: Representação dos principais HPA nas glicoproteínas Ia-IIa, IIb-IIIa, Ib-IX ... 29
- Figura 2: Representação esquemática dos mecanismos de adesão e agregação plaquetária na corrente sanguínea 38

Capítulo III

- Figura 1: Géis de agarose corados com brometo de etídio a 2% mostrando os produtos de PCR correspondendo à análise por RFLP dos sistemas HPA-1, -2, -3 e -5, e análise por SSP para o sistema HPA-4 65

Resumo	xv
---------------------	----

Summary	xxi
----------------------	-----

Capítulo I

· Introdução	25
· Função plaquetária	28
· Organização da estrutura plaquetária	30
· Glicoproteínas da membrana plaquetária	32
· Polimorfismos das glicoproteínas plaquetárias: antígenos plaquetários humanos (HPAs)	37
· Prevalência dos HPA em diferentes populações	41
· Sistemas HPA e doenças aloimunes plaquetárias	43
· Púrpura Trombocitopênica Aloímune Neonatal	44
· Púrpura Pós-Transfusional	47
· Refratariedade Transfusional Plaquetária	49
· Incompatibilidade relacionada ao sistema HPA e rejeição em transplante renal	49
· Púrpura Trombocitopênica Idiopática	50
· Doenças Vasculares Oclusivas	51

Capítulo II

· Objetivos	55
-------------------	----

Capítulo III

- Trabalho: “Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1-5 in three distinct ethnic groups in Brazil” 59

Capítulo IV

- Trabalho: “Prevalence of neonatal thrombocytopenia among 12,714 unselected newborns: etiology and impact of genotyping for the human platelet alloantigen systems” 69

Capítulo V

- Trabalho: “The human platelet alloantigen 5 polymorphism as a risk for the development of acute idiopathic thrombocytopenic purpura” 85

Capítulo VI

- Trabalho: “Polymorphism of the human platelet alloantigen 1 (HPA-1) of the glycoprotein IIIa as an inherited risk factor for occlusive arterial disease or venous thrombosis” 91

Capítulo VII

- Discussão..... 103

Capítulo VIII

- Referências bibliográficas 113

Apêndices

- Abstract do trabalho: “HPA-1b of platelet glycoprotein IIIa as a risk factor for arterial disease” 129
- Abstract do trabalho: “Thrombocytopenia in 3347 unselected newborns: Prevalence, etiology, and impact of genotyping for the HPA systems” 131

Resumo

Os aloantígenos plaquetários humanos (HPA), são polimorfismos das glicoproteínas da membrana da plaqueta que estão associados a patologias imunes plaquetárias como a púrpura trombocitopênica aloimune neonatal, a púrpura pós-transfusional, a refratariedade transfusional plaquetária podendo estar relacionados a doenças vasculares oclusivas.

Vários sistemas HPA são conhecidos e a distribuição dos alelos desses sistemas é bastante heterogênea em grupos étnicos distintos.

Nesse estudo, os principais sistemas HPA envolvidos na aloimunização plaquetária foram determinados pela reação em cadeia da polimerase, em três grupos étnicos que compõe a população brasileira: Caucasóides, Negróides e Índios. Os resultados obtidos demonstraram que entre os grupos de Caucasóides e Negróides brasileiros, a prevalência dos HPAs-1 a 5 foi similar. Nossos dados contrastam com os descritos para grupos étnicos semelhantes em outros países. Entre os Índios, nenhum alelo b (de baixa frequência) foi encontrado para os sistemas HPA-1,-4 e -5.

Para avaliar o possível impacto clínico dessas observações no desenvolvimento da púrpura trombocitopênica aloimune neonatal (PTAN), realizamos um rastreamento para a plaquetopenia neonatal e sua relação com a incompatibilidade genotípica materno-fetal. A plaquetopenia foi identificada em 1% de 12.714 recém-nascidos não selecionados de Campinas, nos quais 0,11% (13 casos) apresentou contagem plaquetária menor que $50 \times 10^9/L$. Dois recém-nascidos com plaquetopenia desenvolveram sangramento grave, enquanto a maioria dos casos foi assintomática. Em aproximadamente metade dos casos, existiam condições clínicas associadas ao desenvolvimento de plaquetopenia neonatal. Foi realizada a investigação de plaquetopenia neonatal secundária à aloimunização para os sistemas HPA, através da identificação de incompatibilidade genotípica materno-fetal. Os

resultados demonstraram a ocorrência de incompatibilidade genotípica em 50% dos casos tanto no grupo controle quanto no grupo de recém-nascidos plaquetopênicos. O sistema mais comumente associado à plaquetopenia aloimune foi o HPA-3, seguido pelo sistema HPA-2. Em conclusão, a plaquetopenia neonatal é comum entre recém-nascidos não selecionados e o desenvolvimento de plaquetopenia não pôde ser previsto pela incompatibilidade genotípica HPA.

O papel dos sistemas HPA como fator de risco para o desenvolvimento de púrpura trombocitopênica imunológica (PTI) em pacientes adultos também foi avaliado. Os resultados desse estudo demonstraram uma frequência duas vezes maior do alelo HPA-5b nos pacientes portadores de PTI aguda do que em controles normais. Esses dados sugerem que a presença do alelo HPA-5b pode estar associada ao aumento do risco para PTI aguda em adultos.

Finalmente, avaliamos o papel dos alelos do sistema HPA-1 como fator de risco para doenças arteriais ou venosas. Plaquetas que apresentam o alelo HPA-1b na GpIIIa, apresentam maior resposta agregante ao fibrinogênio o que pode resultar em maior resistência do trombo plaquetário à lise fisiológica. Foram estudados dois grupos de pacientes com doenças arteriais ou trombose venosa. Nenhuma associação foi encontrada entre a presença do alelo HPA-1b e o risco para trombose venosa ou doença arterial. Embora a prevalência do alelo HPA-1b não tenha apresentado diferença em um grupo de 137 pacientes que apresentaram infarto agudo do miocárdio (IAM), comparados a um grupo controle (12,7% vs. 14,6%), a prevalência do alelo HPA-1b foi maior entre pacientes jovens do que em idosos ($p=0,014$). Diferindo de fatores de risco convencionais, o alelo HPA-1b não representa um fator de risco para trombose venosa, para doença arterial

sistêmica ou IAM. A maior prevalência do alelo HPA-1b em pacientes jovens com IAM pode levar a uma patogênese distinta no aparecimento precoce da doença arterial coronariana.

Summary

Human platelet alloantigens (HPA) are polymorphic sequences of the platelet membrane glycoproteins, which are associated to immune platelet disorders, such as neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT), post-transfusion purpura (PTP), platelet transfusion refractoriness and may be related to occlusive vascular disease. Several distinct biallelic systems are known, and a heterogeneous distribution of HPA alleles has been described among distinct ethnic groups.

In this study, the most frequently HPA systems involved in alloimmunization were determined by polymerase chain reaction, in three distinct ethnic groups which compose Brazilian population: Caucasians, Blacks and Indians. The HPA-1 to -5 allele frequencies obtained between Caucasian and Blacks were similar. These data contrast with those reported for similar ethnic groups in other countries. Among the Indians, no b allele (low frequency allele) of the HPA-1, -4 and -5 systems were identified.

To evaluate the possible clinical impact of these data in the development of NAIT, we carried out a screening for neonatal thrombocytopenia and its relation to maternal-fetal genotype mismatch. Thrombocytopenia was determined in 1% of 12,714 unselected newborns from Campinas in which 0.11% (13 cases) presented platelet count less than $50 \times 10^9/L$. Two newborns with thrombocytopenia developed a severe bleeding disorder, whereas the majority was asymptomatic. Maternal-fetal clinical conditions related to the development of thrombocytopenia were presented in almost half of the cases. The risk for neonatal thrombocytopenia due to alloimmunization to HPA systems was investigated by genotype mismatch between mother and newborn. The results showed that 50% of genotypes revealed a maternal-newborn mismatch in both control and thrombocytopenic group. The most common system likely to be associated with alloimmune

thrombocytopenia is the HPA-3 system, followed by the HPA-2 system. In conclusion, neonatal thrombocytopenia is common among unselected newborns and the development of thrombocytopenia can not be predicted by the genotype mismatch.

The role of HPA in the risk for an autoimmune platelet disease was carried out among adults with immune thrombocytopenic purpura (ITP). The result of this study was the detection of a two-fold higher frequency of allele HPA-5b among acute-ITP patients compared to a control group. These data suggest that the presence of HPA-5b allele could be related to an increased risk of adults with acute ITP.

Finally, we determined role of HPA-1 system alleles as an inherited risk factor for venous or arterial disease. Platelet carrying the HPA-1b protein has a higher aggregation response to fibrinogen and may result in a clot resistant to physiological removal. Two groups of patients with venous thrombosis or arterial disease were evaluated. No association was found between HPA-1b allele and the risk for either venous thrombosis or arterial disease. Although the prevalence of HPA-1b allele among 137 patients with myocardial infarction (MI) did not differ from that observed in the control group (12.7% vs. 14.6%), the prevalence of the allele HPA-1b was higher among young patients than older patients ($p=0.014$). Unlike conventional risk factors, HPA-1b allele does not represent a risk factor for venous thrombosis, systemic arterial disease or MI. The higher prevalence of HPA-1b allele among young patients with MI could result from a distinct pathogenesis of the early onset of the coronary artery disease.

Capítulo I - Introdução

As plaquetas são pequenos fragmentos discóides e anucleados, originários do citoplasma do megacariócito que circulam na corrente sanguínea para o controle da hemostasia (WARE & COLLER, 1995).

As principais funções plaquetárias estão relacionadas à manutenção da hemostasia sanguínea pela imediata adesão à superfície endotelial lesada e a formação de agregado plaquetário estável (NEWMAN, 1991). Ainda que a formação do agregado plaquetário seja o responsável para o controle de hemorragias sob condições fisiológicas, esse trombo plaquetário pode levar à oclusão vascular arterial e à fenômenos embólicos quando em contato com uma superfície vascular patológica. Assim, durante a formação do trombo plaquetário, não há distinção pelas plaquetas ou pelos componentes da hemostasia entre um reparo endotelial fisiológico e a formação de um trombo plaquetário que pode levar à acidente vascular isquêmico cerebral, coronariano ou periférico (KULKARNI *et al.*, 2000). Concordando com essa observação está o fato de que, o uso de antiagregantes plaquetários como a aspirina, está relacionado à redução da incidência de doença oclusiva arterial em adultos (HENNEKENS *et al.*, 1988).

O controle humoral da produção plaquetária pelos megacariócitos é realizado pela trombopoietina (TPO) através da ligação com o receptor de superfície *c-mpl*, que pertence à superfamília de receptor-citocinas, com expressão restrita à linhagem megacariocítica, plaquetas e precursores hematopoiéticos CD34+ (KAUSHANSKY, 1995; FOSTER *et al.*, 1994). A TPO estimula a expansão, a maturação nuclear e citoplasmática dos megacariócitos e a formação plaquetária. A ação da TPO é de um potente fator estimulador de colônia de megacariócitos, atuando sinergicamente com interleucina (IL) 3, IL-11 e

eritropoietina para promover a proliferação de megacariócitos e também de progenitores imaturos totipotentes.

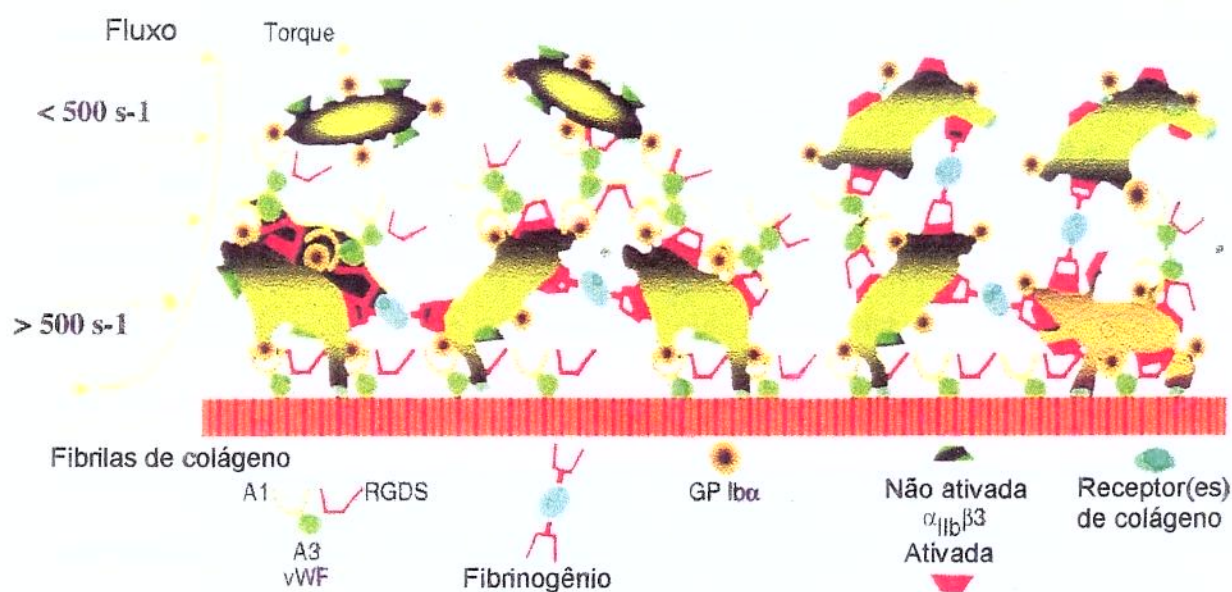
A concentração plasmática da TPO é inversamente relacionada ao número de plaquetas circulantes em doenças caracterizadas pela diminuição da massa megacariocítica, tais como a aplasia de medula óssea primária ou secundária (KUTER, 1997). Estudos em animais trombocitopênicos por mieloablação demonstram que os níveis de TPO diminuem após a transfusão plaquetária e voltam a elevar quando a trombocitopenia recorre, o que colabora com a regulação da TPO dependente do número de plaquetas (KAUSHANSKI *et al.* 1994; FOSTER *et al.*, 1994 KUTER *et al.*, 1997). No entanto, em patologias caracterizadas por destruição periférica das plaquetas, os níveis plasmáticos de TPO são discretamente elevados (KAUSHANSKI *et al.* 1994; KUTER *et al.*, 1997).

Função plaquetária

As plaquetas aderem ao endotélio lesado pela exposição de estruturas subendoteliais e da matriz extra-celular, que ativam a adesão plaquetária. Uma vez ativadas, as plaquetas ligam-se a moléculas de adesão solúveis e transformam-se em uma superfície aonde ocorre a contínua deposição de plaquetas. Esses processos envolvem a adesão e a agregação plaquetária. A adesão é um processo complexo que envolve o sequestro celular no local de lesão endotelial através da interação com quatro receptores sinérgicos, que são a glicoproteína (Gp) Ib-IX-V, e as integrinas Gp Ia-IIa, Gp IIb-IIIa e a Gp Ic-IIIa. Por outro lado, a agregação plaquetária depende somente da Gp Ib-IX-V e Gp IIb-IIIa (PLOW & GINSBERG, 1995; WARE & COLLIER, 1995).

O controle da adesão e agregação plaquetária ocorre em função do fluxo sanguíneo no qual as células estão circulando naquele momento. O fibrinogênio é o único ligante na Gp IIb-IIIa em sistema de fluxo lento, como o sistema venoso. Entretanto, no sistema arterial, o fibrinogênio é substituído pelo fator de von Willebrand (vWF) para a ligação nesse receptor (KULKARNI *et al.*, 2000). A representação esquemática da agregação plaquetária está demonstrada na figura 1.

Figura 1 (Modificado de BYZOVA & PLOW, 2000)



Representação Esquemática dos Mecanismos de Adesão e Agregação Plaquetária na Corrente Sanguínea. Interação GPIb α e vWF é fundamental para o sequestro transitório de plaquetas e adesão ao endotélio. Esse processo é amplificado pela ativação do receptor α IIb β 3 das plaquetas e ligação com colágeno e estruturas subendoteliais. O resultado final é a formação de um agregado plaquetário estável e ligações irreversíveis com fibrinogênio e vWF, originando assim um agregado que resiste ao fluxo acelerado. Entretanto, em condições de fluxo lento as funções do vWF não são críticas e a ligação das plaquetas com colágeno permite a formação de agregado plaquetário estável.

A interação Gp Ib α e vWF é fundamental para o sequestro transitório de plaquetas e adesão ao endotélio. Esse processo é amplificado pela ativação do receptor Gp IIb-IIIa das plaquetas e ligação com o colágeno e estruturas subendoteliais. O resultado final é a

formação de um agregado estável e ligações irreversíveis com o fibrinogênio e vWF, originando assim um agregado que resiste ao fluxo sanguíneo acelerado (KULKARNI *et al.*, 2000).

Entretanto, em condições de fluxo lento, as funções do vWF não são críticas e a ligação das plaquetas com o colágeno permite a formação de um agregado plaquetário estável.

Organização da estrutura plaquetária

A membrana plaquetária é constituída por glicolípídeos como colesterol e fosfolípídeos que são distribuídos assimetricamente entre o interior e o exterior celular. Na membrana estão localizados os receptores celulares das plaquetas, representados por complexos de glicoproteínas com domínios extra-celular, transmembrana e citoplasmático. Essa organização celular permite à plaqueta receber e traduzir uma variedade de sinais externos de ativação para o meio intracelular, que habitualmente resulta na mudança da forma discóide da célula, na agregação com outras plaquetas e na liberação do conteúdo dos grânulos intracelulares. Esse processo é fundamental para a função hemostática plaquetária (PLOW & GINSBERG, 1995; WARE & COLLER, 1995). De fato, deficiências hereditárias ou adquiridas da função dos receptores celulares, do conteúdo dos grânulos ou do número de plaquetas resultam em doenças hemorrágicas com ampla heterogeneidade clínica, caracterizadas por sangramentos cutâneo-mucosos ou hemorragias para estruturas anatômicas vitais (GEORGE & NURDEN, 1994; WEISS, 1994).

O desenvolvimento de drogas antiplaquetárias como os anticorpos monoclonais neutralizadores dos receptores plaquetários, trouxeram um grande avanço no tratamento de doenças oclusivas arteriais (CAMPBELL *et al.*, 2000). No entanto, o tratamento das doenças hemorrágicas hereditárias plaquetárias, ou trombopatias hereditárias, é dependente

da transfusão de plaquetas (GEORGE & NURDEN, 1994; WEISS, 1994). Esse tratamento expõe os pacientes ao risco de doenças transmissíveis pelo sangue, pois os métodos de inativação viral como os fotodinâmicos e pasteurização interferem na função plaquetária ou apresentam eficácia questionável (CORASH, 1998).

Adicionalmente, a produção de anticorpos por incompatibilidade do sistema HLA ou dos antígenos plaquetários específicos resultam em menor eficácia no controle das hemorragias e apresentam grande morbidade (KUNICKI & NEWMAN, 1992). Recentemente, o uso de concentrado de fator VII ativado recombinante oferece uma alternativa no controle das hemorragias em pacientes com trombopatias hereditárias (HEDNER, 2000). O elevado custo desse produto e o risco de fenômenos trombóticos após a infusão do fator VII ativado são obstáculos ao uso sistemático nesses pacientes.

Assim, o maior conhecimento das bases moleculares das doenças hemorrágicas resultantes de alterações das glicoproteínas plaquetárias pode oferecer a oportunidade para o desenvolvimento de melhores terapias e métodos diagnósticos precisos.

Usualmente, as trombopatias hereditárias mais comuns resultam de deficiências de uma ou mais proteínas dos complexos receptores plaquetários (PLOW & GINSBERG, 1995). Por outro lado, sequências polimórficas de nucleotídeos nos genes das Gps, codificam diferentes aminoácidos nas proteínas que habitualmente não resultam na deficiência funcional do receptor, ou seja, não causam diretamente doença hemorrágica. Entretanto, tais polimorfismos da proteína podem resultar em desenvolvimento de aloimunização diante da incompatibilidade entre doador e receptor de plaquetas, ou durante a gravidez. Os anticorpos antiplaquetários aderem à superfície celular e esse imunocomplexo é fagocitado

pelo sistema retículo-endotelial, resultando em diminuição do número de plaquetas circulantes (KUNICKI & NEWMAN, 1992).

Recentemente os polimorfismos das Gps plaquetárias foram relacionados a alterações funcionais que resultam em maior atividade da resposta plaquetária a estímulos para a agregação (VIJAYAN *et al.*, 2000). Dessa forma, os polimorfismos podem resultar em ganho de função e não em diminuição da função plaquetária. Consequentemente, esses dados oferecem a base fisiológica da correlação entre a presença de polimorfismo das Gps plaquetárias e o desenvolvimento de doença oclusiva arterial.

Glicoproteínas da membrana plaquetária

As glicoproteínas são denominadas de acordo com o seu peso molecular em sistema de gel de poliacrilamida em ordem decrescente de tamanho, isto é, Gp I a Gp IX. Aquelas Gp que apresentam peso molecular semelhante, recebem a nomenclatura adicional com letras, isto é, Gp Ia, Gp Ib, Gp Ic, Gp IIb, Gp IIIa, etc., identificadas com a utilização de sistemas de eletroforese de maior resolução (PLOW & GINSBERG, 1995).

As Gp são derivadas de diferentes famílias de receptores como as integrinas, as glicoproteínas ricas em leucina e as moléculas de adesão celular a imunoglobulinas. A maioria das Gp plaquetárias pertencem à família das integrinas, que são complexos protéicos heterodiméricos integrais da membrana, compostos por uma subunidade α e uma subunidade β , e mediam a interação adesiva célula-célula e célula-matriz extracelular. Essas subunidades das Gp são produtos de genes distintos e são mutuamente interdependentes para seu processamento e expressão corretos na superfície celular (GINSBERG *et al.*, 1993).

Na tabela I estão representados os diversos complexos de glicoproteínas, suas características bioquímicas, moleculares, ligantes e funções.

As cinco principais integrinas existentes na membrana plaquetária são o receptor para o colágeno GpIa-IIa ($\alpha_2\beta_1$), para a fibronectina GpIc-IIa ($\alpha_5\beta_1$), para a laminina GpIc'-IIa ($\alpha_6\beta_1$), para a vitronectina VnR ($\alpha_v\beta_3$) e o receptor dependente da ativação, GpIIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) (KUNICKI & NEWMAN, 1992). A GpIIb-IIIa e a GpIa-IIa figuram de forma proeminente entre os constituintes imunogênicos da membrana plaquetária (KUNICKI & NEWMAN, 1992).

Tabela 1. Glicoproteínas adesivas da membrana da plaqueta

Glicoproteína	designação alternativa	Peso molecular (reduzido) ^a			família gênica	ligante ^b	função	expressão da glicoproteína ^c
		subunidade α	subunidade β	subunidade β				
Gp IIb-IIIa	α_{IIb}/β_3	125 Kda, 23 Kda		110 Kda	Integrina	Fib, vWF, FN, VN	agregação adesão	C, S
receptor de vitronectina	α_v/β_3	135 Kda, 25 Kda		110 Kda	Integrina	VN, vWF?, Fib	adesão	C
Gp Ic-IIa	VLA-5	135 Kda, 27 Kda		130 Kda	Integrina	FN, Laminina ?	adesão	C
Alfa _v /IIa	VLA-6	125 Kda		130 Kda	Integrina	Laminina	adesão	C
Gp Ia-IIa	VLA-2	167 Kda		130 Kda	Integrina	Colágeno	adesão	C
Gp Ib-IX		145 Kda, 24 Kda		17 Kda	LRG ^d	vWF, THR	adesão	C
P-selectina	GMP140 PADGEM CD-62	140 Kda			Selectina	PSGL-1 ^e , carbohidrato O- ligado	Interação plaqueta- leucócito	S
PECAM-1	CD 31	130 Kda			Imunoglobulina	?	Interação plaqueta-cel. endotelial	C
Gp IV	Gp IIb CD-36	88 Kda			?	TSP, colágeno	adesão	C
Gp VI		61 Kda			?	colágeno	agregação	C
PETA-3 ^f		27 Kda			Tetraspan	?	agregação?	C

^a - os números separados por vírgulas representam o peso molecular das cadeias α e β da respectiva subunidade α e β do receptor

^b - vWF: fator de von Willebrand; Fib: fibrinogênio; FN: fibronectina; VN: vitronectina; TSP: trombospondina; THR: trombina

^c - C: expressão constitutiva; S: expressão na membrana requer estímulo plaquetário

^d - Glicoproteína rica em leucina

^e - P-ligante 1 da glicoproteína selectina

^f - antígeno-3 tetraspan da plaqueta-célula endotelial

A Gp IIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) foi a primeira das cinco integrinas a ser identificada e purificada e seus genes, os primeiros genes de Gp a serem clonados e sequenciados (figura 2) (GINSBERG et al., 1993). O gene das duas subunidades que compõe a Gp IIb-IIIa está localizado num mesmo segmento de 260 kb no braço q21-23 do cromossomo 17. O gene da Gp IIIa é composto por pelo menos 40 kb, contendo 14 exons que codificam a Gp madura (ZIMRIM et al., 1990), enquanto o da Gp IIb tem aproximadamente 17 kb, sendo composto por 30 exons (HEIDENREICH *et al.*, 1990). Existem aproximadamente 40.000-80.000 cópias da Gp IIb-IIIa na superfície plaquetária e há evidências sugerindo que a Gp IIb-IIIa é exclusiva da linhagem megacariocítica (NURDEN, 1995). A expressão da Gp IIb-IIIa ocorre precocemente na membrana de progenitores CD34+, sendo que sua expressão aumenta com a maturação celular (BURSTEIN & BRETON-GORIUS, 1995). Este complexo serve como receptor fisiológico para o fibrinogênio e para o fator de von Willebrand (na ausência de fibrinogênio), sendo também capaz de se ligar à fibronectina e à vitronectina. Esses 4 ligantes tem em comum a sequência tripeptídica Arginina-Glicina-Asparagina (RGD), que media sua interação ao receptor na Gp IIb-IIIa. Os três principais sítios de ligação da Gp IIb-IIIa à sequência RGD estão nos resíduos 109-171, 211-222 da Gp IIIa e próximos ao segundo domínio de ligação ao Ca^{2+} na Gp IIb (NURDEN, 1995). Além da função de reconhecer esses ligantes, a Gp IIb-IIIa também atua na sinalização transmembrana, na indução e/ou controle da mudança de forma da plaqueta e na formação de pontes plaqueta-plaqueta. Assim, a Gp IIb-IIIa tem papel central na ativação e agregação plaquetária (NEWMAN, 1991).

A GpIa-IIa ($\alpha_2\beta_1$), implicada como receptor para o colágeno dependente de magnésio, está presente também em outras células além das plaquetas, como os linfócitos T ativados, em

fibroblastos de pulmão e em células aderentes de crescimento rápido (STAATZ et al., 1989; TAKADA & HEMLER, 1989). A especificidade de adesão ao colágeno reside no domínio I (resíduos 140-359) da subunidade α_2 , em cuja porção N-terminal existem três domínios de ligação a metal, característica comum às integrinas. O gene dessa subunidade está localizado no cromossomo 5, na posição q23-31, com um cDNA de 5.374 pb (TAKADA & HEMLER, 1989; JASPERS *et al.*, 1991). A interação da GpIa-IIa com vários anticorpos específicos pode levar à sua ativação, resultando no aumento da afinidade da Gp ao seu ligante. Os epítomos para a ligação desses anticorpos foram identificados como pequenas regiões da subunidade β_1 , na sequência entre os resíduos 207 e 218. Esses dados revelam a importância fisiológica da subunidade β_1 na regulação da ativação da GpIa-IIa (MOROI & JUNG, 1997).

Além das integrinas, as plaquetas contêm outro complexo receptor de Gp importante para a hemostasia e por sua imunogenicidade: a Gp Ib-IX. A GpIb-IX pertence à família das proteínas ricas em leucina -LRG e atua como receptor para o fator de von Willebrand (vWF), sendo considerada como a maior responsável pela adesão da plaqueta à matriz extra-celular em um sistema de fluxo sanguíneo acelerado (KUNICKI & NEWMAN, 1992; NURDEN, 1995; CLEMENTSON, 1997). As plaquetas contêm cerca de 20.000-30.000 cópias desse complexo de Gp na sua membrana (KUNICKI & NEWMAN, 1992; NURDEN, 1995; CLEMENTSON, 1997). O significado funcional do domínio LRG ainda não é bem conhecido. O sítio de ligação ao FvW encontra-se entre os amino-ácidos 209 a 302 da Gp Ib. O complexo apresenta também um sítio de alta afinidade pela α -trombina, embora não seja clivado pela enzima (NURDEN, 1995).

O complexo Ib é composto por uma cadeia pesada, a Ib α composta por 610 aminoácidos, ligada por uma ponte dissulfeto a uma cadeia leve, a Ib β composta por 181 aminoácidos. O gene que codifica a subunidade α tem 2,4 kb e está localizado no cromossomo 17. É composto por 2 exons, dos quais o exon 2 tem toda a sequência codificante da cadeia (LOPEZ *et al.*, 1987). O gene que codifica a subunidade β está localizado no 22q11.2 (YAGI *et al.*, 1994) e é composto por um exon. O complexo GpIb está associado por ligação não-covalente a duas outras Gps: a GpIX (composta por 160 aminoácidos) e a GpV (embora nem todas as GpIb-IX estejam ligadas a Gps V). O gene da Gp IX localiza-se no cromossomo 3q21 e é composto por apenas um exon (HICKEY & ROTH, 1993), e o gene da Gp V está localizado no cromossomo 3q29 (LANZA *et al.*, 1993) também contém apenas um exon.

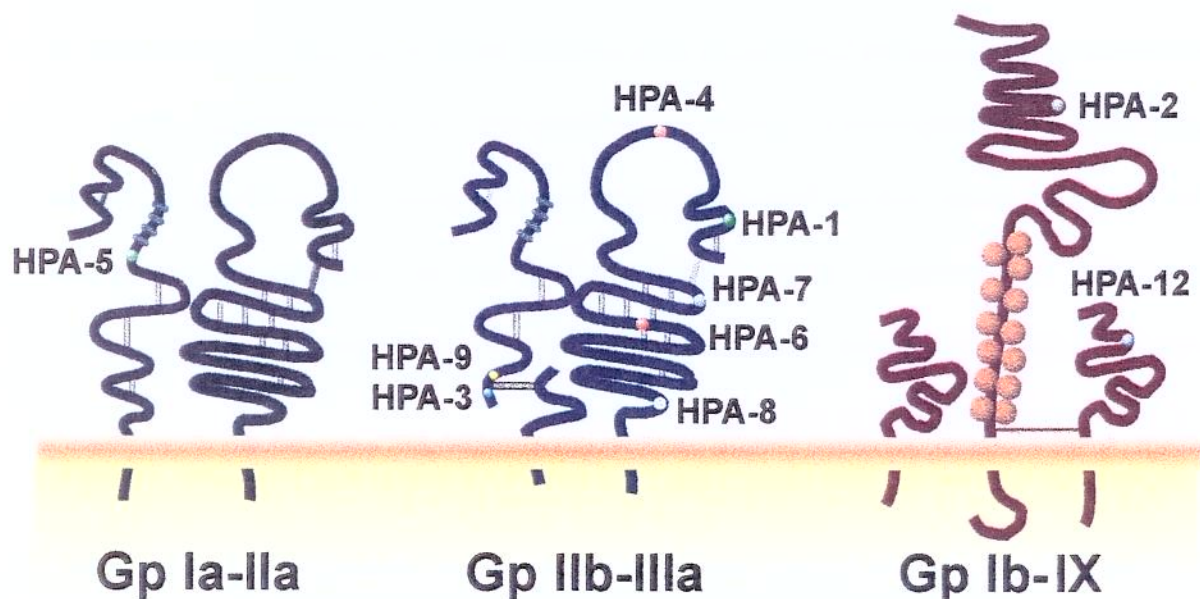
Polimorfismos das glicoproteínas plaquetárias: antígenos plaquetários humanos (HPA)

Usualmente, as trombopatias hereditárias mais comuns resultam de deficiências de uma ou mais proteínas dos complexos receptores plaquetários (PLOW & GINSBERG, 1995). Por outro lado, sequências polimórficas de nucleotídeos nos genes que codificam diferentes aminoácidos nas proteínas, habitualmente não resultam na deficiência funcional do receptor, ou seja, não causam diretamente uma doença hemorrágica (NEWMAN, 1991; NURDEN, 1995; KUNICKI & NEWMAN, 1992).

Devido a essa simples substituição é possível que múltiplos neo-epítomos sejam expressos nas glicoproteínas e possam exercer substancial e permanente alteração da conformação e função dos receptores. Os anticorpos antiplaquetários aderem à superfície celular e esse

complexo é fagocitado pelo sistema retículo-endotelial, resultando na destruição plaquetária e consequente plaquetopenia (NEWMAN & VALENTIN, 1995). Os determinantes antigênicos são chamados de antígenos plaquetários humanos ou HPAs (figura 2) (NEWMAN & VALENTIN, 1995). Vários sistemas distintos de HPAs, que inicialmente foram descritos apenas nas plaquetas, são encontrados em outras células e tecidos (SANTOSO, 1998). Os HPAs que residem na GpIIIa foram detectados em células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos. Os antígenos presentes na GpIa também foram encontrados em linfócitos T ativados e células endoteliais. Já os HPAs localizados na Gp IIb, na GpIb_a, GpIb_b, parecem estar presentes somente nas plaquetas (SANTOSO, 1998). Esses dados sugerem que os mecanismos que resultam na aloimunização plaquetária podem afetar outros tecidos e órgãos, como por exemplo, a incompatibilidade de sistemas HPA expressos em células endoteliais entre doador e receptor de órgãos poderia aumentar a chance de rejeição ao transplante (KEKOMAKI et al., 1997, JUJI *et al.*, 1999).

Figura 2: Representação dos principais HPAs nas glicoproteínas Ia-IIa, IIb-IIIa e Ib-IX



Modificado de Nurden, 1995 e McFarland, 1998.

A nomenclatura atual dos sistemas HPA os classifica numericamente de acordo com a cronologia de sua descrição (HPA-1 a 13), e o alelo de maior frequência é designado pela letra "a" enquanto o de menor frequência é designado pela letra "b" (VON DEM BORNE & DECARY, 1990). Na tabela II estão representados os diversos sistemas HPA, sua localização e caracterização molecular.

Atualmente, são conhecidos 5 sistemas aloantigênicos bialélicos (HPA-1 a 5) e 8 antígenos de baixa frequência (HPA-6W, etc.) localizados em 5 Gps da membrana plaquetária: GpIa, GpIb_α, GpIb_β, GpIIb e GpIIIa. (SANTOSO, 1998). O complexo Gp IIb-IIIa apresenta os epítomos mais comuns no desenvolvimento de aloanticorpos antiplaquetários (NURDEN, 1995).

O sistema HPA-1 (PI) é o mais frequentemente envolvido nas duas principais doenças aloimunes plaquetárias, sendo relatado em mais de 90% dos casos descritos em Caucásios. O epítomo reconhecido pelo anticorpo anti-HPA-1 na Gp IIIa está localizado próximo a um sítio ativo da glicoproteína IIIa e quando esse anticorpo está ligado à essa Gp, há uma inibição da agregação plaquetária (KUNICKI & NEWMAN, 1992).

O sistema HPA-4 (Pen ou Yuk) tem um interesse especial pois está localizado no sítio de ligação RGD (arginina, glicina, ácido aspártico) da Gp IIIa à proteínas de adesão. Assim, anticorpos anti-HPA-4 são habitualmente inibidores da agregação plaquetária induzida por ADP (adenosina di-fosfato) (NURDEN, 1995).

Na Gp IIb estão os sistemas HPA-3 e 9, localizados próximos à região carboxi-terminal da cadeia pesada madura da Gp IIb (LYMAN *et al.*, 1990). Há um desequilíbrio de ligação entre a frequência gênica desses dois sistemas, de forma que é sugerido que o HPA-9 seja uma variante do HPA-3 (NORIS *et al.*, 1995).

Tabela 2. Bases moleculares dos sistemas de antígenos plaquetários humanos (HPA).

Antígeno	Sinonímia	Localização Gp	Substituição de nucleotídeo	Substituição de aa*	Referência
HPA-1a	Zwa, Pl ^{A1}	Gp IIIa	T ₁₉₆	Leu ₃₃	Newman et al., 1989
HPA-1b	Zw ^b , Pl ^{A2}		C ₁₉₆	Pro ₃₃	
HPA-2a	Ko ^b	Gp Ib α	C ₅₂₄	Thr ₁₄₅	Kuijpers et al., 1992
HPA-2b	Ko ^a , Sib ^a		T ₅₂₄	Met ₁₄₅	
HPA-3a	Bak ^a , Lek ^a	Gp IIb	T ₂₆₂₂	Ile ₈₄₃	Lyman et al., 1990
HPA-3b	Bak ^b		G ₂₆₂₂	Ser ₈₄₃	
HPA-4a	Yuk ^b , Pen ^a	Gp IIIa	G ₅₂₆	Arg ₁₄₃	Wang et al., 1992
HPA-4b	Yuk ^a , Pen ^b		A ₅₂₆	Gln ₁₄₃	
HPA-5a	Br ^b , Zav ^b	Gp Ia	G ₁₆₄₈	Glu ₅₀₅	Santoso et al., 1993a
HPA-5b	Br ^a , Zav ^a , Hc ^a		A ₁₆₄₈	Lys ₅₀₅	
HPA-6bW	Ca ^a , Tu ^a	Gp IIIa	A ₁₅₆₄ G ₁₅₆₄	Gln ₄₈₉ Arg ₄₈₉	Wang et al., 1993
HPA-7bW	Mo ^a	Gp IIIa	G ₁₃₁₇ C ₁₃₁₇	Ala ₄₀₇ Pro ₄₀₇	Kuijpers et al., 1993
HPA-8bW	Sr ^a	Gp IIIa	T ₂₀₀₄ C ₂₀₀₄	Cys ₆₃₆ Arg ₆₃₆	Santoso et al., 1994
HPA-9bW	Max ^a	Gp IIb	A ₂₆₀₃ G ₂₆₀₃	Met ₈₃₇ Val ₈₃₇	Noris et al., 1995
HPA-10bW	La ^a	Gp IIIa	A ₂₈₁ G ₂₈₁	Gln ₆₂ Arg ₆₂	Peyruchaud et al., 1997
HPA-11bW	Gro ^a	Gp IIIa	A ₁₉₉₆ G ₁₉₉₆	His ₆₃₃ Arg ₆₃₃	Simsek et al., 1997
HPA-12bW	Iy ^a	Gp Ib β	A ₁₄₁ G ₁₄₁	Glu ₁₅ Gly ₁₅	Santoso et al., 1996
HPA-13bW	Sir ^a	Gp Ia	T ₂₅₃₁ C ₂₅₃₁	Met ₇₉₉ Thr ₇₉₉	Santoso et al., 1997

*aa = aminoácidos

No complexo Gp Ib-IX, foram descritos os sistemas *HPA-2* (Ko, Sib), localizado na cadeia α da Gp Ib, e o *HPA-12* (Iy), localizado na cadeia β da Gp Ib.

Na Gp Ia do complexo Gp Ia-IIa, ou “very late antigen-2” (VLA-2), são encontrados dois polimorfismos: o sistema *HPA-5* (Br), o segundo sistema mais frequentemente relacionado a aloimunização (SANTOSO *et al.*, 1993a; McFARLAND, 1998) e o *HPA-13* (Sit), recentemente descrito por SANTOSO *et al.*, (1997). O complexo Ia-IIa corresponde ao VLA-2 expresso nos linfócitos T ativados. Dessa forma, polimorfismos nesses sistemas podem influenciar a resposta imune iniciada pelos linfócitos T ativados, seja no reconhecimento do antígeno apresentado no contexto do sistema HLA classe I ou II, ou na ativação dos linfócitos B dependente dos linfócitos T.

Recentemente os sistemas HPA foram relacionados a alterações funcionais que resultam em maior atividade da resposta plaquetária a estímulos para a agregação. Dessa forma, os polimorfismos podem resultar em ganho de função e não em diminuição da função de agregação plaquetária. Como no território vascular arterial o trombo é constituído principalmente por plaquetas, os polimorfismos dos sistemas HPA, principalmente os sistemas *HPA-1* e *HPA-2*, poderiam estar relacionados a maior risco para o desenvolvimento de doença oclusiva arterial.

Prevalência dos sistemas HPA em diferentes populações

Os estudos de vários polimorfismos gênicos nos últimos anos demonstraram grande heterogeneidade na prevalência dos diferentes alelos quando indivíduos de grupos étnicos distintos foram analisados (tabela 3).

Tabela 3. Frequência alélica dos sistemas HPA-1 a 5 em diferentes populações

População	sistema		HPA-1		HPA-2		HPA-3		HPA-4		HPA-5		Referência
	n		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	
Americanos caucasóides	100		0,89	0,11	0,92	0,09	0,67	0,33	1	0	0,89	0,11	KIM <i>et al.</i> , 1995
Americanos Negróides	100		0,92	0,08	0,82	0,18	0,63	0,37	1	0	0,79	0,21	KIM <i>et al.</i> , 1995
Argelinos	100		0,827	0,173	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,837	0,027	MERCIER <i>et al.</i> , 1994
Austalianos aborígenes	190		0,992	0,008	ND	ND	0,937	0,063	ND	ND	0,847	0,153	CHEN <i>et al.</i> , 1997
Australianos caucasóides	250		0,838	0,162	ND	ND	0,648	0,352	ND	ND	0,930	0,070	CHEN <i>et al.</i> , 1997
Austriacos	906-931		0,852	0,148	0,918	0,082	0,612	0,388	ND	ND	0,892	0,108	HOLENSTEINER <i>et al.</i> , 1995
Chineses	100		0,995	0,005	0,975	0,025	0,525	0,475	1	0	0,965	0,035	CHANG <i>et al.</i> , 1998
Coreanos	200		0,988	0,012	0,923	0,077	0,555	0,445	0,990	0,010	0,978	0,022	SEO <i>et al.</i> , 1998
Dinamarqueses	131-557		0,831	0,169	0,917	0,083	0,626	0,374	1	0	0,921	0,079	STEFFENSEN <i>et al.</i> , 1996
Finlandeses	200		0,86	0,14	0,91	0,09	0,59	0,41	ND	ND	0,95	0,05	KEKÖMAKI <i>et al.</i> , 1995
Índios Brasileiros	116-132		1	0	0,957	0,042	ND	ND	ND	ND	ND	ND	COVAS <i>et al.</i> , 1997
Índios Chilenos	82-112		>0,9	ND	ND	ND	0,673	0,327	0,996	0,004	0,976	0,024	INOSTROSA <i>et al.</i> , 1988
Indonésios	168		0,991	0,009	ND	ND	0,461	0,539	0,997	0,003	0,954	0,046	SANTOSO <i>et al.</i> , 1993
Japoneses	254-331		0,998	0,002	0,898	0,102	0,594	0,406	0,990	0,010	ND	ND	TANAKA <i>et al.</i> , 1995, 1996 a, b
Poloneses	100-171		0,874	0,126	0,898	0,102	0,592	0,408	1	0	0,937	0,026	DRZEWEK <i>et al.</i> , 1998

ND= Não definido

Assim, é possível que a distribuição dos alelos dos sistemas HPA seja também heterogênea, o que pode refletir na prevalência das diversas doenças relacionadas a aloimunização plaquetária entre indivíduos de raças diferentes (KUNICKI & NEWMAN, 1992; SIMSEK *et al.*, 1993; KIM *et al.*, 1995).

O sistema HPA-1 é o mais frequentemente estudado, sendo responsável pela grande maioria dos casos de púrpura trombocitopênica aloimune neonatal (PTAN) (MUELLER-ECKHARDT *et al.*, 1989). Enquanto esses dados são comumente observados em populações Caucásicas, aparentemente a prevalência de PTAN é menor em populações não Caucásicas. (KIM *et al.*, 1995). Além disso, o sistema HPA envolvido pode variar entre as diferentes raças. Entre Orientais, nenhum caso de PTAN está relacionado ao sistema HPA-1, mas sim ao sistema HPA-4 (KUNICKI & NEWMAN, 1992; TANAKA *et al.*, 1995; SEO *et al.*, 1998). Ao contrário, entre os Caucásicos não há descrito, ao nosso conhecimento, casos de PTAN relacionados ao sistema HPA-4.

Em conjunto, esses dados sugerem que estudos em distintas populações tanto da prevalência de plaquetopenia no período neonatal, assim como dos diversos alelos dos sistemas HPA podem contribuir para o conhecimento das patologias relacionadas à aloimunização plaquetária.

Sistemas HPA e doenças aloimunes plaquetárias

A produção de anticorpos contra as sequências polimórficas dos sistemas HPA podem resultar em plaquetopenia e consequentemente em hemorragias fatais. Nos transplantes de órgão e tecidos, a incompatibilidade HPA entre doador e receptor pode resultar em menor sobrevida do transplante (KEKOMAKI *et al.*, 1997, JUJI *et al.*, 1999). Assim, as principais

doenças relacionadas à aloimunização plaquetária resultam de transfusões sanguíneas, gestações, transplante de órgãos e, raramente, da transmissão passiva de anticorpos.

Púrpura Trombocitopênica Aloimune Neonatal – PTAN

A púrpura trombocitopênica aloimune neonatal (PTAN) é uma doença hemorrágica do feto ou neonato, resultante da plaquetopenia aloimune por anticorpos maternos contra aloantígenos plaquetários paternos herdados pelo feto (MUELLER-ECKHARDT *et al.*, 1989). A PTAN possui, dessa forma, uma analogia à doença hemolítica do recém-nascido, porém em 50% dos casos ocorre já na primeira gestação.

Habitualmente, os casos de PTAN são identificados inicialmente pela plaquetopenia detectada no período neonatal. A frequência da PTAN é variável de acordo com o critério adotado para o número de plaquetas com que os recém-nascidos e mães são avaliados, a seleção dos casos estudados (nascimentos consecutivos ou não) e da metodologia aplicada para a detecção de anticorpos antiplaquetários. Estudos prospectivos revelam que a plaquetopenia (contagem de plaquetas menor do que $150 \times 10^9/L$) no período neonatal ocorre em 0,9% dos recém-nascidos, sendo 0,7% dos casos quando é considerada plaquetopenia menor que $100 \times 10^9/L$ (DREYFUS *et al.*, 1997). As plaquetopenias decorrentes de doenças imunes ocorrem em 0,3% dos casos de plaquetopenia. Assim, a prevalência de PTAN é estimada em 1 caso a cada 2.000-4.000 nascimentos. Com a taxa anual de crescimento de 4 milhões de indivíduos nos EUA, é esperado que 2.000 neonatos tenham PTAN anualmente (FLUG *et al.*, 1994; DOUGHTY *et al.*, 1995; PANZER *et al.*, 1995). Considerando a mesma proporção para a população brasileira, teríamos 1.600 casos anualmente de PTAN. Na região de Campinas, a taxa de nascimentos ao ano é de 10.000

crianças (MARIOTONI & BARROS FILHO, 2000), assim esperaríamos 3-5 casos de PTAN ao ano.

O quadro clínico de PTAN é caracterizado pela presença de sangramento cutâneo ou mucoso, tais como do trato gastrointestinal ou genito-urinário, identificado já ao nascimento. A mais grave complicação é o sangramento de sistema nervoso central (SNC) que ocorre em 20-30% dos casos e pode acontecer precocemente, sendo detectado entre a 20ª e 24ª semanas de gestação (MUELLER-ECKHARDT *et al.*, 1989), podendo resultar em óbito fetal. A mortalidade dessa complicação é de aproximadamente 10%. Entre os sobreviventes, são observadas sequelas neurológicas graves em aproximadamente 21% dos casos.

Os principais sistemas envolvidos são o HPA-1, em 80% e o HPA-5 em 19% dos casos. Embora aproximadamente 2 a 2,5% da população Caucasóide seja HPA-1a negativa, a incidência de PTAN envolvendo a incompatibilidade HPA-1 é menor que a esperada nesse grupo. De fato, um segundo fator de risco genético ligado ao sistema HLA de classe II (alelo DRB3* 0101 ou DR52a) está claramente associado ao desenvolvimento de aloimunização de mulheres HPA-1b durante a gestação de fetos HPA-1a (DOUGHTY *et al.*, 1995; PANZER *et al.*, 1995).

A recorrência de PTAN relacionada ao sistema HPA-1 em famílias com filhos previamente afetados varia de 75 a 90% (MUELLER-ECKHARDT *et al.*, 1989; Mc FARLAND *et al.*, 1998; WILLIAMSON *et al.*, 1998). É importante considerar que a gravidade hemorrágica da doença parece aumentar em gestações subsequentes. Assim, a identificação da aloimunização permite a orientação da mãe para os riscos de novos casos em gestações

subsequentes, bem como a adoção de medidas terapêuticas profiláticas (McFARLAND, 1998; WILLIAMSON *et al.*, 1998).

O segundo sistema HPA mais frequentemente envolvido entre Caucásios é o HPA-5. No entanto nesse grupo o quadro clínico é menos grave e a recorrência da doença é menor. Uma provável explicação para a menor patogenicidade do sistema HPA-5 em relação ao sistema HPA-1, seria o menor número de cópias da Gp Ia na membrana plaquetária comparada ao da Gp IIIa (que contem o HPA-1). Ainda que não totalmente definido, a presença de alelos HLA-DR (p. ex: DRB1, Glu-Asp na posição 69-70) ou o polimorfismo do gene TAP (região polimórfica do HLA de classe II, envolvida no processamento de antígenos) podem estar relacionados com o desenvolvimento da PTAN associada ao sistema HPA-5 (SEMANA *et al.*, 1996; KEKÖMAKI *et al.*, 2000).

O diagnóstico da PTAN é baseado no quadro clínico, na identificação de anticorpos no soro materno e confirmado e pela fenotipagem plaquetária dos pais e do neonato. No entanto, a plaquetopenia do paciente decorrente da destruição aloimune é um importante fator limitante da fenotipagem plaquetária, assim como a qualidade inconstante dos anticorpos comercialmente disponíveis para os testes laboratoriais. O reconhecimento das bases moleculares e a disponibilidade de métodos de biologia molecular para a genotipagem dos sistemas HPA, oferecem uma alternativa para o diagnóstico de PTAN. (Mc FARLAND *et al.*, 1991; DOUGHTY *et al.*, 1995; WILLIAMSON *et al.*, 1998). A vantagem desses métodos reside no fato de que não há necessidade de grande volume de sangue ou de plaquetas circulantes. Os vários sistemas HPA podem ser avaliados utilizando-se “primers” específicos, o que é fundamental para a análise de outros sistemas para os quais não há anticorpos comercialmente disponíveis.

O tratamento da PTAN é baseado na reposição plaquetária e uso de imunoglobulina venosa. Nos casos em que a gestante sabidamente teve uma criança com PTAN, e principalmente com sangramento em SNC, a gestação subsequente deve ser monitorizada cuidadosamente. A profilaxia materna no período pré-natal consiste na administração semanal de altas doses de imunoglobulina intravenosa (IgIV) e eventualmente a associação de prednisona. Ainda nesse período, as transfusões intra-uterinas de plaquetas compatíveis são indicadas (WILLIAMSON *et al.*, 1998; SAINIO *et al.*, 1999). Entretanto, para esse programa de tratamento, são necessárias amostras do sangue fetal para o diagnóstico de plaquetopenia e seguimento clínico da terapia, o que pode resultar em complicações hemorrágicas eventualmente fatais para o feto.

Púrpura Pós-Transfusional

A púrpura pós-transfusional (PPT) é uma patologia caracterizada pelo desenvolvimento de aloanticorpos plaquetários induzido por transfusão de hemocomponentes, resultando em plaquetopenia grave em paciente previamente aloimunizado (MUELLER-ECKHARDT, 1986). O quadro clínico é caracterizado pelo aparecimento súbito de púrpura trombocitopênica grave, aproximadamente uma semana após a transfusão sanguínea. A duração da plaquetopenia em pacientes não tratados é de aproximadamente 2 semanas e apresenta morbidade grave. É uma doença rara cuja incidência exata não é conhecida. A maioria dos casos ocorre no sexo feminino, numa proporção de 5 mulheres para cada homem, ocorrendo predominantemente na sexta e sétima décadas de vida. Habitualmente, a maioria dos casos descritos revela pacientes previamente expostos a antígenos plaquetários, através de gestações ou de transfusões (MUELLER-ECKHARDT, 1986). O mecanismo

exato envolvido na destruição das plaquetas do paciente que apresenta a PPT não é bem definido. É interessante a observação de que o anticorpo produzido contra um aloantígeno ausente em suas plaquetas acaba por destruir as próprias plaquetas do paciente. A hipótese mais provável para explicar esse mecanismo é que a destruição resulta da presença de imuno-complexos, que se formam pela adesão do anticorpo a antígenos presentes no sangue do doador, ou pela liberação dos mesmos após a lise de plaquetas do doador. Esses imuno-complexos aderem à membrana plaquetária e as plaquetas seriam fagocitadas pelo sistema retículo-endotelial (KICKLER *et al.*, 1986; Mc FARLAND, 1996; MOLLISON *et al.*, 1997).

O sistema HPA mais frequentemente envolvido nos casos de PPT é o HPA-1, em aproximadamente 88% dos casos, seguido pelo HPA-5 e HPA-3. (Mc FARLAND, 1996).

As manifestações hemorrágicas mais frequentes são o sangramento cutâneo-mucoso, epistaxe, sangramento em trato gastro-intestinal e genito-urinário. A complicação mais grave é o sangramento em sistema nervoso central, com mortalidade de 9% (Mc FARLAND, 1996).

O tratamento da PPT é baseado na administração de IgIV, que habitualmente resulta em resposta satisfatória já evidente algumas horas após a primeira infusão do hemoderivado (Mc FARLAND, 1996). Para os casos refratários à IgIV a plasmaférese pode oferecer benefícios. O uso de imunossupressão com corticosteróides não é acompanhado de eficácia clínica, pois o mecanismo de ação é lento e não protege o paciente nas primeiras horas. Medidas terapêuticas menos eficazes incluem a transfusão de plaquetas compatíveis, esplenectomia e o uso de vincristina (MUELLER-ECKHARDT, 1986; WIN *et al.*, 1995; FRIEDBERG & GAUPP, 1999). O prognóstico da PPT depende do diagnóstico correto e da

instituição da terapêutica eficaz de imediato. A recorrência da doença pode ser evitada com a utilização de hemocomponentes HPA-compatíveis (MC FARLAND, 1996).

Embora as duas síndromes descritas anteriormente tenham a mesma fisiopatologia, ou seja, incompatibilidade entre os antígenos dos sistemas HPA, essas doenças acontecem em contextos distintos. Por exemplo, mulheres que desenvolvem PPT (nos casos descritos até o momento), não apresentavam PTAN anteriormente. Esses dados sugerem que outros mecanismos imunológicos funcionem como coadjuvantes no desenvolvimento das distintas patologias.

Refratariedade Transfusional Plaquetária

A refratariedade transfusional plaquetária é caracterizada por uma recuperação insatisfatório do número de plaquetas infundidas a pelo menos duas transfusões de plaquetas consecutivas (KEKOMÄKI, 1998). As causas associadas à refratariedade podem ou não ser imunológicas. Entre as causas imunológicas, a mais importante é decorrente da presença de aloanticorpos para o sistema de antígenos leucocitários humanos - HLA, que podem ser detectados em 30 a 100% de pacientes politransfundidos (NOVOTNY, 1999). Entretanto, nesse grupo de pacientes imunizados por incompatibilidade do sistema HLA, em 9 a 25% dos casos há coexistência de anticorpos anti-HPA (SCHNAIDT *et al.*, 1996; KEKOMÄKI, 1998).

Incompatibilidade relacionada ao sistema HPA e rejeição em transplante renal

Em 1997, Kekömaki *et al.* verificaram que pacientes desenvolvendo rejeição vascular aguda a transplantes renais, apresentavam títulos altos de anticorpos anti-HPA, em

particular o anti-HPA-5, sugerindo assim um possível envolvimento da incompatibilidade HPA na perda de enxertos. A expressão de aloantígenos plaquetários incompatíveis entre doador e receptor, seja por HPA expressos em células endoteliais ou linfócitos T ativados poderia resultar na rejeição ao órgão ou tecido transplantado. Esses autores postulam a eventual necessidade da verificação da compatibilidade HPA, além da HLA, para o sucesso no transplante renal. No entanto, não há outros estudos publicados até o momento para a confirmação desses dados iniciais.

Púrpura trombocitopênica idiopática

A púrpura trombocitopênica idiopática (PTI) é uma patologia auto-imune caracterizada pela produção de auto-anticorpos plaquetários que resultam na remoção da circulação e destruição das plaquetas pelo sistema retículo-endotelial. Os autoanticorpos identificados nos casos de PTI podem reagir com receptores específicos da membrana plaquetária, mas na grande maioria dos casos esses anticorpos são inespecíficos e podem estar presentes em plasma de indivíduos normais sem PTI (SHULMAN & REID, 1994). O tratamento da doença em adultos é baseado no uso de corticosteróides, imunossupressores ou esplenectomia. A resolução permanente da plaquetopenia no período de seis meses após o diagnóstico define a PTI aguda, do contrário a doença é reconhecida como crônica. A maioria dos adultos apresenta a forma crônica da doença com resposta satisfatória ao tratamento anteriormente descrito em apenas 20-40% dos pacientes. É importante observar que ao diagnóstico, o quadro clínico de PTI aguda e crônica são indistinguíveis. Ao contrário da PT imune aguda da criança, comumente observada após doença viral ou de PT

imune secundária a drogas em adultos idosos, a PTI aguda em adultos é incomum (GEORGE *et al.*, 1996).

Entre os fatores hereditários estudados para o desenvolvimento da PTI estão o polimorfismo do sistema HLA, dos receptores FcγRIIA plaquetário (NOMURA *et al.*, 1998; WILLIAMS *et al.*, 1998). Recentemente os polimorfismos do sistema HPA foram avaliados em pacientes com PTI (THUDE *et al.*, 1999). No entanto, a maioria desses estudos analisou pacientes com PTI crônica e até o momento nenhum estudo avaliou os casos de PTI aguda.

Em 1997, KIM *et al.*, descreveram uma maior frequência do alelo HPA-5b em 29 pacientes Coreanos adultos com diagnóstico de PTI. O autor sugere que este polimorfismo poderia representar um fator genético de risco para a patologia. THUDE *et al.* (1999) estudaram 33 pacientes alemães com PTI crônica e foi observada ausência do HPA-2b entre pacientes, quando em 8% dos controles normais esse alelo estava presente.

Esses dados iniciais sugerem que assim como nas doenças de aloimunização, o sistema HPA pode estar relacionado a doenças autoimunes plaquetárias.

Doenças Vasculares Oclusivas

O estudo de vários polimorfismos gênicos relacionados a doenças trombóticas venosas permite reconhecer os mais importantes fatores de risco hereditários para trombose venosa periférica. No entanto, o mesmo sucesso não é observado quando vários fatores relacionados a hipercoagulabilidade primária foram estudados em pacientes com doenças arteriais (BAUER, 1999).

As plaquetas são componentes essenciais do trombo arterial e não do trombo venoso (KULKARNI *et al.*, 2000). Dessa forma, nas doenças isquêmicas arteriais coronárias ou cerebrais, o controle da função plaquetária é importante na redução da mortalidade das doenças oclusivas arteriais. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais que bloqueiam a ação dos receptores de membrana plaquetária forma um importante avanço no tratamento das doenças isquêmicas coronárias (FERGUSON & ZAPPA, 1999). Assim, polimorfismos nos genes dos receptores plaquetários, teoricamente poderiam estar relacionados ao desenvolvimento de doenças trombóticas arteriais.

Em 1996, GOLDSCHMIDT-CLERMONT, analisando as possíveis causas da morte de um campeão olímpico, determinou que o atleta apresentara homozigose para o alelo HPA-1b, na ausência de outros fatores de risco para doença coronariana. No mesmo ano, WEISS *et al.*, observaram alta prevalência do HPA-1b em indivíduos de uma mesma família com infarto agudo do miocárdio. Esses autores estenderam o estudo para uma série de 72 pacientes e definiram que indivíduos com alelo HPA-1b tinham a chance de desenvolver infarto agudo do miocárdio 2 vezes maior do que indivíduos sem o alelo. Esse risco era maior ainda nos pacientes com idade inferior a 60 anos. Estudos posteriores trouxeram resultados conflitantes. Até o momento, 17 publicações sobre a associação do HPA-1 e doença arterial coronariana resultaram em 9 estudos positivos e 8 estudos negativos para a associação (BYZOVA & PLOW, 2000). O mais significativo estudo prospectivo corresponde à avaliação de 14.916 homens acompanhados por 8,5 anos, tendo sido publicado por RIDKER *et al.* (1997). Nesse estudo não houve correlação entre infarto agudo do miocárdio, acidente vascular isquêmico cerebral ou trombose venosa e os alelos do sistema HPA-1. Outro estudo, com uma metodologia diferente, analisando autópsia de

homens adultos que faleceram por morte súbita fora do ambiente hospitalar, permite outra interpretação. MIKKELSSON *et al.* (1999), demonstraram que o HPA-1b está relacionado ao desenvolvimento de trombose no infarto agudo do miocárdio e além disso os pacientes podem desenvolver doença coronariana mais grave e extensa com maior chance de ruptura da placa ateromatosa e morte súbita. Assim, ao estudarmos sobreviventes de infarto ou paciente no ambiente hospitalar, os mecanismos responsáveis pela fisiopatogenia da doença podem ser diferentes.

Em conjunto, esses dados podem ser analisados no atual conhecimento de que as plaquetas com HPA-1b apresentam resposta acentuada ao fibrinogênio imobilizado e formam coágulo com maior capacidade de retração, sendo assim mais resistente à trombólise (VIJAYAN *et al.*, 2000).

Outro polimorfismo com associação descrita à doença coronariana é o sistema HPA-2. Nesse caso, o alelo HPA-2b está em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo da GpIa, o VNTR (4 alelos, A, B, C e D), localizado na região macroglicopeptídica da molécula, e que resulta em uma Gp de maior massa molecular quando presentes os alelos A ou B. Como resultado, o sítio de ligação ao vWF estaria mais exteriorizado na membrana, e assim, haveria maior facilidade na ativação plaquetária. A frequência do alelo HPA-2b encontrada por GONZALES-CONEJERO *et al.* (1998), foi significativamente maior em pacientes jovens com doenças arteriais coronariana ou cerebral prematuras do que no grupo controle estudado.

Capítulo II - Objetivos

O objetivo desse estudo foi a determinação da participação dos sistemas de antígenos plaquetários humanos (HPA) em doenças hemorrágicas e trombóticas. Inicialmente realizamos o estudo da distribuição dos alelos dos sistemas HPA entre indivíduos de grupos étnicos distintos, resumidos no capítulo III. Posteriormente, determinamos a prevalência de plaquetopenia neonatal em 12.714 recém-nascidos (capítulo IV). Nesse estudo, determinamos a prevalência de incompatibilidade genotípica entre mães e recém-nascidos com plaquetopenia e comparamos com um grupo controle. No capítulo V, abordamos a prevalência do polimorfismo do sistema HPA-5 e o desenvolvimento de PTI aguda em adultos. E finalmente no capítulo VI, analisamos a prevalência dos alelos do sistema HPA-1 em pacientes com doenças arteriais ou venosas.

Capítulo III

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Resumo

Os antígenos plaquetários humanos (HPA) estão relacionados à doenças aloimunes plaquetárias e ao desenvolvimento de doenças vasculares oclusivas. Vários sistemas HPA bialélicos distintos foram descritos com distribuição heterogênea entre diferentes grupos étnicos. Nesse estudo, foram genotipados para os sistemas HPA-1 a 5, 320 indivíduos de três grupos étnicos distintos do Brasil (Caucasóides, Negróides e Índios da Amazônia), cuidadosamente selecionados. Uma prevalência similar dos alelos HPA foi encontrada em brasileiros Caucasóides e Negróides. Esses dados diferem dos encontrados em grupos étnicos semelhantes de outros países. Entre os Índios da Amazônia, não foi detectado o alelo b para os sistemas HPA-1, 4 e 5. Os resultados descritos contribuem no diagnóstico de doenças relacionadas à aloimunização plaquetária e no desenvolvimento de programas para rastreamento de doenças associadas aos HPA.

Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1–5 in three distinct ethnic groups in Brazil

V. Castro,* A. F. Origa,* J. M. Annichino-Bizzacchi,* M. Soares,† R. C. Menezes,†
M. S. Gonçalves,‡ F. F. Costa* & V. R. Arruda*

Summary

The human platelet antigen (HPA) systems are related to immune platelet disorders as well as to the development of occlusive vascular disease. Several distinct biallelic HPA systems are known, and a heterogeneous distribution of HPA alleles has been described among distinct ethnic groups. In this study we genotyped 320 carefully selected individuals from three distinct ethnic groups in Brazil (Caucasians, Blacks and Amazonian Indians) for the HPA-1, -2, -3, -4 and -5 systems. A similar prevalence for all HPA alleles was found in Brazilians of Caucasian and Black descent. These data contrast with those reported for similar ethnic groups in other countries. Among the Amazonian Indians, no b allele of the HPA-1, -4 and -5 systems was identified. The data presented here could be useful in the diagnosis of alloimmune platelet disease, in genetic counselling and in the development of screening programmes for HPA-related diseases.

Introduction

The human platelet alloantigen (HPA) systems are immunological epitopes resulting from polymorphism in the genes encoding membrane glycoproteins (Kunicki & Newman, 1992).

Alloimmunization to HPA systems is recognized clinically as a severe bleeding disease resulting from maternal sensitization to paternal alloantigens on foetal platelets, known as neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura—NATP (Mueller-Eckhardt *et al.*, 1989). Although distinct from red cell alloimmunization to the Rh system, the severe thrombocytopenia due to alloimmunization can result in a life-threatening disease in 50% of cases of NATP during the first pregnancy. Neonatal thrombocytopenia is not a rare event and has been described in

0.9% of an unselected cohort of neonates, and immune thrombocytopenia can be detected in 0.3% of live births (Dreyfus *et al.*, 1997). However, antenatal screening to detect foetuses with a risk of NATP is generally not performed when there is no previous family history of the condition.

Several distinct biallelic HPA systems are known, and a heterogeneous distribution of HPA alleles has been described in distinct ethnic groups (Kim *et al.*, 1995; Noris *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1996; Santoso & Kiefel, 1998). In Caucasians with NATP, antibody to HPA-1 or HPA-5 systems has been detected in 80 and 19% of cases, respectively (Mueller-Eckhardt *et al.*, 1989). However, in African-American and Asian populations screening for HPA-1 has not been recommended due to the low prevalence of the HPA-1b allele in this group (Kim *et al.*, 1995). In fact, in the Japanese population, the HPA-4 system is the most commonly involved in the cases of NATP, while anti-HPA-1 has never been described (Tanaka *et al.*, 1996).

Alloimmune thrombocytopenia related to HPA systems is also observed after platelet transfusion in two distinct situations: the rare post-transfusion purpura (PTP), and in multitransfused patient who are refractory to platelet transfusion therapy (Friedman *et al.*, 1996; Mueller-Eckhardt, 1986).

Moreover, HPA systems are expressed by integrins in vascular endothelial cells and may serve as minor histocompatibility antigens in organ transplantation (Kekomäki *et al.*, 1997). The problem of platelet antigen mismatching in blood transfusion as well as in organ transplantation could be clinically important (Friedman *et al.*, 1996; Sirén *et al.*, 1998). The HPA systems were also recently related to non-immune diseases such as the increased risk for coronary and cerebral arterial occlusive diseases among those individuals carrying the HPA-1b or the HPA-2b alleles (Weiss *et al.*, 1996; Gonzalez-Conejero *et al.*, 1998). Further studies, on patients with occlusive vascular disease from distinct ethnic groups, have failed to confirm these results (Odawara *et al.*, 1996; Reuner *et al.*, 1997; Ridker *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1998). The ethnic origin of the Brazilian population is highly heterogeneous. It is composed of immigrants from Europe, Africa and Asia, as well as Amerindian

*Hematology and Hemotherapy Center, State University of Campinas, Campinas-SP, †Evandro Chagas Institute, Belém-PA, and ‡Federal University of Bahia, Salvador-BA, Brazil.

Received 27 August 1998; revised 19 May 1999;
accepted 19 May 1999

Correspondence: Valder R. Arruda, Hematology-Hemotherapy Center, State University of Campinas, PO Box 6198, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

groups, which results in a complex race admixture, and differs from previously studied populations. Thus, an increasing interest in determining the prevalence of HPA alleles in the general population led us to study a sample of the three major racial groups which comprise the Brazilian population.

Materials and methods

Ethnic groups

The population studied was from three distinct regions of Brazil and represented samples from the three major ethnic groups which make up the population of this country. The samples were collected by the authors after an interview with the subjects from the groups of both Caucasian and African origin to verify the absence of admixture in the last three generations.

The first group consisted of 100 non-related individuals of Caucasian descent (56 male, 44 female) with an average age of 34.2 years (range: 19–62 years) recruited by the author from the students, physicians, and hospital staff of the State University of Campinas, State of São Paulo, south-eastern Brazil. Their ancestors were usually from Italy, Spain, Portugal and Germany.

The second group consisted of 150 (93 males, 57 females) non-related Brazilian Blacks with an average age of 33 years (range: 12–64 years). The samples were collected randomly by M.S.G. from students, laboratory staff, and physicians at the Federal University of Bahia, State of Bahia, north-eastern Brazil, where the large majority of the population is of African descent derived from the slave trade (Curtin, 1969).

The third group was composed of 70 Amazonian Indians (37 males, 33 females) with an average age of 31.8 years (range: 11–70 years) from the Tupi tribe known as the Parakanã. Random samples were collected in two villages (Paranatinga and Maroxewara), which are approximately 50 km apart, in Oriental Amazonia by two of the authors (M.S. and R.C.M.) during a campaign to control viral hepatitis.

Method

Genomic DNA was isolated from peripheral blood cells using a standard method (Millar *et al.*, 1988). Genotyping was done using PCR-RFLP or PCR-SSP (for HPA-4). The polymerase chain reaction (PCR) was performed with the primers described for the HPA-1 (Jin *et al.*, 1993), HPA-2 (Unkelbach *et al.*, 1995), HPA-3 (Simsek *et al.*, 1993), HPA-4 (Skogen *et al.*, 1994) and HPA-5 systems (Kalb *et al.*, 1994).

Briefly, 500 ng of genomic DNA was amplified by PCR in 30 µL of a reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1.0 mM each of dATP, dGTP, dTTP and dCTP, 400 ng of each primer and 2 U of *Taq* DNA polymerase. The reactions were performed under the following conditions: for the HPA-1, 3 and 5 systems: 5 min at 94 °C followed by 35

cycles consisting of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1.5 min; for the HPA-2 system, similar conditions were used, except for annealing at 57 °C for 1 min. The PCR products were incubated overnight at 37 °C with endonucleases as follows: HPA-1 (*NciI* or *MspI*); HPA-2 (*BsaFI*); HPA-3 (*FokI*); HPA-5 (*MnlI*). The digestion products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels followed by staining with ethidium bromide (Fig. 1).

Genotyping for the HPA-4 system was performed using allele-specific primers for alleles HPA-4a and HPA-4b, described by Skogen *et al.* (1994). In each reaction, we included a pair of primers for the amplification of a fragment of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (Froost *et al.*, 1995) as an internal control for the presence of DNA and the PCR reaction.

Results

The results obtained in this study are shown in Table 1. The genotype frequencies for all the HPA systems studied among Brazilian Caucasians and Blacks were a good fit to Hardy-Weinberg equilibrium (results not shown).

The prevalence of the HPA-1b allele among Brazilian Caucasians (0.075) was lower than that reported for European and U.S. populations (average: 0.152; $P = 0.05$, $\chi^2 = 3.9$) (Holensteiner *et al.*, 1995; Kekomäki *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1995; Steffensen *et al.*, 1996) and similar to the prevalence among Brazilians (0.097) and North Americans (0.080) of African descent (Kim *et al.*, 1995).

The prevalence of the HPA-2b allele was found to be higher among Caucasians from Brazil than among those from Europe or the U.S. (average: 0.085; $P = 0.01$, $\chi^2 = 5.7$) (Holensteiner *et al.*, 1995; Kekomäki *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1995; Steffensen *et al.*, 1996), and was similar to that reported among populations of African descent (0.190; $P = 0.89$) (Kim *et al.*, 1995).

Analysis of allele frequencies of the HPA-3 and HPA-4 systems revealed no statistically significant difference between Caucasians from Brazil and those from other populations (Holensteiner *et al.*, 1995; Kekomäki *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1995; Steffensen *et al.*, 1996), or between Brazilian Blacks and African-Americans (Kim *et al.*, 1995).

The prevalence of HPA-5 alleles was similar in the Brazilian and other Caucasian populations (Holensteiner *et al.*, 1995; Kekomäki *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1995; Steffensen *et al.*, 1996). In Brazilians of African descent, a lower prevalence of HPA-5b was detected when compared to that described in Americans of African descent (0.124 vs. 0.210, respectively) (Kim *et al.*, 1995); however, this difference failed to reach statistical significance ($P = 0.07$).

Among the Parakanã no b allele of the HPA-1 system was identified, which is in accordance with previous published data on six other distinct groups of native Amazonian Indians (Covas *et al.*, 1997). However, the HPA-2b allele showed a higher prevalence among Parakanãs (0.179) compared to that found in the other groups of Amazonian Indians ($P = 0.001$, $\chi^2 = 10.16$) (Covas *et al.*, 1997), for whom no data concerning the

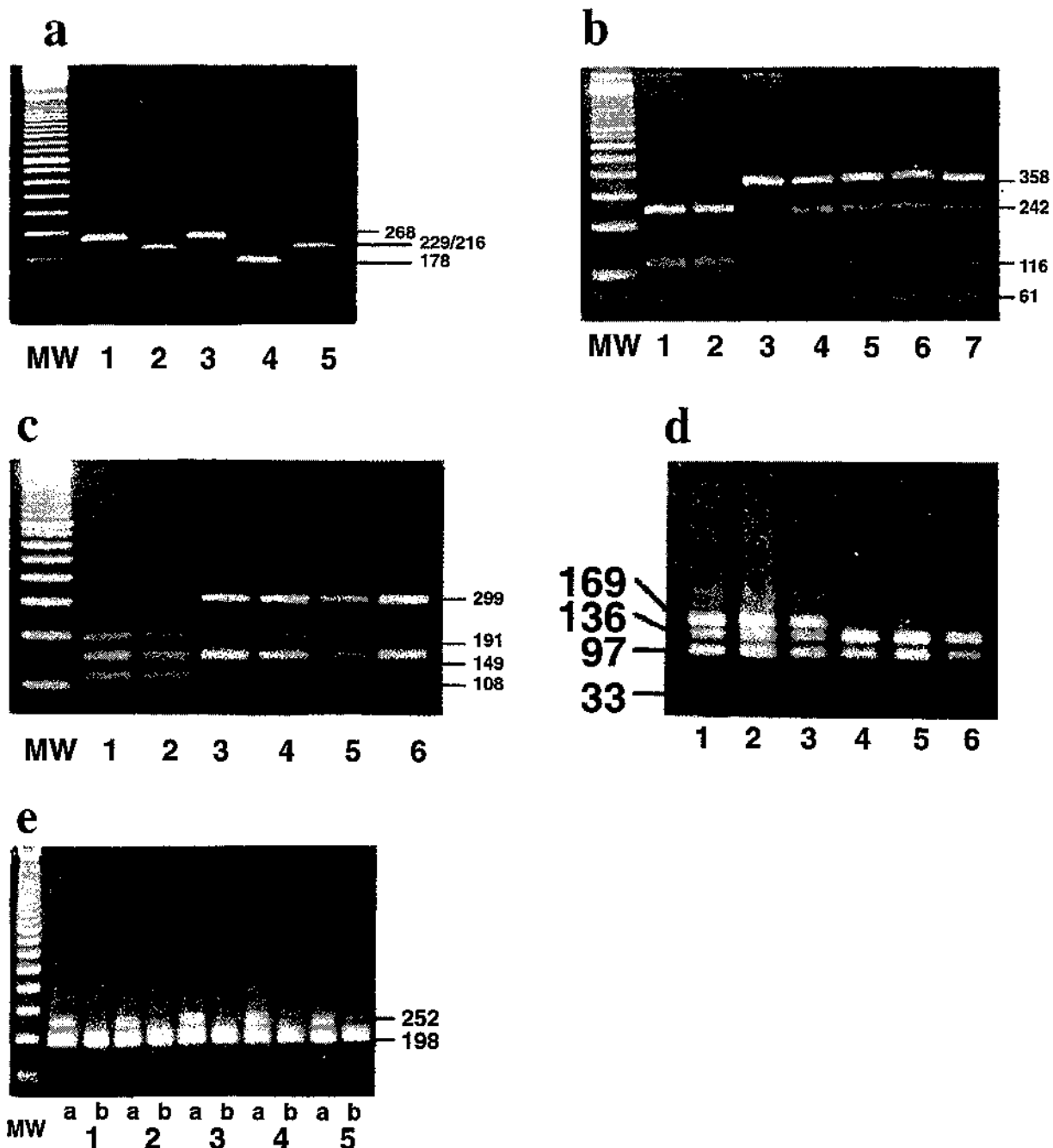


Figure 1. Ethidium bromide-stained 2% agarose gels showing PCR products corresponding to RFLP analysis for the HPA-1, -2, -3 and -5 systems and SSP analysis for the HPA-4 system. (a) HPA-1 system, *NciI* endonuclease: allele a = fragments of 268 bp; allele b = fragments of 216 and 52 bp. Homozygous for allele a — lanes 1 and 3; homozygous for allele b — lane 2. MW = 100-bp ladder molecular weight marker. HPA-1 system, *MspI* endonuclease: allele a = fragments of 39 (not seen) and 229 bp; allele b = fragments of 39, 51 (not seen) and 178 bp. Homozygous for allele a — lane 5; homozygous for allele b — lane 4. (b) HPA-2 system (*BsaHI* endonuclease): allele a = fragments of 61, 116 and 242 bp; allele b = fragments of 61 and 358 bp. Homozygous for allele a — lanes 1 and 2; homozygous for allele b — lane 3; heterozygous — lanes 4–7. MW = 100-bp ladder molecular weight marker. (c) HPA-3 system (*FokI* endonuclease): allele a = fragments of 108, 149 and 191 bp; allele b = fragments of 149 and 299 bp. Homozygous for allele a — lanes 1 and 2; homozygous for allele b — lanes 5 and 6; heterozygous — lanes 3 and 4. MW = 100-bp ladder molecular weight marker. (d) HPA-5 system (*MnlI* endonuclease): allele a = fragments of 33 (not seen), 97 and 136 bp; allele b = fragments of 97 and 169 bp. Homozygous for allele a — lanes 4–6; heterozygous — lanes 1–3. (e) HPA-4 system (PCR-SSP): presence of the allele = fragments of 198 bp (PCR control — MTHF-R gene) and 252 bp; absence of the allele = only the fragment of 198 bp (PCR control — MTHF-R gene). a = lanes with allele a specific-primer; b = lanes with allele b specific-primer. All individuals (1–5) are homozygous for allele a. MW = 100-bp ladder molecular weight marker.

Table 1. Genotype and gene frequencies of HPA-1-5 systems in Amerindians, Brazilian Caucasians and Brazilian Blacks

HPA	Caucasians (n = 100)					Blacks (n = 150)					Parakanã Indians (n = 70)				
	Genotype (%)			Gene frequency		Genotype (%)			Gene frequency		Genotype (%)			Gene frequency	
	aa	ab	bb	a	b	aa	ab	bb	a	b	aa	ab	bb	a	b
1	86	13	1	0.925	0.075	82.6	15.4	2	0.903	0.097	100	—	—	1	0
2	73	24	3	0.850	0.150	65.4	31.3	3.3	0.810	0.190	71.4	21.4	7.2	0.821	0.179
3	37	46	17	0.600	0.400	45.4	42.6	12	0.666	0.334	58.5	34.3	7.2	0.757	0.243
4	100	0	0	1	0	100	0	0	1	0	100	0	0	1	0
5	85	14	1	0.920	0.080	76	23.3	0.7	0.876	0.124	100	—	—	1	0

HPA-3, -4 or -5 systems are currently available, to our knowledge. No b alleles of the HPA-4 and -5 systems were identified among the Parakanãs.

As the South Amerindians probably descend from Oriental populations, we decided to compare our data to those reported for Koreans, Chinese Indonesians and Japanese (Santoso *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1998; Seo *et al.*, 1998). A similar prevalence of HPA-1a and HPA-5a alleles (allele frequency > 0.99) was found among these groups, except for HPA-5a in Indonesians (allele frequency: 0.954; not statistically significant). In contrast, the prevalence of the HPA-2, -3 and -4 system alleles among the Parakanã differed from those in Oriental populations (Santoso *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1998; Seo *et al.*, 1998). The HPA-2b allele was more frequent among the Parakanãs (0.179) than in Koreans (0.077; $P = 0.009$, $\chi^2 = 6.84$) (Seo *et al.*, 1998) or Chinese (0.025; $P = 0.0001$, $\chi^2 = 14.06$) (Chang *et al.*, 1998). On the other hand, the prevalence of HPA-3b alleles was lower among the Parakanãs (0.243) than in Koreans (0.445; $P = 0.003$, $\chi^2 = 8.89$) (Seo *et al.*, 1998), Chinese (0.475; $P = 0.001$, $\chi^2 = 9.81$) (Chang *et al.*, 1998), Indonesians (0.539; $P = 0.00002$, $\chi^2 = 17.80$) (Santoso *et al.*, 1993) or Japanese (0.406; $P = 0.03$, $\chi^2 = 4.58$) (Tanaka *et al.*, 1995). No HPA-4b allele was identified among Parakanãs, as for Chinese (Chang *et al.*, 1998), but contrasting with data obtained for Koreans (0.010) (Seo *et al.*, 1998), Indonesians (0.003) (Santoso *et al.*, 1993) and Japanese (0.010) (Tanaka *et al.*, 1995).

Discussion

Data obtained in this study on selected groups of Caucasian and African descent in Brazil showed a distinct pattern from that reported for other countries (Mercier *et al.*, 1994; Holenstainer *et al.*, 1995; Kekömak *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1995; Steffensen *et al.*, 1996).

The prevalence of HPA-1b and HPA-2b alleles differed between Brazilian and European Caucasians (Holenstainer *et al.*, 1995; Kekömak *et al.*, 1995; Steffensen *et al.*, 1996), but was similar in Brazilians and North Americans of African descent (Kim *et al.*, 1995). On the other hand, the prevalence of the HPA-3, HPA-4 and HPA-5 alleles was similar among Caucasians from Brazil, Europe

(Holenstainer *et al.*, 1995; Kekömak *et al.*, 1995; Steffensen *et al.*, 1996) and the USA (Kim *et al.*, 1995).

Among Brazilians of African descent, the prevalence of HPA-5b was 2-fold lower than that reported for African-Americans (Kim *et al.*, 1995), but similar to that for Brazilian Caucasians. It is interesting to note that the origins of the Brazilian black population are mainly in Angola, Congo and Mozambique, unlike the African-Americans in which the majority of the studies on the HPA system have been carried out (Curtin, 1969; Kim *et al.*, 1995). These data show a heterogeneous distribution of HPA alleles among groups of African as well as Caucasian descent from different countries. A possible reason for the equal prevalence of the HPA alleles among Brazilians of Caucasian and African descent may lie in a potential admixture of races in the past. However, when the population samples used in this study were analysed to determine the prevalence of the most frequent inherited risk factors for venous thrombosis, such as factor V Leiden and the prothrombin gene variant, we were able to show a clear difference between groups of Caucasian and African descent from Brazil. In fact, factor V Leiden and the prothrombin gene variant were found in 5 and 2% of Caucasians, respectively, and were rare (less than 1%) or absent among those of African descent (Arruda *et al.*, 1995, 1997). Moreover, we have also determined the prevalence of the mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene, related to neural tube defect (Froost *et al.*, 1995), which was found in 10% of Caucasians from Brazil, and 1.5% of Brazilians of African descent (Arruda *et al.*, 1998). These results are in accordance with those described previously both in Caucasians and in Africans (Motulsky, 1996; De Stefano *et al.*, 1998; Rosendaal *et al.*, 1998). Thus it is unlikely that racial admixture could account for the results described in this study. Further studies on the prevalence of HPA systems in larger populations where racial admixture is common would be of interest for comparison with our data.

South American Indians are probably related to Oriental populations and represent the descendants of migrating peoples originating in north-east Asia (Cavalli-Sforza *et al.*, 1988). The prevalence of the HPA-1 and HPA-5 alleles was similar among the Amazonian Indians in this study and six distinct Amerindian groups

from the Brazilian Amazon and Chile, as well as Oriental populations, in other studies (Inostroza *et al.*, 1988; Santoso *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1995; Covas *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1998; Seo *et al.*, 1998). However, the Parakanã differed from other native populations and Oriental populations when HPA-2, -3 and -4 were analysed. The Parakanã Indians represent a population almost unaffected by neo-Brazilians, with whom they only recently established regular contact. No clear evidence of European or African human leukocyte antigen or blood groups was found in members of this tribe born before 1974 (Black *et al.*, 1980). They present distinct and typically Amerindian gene frequencies for the HLA system and some blood groups, such as ABO, Duffy and Diego. The lower degree of polymorphism in the Parakanã and in the other Amerindian groups compared to Blacks and Caucasians, as well as the differences in allele frequencies among the several Amerindian groups, are likely to result from random genetic drift (Black *et al.*, 1980; Bailliet *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 1996). In conclusion, the prevalence of HPA-1, -2, -3, -4 and -5 alleles among Brazilians of Caucasian and African descent was similar. The data presented here would be useful in diagnosis and genetic counselling and in the development of screening programmes for couples at risk of having babies with NATP. In addition, the small difference of HPA allele prevalence between Caucasian and Black Brazilians will not be of major clinical significance in platelet transfusion or organ transplantation. However, when individuals of Amerindian descent are considered for these procedures, these data suggest that compatibility for the HPA-1 and -5 systems should be carefully evaluated.

References

- Arruda, V.R., Annichino-Bizzacchi, J.M., Costa, F.F. & Reitsma, P.H. (1995) Factor-V Leiden (FVQ-506) is common in a Brazilian population. *American Journal of Hematology*, **49**, 242.
- Arruda, V.R., Annichino-Bizzacchi, J.M., Gonçalves, M.S. & Costa, F.F. (1997) Prevalence of the prothrombin gene variant (nr20210A) in venous thrombosis and arterial disease. *Thrombosis Haemostasis*, **78**, 1430.
- Arruda, V.R., Siqueira, L.H., Gonçalves, M.S., Von Zuben, P.M., Soares, M.C.P., Menezes, R., Annichino-Bizzacchi, J.M. & Costa, F.F. (1998) Prevalence of the mutation C677 → T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *American Journal of Medical Genetics*, **78**, 332.
- Bailliet, G., Rothhammer, F., Carnese, F.R., Bravi, C.M. & Bianchi, N.O. (1994) Founder mitochondrial haplotypes in Amerindian populations. *American Journal of Human Genetics*, **54**, 27.
- Black, F.L., Salzano, F.M., Layrisse, Z., Franco, M.H.L.P., Harris, N.S. & Weimer, T.A. (1980) Restriction and persistence of polymorphisms of HLA and other genetic traits in the Parakanã Indians of Brazil. *American Journal of Physical Anthropology*, **52**, 119.
- Cavalli-Sforza, L.L., Piazza, A., Menozzi, P. & Montain, J. (1988) Reconstitution of human evolution: bringing together genetic, archaeological and linguistic data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **85**, 6002.
- Chang, Y.W., Mytilineos, J., Opetz, G. & Hawkins, B.R. (1998) Distribution of human platelet antigens in the Chinese population. *Tissue Antigens*, **51**, 391.
- Covas, D.T., Delgado, M., Zeitune, M.M., Guerreiro, J.F., Santos, S.E. & Zago, M.A. (1997) Gene frequencies of the HPA-1 and HPA-2 platelet antigen alleles among the Amerindians. *Vox Sanguinis*, **73**, 182.
- Curtin, P.D. (1969) *The Slave Atlantic Trade: a Census*. University of Wisconsin Press, Milwaukee.
- De Stefano, V., Chiusolo, P., Paciaroni, K., Casorelli, L., Di Mario, A., Rossi, E. & Leone, G. (1998) Prevalence of the factor II G20210A mutation in symptomatic patients with inherited thrombophilia. *Thrombosis Haemostasis*, **80**, 342.
- Dreyfus, M., Kaplan, C., Verdy, E., Schlegel, N., Durand-Zaleski, I., Tchernia, G. & The Immune Thrombocytopenia Working Group (1997) Frequency of immune thrombocytopenia in newborns: a prospective study. *Blood*, **87**, 4402.
- Friedman, D.F., Lukas, M.B., Jawad, A., Larson, P.J., Ohene-Frempong, K. & Manno, C.S. (1996) Alloimmunization to platelet in heavily transfused patients with sickle cell disease. *Blood*, **88**, 3216.
- Frost, P., Bloom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.A., Matthews, R.G., Boers, G.H.J., Den Heijer, M., Kluijtmans, L.A.J., Van Den Heuvel, L.P. & Rozen, R. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*, **10**, 111.
- Gonzalez-Conejero, R., Lozano, M.L., Rivera, J., Corral, J., Iniesta, J.A., Moraleda, J.M. & Vicente, V. (1998) Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib alpha associated with arterial thrombotic disease. *Blood*, **92**, 2771.
- Holenshteyn, A., Walchshofer, S., Adler, A., Kittl, E.M., Mayr, W.R. & Panzer, S. (1995) Human platelet antigen in the Austrian population. *Haemostasis*, **25**, 1336.
- Inostroza, J., Kiefel, V. & Mueller-Eckhardt, C. (1988) Frequency of platelet-specific antigens PI^{A1}, Bak^a, Yuk^a, Yuk^b, and Br^a in South American (Mapuches) Indians. *Transfusion*, **28**, 586.
- Jin, Y., Dietz, H.C., Nurden, A. & Bray, P.F. (1993) Single-strand conformation polymorphism analysis is a rapid and effective method for the identification of mutations and polymorphisms in the gene for glycoprotein IIIa. *Blood*, **82**, 2281.
- Kalb, R., Santoso, S., Unkelbach, K., Kiefel, V. & Mueller-Eckhardt, C. (1994) Localization of the Br polymorphism on a 144 bp exon of the GPIa gene and its application in platelet DNA typing. *Thrombosis Haemostasis*, **71**, 651.
- Kekomäki, S., Partanen, J. & Kekomäki, R. (1995) Platelet allo-antigens HPA-1 -2 -3 -5 and -6b in Finns. *Transfusion Medicine*, **5**, 193.
- Kekomäki, S., Salmela, K., Partanen, J., Koskimies, S. & Kekomäki, R. (1997) Alloimmunization against platelet antigens in renal transplant patients with acute vascular rejection. *Clinical Transplantation*, **11**, 19.
- Kim, H.O., Jin, Y., Kickler, T.S., Blakemore, K., Kwon, O.H. & Bray, P.F. (1995) Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American, White, and Korean populations. *Transfusion*, **35**, 863.
- Kunicki, T.J. & Newman, P.J. (1992) The molecular immunology of human platelet antigens. *Blood*, **80**, 1386.
- Mercier, P., Chicheportiche, C., Dabanian, C., Gamarre, M. & Reviron, D. (1994) Platelet antigen HPA-5b (Bra) in an Algerian population. *Tissue Antigens*, **43**, 58.
- Millar, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, **16**, 1215.
- Motulsky, A.G. (1996) Nutritional ecogenetics: homocystein-related arteriosclerosis vascular disease, neural tube defects and folic acid. *American Journal of Human Genetics*, **58**, 17.

- Mueller-Eckhardt, C. (1986) Post-transfusion purpura. *British Journal of Haematology*, **64**, 419.
- Mueller-Eckhardt, C., Grubert, A., Weisheit, M., Mueller-Eckhardt, G., Kiefel, V., Kroll, H., Schmidt, S. & Santoso, S. (1989) 348 cases of suspected neonatal allo-immune thrombocytopenia. *Lancet*, **1**, 363.
- Noris, P., Simsek, S., De Bruijne-Admiraal, L.G., Porcelijn, L., Huiskes, E., Van Der Vlist, G.J., Van Leewen, E.F., Van Der Schoot, C.E. & Von Dem Borne, A.E.G. (1995) Max⁺, a new low-frequency platelet-specific antigen localized on glycoprotein IIb, is associated with Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. *Blood*, **86**, 1019.
- Odawara, M., Matsunuma, A. & Yamashita, K. (1996) Platelet glycoprotein IIIa P1^a polymorphism and Japanese diabetic patients with coronary heart disease. *Lancet*, **348**, 1310.
- Reuner, K.H., Elgas, M., Kaps, M., Ruf, A. & Patscheke, H. (1997) The human platelet antigen HPA-1a/1b (P1^a / P1^{a2}) polymorphism and cerebral ischaemia. *Thrombosis Haemostasis*, **77**, 964.
- Ridker, P.M., Hennekens, C.H., Schmitz, C., Stampfer, M.J. & Lindpaintner, K. (1997) P1^a/P1^{a2} polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet*, **349**, 385.
- Rosendaal, F.R., Doggen, C.J.M., Zivelin, A., Arruda, V.R., Aiach, M., Siscovick, D.S., Hillarp, A., Watzke, H.H., Bernardi, F., Cumming, A.M., Preston, F.E. & Reitsma, P.H. (1998) Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thrombosis Haemostasis*, **79**, 706.
- Santos, S.E.B., Ribeiro-Dos-Santos, A.K.C., Meyer, D. & Zago, M.A. (1996) Multiple founder haplotypes of mitochondrial DNA in Amerindians revealed by RFLP and sequencing. *Annals of Human Genetics*, **60**, 305.
- Santoso, S. & Kiefel, V. (1998) Human platelet-specific allo-antigens: update. *Vox Sanguinis*, **74** (Suppl. II), 249.
- Santoso, S., Kiefel, V., Masri, R. & Mueller-Eckhardt, C. (1993) Frequency of platelet-specific antigens among Indonesians. *Transfusion*, **33**, 739.
- Seo, D.H., Park, S.S., Kim, D.W., Furihata, K., Ueno, I. & Han, K.S. (1998) Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfusion Medicine*, **8**, 129.
- Simsek, S., Faber, N.M., Bleeker, P.M., Vlekke, A.B.J., Huiskes, E., Goldschmeding, R. & Von Dem Borne, A.E.G. (1993) Determination of platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood*, **81**, 835.
- Sirén, M.-K., Koponen, A. & Kekomäki, R. (1998) Serious adverse events after HPA-incompatible platelet transfusion in an allo-immunized patient with leukaemia. *Transfusion Medicine*, **8**, 221.
- Skogen, B., Bellissimo, D.B., Hessner, M.J., Santoso, S., Aster, R.H., Newman, P.J. & McFarland, J.G. (1994) Rapid-determination of platelet alloantigen genotypes by polymerase chain-reaction using allele-specific primers. *Transfusion*, **34**, 955.
- Steffensen, R., Kaczan, E., Varming, K. & Jersild, C. (1996) Frequency of platelet-specific alloantigens in a Danish population. *Tissue Antigens*, **48**, 93.
- Tanaka, S., Ohnoki, S., Shibata, H., Okubo, Y., Yamaguchi, H. & Shibata, Y. (1996) Gene frequencies of human platelet antigens on glycoprotein IIIa in Japanese. *Transfusion*, **36**, 813.
- Tanaka, S., Taniue, A., Nagao, N., Ohnoki, S., Shibata, H., Okubo, Y. & Yamaguchi, H. (1995) Simultaneous DNA typing of human platelet antigens 2, 3 and 4 by an allele-specific PCR method. *Vox Sanguinis*, **68**, 225.
- Unkelbach, K., Kalb, R., Santoso, S., Kroll, H., Mueller-Eckhardt, C. & Kiefel, V. (1995) Genomic RFLP typing of human platelet alloantigens Zw (P1^a), Ko, Bak, and Br (HPA-1, 2, 3, 5). *British Journal of Haematology*, **89**, 169.
- Wagner, K.R., Giles, W.H., Johnson, C.J., Ou, C.Y., Bray, P.F., Goldschmidt-Clermont, P.J., Croft, J.B., Brown, V.K., Stern, B.J., Feaser, B.R., Buchholz, D.W., Earley, C.J., Macko, R.F., McCarter, R.J., Sloan, M.A., Stolley, P.D., Wityk, R.J., Wozniak, M.A., Price, T.R. & Kittner, S.J. (1998) Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism P1^{a2} and ischemic stroke risk: the Stroke Prevention in Young Women Study. *Stroke*, **29**, 581.
- Weiss, E.J., Bray, P.F., Tayback, M., Schulman, S.P., Kickler, T.S., Becker, L.C., Weiss, J.L., Gerstenblith, G. & Goldsmith-Clermont, P.J. (1996) A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *New England Journal of Medicine*, **334**, 1090.

Capítulo IV

Resumo

A plaquetopenia neonatal é descrita em 0,5% a 0,9% dos recém-nascidos, sendo que contagens inferiores a $50 \times 10^9/L$, que levam a maior risco de sangramento, geralmente estão associadas à aloimunização contra sistemas de aloantígenos plaquetários humanos (HPA). Foram estudados 12.714 recém-nascidos não selecionados em Campinas, Brasil, sendo identificado 1% com contagem de plaquetas menor que $100 \times 10^9/L$, dos quais 0,11% (13 casos) apresentavam uma contagem menor que $50 \times 10^9/L$. Apenas dois neonatos plaquetopênicos apresentaram sangramento grave, enquanto a maioria foi assintomática. Aproximadamente 50% dos casos apresentaram condições clínicas materno-fetais associadas à diminuição do número de plaquetas. O risco de plaquetopenia neonatal secundária à aloimunização foi estudado através da investigação de incompatibilidade materno-fetal pela genotipagem HPA. Os resultados demonstraram que 50% dos recém-nascidos plaquetopênicos e do grupo controle, apresentavam incompatibilidade HPA. Os sistemas mais frequentemente associados à plaquetopenia aloimune foram o HPA-3, seguido pelo HPA-2. Concluímos que a plaquetopenia neonatal é frequente em recém-nascidos não selecionados e que a incompatibilidade HPA não pode ser considerada fator um preditivo para o quadro.

*Submetido para publicação no periódico *Am J Obst Gynecol*. Os resultados parciais desse trabalho foram apresentados no Congresso Anual da Sociedade Americana de Hematologia em 1998 (CASTRO *et al.*, 1998)

Prevalence of neonatal thrombocytopenia among 12,714 unselected newborns: etiology and impact of genotyping for the human platelet alloantigen systems

Vagner Castro¹, Andréa F. Origa¹, Monica A. Falconi¹, Elaine C. Faria¹, Sérgio T. M. Marba², Renato Passini³, Joyce M. Annichino-Bizzacchi¹, Fernando F. Costa¹, Valder R Arruda¹

1- Hematology-Hemotherapy Center, Department of Clinical Medicine; 2- Department of Neonatology; 3- Department of Obstetrics and Gynecology, State University of Campinas, Campinas-SP, Brazil.

Running title: neonatal thrombocytopenia

Correspondence

Valder R Arruda

Hematology-Hemotherapy Center

State University of Campinas

C.P.: 6198 C.E.P.: 13.081-970

Campinas-SP, Brazil

FAX: 55 19 289.1089

Abstract

Recent studies described that 0.5% to 0.9% of unselected newborns presented thrombocytopenia at birth. Severe thrombocytopenia ($< 50 \times 10^9/L$) which a high risk for bleeding, is usually related to alloimmunization to human platelet alloantigen systems (HPA). In this study we determined that 1% of 12, 714 unselected newborns from Campinas, Brazil, presented platelet count lower than $100 \times 10^9/L$, in which 0.11% (13 cases) presented platelet count less than $50 \times 10^9/L$. Two newborns with thrombocytopenia developed a severe bleeding disorder, whereas the majority was asymptomatic. Maternal-fetal clinical conditions related to development of thrombocytopenia were presented in almost half of cases. The risk for neonatal thrombocytopenia due to alloimmunization to HPA systems was investigated by genotype mismatch between mother and newborn. The results showed that 50% of genotype revealed a maternal-newborn mismatch in both control and thrombocytopenic group. The most common system likely to be associated with alloimmune thrombocytopenia is the HPA-3 followed by HPA-2 system. In conclusion, neonatal thrombocytopenia is common among unselected newborns and the development of thrombocytopenia can not be predicted by the genotype mismatch search.

Introduction

Thrombocytopenia is a common condition reported in 20% to 40% of infants in intensive care units¹. However, the frequency of neonatal thrombocytopenia in a normal cohort of newborns is not defined because platelet count is not routinely performed. Three of the most recent studies showed that thrombocytopenia was detected in 0.5% to 0.9% of unselected newborns²⁻⁵. Fetal alloimmunization to paternal platelet-specific antigens on fetal platelets is the most common cause of severe thrombocytopenia in neonates, a condition known as neonatal alloimmune thrombocytopenia purpura (NAITP). The prevalence of NAITP is estimated to be 1:1000 to 1:2000, the most serious consequence is intracranial hemorrhage that results in 6% of mortality and 20% of survivals present severe neurological sequelae^{6,7}. Most cases show disparity in the biallelic human platelet antigen HPA-1 system with an HPA-1a negative woman and an HPA-1a-positive fetus⁸. Approximately 2% to 2.5% of the white population are HPA-1a negative; however, the HPA-1a alloimmunization occurs in approximately 10% of cases and is strongly associated with maternal HLA class-II DR52a type^{9,10}. A parental HPA-1 mismatch is the likely cause of NAITP, even when there is no detectable anti-HPA-1a antibody in the serum of the mother¹¹. In contrast, for other HPA systems, when parental HPA incompatibility is not associated with the corresponding anti-HPA antibody in the maternal serum, the diagnosis of NAITP is equivocal⁷. Whereas screening programs for anti-HPA-1a antibodies have been done in large population, the clinical impact of alloimmunization related to other HPA systems is unknown. Among Japanese no NAITP has been related to anti-HPA-1 but to HPA-4¹² which in contrast has not been described in Caucasians.

The molecular basis of the most HPA systems is defined and easily determined by several DNA techniques⁶. Thus, the genotype for the HPA system could be informative in the search for the risk of maternal alloimmunization to the HPA. Previously we determined that the prevalence of homozygous for the allele HPA-1b was 1% and 2% among Caucasian and African Brazilian descents, respectively¹³. The prevalence of neonatal thrombocytopenia or NAITP is unknown in our population. We therefore aimed to elucidate the prevalence of neonatal thrombocytopenia among 12,714 nonselected newborns and to defining the risk of

alloimmunization we carried out a case-control study to determine the prevalence of genotype mismatch between mothers and newborns with or without thrombocytopenia.

Material and Methods

Population studied

During 4 years period of study we attempted to obtain umbilical cord blood samples from all neonates born in the University Hospital in Campinas, Brazil. During this period a total of 14,400 children were born. Ten percent of all samples collected were not analyzed for various technical problems, such as presence of platelet aggregates, blood clotting, or problems with test tube identification. Thus, a total of 12,714 cord blood samples were suitable for the study, which represents 89% of all births. A case-control study was carried out to determine the prevalence of maternal-newborn genotype mismatch between groups of newborns with or without thrombocytopenia at birth. In the control group, only apparently healthy newborns of mothers without systemic disease or drug intake were evaluated. The evaluation of systemic disease, drug intake, age, number of pregnancies was obtained from the subject's file. The informed consent was obtained for all mothers in both groups. This protocol was approved by the Ethical Committee on Research of State University of Campinas.

Methods

Platelet count was performed on EDTA anticoagulated blood using a standard automatic blood cell counter (Celldyn 1600[®], Abbott Laboratories, Santa Clara, CA). Platelet counts lower than $<100 \times 10^9/L$ was diagnosed in the absence of platelet aggregates on the microscopy, blood clot, or sample diluted. When thrombocytopenia was confirmed, a second venous blood sample was obtained from the newborn. Maternal blood sample was collected on EDTA for platelet count and DNA extraction. Genomic DNA was isolated from the buffy coat by salting-out procedure¹⁴. The genotype for HPA 1, 2, 3, and 5 was carried out by PCR-RFLP¹³ and for HPA-4¹⁵ by PCR using allele-specific primers.

Results

Prevalence of the neonatal thrombocytopenia.

In 142 of the 12,714 newborns evaluated, the platelet count was $<100 \times 10^9/L$, indicating an incidence of 1.1% thrombocytopenia at birth. The majority of neonates (128 cases) had platelet count between 50 to $100 \times 10^9/L$; whereas moderate thrombocytopenia ($< 50 \times 10^9/L$) was detected in 13 cases, and severe thrombocytopenia ($< 20 \times 10^9/L$) was present at birth in one neonate. Of these 142 thrombocytopenic newborns, 127 were symptom-free, apparently healthy. Bleeding symptoms were observed in 12 out of 142 (8.4%) newborns. The summary of clinical and laboratorial data is showed in Table I. A second blood sample confirming the platelet count was collected in eight newborns, and in three out of eight thrombocytopenia lowered after 24 to 48 hrs of life. Two neonates displayed an extensive purpura at birth (cases 2 and 12), the later case was associated to severe respiratory distress syndrome. Subcutaneous bleeding usually related to trauma during delivery was observed in 7 out of 12 cases (60%). Clinical conditions related to neonatal thrombocytopenia were detected in almost half of all cases. In this group, maternal hypertension or preeclampsia was present in 60% of cases, idiopathic thrombocytopenia purpura, congenital abnormalities, growth-retarded infants, infections, respiratory distress syndrome, Rh hemolytic anemia, and drug intake were among causes identified.

The prevalence of HPA genotype mismatch in the case-control study

We sought to determine the prevalence of HPA allele mismatch in mother and newborn with thrombocytopenia and compare to apparently healthy race and age matched control group. Ninety-eight (70%) pairs of mother and neonatal were analyzed in the thrombocytopenic group, in 44 cases the mother sample was not available due to refusal to participate or to discharge from the hospital before notification for blood collection.

In the group of mothers from newborns with thrombocytopenia the median age was 25.7 years (range: 12-43 years) which is similar to 24.8 years (range: 14-40 years) in the control group. In the former group, median platelet count was $197 \times 10^9/L$ (range: 86 to $362 \times 10^9/L$) which is similar to $216 \times 10^9/L$ (range: 150 - $344 \times 10^9/L$). In the newborns

with thrombocytopenia the median platelet count was $71.7 \times 10^9/\text{ml}$ (range: $12-99 \times 10^9/\text{L}$), and in the control group $281 \times 10^9/\text{L}$ (range: $150-549 \times 10^9/\text{L}$).

The distribution of HPA system mismatches among pairs of mother and newborns with thrombocytopenia compared to the control group are given in Table II.

The prevalence of mismatch in the genotype for the HPA systems was detected in 54% of the thrombocytopenic group, which was similar to 47% of the control group. No difference in the prevalence of mismatch was observed according to the severity of thrombocytopenia compared to controls.

The results showed that the HPA system most likely to be associated with maternal-fetal mismatch is the HPA-3 (27% or 21%) followed by HPA-2, HPA-1, and HPA-5. No heterozygous for HPA-4 alleles was found in both patients and control groups. These results are in agreement with the distribution of HPA systems obtained in the Brazilian general population¹³. HPA-1b homozygous mothers were more frequent in the control group (4%) than in the general Brazilian population (2%)¹³ whereas no one HPA-1b homozygous mother were observed in the thrombocytopenic group. Two neonates from mothers with previous diagnosis of purpura thrombocytopenic idiopathic were present in the thrombocytopenic group, in both cases no bleeding was observed. In one of them, an incompatibility for the HPA-5 system was detected.

Discussion

In this study, approximately 1% of 12,714 unselected newborns presented thrombocytopenia (platelet count $<100 \times 10^9/\text{L}$) at birth. This frequency is higher than 0.7% reported in Finland⁴ and Poland^{2,3} when cord blood were analyzed. Moreover, prevalence of severe or moderate neonatal thrombocytopenia, defined as a platelet count $50 \times 10^9/\text{L}$, was 0.11% (13 of 12,714 newborns) at birth, which is lower than 0.24% in Finland but similar to 0.12% or 0.15% described in Canada and Poland, respectively^{2,3}. However, it is important to consider that platelet counts obtained in the cord blood or venopuncture are not identical. Dreyfus et al¹⁶ observed that when thrombocytopenia is detected in sample obtained by venopuncture at the first day of life; the platelet counts decreased after birth. These data suggest that infants in whom the platelet count was in the low normal range at birth may develop thrombocytopenia during the first week of life. On the other hand,

Sainio et al.⁴ and De Moerloose et al.⁵ observed that when thrombocytopenia is detected in the cord blood sample (excluding pseudo-thrombocytopenia), in the first two days of life approximately half of newborns analyzed presented an increase in the platelet counts. Thus, an underestimation of the frequency of thrombocytopenia might occur if only peripheral blood sample is reported. Bleeding symptoms were observed in 12 out of 142 thrombocytopenic newborns; but only in two cases severe bleeding was observed. These data agree with previous report of absence of severe bleeding symptoms in the majority of newborns with thrombocytopenia. Maternal-fetal conditions associated with neonatal thrombocytopenia was present in more than half of cases, and low birth weight was common among thrombocytopenic newborns, which is the most common risk factor for thrombocytopenia^{4,16}. However, when clinically important cases of severe thrombocytopenia are present, usually are related to alloimmunization⁴. The risk of development of NAITP related to HPA-1 system and HLA- DR52a is well known among Caucasian descents^{10,17,18}. The lower prevalence of HPA-1b negative women among Africans or Asians than among Caucasians descents^{19,20} suggests that the risk of non-Caucasian populations for NAITP is low. Previous report by our group determined that 1-2% of Caucasian or African Brazilians are homozygous for the HPA-1b allele. Moreover, the prevalence of the common HLA-DRB3*0101 (DR52a) allele for the development of NAITP related to HPA-1 is present in 69% of general population in Brazil²¹. These data suggest that the screening for NAITP could be clinically relevant in our population.

In the present study, we sought to determine the HPA genotype as method to identify high-risk mothers for NAITP. This was considered to be preferable to the detection of antibodies, because alloimmunization leading to thrombocytopenia may occur in the absence of detectable antibodies in up to 20% of HPA-1 related NAITP¹⁰. Moreover, the risk for NAITP varies according to ethnic group, and the risk for NAITP related to non-HPA-1 system is not defined^{7,17,18}. Thus, the genotype mismatch between mother and newborns for the most common alleles for the HPA system may be useful in order to detect high-risk women for NAITP. In a case control study, we determined that HPA mismatched was commonly observed in almost half of all pairs of mother-newborn with or without thrombocytopenia. In our population, the most likely HPA systems to be associated with maternal-fetal mismatch are HPA-3 and HPA-2. However, no relationship between the

development of neonatal thrombocytopenia and a specific HPA mismatch was observed in this analysis. These results are in agreement with data reported by Panzer et al.²² using both molecular diagnosis and antibody detection. These authors reported that HPA-3 or HPA-5 mismatches were commonly detected, however, even in association with maternal antibody to specific HPA system, all newborns were asymptomatic and without thrombocytopenia. The potential risk for development of neonatal thrombocytopenia when mother with ITP carried HPA-5 mismatch was observed in one case in our study. This association has been described before²³. However, previous data showed that maternal ITP does not increase the risk of neonatal bleeding complications²⁴. One interesting observation in our study was the absence of HPA-1b homozygous mother among thrombocytopenic neonates compared to 4% among those in the control group. Panzer et al described that among 11 homozygous mother for the HPA-1b allele, three of them presented two or more abortions²². It is possible that homozygous for the HPA-1b allele has an increased risk for fetal loss, which was not subject of our study and these children were not evaluated in the newborn screening. Prospective studies of homozygous mothers for HPA-1b allele could be interesting to determine the risk for fetal loss. The optimal screening strategy for detection of NAITP is unclear. The approach developed in this study is simple and can be adapted to screening for hemoglobinopathies. The health economic of this strategy seems to be justified based on the prevalence of 1% of newborn presenting thrombocytopenia with an actual risk for bleeding comparing with detection of disease such as sickle cell anemia or β -thalassemia, in which clinical symptoms are not presented before six months of life. At this point is not clear if screening using both genotype and antibody detection to identify high-risk mothers for NAITP^{7,10,17,18,25}. However, in the group identified in this study it will be important to offer genetic counseling, to determine the prevalence and natural history of NAITP in subsequent pregnancies, the risk of alloimmunization (if any), and may be, to identify inherited risk factors related to NAITP.

References

1. Udom-Rice I, Bussel JB. Fetal and neonatal thrombocytopenia. *Blood Rev* 1995;9:57.
2. Uhrynowska M, Niznikowska-Marks M, Zupanska B. Neonatal and maternal thrombocytopenia: incidence and immune background. *Eur J Haematol* 2000;64:42-46.
3. Uhrynowska M, Maslanka K, Zupanska B. Neonatal thrombocytopenia: incidence, serological and clinical observations. *Am J Perinatol* 1997;14:415-418.
4. Sainio S, Jarvenpaa A-L, Renlund M, Riikonen S, Teramo K, Kekomaki R. Thrombocytopenia in term infants: a population-based study. *Obstet Gynecol* 2000;95:441-446.
5. de Moerloose P, Boehlen F, Extermann P, Hohlfield P. Neonatal thrombocytopenia: incidence and characterization of maternal antiplatelet antibodies by MAIPA assay. *Br J Haematol* 1998;100:735-740.
6. Kunicki TJ, Newman PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood* 1992;80:1386-1404.
7. Porcelijn L, Kanhai HHH. Fetal thrombocytopenia. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998;10:117-122.
8. Mueller-Eckhardt C, Grubert A, Weisheit M, et al. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *The Lancet* 1989;ii:363-366.
9. Decary F, L'Abbe D, Tremblay L, Chartrand P. The immune response to the HPA-1a antigen: association with HLA-DRw52a. *Trasfus Medicine* 1991;1:55-59.
10. Williamson LM, Hackett G, Rennie J, et al. The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (PLA1, Zwa) as determined by antenatal screening. *Blood* 1998;92:2280-2287.
11. Blanchette VS, Chen L, Friedberg ZS, Hogan VA, Trudel E, Decary F. Alloimmunization to the PLA1 platelet antigen: results of a prospective study. *Br J Haematol* 1990;74:209-215.
12. Tanaka S, Taniue A, Nagao N, Yamaguchi H. Simultaneous DNA typing of human platelet antigens 2, 3 and 4 by allele-specific PCR method. *Vox Sang* 1995;68:225-231.

13. Castro V, Origa AF, Goncalves MS, et al. Frequencies of platelet-specific alloantigens systems 1 to 5 in three distinct ethnic groups in Brazil. *Eur J Immunogenet* 1999;26:355-360.
14. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
15. Tanaka S, Ohnoki S, Shibata H, Okubo Y, Yamaguchi H, Shibata Y. Gene frequencies of human platelet antigens on glycoprotein IIIa in Japanese. *Transfusion* 1996;36:813-818.
16. Dreyfus M, Kaplan C, Verdy E, Schlegel N, Durand-Zaleski I, Tchernia G. Frequency of immune thrombocytopenia in newborns: a prospective study. *Blood* 1997;89:4402-4406.
17. Doughty HA, Murphy MF, Waters AH. Antenatal screening for fetal alloimmune thrombocytopenia: the results of a pilot study. *Br J Haematol* 1995;90:321-325.
18. Flug F, Karpatkin M, Karpatkin S. Should all pregnant women be tested for their platelet PLA (Zw, HPA-1) phenotype? *Br J Haematol* 1994;86:1-5.
19. Kim HO, Jin Y, Kickler TS, Blakemore K, Kwon OH, Bray PF. Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American, White, and Korean populations. *Transfusion* 1995;35:863-867.
20. Inostroza J, Kiefel V, Mueller-Eckhardt. Frequency of platelet-specific antigens PLAI, Baka, Yuka, Yukb, and Bra in South American (Mapuches) Indians. *Transfusion* 1988;28:586-587.
21. Bittencourt PL, Golberg AC, Cancado ELR, et al. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1906-1913.
22. Panzer S, Auerbach L, Cechova E, et al. Maternal alloimmunization against fetal platelet antigens: a prospective study. *Br J Haematol* 1995;90:655-660.
23. Gururangan S, McFarland JG, Cines DB, Skupski D, Bussel JB. BRa (HPA-5b) incompatibility may cause thrombocytopenia in neonates of mothers with immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol/Oncol* 1998;20:202-206.

24. Burrows RF, Kelton JG. incidentally detected thrombocytopenia in healthy mothers and their infants. *N Engl J Med* 1988;319:142-145.
25. Metcalfe P, Allen D, Chapman J, Ouwehand WH. Interlaboratory variation in the detection of clinically significant alloantibodies against human platelet alloantigens. *Br J Haematol* 1997;97:204-207.

Table I: Clinical and Laboratorial Data from Neonates with Thrombocytopenias

Case	Clinical symptom	Platelet Count at Birth (x 10 ⁹ /l)	Platelet Count At Evoultion (x 10 ⁹ /l)
1	Subcutaneous bleeding	30	nd*
2	purpura	62	nd
3	Subcutaneous bleeding	44	nd
4	Subcutaneous bleeding	99	nd
5	Rh hemolytic	86	nd
6	Subcutaneous bleeding	91	43
	Maternal preeclampsia		
7	Subcutaneous bleeding	26	nd
8	Subcutaneous bleeding	76	168
9	Subcutaneous bleeding	54	216
10	Subcutaneous bleeding	76	186
11	Hydrops fetalis	32	nd
12	Purpura, respiratory distress syndrome	98	45

* not determined

Table II: Prevalence of Incompatibility in the Genotype for the HPA alleles in neonatal thrombocytopenia.

HPA systems	Neonatal thrombocytopenic group n=98	Control group n=100
HPA-1	13	13 (2: mother bb)
HPA-2	17 (4: mother bb)	14 (3: mother bb)
HPA-3	27 (4: mother bb)	21 (6: mother bb)
HPA-4	0	0
HPA-5	11	6 (1: mother bb)
Disparity in at least two systems	15	8

Capítulo V

Resumo

A púrpura trombocitopênica imunológica (PTI) é uma doença autoimune caracterizada pela destruição plaquetária por auto-anticorpos. A etiologia da PTI não é conhecida, estando envolvidos fatores genéticos e ambientais. Entre os fatores genéticos, estão descritos o polimorfismo dos antígenos HLA de classe II, do receptor FcγRIIA e mais recentemente os sistemas de antígenos plaquetários humanos (HPA). Neste estudo foi avaliado o papel do sistema HPA-5 em pacientes com diagnóstico de PTI, acompanhados ambulatorialmente no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Os resultados demonstraram uma frequência duas vezes maior do alelo HPA-5b em pacientes com quadro de PTI aguda, comparados à controles normais. Esses dados sugerem que a presença do alelo HPA-5b pode estar relacionado ao maior risco para a PTI aguda na nossa população. Novos estudos em outras populações seriam importantes para avaliar o papel do HPA-5b na etiopatogenia da PTI aguda em grupos étnicos distintos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

group (by 96 and 54 %; $P = 0.02$), but not in the transdermal 17β -estradiol group ($P = 0.20$; $P = 0.01$ for comparison of oral ethinyl estradiol with the transdermal 17β -estradiol group; Fig. 1). Oral cyproterone acetate administration alone did not affect CRP levels in men ($P = 0.67$; Fig. 1), and parenteral testosterone administration increased CRP levels in women (by 141 %; $P = 0.001$; Fig. 1).

We conclude that administration of oral ethinyl estradiol was associated with increased CRP levels in men, similar to the effects of oral estrogens in postmenopausal women (5, 6, 9). In contrast, transdermal 17β -estradiol did not affect CRP levels in men. In women with type 2 diabetes mellitus, transdermal administration of 17β -estradiol with oral progestin did decrease CRP levels. Our findings suggest that the stronger hepatic first-pass effect of oral ethinyl estradiol compared to transdermal 17β -estradiol is responsible for the increase in CRP levels. We also observed a potentially harmful increase in CRP levels upon intramuscular administration of testosterone in women, but no decrease upon suppression of endogenous androgens by cyproterone acetate in men. Whether testosterone administration elevates CRP levels also in men, as well as the relevance of these findings for cardiovascular risk, remains to be elucidated.

Erik J. Giltay¹, Louis J. G. Gooren¹, Jef J. Emeis², Teake Kooistra², Coen D. A. Stehouwer³

From the ¹Research Institute for Endocrinology, Reproduction and Metabolism, the ²Department of Internal Medicine, University Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam, and the ³Gaubius Laboratory, TNO-PG, Leiden, the Netherlands

References

1. Niculescu F, Rus HG, Vlaicu R. Immunohistochemical localization of C5b-9, S-protein, C3d and apolipoprotein B in human arterial tissues with atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1987; 65: 1-11.

2. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuszi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331: 417-24.
3. Thompson SG, Kienast J, Pyke SDM, Haverkate F, Van De Loo JCW, for the European Concerted Action on Thrombosis and disabilities angina pectoris study group. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med* 1995; 332: 635-41.
4. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336: 973-9.
5. Cushman M, Legault C, Barrett-Connor E, Stefanick ML, Kessler C, Judd HL, Sakkinen PA, Tracy RP. Effects of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) study. *Circulation* 1999; 100: 717-22.
6. Van Baal WM, Kenemans P, Van Der Mooren MJ, Kessel H, Emeis JJ, Stehouwer CDA. Increased C-reactive protein levels during short-term hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women. *Thromb Haemost* 1999; 81: 925-8.
7. Chetkowski RJ, Meldrum DR, Steingold KA, Randle D, Lu JK, Eggena P, Hershman JM, Aikjaersig NK, Fletcher AP, Judd HL. Biologic effects of transdermal estradiol. *N Engl J Med* 1986; 314: 1615-20.
8. Giltay EJ, Gooren LJG, Emeis J, Kooistra T, Stehouwer CDA. Oral, but not transdermal, administration of estrogens lowers tissue-type plasminogen activator levels without affecting its endothelial synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1396-403.
9. Ridker PM, Hennekens CH, Rifai N, Buring JE, Manson JE. Hormone replacement therapy and increased plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 1999; 100: 713-6.
10. Sattar N, Perera M, Small M, Lumsden MA. Hormone replacement therapy and sensitive C-reactive protein concentrations in women with type-2 diabetes. *Lancet* 1999; 354: 487-8.

Received March 27, 2000 Accepted April 3, 2000

Thromb Haemost 2000; 84: 360-1

The Human Platelet Alloantigen 5 Polymorphism as a Risk for the Development of Acute Idiopathic Thrombocytopenia Purpura

Dear Sir,

Immune thrombocytopenic purpura (ITP) is an autoimmune disease characterized by thrombocytopenia due to platelet autoantibodies resulting in removal of the opsonized platelets by the reticuloendothelial system. The etiology of ITP remains unknown. However, both genetic and environmental risk factors are implicated. Among genetic risk factors, polymorphisms of the HLA class II antigens, of FcγRIIA ex-

pressed on platelets, and more recently of human platelet antigen (HPA) systems have been associated to development of ITP and therapeutic response (1, 2).

The HPA-5 system polymorphism is characterized by a G to A transition at nucleotide 1648 in the glycoprotein Ia of the GpIIa/IIb complex, which results in Glu505 to Lys substitution, defining allele a and b, respectively. The GpIIa/IIb complex is homologous to very late antigen 2 (VLA-2) appearing on activated T cells that can be upregulated on lymphocytes in response to antigenic stimulation (3). The HPA-5 antigen is the second most common cause of alloimmune platelet disorders (4). The polymorphism of the HPA-5 system has been related to immune-mediated diseases such as chronic ITP or acute vascular rejection of renal grafts (1, 5). In this study we sought to determine whether the HPA-5 polymorphism could be related to development of either acute or chronic ITP.

Correspondence to: Valder R. Arruda, University of Pennsylvania Medical Center, University of Pennsylvania School of Medicine, 310 Abramson Research Center, 324. S. 34th Street, Philadelphia, PA, 19104, U.S.A. - Phone: 001 (215) 5904907; E-mail: vrrarruda@mail.med.upenn.edu

We studied 86 unrelated Brazilian patients (25 males, 61 females), median age of 37.8 years (range from 13 to 83 years) with the diagnosis of ITP. This cross-sectional study was carried from 1992 to 1999 at the outpatient clinic of the University Hospital of Campinas, in which an informed consent was obtained from all patients enrolled. The median follow-up period of these patients was 58 months (range from 4 to 120 months). The diagnosis of ITP was based on presence of isolated thrombocytopenia (platelet count lower than $150 \times 10^9/L$) with a normal or increased number of megakaryocytes on the bone marrow smear. Secondary platelet destruction such as thrombocytopenia following infection, drug intake or due to underlying disease was detected in 22 patients who were subsequently excluded from the study.

Acute ITP was defined when the clinical symptoms and recovery of platelet counts to values higher than $100 \times 10^9/L$ were obtained in a period less than six months and chronic ITP when the control of the disease required long-term treatment. According to the platelet count we defined complete response (CR) when values higher than $100 \times 10^9/L$ were obtained, partial response (PR) when platelet count remained between 50 and $100 \times 10^9/L$, and no response (NR) when platelet counts were lower than $50 \times 10^9/L$.

All but 2 patients were treated. Prednisone was administered as the first treatment at a dose of 0.5 to 1 mg/kg/day in 62 patients. A CR was obtained in 17 patients, PR in 4 cases and prednisone refractory or dependent was observed in 41 cases. Splenectomy was performed in 18 patients, in whom ITP was either refractory ($n = 8$) or prednisone dependent ($n = 10$). In this group, CR and PR were observed in 22% and 50%, respectively. To 12 patients refractory to prednisone and/or splenectomy in which clinical bleeding was present, an immunosuppression therapy (cyclophosphamide, azathioprine, and/or vincristin) was administered.

The control group consisted of 250 individuals (149 males, 101 females), median age of 33.6 years (range 12 to 64 years) selected among unrelated students, laboratory staff and physicians of the University Hospital.

HPA-5 system genotyping was performed using PCR-RFLP as previously described (6). Clinical and laboratorial data are summarized in Table 1. Twenty patients presented with acute ITP, in whom the normal platelet counts persisted for 12 months of follow-up after CR. At this time patients are followed only at their reference center. In this group, 5 patients presented a relapse of ITP 2 years (3 cases) or 4 years (2 cases) after obtained a CR. The acute ITP patients group showed a higher incidence of HPA-5b allele (0.275) compared to the control group (0.108; $p = 0.03$, $\chi^2 = 4.7$). Among those patients who relapsed, no HPA-5b allele was detected. No significant differences were found when the chronic ITP patients group was compared to the control group.

Studies of the inherited predisposition to the development of ITP have focused on the chronic form of ITP. In this study we demonstrated that acute ITP was significantly correlated to the presentation of the HPA-5b allele. In our study, a selection bias could be present; we did not analyze genotypes from patients with fatal thrombocytopenic events as the study was performed at an outpatient clinic. However, this

Table 1 Clinical data and HPA-5 system allele frequencies in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP)

	Acute ITP	Chronic ITP	Control
No. patients	20	44	250
Sex (Male:female)	8:12	12:32	149:101
Age (years)	39.8 (13-82)	35.5 (14-80)	33.6 (12-64)
Platelet count (at diagnosis), $\times 10^9/L$	16.4 (1-115)	26.8 (1-105)	
HPA-5a	0.725	0.867	0.892
HPA-5b	0.275*	0.133	0.108

* - p value of 0.03 ($\chi^2=4.7$) when Acute ITP was compared to the control group

is unlikely to affect our results since mortality in ITP is as low as 5% and most of the high risk patients have ITP secondary to drug intake (7), who were excluded from our study. Also, the racial admixture seen in our population should not have an impact on the results, as allele distribution of HPA-5 among Brazilian Blacks and Caucasians, which comprise the great majority of Brazilian population, are similar (6).

In conclusion, we suggest that the presence of HPA-5b could be related to an increased risk for acute ITP in our population. Whether the role of this polymorphism could vary in different ethnic groups of patients with acute ITP remains to be determined.

Vagner Castro, Gislaire B. Oliveira, Andréa F. Origa, Joyce M. Annichino-Bizzacchi, Valder R. Arruda
Hematology and Hemotherapy Center, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

References

- Kim BS, Song KS. Genetic polymorphism of human platelet specific antigen (HPA) in patients with immune thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1997; suppl, PS 1037.
- Thude H, Gatzka E, Anders O, Barz D. Allele frequencies of human platelet antigen 1, 2, 3 and 5 systems in patients with chronic refractory autoimmune thrombocytopenia and in normal persons. *Vox Sang* 1999; 77: 149-53.
- Takada W, Hemler ME. The primary structure of the VLA-2/Collagen receptor $\alpha 2$ subunit (platelet GpIa): homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain. *J Cell Biol* 1989; 109: 397-407.
- Santoso S, Kalb R, Walka M, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Newman P. The human platelet alloantigens Br^a and Br^b are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (Integrin subunit $\alpha 2$). *J Clin Invest* 1993; 92: 2427-32.
- Kekomäki S, Salmela K, Partanen J, Koskimies S, Kekomäki R. Alloimmunization against platelet antigens in renal transplant patients with acute vascular rejection. *Clin Transpl* 1997; 11: 19-24.
- Castro V, Origa AF, Annichino-Bizzacchi JM, Soares M, Menezes RC, Gonçalves MS, Costa FF, Arruda VR. Frequencies of platelet-specific alloantigens systems 1 to 5 in three distinct ethnic groups in Brazil. *Eur J Immunogenet* 1999; 26: 355-60.
- Frederiksen H, Schmidt K. The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age. *Blood* 1999; 94: 909-13.

Received February 2, 2000 Accepted after revision March 23, 2000

Capítulo VI

Resumo

As plaquetas exercem um papel fundamental na formação do trombo arterial. Uma correlação entre o polimorfismo do sistema de aloantígeno plaquetário humano 1 (HPA) e o desenvolvimento de doença vascular oclusiva foi descrita, sendo que a presença do alelo HPA-1b aumentaria o risco de angina instável e infarto agudo do miocárdio, principalmente em pacientes jovens. Vários estudos posteriores apresentaram resultados controversos em doenças coronárias, doença vascular cerebral e trombose venosa. No entanto, recentemente foi demonstrado que plaquetas expressando o alelo HPA-1b apresentavam ganho de função, resultando em um trombo plaquetário mais resistente à lise fisiológica, dando maior consistência à hipótese da participação desse alelo na patogênese da doença vascular oclusiva. Neste estudo, foi avaliada a prevalência do alelo HPA-1b em pacientes sobreviventes de infarto do miocárdio, pacientes com doença arterial cerebral e periférica e com trombose venosa. Os resultados demonstraram uma prevalência semelhante desse alelo nos grupos de pacientes e em controles normais, não revelando sua associação a maior risco de doença vascular oclusiva. Entretanto, a prevalência do alelo HPA-1b foi maior em pacientes sobreviventes de infarto com idade inferior a 45 anos do que verificada em pacientes mais idosos, sugerindo patogênese distinta no início precoce da doença coronária.

*Submetido para publicação no periódico *Cardiovascular Research*. Os resultados parciais desse trabalho foram apresentados no Congresso Anual da Sociedade Americana de Hematologia em 1996 (CASTRO *et al.*, 1996)

Polymorphism of the Human Platelet Alloantigen (HPA-1) of the glycoprotein IIIa as an inherited risk factor for occlusive arterial disease or venous thrombosis

Vagner Castro, Joyce M. Annichino-Bizzacchi, Luiz C. Chiaparini, Otavio R. Coelho, Fernando F. Costa, Valder R. Arruda

Hematology-Hemotherapy Center, Department of Clinical Medicine, State University of Campinas, Campinas-SP, Brazil

Correspondence

Valder R. Arruda

Hematology-Hemotherapy Center

State University of Campinas

C.P.: 6198 C.E.P.: 13.081-970

Campinas-SP, Brazil

FAX: 55 19 289.1089/ 788.8600

e-mail: vrarruda@hotmail.com

Vascular disease is a serious health problem in Southern Brazil (1) and an investigation of inherited risk factors would be useful in the management of these patients. Whereas inherited thrombophilia risk factors such as factor V Leiden and 20210 A allele of prothrombin gene are clearly related to venous thrombosis, the role of these variants in development of occlusive arterial disease is less evident (2). In contrast to vein vessel, platelets have a central role in the thrombi formation at arterial vessel. The first platelet polymorphism associated with a high risk for occlusive vascular disease was reported by Weiss et al (3). In this study, the development of myocardial infarction and unstable angina particularly among young patients was related to the human platelet antigen-1b (HPA-1b) allele, formerly known as PIA2 allele (4). Since the initial report several studies have been published and the results still controversial (6-13). In a large prospective study described by Ridker et al. (11) no evidence of association between the HPA-1b allele and the risk for myocardial infarction, stroke, or venous thrombosis was found among 14,916 men followed for a mean of 8.6 years. However, an important observation was reported by Mikkelsen et al. (13) showing that the HPA-1b allele was not associated to MI but related to the severity of coronary artery disease or stenosis. Gardemann et al (12) suggested that HPA-1b was associated with coronary artery disease among patients with normal angiographic study but no association was found with MI. Recently, Viajara et al (14) described that HPA-1b platelet adhered significantly more to immobilized fibrinogen and has an enhanced clot retraction than HPA-1a cells. Thus, arterial thrombi rich in HPA-1a platelet may response less efficiently to conventional antiplatelet drugs. In this study, we have determined the prevalence of the HPA-1 alleles among patients with arterial disease or venous thrombosis, and in the general population of the same region in Brazil.

The selection of the patients and controls was previously reported (15). Briefly, two groups of survivors of myocardial infarction (MI) were analyzed: group A (27 males, 7 females) had the first ischemic event before 45 years old with median age of 38 years (range: 23-45) and group B (66 males, 37 females), median age of 59.1 years (range: 46-70). Peripheral or cerebral occlusive arterial disease was diagnosed in 48 patients (22 males, 26 females), median age of 37 years (range: 17-56). This group comprised those patients who arterial disease occurred in the absence of known risk factors such as hypertension, hyperlipoproteinemia, and diabetes mellitus (15). The venous thrombosis group comprised 89 patients (33 males, 56 females), median age of 31 years (age range: 14 to 62 years) in whom at least one episode of spontaneous venous thrombosis was diagnosed. The control group consisted of 294 consecutive newborns from the same University Hospital in order to provide a representative group of the general population that seeks medical assistance in this region. Genomic DNA was obtained from peripheral blood of patients and from the umbilical cord vein of control group, and was extracted by a standard method (16). The diagnosis of the HPA-1 alleles was carried out as described by Jin et al (17).

The results are showed in Table 1 and the statistical analysis was calculated using the Epi Info program (18). Among 294 controls studied, the allele frequency of HPA-1b was 14.6% and for the HPA-1a was 85.4%. The genotypes analysis showed homozygous for the HPA-1a allele in 73%, homozygous for the HPA-1b allele in 2%, and for heterozygous 25%. Based on the sum of all the genotypes, there was a good fit to the Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2=0.03$). In the venous thrombosis and peripheral or cerebral arterial disease group no difference was observed when compared to the control. There was no sex-related difference in the prevalence of HPA-1 alleles among patients with arterial or venous

thrombosis groups. The prevalence of the allele HPA-1b among 137 patients with MI did not differ from that observed in the control group (12.7% vs. 14.6%), neither for those of group A ($P=0.10$) nor group B ($P=0.09$). Nevertheless the prevalence of the allele HPA-1b was higher among young patients than older patients (22% vs. 9.7%; $P=0.014$), odds ratio of 2.63 (95% C.I., 1.18 to 5.83).

Unlike conventional risk factors, HPA-1b allele does not represent a risk factor for venous thrombosis, systemic arterial disease, or MI. In our study, as we analyzed survivors of myocardial infarction, a selection bias for patient with more favorable prognosis may occurred. The higher prevalence of HPA-1b allele among young patients with myocardial infarction could result from a distinct pathogenesis of the early onset of the coronary artery disease. In fact, when analyzing autopsy findings in sudden death of middle aged men out of hospital, Mikkelsen et al (13). showed that HPA-1b allele was associated with less-narrowed coronary arteries and a large area of complicated lesions, and MI due to coronary thrombosis. Thus, the HPA-1b allele may be related to development of more severe MI or to the early onset of the coronary artery disease. Study of unselected patients with either coronary artery disease or MI will be important to determine the role of HPA-1b allele and may be for therapeutic intervention.

References

1. Duncan BB, Schmidt MI, Polanczyk CA, Mengue SS. High mortality rates in Brazilian adult populations-an international comparison. *Rev Ass Med Brasil*. 1992; 38: 138-144.
2. Siscovick DS, Schwartz SM, Rosendaal, Psaty BM. Thrombosis in the young: effect of atherosclerotic risk factor on the risk of myocardial infarction associated with prothrombotic factors. *Thromb Haemost* 1997; 78:7-12.

3. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 1090-1094.
4. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PlA1 and PlA2, are associated with a leucine33/ proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989; 83: 1778-1781.
5. Carter AM, Ossei-Gerning N, Grant PJ. Platelet glycoprotein IIIa PlA polymorphism in young men with myocardial infarction. *Lancet* 1996; 348: 485-486.
6. Osborn SV, Hampton KK, Smillie D, Channer KS, Daly ME. Platelet glycoprotein IIIa gene polymorphism and myocardial infarction. *Lancet* 1996; 348: 1309-1310.
7. Odawara M, Matsunuma A, Yamashita K. Platelet glycoprotein IIIa PlA polymorphism and Japanese diabetic patients with coronary heart disease. *Lancet* 1996; 348: 1310.
8. Samani NJ, Lodwick D. Glycoprotein IIIa polymorphism and risk of myocardial infarction. *Cardiovascular Res* 1997; 33: 693-697.
9. Herrmann S-M, Poirier O, Marque-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, Emmerich J, Cambien F. The Leu33 / Prol polymorphism (PlA1 / PlA2) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1179-1181.

10. Reuner KH, Elgas M, Kaps M, Ruf A, Patscheke H. The human platelet antigen HPA-1a/1b (PIA1 / PIA2) polymorphism and cerebral ischaemia. *Thromb Haemost* 1997; 77: 964-965.
11. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet* 1997; 349: 385-388.
12. Gardemann A, Humme J, Stricker J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M, Tilmanns H, Hehrlein FW, Rau M, Haberbosch W. Association of the platelet glycoprotein IIIa PIA1/A2 gene polymorphism to coronary artery disease but no to nonfatal myocardial in low risk patients. *Thromb Haemost* 1998; 80: 214-217.
13. Mikkelsen J, Perola M, Laippala P, Savolainen V, Pajarinen J, Lalu K, Penttilä A, Karhunen PJ. Glycoprotein IIIa P11 polymorphism associates with progression of coronary artery disease and with myocardial infarction in an autopsy series of middle-aged men who died suddenly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2573-2578.
14. Vijayan KV, Goldsmith-Clermont PJ, Roos C, Bray P. The PIA2 polymorphism of integrin b3 enhances outside-in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest* 2000; 105: 793-802
15. Arruda VR, von Zuben PM, Chiapparini LC, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FC. The mutation Ala 677ÆVal in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: A risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 1997; 77:818-821.
16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cell. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.

16. Jin Y, Dietz HC, Nurden A, Bray PF. Single-strand conformation polymorphism analysis is a rapid method for the identification of mutations and polymorphisms in the gene for glycoprotein IIIa. *Blood* 1993; 82: 2281-2288.
17. Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, Dicker RC, Sullivan KM, Fagan RF, Arner TG. Epi Info, version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta: Center for Disease Control and Prevention, 1994.

Table 1. Distribution of the Human Platelet Alloantigen-1 (HPA-1) alleles among patients with myocardial infarction, systemic arterial disease, venous thrombosis, and controls.

HPA-1	CONTROLS	VENOUS THROMBOSIS	ARTERIAL DISEASE	MYOCARDIAL INFARCTION		
				TOTAL	GROUP A	GROUP B
ALLELES	$\eta=588$	$\eta=178$	$\eta=96$	$\eta=274$	$\eta=68$	$\eta=206$
A	85.4% ($\eta=502$)	85.4% ($\eta=152$)	92.7% ($\eta=89$)	87.2% ($\eta=239$)	77.9% ($\eta=53$)	90.3% ($\eta=186$)
B	14.6% ($\eta=86$)	14.6% ($\eta=26$)	7.3% ($\eta=7$)	12.8% ($\eta=35$)	22.1% ($\eta=15$)	9.7% ($\eta=20$)
GENOTYPE	$\eta=294$	$\eta=89$	$\eta=48$	$\eta=137$	$\eta=34$	$\eta=103$
AA	72.8% ($\eta=214$)	73% ($\eta=65$)	85.4% ($\eta=41$)	75.2% ($\eta=103$)	58.9% ($\eta=20$)	80.6% ($\eta=83$)
AB	25.2% ($\eta=74$)	24.7% ($\eta=22$)	14.6% ($\eta=7$)	24.1% ($\eta=33$)	38.2% ($\eta=13$)	19.4% ($\eta=20$)
BB	2.0% ($\eta=06$)	2.3% ($\eta=02$)	0	0.7% ($\eta=01$)	2.9% ($\eta=01$)	0

Group A and B denotes those patients with myocardial infarction under or older than 45 years, respectively.

The prevalence of the HPA-1b allele was not different among patients with myocardial infarction between group A and B when compared to the controls ($P=0.10$ and $P=0.09$, respectively). However, a higher prevalence of the allele HPA-1b was observed among group A when compared to group B ($\chi^2_{(1)} 5.93$; $P=0.014$). No difference was found also when venous thrombosis or arterial disease groups were compared to the control.

Capítulo VII - Discussão

A caracterização das bases moleculares dos vários sistemas HPA possibilitaram não apenas o diagnóstico molecular relativo a cada sistema, mas também trouxe importantes informações ao conhecimento do desenvolvimento das aloimunizações plaquetárias (KUNICKI & NEWMAN, 1992). É importante considerar que previamente ao diagnóstico molecular, os estudos relacionados às incompatibilidades entre os sistemas HPA eram limitados basicamente a pesquisa de anticorpos relacionados aos sistemas HPA-1 e raramente aos sistemas HPA-3 e 5 (Mc FARLAND *et al.*, 1991; DOUGHTY *et al.*, 1995; WILLIAMSON *et al.*, 1998). A falta de anticorpos específicos comercialmente disponíveis para os diversos sistemas HPA continua sendo um importante fator limitante aos estudos das aloimunizações plaquetárias (DOUGHTY *et al.*, 1995). A ausência de anticorpos circulantes detectáveis em mulheres homozigotas para o alelo menos frequente dos sistemas HPA, não permite o diagnóstico de PTAN (WILLIAMSON, 1998). Por outro lado, para o sistema HPA-1 a detecção do anticorpo circulante não é sempre possível e mesmo assim o diagnóstico de PTAN pode ser estabelecido (BLANCHETTE *et al.*, 1990; DOUGHTY *et al.*, 1995). Dessa forma, a disponibilidade de métodos sorológicos e moleculares são complementares no reconhecimento de indivíduos de alto risco para aloimunizações, para o diagnóstico preciso de PTAN e dessa forma orientar o acompanhamento clínico e provavelmente a conduta terapêutica.

A prevalência dos alelos dos sistemas HPA é heterogênea quando diferentes grupos étnicos foram estudados (KUNICKI & NEWMAN, 1992; KIM *et al.*, 1995; SANTOSO & KIEFEL, 1998). Dessa forma a prevalência de doenças decorrentes de aloimunização plaquetária está relacionada à frequência de indivíduos homozigotos para os alelos menos comuns dos sistemas HPA (KUNICKI & NEWMAN, 1992; SIMSEK *et al.*, 1993; KIM *et al.*, 1995). De fato, a baixa prevalência do alelo HPA-1b em raças não Caucasóides, é a

justificativa de que estudos de rastreamento para PTAN seria de pouca utilidade nessas populações (KUNICKI & NEWMAN, 1992; KIM *et al.*, 1995; TANAKA *et al.*, 1995; SEO *et al.*, 1998).

A população brasileira é caracterizada por grande miscigenação entre indivíduos de raças distintas (CASTRO *et al.*, 1999). Assim foi nosso objetivo determinar a distribuição dos alelos dos sistemas HPA de grupos étnicos distintos tais como Caucasóides, Negróides e Indígenas. É interessante notar que a prevalência dos alelos dos sistemas HPA-1, 2, 3, 4, e 5 foi similar entre brasileiros descendentes de Caucasóides e Negróides e diferenciaram de outros estudos em similares grupos étnicos de outros países (CASTRO *et al.*, 1999). Embora não possa ser totalmente excluída a possibilidade de miscigenação nas populações estudadas, acreditamos que esta não é a razão dos resultados obtidos. Estudos anteriores em nosso laboratório, utilizando os mesmos indivíduos como representantes dos diversos grupos raciais, para a determinação de mutações frequentes em Caucasóides e rara entre Negróides estabeleceram que esses grupos apresentam a mesma prevalência das mutações do respectivo grupo étnico (ARRUDA *et al.*, 1995, 1997).

Conforme discutido no Capítulo III, determinarmos que o critério raça não deve ser estabelecido como fator de risco para o desenvolvimento de PTAN nesta amostra populacional estudada. Baseado na presença de indivíduos homozigotos para o alelo HPA-1b, 1% entre os Caucasóides e 2% entre os Negróides seriam indivíduos de risco para a PTAN (CASTRO *et al.*, 1999). Adicionalmente, foi importante definirmos que o sistema HPA-3, pela frequência relativamente elevada de homozigotos para o alelo HPA-3b (12 a 17%), estaria potencialmente relacionado à PTAN nesta população estudada.

Para avaliarmos o impacto clínico dessas observações, desenvolvemos um estudo prospectivo de pesquisa de plaquetopenia no período neonatal (Capítulo IV) no qual, num

período de quatro anos consecutivos, foram colhidas amostras de sangue de cordão umbilical para a determinação do número de plaquetas. Nesse sentido, detectamos que a plaquetopenia ($<100 \times 10^9/L$) foi detectada em 142 casos, ou seja 1% da população, sendo grave ($< 50 \times 10^9/L$) em 0,11% dos casos. Esses dados estão em acordo com estudos prospectivos desenvolvidos em populações européias (UHRYNOWSKA *et al.*, 1997, 2000). É importante ressaltar que esse é o primeiro estudo na população brasileira e talvez Latino Americana, para a determinação de frequência e etiologia de plaquetopenia neonatal.

O seguinte estudo foi a avaliação do impacto clínico do incompatibilidade genotípica materno-fetal e o risco de desenvolvimento de plaquetopenia. O estudo foi elaborado na forma de caso-controle com indivíduos pareados por raça e idade. A análise revelou que a incompatibilidade e provável risco de aloimunização está relacionada aos sistemas HPA-3 e 2, que combinados são responsáveis por quase metade dos casos de incompatibilidade. Entretanto, a incompatibilidade genotípica estava presente em 50% dos casos controle e de pacientes. Assim essa abordagem isolada, não permite o reconhecimento de gestações de alto risco para PTAN. Acreditamos que o método de rastreamento futuro deve associar o genótipo e a determinação de anticorpos circulantes e o acompanhamento prospectivos de futuras gestações das mulheres identificadas nesse estudo.

Como discutido anteriormente a nossa população apresenta menor prevalência dos alelos HPA-1b do que determinado em outras populações Européias ou dos EUA (CASTRO *et al.*, 1999), mas 1 a 2% na nossa população geral não é uma prevalência desprezível para estudos populacionais. Assim, esperaríamos na amostra analisada 1:2.000 ou 1:4.000 casos por 10.000 nascimentos, ou seja, entre 12.714 recém nascidos 1 ou 2 casos apresentariam PTAN. DREYFUS *et al.*, (1997) descreveram que em casos de plaquetopenia neonatal,

diagnosticada por análise de sangue periférico, pode haver uma diminuição do número de plaquetas nos dias subsequentes. SAINIO *et al.*, (2000) descreveram que ao nascimento o número de recém nascidos com plaquetopenia é maior do que no primeiro dia de vida. Nosso estudo, assim, optou pelo método mais sensível. É possível que tenham ocorrido casos de PTAN clinicamente silenciosos ou que desenvolveram plaquetopenia após o primeiro dia de vida. O uso de imagem para o diagnóstico de hemorragia intracraniana não foi utilizado em todos os casos de plaquetopenia, o que poderia ter sido de valor significativo nessa análise. Outra possibilidade é o fato de analisarmos recém-nascidos na população estudada, e não em todas as gestações. Aproximadamente 9 ± 3 casos de óbitos fetais são relatados mensalmente no Hospital das Clínicas da UNICAMP (dados do Departamento de Arquivo Médico e Estatística do Hospital das Clínicas da UNICAMP). Assim como a PTAN pode ocorrer precocemente (já na 20ª semana de gestação), no estudo, 3-4% dos recém-nascidos ao mês não foram incluídos. WILLIAMSON *et al.*, (1998) num estudo prospectivo de 24.417 gestantes, demonstraram que apenas 12% (n=46) de mulheres homozigotas para o HPA-1b (n=387) desenvolveram aloimunização. O segundo fator de risco para o desenvolvimento de PTAN relacionada ao sistema HPA-1 é o polimorfismo do sistema HLA-DRB3* 0101 (DR52a). Em um estudo na população brasileira por BITTENCOURT e colaboradores (1999) foi determinado que 69% dos indivíduos analisados apresentavam esse alelo do sistema HLA-DR, assim esse polimorfismo não parece ser raro para justificar a ausência de PTAN em nossa população. Talvez o que influencie a capacidade de aloimunização de mães HPA-1b, e talvez para os outros sistemas HPA, seja a relação direta entre o número de cópias dos receptores expressos por plaquetas. Assim quanto maior o número de cópias por células, maior seria o risco de desenvolver aloimunização. Essa hipótese explicaria a maior imunogenicidade do

sistema HPA-1 (50.000 cópias/plaqueta) comparado ao HPA-5 (25.000 cópias/plaqueta), mas não explicaria a baixa imunogenicidade do HPA-3 que está expresso no mesmo complexo do sistema HPA-1 (GpIIIa). Esses dados são concordantes com os descritos por PANZER e colaboradores (1995), que utilizaram métodos de biologia molecular e de detecção de anticorpos antiplaquetários. Esses autores demonstraram que as incompatibilidades para os sistemas HPA-3 e HPA-5 são as mais frequentemente detectadas. Entretanto, mesmo na presença de anticorpos anti-HPA, todos os neonatos estudados eram assintomáticos e não apresentavam plaquetopenia. Um risco potencial para o desenvolvimento de plaquetopenia neonatal, em mãe portadora de PTI, associada à incompatibilidade HPA-5 materno-fetal, foi verificada em um caso desse estudo.

A resposta imune a um estímulo antigênico, mais do que o conceito de “self” ou “non-self” está baseada no contexto em que o antígeno é apresentado ao sistema imune. Uma proteína pouco antigênica pode tornar-se extremamente imunogênica caso durante a sua apresentação ao sistema imune ocorra no contexto de “perigo” (MATZINGER *et al.*, 1994). Assim, na ausência de sinal de “perigo” um antígeno “non-self” não necessariamente desencadeia resposta imune, caso a apresentação não seja traumática. Um exemplo dessa possibilidade é a ativação da principal célula que tem os componentes necessários para a apresentação de antígenos ao sistema imunológico, denominadas células dendríticas (MULÉ, 2000). Essas células são ativadas por sinais de necrose celular (perigo), mas não por apoptose (fisiológica; sem perigo) (GALLUCCI *et al.*, 1999).

Dessa forma, como é conhecido que células fetais e maternas transitam livremente entre as duas circulações, caso isso ocorra em situações não traumáticas, o sistema imune materno pode tolerar células fetais. De fato, está definido que células nucleadas fetais podem ser detectadas na circulação materna por longo tempo (até anos) (SCHRODER, 1975; STEELE

et al., 1996; ARTELETT *et al.*, 1998). Eventualmente essas células quando depositadas em tecidos, podem resultar em um mecanismo de doença similar a doença enxerto-versus-hospedeiro como tem sido sugerido recentemente para o desenvolvimento da esclerodermia sistêmica progressiva (ARTELETT *et al.*, 1998). Assim, acreditamos que o desenvolvimento de PTAN está baseado na predisposição determinada por múltiplos genes além dos que estão envolvidos no sistemas HPA e HLA e na interação de fatores circunstanciais e ambientais. Até o momento não está claro qual o programa ideal para o rastreamento da PTAN. O programa desenvolvido nesse estudo é simples e facilmente adaptável a programas já existentes, como aqueles para o diagnóstico de hemoglobinopatias. A implicação econômica dessa estratégia é justificada pela alta prevalência de recém-nascidos com plaquetopenia (1%) e essa população é de risco imediato para complicações hemorrágicas, enquanto para as doenças relacionadas à presença de hemoglobina S, C ou β -talassemia as manifestações clínicas não surgem antes dos seis meses de vida (BEUTLER, 1995; WEATHERALL, 1995).

No objetivo seguinte (Capítulo V) exploramos a importância dos sistemas HPA em doenças não relacionada a aloimunização plaquetária. Ao abordamos a prevalência do polimorfismo do sistema HPA-5 e o desenvolvimento de púrpura trombocitopênica imunológica (PTI) aguda em adultos, demonstramos pela primeira vez que a frequência do alelo HPA-5b foi duas vezes maior entre os casos de PTI aguda comparados com a população controle. É importante considerarmos que a PTI aguda em adultos, ao contrário do que ocorre no grupo pediátrico, é uma doença pouco frequente e raramente apresenta remissão espontânea (GEORGE *et al.*, 1996). Assim indivíduos HPA-5b teriam maior risco de desenvolver PTI aguda. Esses dados são clinicamente significativos ao considerarmos que vários adultos

apresentam plaquetopenia por destruição imune após o uso de drogas, tais como diuréticos e antiarrítmicos que são prescritos comumente. Esses casos são denominados de purpura trombocitopênica imune secundária à droga administrada. Não há até o momento, nenhum dado clínico ou laboratorial para selecionar a população de risco para PTI secundária. A implicação futura direta desse estudo pode ser a de avaliar a prevalência do HPA-5b nesse grupo de pacientes, que é o grupo de maior mortalidade entre os pacientes adultos com PTI (FREDERIKSEN & SCHMIDT, 1999). Caso comprovada, o genótipo do sistema HPA-5 poderia ser indicado para pacientes que iriam utilizar drogas comumente relacionadas a PTI, como é objetivo de vários estudos em farmacogenética.

Estudos iniciais não identificaram alterações funcionais, relacionadas a agregação e adesão plaquetárias, em decorrência da presença de diferentes aminoácidos expressos nos receptores plaquetários do fibrinogênio e fator de von Willebrand (NEWMAN, 1991; NURDEN, 1995). Recentemente esse conceito foi reavaliado e de fato, plaquetas com HPA-1b (prolina na posição 33) no complexo GPIIb-IIIa apresentam maior resposta agregante quando estimuladas pelo fibrinogênio imobilizado, resultando na formação de um trombo plaquetário com maior resistência à lise fisiológica (VIJAYAN *et al.*, 2000). A consequência funcional desse estudo colabora com a extensa investigação em pacientes com doença vascular isquêmica ou trombótica e a presença de alelo HPA-1b. Ainda que discutível, a correlação direta entre a obstrução vascular coronariana ou cerebral e alelos dos sistema HPA (BYZOVA & PLOW, 2000), é importante considerar a observação de que o desenvolvimento de doença oclusiva coronariana e maior risco de estenose entre homens com pelo menos um alelo HPA-1b foram claramente demonstrados por MIKKELSSON *et al.*, (1999). O alelo HPA-1b representa o primeiro polimorfismo plaquetário relacionado a doença vascular oclusiva (WEISS *et al.*, 1996) e

fisiopatogenicamente exemplifica uma mutação que resulta em ganho de função plaquetária. Esses dados estão de acordo com a observação de que as principais causas hereditárias de trombose venosa resultam de duas mutações que conferem ganho de função coagulante da proteína mutante, como são as mutações no fator V (fator V Leiden) e no fator II (alelo 20210A) da coagulação sanguínea. Essas duas mutações estão presentes em 20-40% dos casos de trombose venosa primária em indivíduos abaixo de 45 anos. Em contraste as mutações que resultam em perda de função dos anticoagulantes naturais como proteína C, proteína S ou antitrombina III estão presentes conjuntamente em apenas 4-5% desses casos. Nosso estudo determinou que a prevalência do HPA-1b não foi maior em pacientes sobreviventes de infarto do miocárdio, mas foi significativamente maior entre aqueles com idade inferior a 45 anos. Esses dados, parcialmente apresentados no Congresso da Sociedade Americana de Hematologia em 1996 (CASTRO *et al.*, 1996), podem ser interpretados na idéia atual de que indivíduos com HPA-1b provavelmente tenham doença coronariana distinta daqueles sem o alelo b. Esses mesmos dados foram observados por GARDEMANN *et al.*, (1998) no estudo no qual o alelo HPA-1b foi associado à doença coronariana isquêmica em pacientes jovens com angiografia coronária normal. O estudo de MIKKELSSON *et al.*, (1999) demonstra que a análise de pacientes com morte súbita por doença vascular coronariana extra-hospitalar pode diferenciar daqueles pacientes que tiveram tempo de ter o atendimento hospitalar.

Em conclusão, esse projeto determinou a prevalência dos alelos HPA em uma população brasileira e algumas aplicações desse heterogêneo sistema plaquetário em patologias plaquetárias imunológicas e também em doenças vasculares oclusivas. Os dados obtidos nesse estudo podem fornecer a base para estudos posteriores da participação dos sistemas HPA em doenças hemorrágicas e trombóticas.

Capítulo VIII

Referências Bibliográficas

- ARRUDA VR, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, COSTA FF, REITSMA PH: *Factor-V Leiden (FVQ-506) is common in a Brazilian population. Am J Hematol* 49:242-243 1995.
- ARRUDA VR, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, GONCALVES MS, COSTA FF: *Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. Thromb Haemost* 78:1430-1433, 1997.
- ARTLETT CM, SMITH JB, JIMENEZ AS: *Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. N Engl J Med* 338:1186-1191, 1998.
- BAUER KA: *The hypercoagulable state: evaluation and management. Update on thrombophilia.* in: Hematology 1999, American Society of Hematology Education Program Book, Washington DC, pp231-235, 1999.
- BERTINA R: *Molecular risk factors for thrombosis. Thromb Haemost* 82:601-609, 1999.
- BEUTLER E: *The sickle cell diseases and related traits.* In: Williams Hematology, 5th edition, Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ eds, McGraw-Hill Inc, New York, NY, pp616-654, 1995.
- BITTENCOURT PL, GOLDBERG AC, CANÇADO ELR, PORTA G, CARRILHO FJ, FARIAS AQ, PALACIOS AS, CHIARELLA JM, ABRANTES-LEMOs CP, BAGGIO VL, LAUDANNA AA, KALIL J: *Genetic susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. Am J Gastroenterol* 94:1906-1913, 1999.
- BLANCHETTE VS, CHEN L, FRIEDBERG ZS, HOGAN VA, TRUDEL E, DECARY F: *Alloimmunization to the PL^{A1} platelet antigen: results of a prospective study. Br J Haematol* 74:209-215, 1990.
- BURSTEIN SA, BRETON-GORIUS J: *Megakaryopoiesis and platelet formation.* In: Williams Hematology, 5th edition, Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ eds, McGraw-Hill Inc, New York, NY, pp1149-1161, 1995.
- BYZOVA TV, PLOW EF: *The PL^{A2} allele and cardiovascular disease: the pro³³ and con.* *J Clin Invest* 6: 697-698, 2000.
- CAMPBELL KR, OHMAN EM, CANTOR W, LINCOFF AM: *The use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitor therapy in acute ST-segment elevation myocardial infarction: current practice and future trends. Am J Cardiol* 85: 32-38C, 2000.

- CASTRO V, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, COSTA FF, ARRUDA VR: *HPA-1b of platelet glycoprotein IIIa as a risk factor for arterial disease*. **Blood** 88 suppl.1: 703, 1996.
- CASTRO V, OLIVEIRA GB, ORIGA AF, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, ARRUDA VR: *The human platelet alloantigen 5 polymorphism as a risk for the development of acute idiopathic thrombocytopenia purpura*. **Thromb Haemost** 84: 360-361, 2000.
- CASTRO V, ORIGA AF, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, SOARES M, MENEZES RC, GONÇALVES MS, COSTA FF, ARRUDA VR: *Frequencies of platelet-specific alloantigens systems 1 to 5 in three distinct ethnic groups in Brazil*. **Eur J Immunogenet** 26: 355-360, 1999.
- CASTRO V, ORIGA AF, FALCONI MA, MARBA STM, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, COSTA FF, ARRUDA VR: *Thrombocytopenia in 3347 unselected newborns: Prevalence, etiology, and impact of genotyping for the HPA systems*. **Blood** 92 723 , Part 1, Suppl. 1, 1998
- CAVALLI-SFORZA LL, PIAZZA A, MENOZZI P, MONTAIN J: *Reconstitution of human evolution: bringing together genetic, archaeological and linguistic data*. **Proc Natl Acad Sci USA** 85, 6002-6006, 1988.
- CHANG YW, MYTILINEOS J, OPELZ G, HAWKINS BR: *Distribution of platelet antigens in a Chinese population*. **Tissue Antigens** 51: 391-393, 1998.
- CHEN Z, LESTER S, BOETTCHER B, MCCLUSKEY J: *Platelet antigen alleles frequencies in Australian Aboriginal and Caucasian populations*. **Pathology** 29: 392-398, 1997.
- CLEMETSON KJ. *Platelet GPIb-V-IX complex*. **Thromb Haemost** 78: 266-270, 1997.
- CORASH L: *Inactivation of virus, bacteria, protozoa, and leucocytes in platelet concentrates*. **Vox Sang** 74 suppl 2: 173-176, 1998.
- COVAS DT, DELGADO M, ZEITUNE MM, GUERREIRO JF, SANTOS SE, ZAGO MA: *Gene frequencies of the HPA-1 and HPA-2 platelet antigen alleles among the Amerindians*. **Vox Sang** 73, 182-184, 1997.
- DOUGHTY HA, MURPHY MF, METCALFE P, WATERS AH: *Antenatal screening for fetal alloimmune thrombocytopenia: the results of a pilot study*. **B J Haematol** 90: 321-325, 1995.

- DREYFUS M, KAPLAN C, VERDY E, SCHLEGEL N, DURAND-ZALESKI I, TCHERNIA G: *Frequency of immune thrombocytopenia in newborns: a prospective study*. **Blood** 89: 4402-4406, 1997.
- DRZEWEK K, BROJER E, ZUPANSKA B: *The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the Polish population*. **Transf Med** 8: 399-342, 1998.
- FERGUSON JJ, ZAQQA M: *Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists - Current concepts and future directions*. **Drugs** 58: 965-982, 1999.
- FLUG F, KARPATKIN M, KARPATKIN S: *Should all pregnant women be tested for their platelet PLA (Zw, HPA-1) phenotype?* **Br J Haematol** 86: 1-5, 1994.
- FOSTER DC, SPRECHER CA, GRANT FJ, KRAMER JM, KUIJPER JL, HOLLY RD, WHITMORE TE, HEIPEL MD, BELL LA, CHING AF, MC GRANE V, HART C, O'HARA P, LOK S: *Human thrombopoietin: gene structure, cDNA sequence, expression, and chromosomal localization*. **Proc Natl Acad Sci USA** 91: 13023-13027, 1994.
- FREDERIKSEN H, SCHMIDT K: *The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age*. **Blood** 94: 909-913, 1999.
- FRIEDBERG RC, GAUPP B: In: Current issues in platelet transfusion therapy and platelet alloimmunity, Kickler & Hermann eds, AABB Press, Bethesda, Maryland, pp 1-29, 1999.
- GALLUCCI S, LOLKEMA M, MATZINGER, P: *Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells*. **Nature Medicine** 5: 1249-1255, 1999.
- GARDEMANN A, HUMME J, STRICKER J, NGUYEN QD, KATZ N, PHILIPP M, TILMANN H, HEHRLEIN FW, RAU M, HABERBOSCH W: *Association of the platelet glycoprotein IIIa $PI^{A1/A2}$ gene polymorphism to coronary artery disease but not to nonfatal myocardial in low risk patients*. **Thromb Haemost** 80: 214-217, 1998.
- GEORGE JN, NURDEN AT: *Inherited disorders of the platelet membrane: Glanzmann Thrombastenia, Bernard-Soulier Syndrome, and other disorders*. In: Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, pp652-672, 1994.

- GEORGE JN, WOOLF SH, RASKOB GE, WASSER JS, ALEDORT LM, BALLEM PJ, BLANCHETTE VS, BUSSEL JB, CINES DB, KELTON JG, LICHTIN AE, MCMILLAN R, OKERBLOOM JA, REGAN DH, WARRIER I: *Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology*. **Blood** 88: 3-40, 1996.
- GINSBERG MH, XIAOPING D, O'TOOLE TE, LOFTUS JC, PLOW EF: *Platelet Integrins*. **Thromb Haemost** 70: 87-93, 1993.
- GOLDSCHMIDT-CLERMONT PJ, SHEAR WS, SCHWARTZBERG J, VARGA CF, BRAY PF: *Clues to the death of an Olympic champion*. **Lancet** 347: 1833, 1996.
- GONZALEZ-CONEJERO R, LOZANO ML, RIVERA J, CORRAL J, INIESTA JA, MORALEDA JM, VICENTE V: *Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib alpha associated with arterial thrombotic disease*. **Blood** 92: 2771-2776, 1998.
- HEDNER U: *NovoSeven(R) as a universal haemostatic agent*. **Blood Coag Fibrinol** suppl S107-1, 2000.
- HEIDENREICH R, EISMAN R, SURREY S, DELGROSSO K, BENNETT JS, SCHWARTZ E, PONCZ M: *Organization of the gene for platelet glycoprotein IIb*. **Biochemistry** 29: 1232-1244, 1990.
- HENNEKENS CH, PETO R, HUTCHISON GB, DOLL R: *An overview of the British and American aspirin studies*. **N Eng J Med** 318: 923-924, 1988.
- HICKEY MJ, ROTH GJ: *Characterization of the gene encoding human platelet glycoprotein IX*. **J Biol Chem** 268: 3438-3443, 1993.
- HOLENSTEINER A, WALCHSHOFER S, ADLER A, KITTL EM, MAYR WR, PANZER S: *Human platelet antigen in the Austrian population*. **Haemostasis** 25: 133-136, 1995.
- INOSTROZA J, KIEFEL V, MUELLER-ECKHARDT C: *Frequency of platelet-specific antigens PF^{A1} , Bak^a , Yuk^a , Yuk^b , and Br^a in South American (Mapuches) Indians*. **Transfusion** 28, 586-587, 1988.
- JASPERS M, MARYNEN P, ALY MS, CUPPENS H, HILLIKER C, CASSIMAN JJ: *Localization of the gene encoding the alpha 2 subunit of the human VLA-2 receptor to chromosome 5q23-31*. **Somat Cell Mol Genet** 17: 505-511, 1991.

- JUJI T, WATANABE Y, ISHIKAWA Y, FUJIWARA K, TONAMI H, TANAKA H, SATAKE M, AKAZA T, TADOKORO K, KODERA Y, SASAZUKI T, MORISHIMA Y, TAKAKU F: *Human platelet alloantigen (HPA)-5a/b mismatch decreases disease-free survival in unrelated bone marrow transplantation. Tissue Antigens* **54**: 229-234, 1999.
- KAUSHANSKY K: *Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. Blood* **86**: 419-431, 1995.
- KEKÖMAKI R: *Use of HLA- and HPA-matched platelets in alloimmunized patients. Vox Sang* **74**: 359-363, 1998.
- KEKÖMAKI S, KOSKELA S, LAES M, TERAMO K, KEKÖMAKI R: *Neonatal thrombocytopenia in two of six human platelet alloantigen (HPA) 5a-positive children of an HPA-5a-immunized mother. Transfus Med* **10**: 81-85, 2000.
- KEKÖMAKI S, PARTANEN J, KEKOMÄKI R: *Platelet alloantigens HPA-1, -2, -3, -5 and -6b in Finns. Transfus Med* **5**: 193-198, 1995.
- KEKOMÄKI S, SALMELA K, PARTANEN J, KOSKIMICS S, KEKOMÄKI R: *Alloimmunization against platelet antigens in renal transplant patients with acute vascular rejection. Clin Transpl* **11**: 19-24, 1997.
- KICKLER TS, NESS PM, HERMAN JH, BELL WR: *Studies on the pathophysiology of posttransfusion purpura. Blood* **68**: 347-350, 1986.
- KIM BS, SONG KS: *Genetic polymorphism of human platelet specific antigen (HPA) in patients with immune thrombocytopenia. Thromb Haemost suppl, PS 1037*, 1997.
- KIM HO, JIN Y, KICKLER TS, BLAKEMORE K, KWON OH, BRAY PF: *Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American, White, and Korean populations. Transfusion* **35**: 863-867, 1995.
- KUIJPERS RW, FABER NM, CUYPERS HT, OUWEHAND WH, VON DEM BORNE AE: *NH2-terminal globular domain of human platelet glycoprotein Ib alpha has a methionine 145/threonine145 amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens. J Clin Invest* **89**: 381-384, 1992.
- KULKARNI S, DOPHEID SM, YAP CL, RAVANAT C, FREUND M, MANGIN P, HEEL KA, STREET A, HARPER IS, LANZA F, JACKSON S: *A revised model of platelet aggregation. J Clin Invest* **6**: 783-792, 2000.

- KUNICKI TJ, NEWMAN PJ: *The molecular immunology of Human Platelet Antigens. Blood* **80**: 1386-1404, 1992.
- KUTER DJ: *The regulation of platelet production in vivo.* in: Thrombopoiesis and Thrombopoietins: molecular, cellular, preclinical and clinical biology, DJ Kuter, P Hunt, W Sheridan, D Zucker-Franklin, eds, Humana Press Inc, Totowa NJ, pp377-395, 1997.
- LANE D: *Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombosis disease. Blood* **95**:1517-1532, 2000.
- LANZA F, MORALES M, DE LA SALLE C, CAZENAVE JP, CLEMETSON KJ, SHIMOMURA T, PHILLIPS DR. *Cloning and characterization of the gene encoding the human platelet glycoprotein V. A member of the leucine-rich glycoprotein family cleaved during thrombin-induced platelet activation. J Biol Chem* **268**: 20801-20807, 1993
- LOPEZ JA, CHUNG DW, FUJIKAWA K, HAGEN FS, PAPAYANNOPOULOU T, ROTH GJ: *Cloning of the alpha chain of human platelet glycoprotein Ib: a transmembrane protein with homology to leucine-rich alpha 2-glycoprotein. Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 5615-5619, 1987.
- LYMAN S, ASTER RH, VISENTIN GP, NEWMAN PJ. *Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Bak^a/Bak^b alloantigen system. Blood* **75**: 2343-2348, 1990.
- MARIOTONI GG, BARROS FILHO AA: *Peso ao nascer e mortalidade hospitalar entre nascidos vivos, 1975-1996. Rev Saúde Pública* **34**: 71-76, 2000.
- MATZINGER, P: *Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol* **12**: 991-1045, 1994.
- MC FARLAND J: *Posttransfusion Purpura.* in: Transfusion Reactions, Popovsky M, ed., AABB Press, Bethesda, Maryland, pp 205-229, 1996.
- MC FARLAND JG, ASTER RH, BUSSEL JB, GIANOPOULOS JG, DERBES RS, NEWMAN PJ: *Prenatal diagnosis of neonatal alloimmune thrombocytopenia using allele-specific oligonucleotide probes. Blood* **78**: 2276-2282, 1991.
- MC FARLAND JG: *Platelet and neutrophil alloantigen genotyping in clinical practice. Transf Clin Biol* **5**: 13-21, 1998.

- MERCIER P, CHICHEPORTICHE C, DABANIAN C, GAMERRE M, REVIRON D: *Platelet antigen HPA-5b (Br^a) in an Algerian population. Tissue Antigens* **43**: 58-59, 1994.
- MIKKELSSON J, PEROLA M, LAIPPALA P, SAVOLAINEN V, PAJARINEN J, LALU K, PENTRILA A, KARHUNEN PJ: *Glycoprotein IIIa P11 polymorphism associates with progression of coronary artery disease and with myocardial infarction in an autopsy series of middle-aged men who died suddenly. Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 2573-2578, 1999.
- MOLLISON PL, ENGELFRIET CP, CONTRERAS M: *Some unfavourable effects of transfusion. In: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th edition, Blackwell Science, Oxford, pp 487-508, 1997.*
- MOROI M, JUNG SM: *Platelet receptors for collagen. Thromb Haemost* **78**: 439-444, 1997.
- MUELLER-ECKHARDT C, GRUBERT A, WEISHEIT M, MUELLER-ECKHARDT G, KIEFEL V, KROLL H, SCHMIDT S, SANTOSO S: *348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. Lancet* **1**: 363-366, 1989.
- MUELLER-ECKHARDT C. *Post-Transfusion Purpura. Br J Haematol* **64**: 419-424, 1986.
- MULÉ JJ: *Dendritic cells: at clinical crossroads. J Clin Invest* **105**: 707-708, 2000.
- NEWMAN PJ, DERBES RS, ASTER RH: *The Human Platelet Alloantigens, PL^{A1} and PL^{A2}, are associated with a Leucine33/Proline33 amino acid polymorphism in membrane Glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. J Clin Invest* **83**: 1778-1781, 1989.
- NEWMAN PJ, GORSKI J, WHITE II GC, GIDWITZ S, CRETNEY CJ, ASTER RH: *Enzymatic amplification of platelet-specific messenger RNA using the Polymerase Chain Reaction. J Clin Invest* **82**: 739-743, 1988.
- NEWMAN PJ, VALENTIN N: *Human platelet alloantigens: recent findings, new perspectives. Thromb Haemost* **74**: 234-239, 1995.
- NEWMAN PJ: *Platelet GPIIb-IIIa: Molecular variations and alloantigens. Thromb Haemost* **66**: 111-118, 1991.

- NOMURA S, MATSUZAKI T, OZAKI Y, YAMAOKA M, YOSHIMURA C, KATSURA K, XIE GL, KAGAWA H, ISHIDA T, FUKUHARA S: *Clinical significance of HLA-DRB1*0410 in Japanese patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura*. **Blood** 91: 3616-3622, 1998.
- NORIS P, SIMSEK S, DE BRUJINE-ADMIRAAL LG, PORCELJN L, HUISKES E, VAN DER VLIST GJ, VAN LEEUWEM EF, VAN DER SCHOOT CE, VON DEM BORNE AEGKR: *Max^a, a new low frequency platelet specific antigen localized on Glycoprotein IIb, is associated with Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia*. **Blood** 86: 1019-1026, 1995.
- NOVOTNY VM: *Prevention and management of platelet transfusion refractoriness*. **Vox Sang** 76: 1-13, 1999.
- NURDEN A: *Polymorphisms of human platelet membrane glycoproteins: structure and clinical significance*. **Thromb Haemost** 74: 345-351, 1995
- PANZER S, AUERBACH L, CECHOVA E, FISCHER G, HOLENSTEINER A, KITL EM, MAYR WR, PUTZ M, WAGENBICHLER P, WALCHSHOFER S: *Maternal alloimmunization against fetal platelet antigens: a prospective study*. **Br J Haematol** 90: 655-660, 1995.
- PEYRUCHAUD O, BOURRE F, MOREL-KOPP MC, REVIRON D, MERCIER P, NURDEN A, KAPLAN C: *HPA-10w^b (La^a): Genetic determination of a new platelet-specific aloantigen in glycoprotein IIIa and its expression in COS-7 cells*. **Blood** 89: 2422-2428, 1997.
- PLOW EF, GINSBERG MH: *Molecular basis of platelet function*. In: Hematology: basic principles and practice. Hoffman R , 2nd Edition, Churchill Livingstone Inc., New York, NY, pp1524-1551, 1995.
- RIDKER PM, HENNEKENS CH, SCHMITZ C, STAMPFER MJ, LINDPAINTNER K: *PL^{A1/A2} polymorphism of the platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis*. **Lancet** 349: 385-388, 1997.
- SAINIO S, JARVENPAA A-L, RENLUND M, RIIKONEN S, TERAMO K, KEKOMAKI R: *Thrombocytopenia in term infants: a population-based study*. **Obstet Gynecol** 95:441-446, 2000.

- SAINIO S, TERAMO K, KEKOMAKI R. *Prenatal treatment of severe fetomaternal alloimmune thrombocytopenia*. **Transfus Med** 9: 321-330, 1999.
- SANTOSO S, AMRHEIN J, SACHS U, MUELLER-ECKHARDT C, KIEFEL V: *Single point mutation in glycoprotein Ia responsible for the formation of a new human platelet alloantigen (SIT) involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia*. **Blood** 90 suppl.1: 261, 1997.
- SANTOSO S, BÖHRINGER M, SACHS U, KROLL H, MUELLER-ECKHARDT C, KIEFEL V. *Point mutation in human platelet glycoprotein Ib β is associated with the new platelet specific alloantigen Iy(a)*. **Blood** 88 suppl.1: 1266, 1996.
- SANTOSO S, KALB R, KROLL H, WALKA M, KIEFEL V, MUELLER-ECKHARDT C, NEWMAN PJ: *A point mutation leads to an unpaired cysteine residue and a molecular weight polymorphism of a functional platelet beta 3 integrin subunit. The Sra alloantigen system of GPIIb/IIIa*. **J Biol Chem** 269: 8439-8444, 1994.
- SANTOSO S, KALB R, WALKA M, KIEFEL V, MUELLER-ECKHARDT C, NEWMAN PJ: *The Human Platelet Alloantigens Bra and Brb are associated with a single amino acid polymorphism on Glycoprotein Ia (Integrin Subunit $\alpha 2$)*. **J Clin Invest** 92: 2427-2432, 1993a.
- SANTOSO S, KIEFEL V, MASRI R, MUELLER-ECKHARDT C: *Frequency of platelet-specific antigens among Indonesians*. **Transfusion** 33: 739-741, 1993b.
- SANTOSO S, KIEFEL V: *Human platelet-specific alloantigens: update*. **Vox Sang** 74, Suppl. II, 249-253, 1998.
- SCHNAIDT M, NORTHOFF H, WERNET D: *Frequency and specificity of platelet-specific alloantibodies in HLA-immunized haematologic-oncologic patients*. **Transfus Med** 6: 111-114, 1996.
- SCHRODER J. *Transplacental passage of blood cells*. **J Med Genet** 12: 230-242, 1975
- SEMANA G, ZAZOUN T, ALIZADEH M, MOREL-KOPP MC, GENETET B, KAPLAN C: *Genetic susceptibility and anti-human platelet antigen 5b alloimmunization: role of HLA class II and TAP genes*. **Hum Immun** 46: 114-119, 1996.
- SEO DH, PARK SS, KIM DW, FURIHATA K, UENO I, HAN KS: *Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans*. **Transfus Med** 8: 129-132, 1998.

- SHULMAN NR, REID DM: *Platelet Immunology*. In: Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, pp414-468, 1994.
- SIMSEK S, FABER NM, BLEEKER PM, VLEKKE ABJ, HUISKES E, GOLDSCHMEDING R, VON DEM BORNE AEGKR: *Determination of platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis*. **Blood** 81: 835-840, 1993.
- SIMSEK S, FOLMAN C, VAN DER SCHOOT CE, VON DEM BORNE AE: *The Arg633His substitution responsible for the private platelet antigen Gro(a) unravelled by SSCP analysis and direct sequencing*. **Br J Haematol** 97: 330-335, 1997.
- STAATZ WD, RAJPARA SM, WAYNER EA, CARTER WG, SANTORO AS: *The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen*. **J Cell Biol** 108: 1917-1924, 1989.
- STEELE CD, WAPNER RJ, SMITH JB, HAYNES MK, JACKSON LG: *Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal peripheral blood: a review*. **Clin Obstet Gynecol** 39:801-813, 1996.
- STEFFENSEN R, KACZAN E, VARMING K, JERSILD C: *Frequency of platelet-specific alloantigens in a Danish population*. **Tissue Antigens**; 48: 93-96, 1996.
- TAKADA Y, HEMLER ME: *The primary structure of the VLA-2 collagen receptor alpha-2 subunit (platelet GpIa) - homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain* **J Cell Biol** 109: 397-407, 1989.
- TANAKA S, OHNOKI S, SHIBATA H, OKUBO, Y, YAMAGUCHI H, SHIBATA Y: *Gene frequencies of human platelet antigens in glycoprotein IIIa in Japanese*. **Transfusion** 36: 814-817, 1996a.
- TANAKA S, TANIUE A, NAGAO N, OHNOKI S, SHIBATA H, OKUBO Y, YAMAGUCHI H: *Simultaneous DNA typing of human platelet antigens 2, 3 and 4 by an allele-specific PCR method*. **Vox Sang** 68, 225-230, 1995.
- TANAKA S, TANIUE A, NAGAO N, TOMITA T, OHNOKI S, SHIBATA H, OKUBO Y, YAMAGUCHI H, SHIBATA Y: *Genotype of the human platelet antigen, Ca/Tu in Japanese, determined by a PCR-RFLP method*. **Vox Sang** 70: 40-44, 1996b.

- THEERSCHKE EIA, LOPEZ JA: *Platelet membrane and receptors*. In: Thrombosis and hemorrhage, 2nd edition, Loscalzo J, Schaser AE, eds, Williams W Wilkins Inc, Baltimore, pp253, 1998.
- THUDE H, GATZKA E, ANDERS O, BARZ D: *Allele frequencies of human platelet antigen 1, 2, 3 and 5 systems in patients with chronic refractory autoimmune thrombocytopenia and in normal persons*. *Vox Sang* 77: 149-153, 1999.
- UHRYNOWSKA M, MASLANKA K, ZUPANSKA B: *Neonatal thrombocytopenia: incidence, serological and clinical observations*. *Am J Perinatol* 14:415-418, 1997.
- UHRYNOWSKA M, NIZNIKOWSKA-MARKS M, ZUPANSKA B: *Neonatal and maternal thrombocytopenia: incidence and immune background*. *Eur J Haematol* 64:42-46, 2000.
- VIJAYAN V, GOLDSCHMIDT-CLERMONT PJ, ROOS C, BRAY PF: *The PI^A2 polymorphism of integrin $\beta 3$ enhances outside-in signaling and adhesive functions*. *J Clin Invest* 6: 793-802, 2000.
- VON DEM BORNE AE, DECARY F: *ICSH/ISBT Working Party on platelet serology. Nomenclature of platelet-specific antigens*. *Vox Sang* 58: 176, 1990.
- WANG R, FURIHATA K, MC FARLAND J, FRIEDMAN K, ASTER R, NEWMAN PJ: *An amino acid polymorphism within the RGD binding domain of platelet membrane glycoprotein IIIa is responsible for the formation of the Pena/Penb alloantigen system*. *J Clin Invest* 90: 2038-2043, 1992.
- WANG R, MC FARLAND JG, KEKOMAKI R, NEWMAN PJ: *Amino acid 489 is encoded by a mutational "hot spot" on the beta 3 integrin chain: the CA/TU human platelet alloantigen system*. *Blood* 82: 3386-3391, 1993.
- WARE JA, COLLIER BS: *Platelet morphology, biochemistry and function*. In: Williams Hematology, 5th edition, Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ eds, McGraw-Hill Inc, New York, NY, pp1161-1201, 1995.
- WEATHERALL DJ: *The thalassemias*. In: Williams Hematology, 5th edition, Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ eds, McGraw-Hill Inc, New York, NY, pp581-615, 1995.

- WEISS EJ, BRAY PF, TAYBACK M, SCHULMAN SP, KICKLER TS, BECKER LC, WEISS JL, GERSTENBLITH G, GOLDSCHMIDT-CLERMONT PJ: *A Polymorphism of a Platelet Glycoprotein as an inherited risk for coronary thrombosis. N Eng J Med* 334: 1090-1094, 1996.
- WEISS HJ: *Inherited abnormalities of platelet granules and signal transduction*. In: Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, pp673-684, 1994.
- WILLIAMS Y, LYNCH S, MCCANN S, SMITH O, FEIGHERY C, WHELAN A: *Correlation of platelet FcγRIIA polymorphism in refractory idiopathic (immune) thrombocytopenia purpura. Brit J Haematol* 101: 779-782, 1998.
- WILLIAMSOM LM, HACKETT G, RENNIE J, PALMER CR, MACIVER C, HADFIELD R, HUGHES D, JOBSON S, OUWEHAND WH: *The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1^a (Pl^{A1}, Zw^a) as determined by antenatal screening. Blood* 92: 2280-2287, 1998.
- WIN N, PETERKIN MA, WATSON WH: *The therapeutic value of HPA-1a-negative platelet transfusion in post-transfusion purpura complicated by life-threatening haemorrhage. Vox Sang* 69: 138-139, 1995.
- YAGI M, EDELHOFF S, DISTECHE CM, ROTH GJ: *Structural characterization and chromosomal location of the gene encoding human platelet glycoprotein Ib beta. J Biol Chem* 269: 17424-17427, 1994.
- ZIMRIN AB, GIDWITZ S, LORD S, SCHWARTZ E, BENNETT JS, WHITE GC 2D, PONCZ M: *The genomic organization of platelet glycoprotein IIIa. J Bio Chem* 265: 8590-8595, 1990.

Apêndices

703

146-II

705

148-II

HPA-1b OF PLATELET GLYCOPROTEIN IIIa AS A RISK FACTOR FOR ARTERIAL DISEASE. V. Castro,* J.M. Annichino-Bizzacchi,* E.F. Costa, V.R. Arruda,* Hematology-Hemotherapy Center, State University of Campinas, SP, Brazil

The platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) complex contains binding sites for fibrinogen and von Willebrand factor which is fundamental for platelet aggregation, and inhibition of this receptor is beneficial in the treatment of myocardial ischemia. The platelet-glycoprotein is highly polymorphic and the transition Leu33→Pro of the GP IIIa is the molecular basis of the Human Platelet Antigen I (HPA-1), the alloantigen which is most frequently involved in immune mediated destruction of platelets. The allele HPA-1b has recently emerged as an independent risk factor for coronary arterial disease especially in patients under 60 years. The prevalence of HPA-1 varies according to genetic background, being higher among white descents. Here we described the prevalence of the allele HPA-1b among 228 Brazilian patients with arterial disease followed in the last two years and 169 normal individuals from white, black, and indians descents. The first group comprised 162 white patients survivors of myocardial infarction, confirmed by coronary arteriography. They were 116 males and 46 females, with median age of 49.4 years (range: 19-81 years), and in all of them at least one of the following risk factor were identified: hiperlipoproteinemia, hypertension, diabetes mellitus, and we defined them as the non-premature arterial disease group. The second group consisted of 66 white patients, median age of 39.8 years (17-56 years) with premature arterial disease defined by the absence of systemic disease and none of the risk factor described before, and they included: 25 survivors from myocardial infarction (17 males, 8 females), 34 patients (16 males, 18 females) suffering from cerebral arterial occlusive disease, 15 patients (5 males, 10 females) suffering from peripheral arterial occlusive disease diagnosed by an objective method. Genomic DNA was amplified by PCR and a sequence of 267 bp corresponding to a fragment of exon 2 of GP IIIa was obtained, the recognition of alleles HPA-1 a or b was carried out by digestion with endonuclease Nci I. As the prevalence of the HPA-1 varied largely among the ethnic groups studied (19% among blacks, 10% among whites, and none among indians) we decided to limit our study among patients and controls of white descents. The control group included: 66 (30 male and 36 female) individuals of Caucasian descent, age range from 19-41 years. The prevalence of HPA-1b was 3.8 times higher among the 228 patients with arterial disease than among the control group (27.6% vs. 9.9%, $P=0.002$). The odds ratio for the HPA-1b allele among patients with non-premature arterial disease was 4.21 (95% confidence interval of 1.6 to 11.6), but no difference was found when we analyzed the premature arterial disease with the control ($P=0.17$). These data suggest that the allele HPA-1b is an evident risk factor for arterial disease among Brazilian patients with myocardial infarction. However, the analysis of the premature arterial disease group failed to demonstrate the independent risk of the allele HPA-1b for systemic or coronary arterial disease.

ACTIVATED COAGULATION FACTOR VII, FACTOR VII COAGULANT ACTIVITY AND FIBRINOGEN IN PATIENTS UNDERGOING CORONARY ANGIOGRAPHY. P.T. Oundarson, S. Danielsent, J.H. Morrissey. Department of Hematology and Cardiology, Landspítalinn, University Hospital, Reykjavik, Iceland and the Cardiovascular Biology Research Program, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, Oklahoma, USA.

Since tests of coagulation could possibly identify those patients with coronary artery disease (CAD) who are at risk of acute thrombotic coronary syndromes, 401 consecutive patients who underwent coronary angiography were studied. Conventional risk factors, total factor VII coagulant activity (FVIIc), activated coagulation factor VII (FVIIa), and fibrinogen (FBG) were assessed in relation to the severity of coronary artery disease and previous clinical events. By multivariate analysis a strong positive correlation was found between FVIIa and FVIIc ($p<0.001$) but neither FVIIa nor FVIIc correlated with FBG. FVIIa was higher in females ($p=0.004$) and positively related to total cholesterol ($p=0.002$) but not related to triglyceride levels. FVIIc was also higher in women ($p=0.019$) and was positively related to triglyceride ($p<0.001$) but not to total cholesterol. FBG was positively associated with age ($p=0.019$), hypertension ($p=0.024$), smoking ($p<0.001$) and thrombocytes ($p<0.001$). Neither FVIIa, FVIIc nor fibrinogen were related to the severity of CAD (stenosis score) and all were similar in patients with stable or unstable angina pectoris. However, the FBG was higher (3.5 ± 0.7 g/l) in those with previous myocardial infarction (MI) compared to no MI (3.3 ± 0.7 g/l) ($p=0.009$). FVIIa on the other hand was lower in those with a previous MI (1.92 ± 0.7 vs. 2.12 ± 0.9 ng/ml, $p=0.017$) but FVIIc levels were not different. By stepwise logistic regression analysis a previous MI was negatively associated with FVIIa ($p=0.03$), but positively with fibrinogen ($p=0.03$), total cholesterol ($p=0.02$) and the severity of coronary disease ($p<0.001$). **Conclusion:** FVIIa was decreased and FBG increased in those patients undergoing cardiac catheterization who had a previous MI. FVIIa, FVIIc or FBG levels were not related to the severity of coronary artery disease and were similar in stable or unstable angina pectoris.

704

147-II

706

149-II

EXPRESSION OF THE FACTOR VII ACTIVATING ENZYME, HEPsin, *IN SITU* IN RENAL CELL CARCINOMA. L.R. Zacharski, W. Kisiel, S.M. Rousseau,* and V.A. Memoli*, VA Medical Center, White River Jct., Vt.; Dept. of Pathology, U. of N.M. School of Medicine, Albuquerque, N.M.; and Depts. of Medicine and Pathology, Dartmouth Medical School, Lebanon, N.H.

Renal cell carcinoma (RCC) has a striking tendency to thrive within a tumor thrombus. The tumor cells in RCC are responsible for this fibrin formation because they express *in situ* factors VII and X, thrombin-antithrombin complex neoantigen, and both activated factor X and thrombin (observed using active site-specific probes to these enzymes). Dense deposits of fibrin (i.e., thrombin-cleaved fibrinogen) were present in direct contact with individual tumor cells and tumor nodules. An unexplained discrepancy was that tissue factor (TF), the initiator of the extrinsic pathway of coagulation, was identified on the endothelium of the tumor vasculature in RCC but was not present on the tumor cells themselves. By contrast, TF has been identified on the tumor cells in small cell carcinoma of the lung and ovarian carcinoma that also manifest tumor cell-induced thrombin generation. Recently, hepsin, an integral membrane serine protease that activates factor VII, has been described. We postulated that hepsin might provide the tumor cell trigger for thrombin generation in RCC. To test this hypothesis, immunohistochemical techniques with monospecific, polyclonal antibody to hepsin were applied to RCC and other tissues. Specific staining of tumor cell membranes for hepsin was observed in all of seven cases of RCC. Hepsin was also observed on the membranes of normal hepatocytes and occasionally on the endothelium of capillaries in normal tissues. Staining of other tissues and tumor types was minimal and inconsistent. These results suggest that hepsin may be the initiator of tumor cell-induced thrombin generation in RCC.

MULTICENTER TRIAL OF ACCURATE HOME SELF-TESTING IN ORAL ANTICOAGULANT PATIENTS WITH A NOVEL WHOLE BLOOD SYSTEM. M. Andrew, J. Ansell, D. Becker,* R. Becker,* D. Triplett, A. Shepherd,* Hamilton Civic Hospitals Research Centre, Hamilton, Ontario, Canada, Boston University Hospital, Boston, MA, University of Virginia Health Science Center, Charlottesville, VA, University of Massachusetts Medical Center, Worcester, MA, Ball Memorial Hospital, Muncie, IN, The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX.

The study tested the accuracy of home monitoring as compared to the standard laboratory tests for patients receiving oral anticoagulants. Adults ($n=82$) and children ($n=11$), from multiple clinics in the US and Canada, were trained to use the ProTime® Microcoagulation System (International Technidyne Co., Edison, NJ) with a fingerstick sample. The ProTime® instrument performs five concomitant tests: 3 replicate PT and 2 controls. The study called for fingerstick self-testing at home (HOME) with matched venous samples (VS) obtained in the local hospital within 3 hours of the HOME test, for six weeks. The VS was first tested with the ProTime® System and a separate sample sent to the local laboratory (LAB) where the plasma test was conducted (ISI ranged from 1.2 to 2.1). Aliquots of plasma were frozen and shipped to a reference lab (REF) where it was tested (Ortho Recomboplastin (ISI=1.0), Ortho Diagnostics Raritan, NJ). Patient questionnaires graded the ease of instrument use at home, and the preferred method of blood sampling. No difference was detected between the ProTime® tests conducted at HOME and in the local hospital (Student's *t* test) and the results were highly correlated ($r=.92$, $n=535$). Patients were classified with respect to their prescribed therapeutic ranges: (1) in range, (2) out of range-high, and (3) out of range-low. LAB and HOME results were compared against the REF by therapeutic range classification. LAB and HOME equally predicted the REF correctly (67.9% and 67.2%, respectively). Both test methods underestimated the REF classification (24.9% and 26.1%) more frequently than overestimating the REF (7.2% and 6.7%). The correlation of HOME results to LAB by site ranged from $r=.81$ to $r=.93$ depending on the PT reagent employed. Fingerstick sampling was the preferred method for 95% of the participants. Overwhelmingly, patients graded the ProTime System easy to use at home (85%). In conclusion, the ProTime™ Microcoagulation System was easily used by patients for home PT testing resulting in INR classification similar to standard hospital testing.

BLOOD

Journal of the American Society of Hematology

American Society of Hematology
Fortieth Annual Meeting
December 4-8, 1998
Miami Beach, FL



W. B. SAUNDERS COMPANY
A DIVISION OF
HARCOURT BRACE & COMPANY

LIBRARY OF CONGRESS
PHOTOCOPY SERVICE

IVH (GRADES I-IV) BY DELIVERY METHOD AND PLATELET COUNT (% OF BABIES < 1500G)				
Delivery Method	Platelet Count			p*
	$\geq 100 \times 10^9/L$ (n = 1249)	$< 100 \times 10^9/L$ (n = 146)	$< 50 \times 10^9/L$ (n = 24)	
Overall (n = 1395)	20.7% (258/1249)	41.1% (60/146)	54.2% (13/24)	< 0.001
CSw (n = 851)	13.5% (101/747)	33.7% (35/104)	55.6% (10/18)	< 0.001
Vaginalw (n = 544)	31.3% (157/502)	59.5% (25/42)	50.0% (3/6)	< 0.001
p*	< 0.001	< 0.004	NS	

Abstract# 722

Poster Board#Session: 106-II

THROMBOPOIETIN PRODUCTION IS PRINCIPALLY REGULATED BY MEGAKARYOCYTE PROGENITOR CELL MASS RATHER THAN PLATELET COUNT IN PRETERM BABIES WITH EARLY THROMBOCYTOPENIA. T.L. Watts*, N.A. Murray*, I.A.G. Roberts. *Departments of Haematology/Neonatal Medicine, Hammersmith Hospital, Imperial College School of Medicine, London, England.*

Preterm babies frequently develop thrombocytopenia (platelets $< 150 \times 10^9/L$) within 48 hrs of birth. We have previously shown that (i) in $>80\%$ of babies this follows pregnancies with impaired placental function & is not secondary to sepsis & (ii) it is the result of impaired megakaryocytopoiesis indicated by severely reduced circulating mega-karyocytes [MK] & MK progenitors [BFU-CFU-MK] at birth. The reasons for this are unknown. To investigate the role of thrombopoietin (Tpo) in regulating platelet production in this setting we studied 24 preterm babies (gestational age 28 ± 4 wks, birth weight 900 ± 380 g), 10 with thrombocytopenia and 14 gest age-matched controls. Serial Tpo levels, MK progenitors & platelet counts were measured over the first 12d of life, & plasma levels of IL-11, IL-3 & erythropoietin (Epo) at birth. Control babies maintained normal platelet counts, Tpo levels & MK progenitor numbers & had normal Epo levels at birth (median 6.2 IU/L). In babies with early thrombocytopenia, platelet counts were low at birth ($130 \pm 14 \times 10^9/L$), fell to nadir at day 5 ($76 \pm 6 \times 10^9/L$) in all 10 babies, recovering to normal by day 12. Similarly, MK progenitor nos in these babies were markedly low at birth: median 350 ± 3896 colonies/mL in healthy babies ($p < 0.01$). However, in 5/10 thrombocytopenic babies, MK progenitor nos recovered immediately after birth: median day 1: 189 ($58-763$), day 5: 647 ($213-2310$), day 12: 2642 ($1073-9085$) colonies/mL; in the remaining 5 thrombocytopenic babies MK progenitors fell after birth to a nadir on day 5 then recovered: median day 1: 352 ($312-870$), day 5: 144 (0.527), day 12: 1050 ($200-2014$) colonies/mL. In all babies, Tpo levels precisely mirrored MK progenitor nos rather than platelet count: slightly raised at birth in thrombocytopenic babies (192 ± 160 pg/mL in controls, $p = NS$); falling gradually in the 5 babies whose MK progenitors recovered from birth (day 5: median 175 pg/mL); & rising significantly at day 5 in the babies with MK progenitor nadir at day 5 (median 647 pg/mL, $p < 0.05$). Day 12 Tpo levels were not significantly different: 150 , 165 and 189 pg/mL in controls & the 2 groups of thrombocytopenic babies, $p = NS$. IL-11 and IL-3 were not detected in plasma from either thrombocytopenic or non-thrombocytopenic babies. Epo levels at birth were higher in thrombocytopenic babies v controls ($p < 0.01$) and higher in those babies with progenitor nadir at day 5: 308.5 ± 25.4 IU/mL consistent with severe and moderate intra-uterine hypoxia respectively. These results (i) provide strong evidence that Tpo is the principal regulator of platelet production in preterm babies; (ii) suggest that the severity of impaired megakaryocytopoiesis underlying early thrombocytopenia in preterm babies reflects the degree of intra-uterine hypoxia secondary to placental insufficiency; and (iii) support the hypothesis that total c-mpl mass is important in regulating Tpo levels and that in this unique model of thrombocytopenia secondary to impaired megakaryocytopoiesis, it is MK progenitor numbers, rather than platelet numbers, that are the more important determinants of circulating Tpo concentration.

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Abstract# 723

Poster Board#Session: 107-I

THROMBOCYTOPENIA IN 3347 UNSELECTED NEWBORNS: PREVALENCE, ETHIOLOGY, AND IMPACT OF GENOTYPING FOR THE HPA SYSTEMS. V. Castro*, A.F. Origa*, M.A. Falconi*, S.T.M. Marba J.M. Annichino-Bizzacchi*, F.F. Costa, V.R. Arruda*. *Hematology-Hemotherapy Center and Neonatology Unit, State University of Campinas, SP, Brazil.*

The prevalence of neonatal thrombocytopenia (defined as a platelet count below $100 \times 10^9/L$) among unselected newborns range from 0.7 to 1.0%. Immune thrombocytopenia was detected in 0.12 to 0.3% of the overall cases, and it is commonly related to the neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). NAIT is a serious complication resulting from the materno-fetal incompatibility to the human platelet alloantigens (HPA), mainly due to HPA-1 system. However, the clinical manifestation of thrombocytopenia is often silent and delayed, which suggest that only systematic neonatal platelet count screening would allow the preventive therapy. Genotyping for all important HPA systems can be easily performed by PCR and can provide additional information to the anti-HPA antibodies data concerning materno-fetal HPA incompatibility. In this study, we determined prospectively cord-blood platelet counts from 3,347 consecutive unselected newborns of the University Hospital. Moreover using the same blood sample we extracted the genomic DNA from the newborn with thrombocytopenia and determined fetal-maternal genotypic incompatibility for the clinically relevant HPA systems (i.e. HPA-1, 2, 3, 5), and for the recently described Max-a. During 15 months, the platelet count $< 100 \times 10^9/L$ was detected in 47 newborns, however one case was removed due to platelet aggregate on the blood smear. The prevalence of thrombocytopenia was 1.3% (46 out of 3347), and severe thrombocytopenia (platelet count $< 50 \times 10^9/L$) was detected in 5 cases (0.26%). Clinical data was accessed retrospectively from all thrombocytopenic newborns and 23 out of 46 cases (51%) an identified underlying disease or drug intake that could explain the thrombocytopenia was identified. In four out of 9 cases with severe thrombocytopenia no cause was identified. Two out of over 4 thrombocytopenic newborns (46 cases) died, but none of them were related to intracranial hemorrhage or clinically relevant bleeding. In 27 out of 4 thrombocytopenic cases, we were able to genotype HPA systems from both mother and infant. The platelet count was normal in all mothers' blood sample. Genotypic incompatibility was detected in 8 out of 27 cases (29%), and in 3 cases more than one HPA system was involved (HPA-3: 4 cases; HPA-2: 3 cases; HPA-1: 3 cases; HPA-5: 3 cases). In this group, the severe thrombocytopenia was detected in two cases, and underlying cause for the thrombocytopenia was in three out of 8 cases. This study showed that thrombocytopenia among unselected newborns is relatively common find. The genotypic incompatibility for the most clinically relevant HPA systems is not a rare event in this group. Although no case NAIT was clinically recognized, the close monitoring of subsequent pregnancies would be important to estimate the risk for fetal complications and to allow preventive therapy.

Abstract# 724

Poster Board#Session: 108-I

FETAL AND NEONATAL THROMBOPOIETIN LEVELS IN ALL IMMUNE THROMBOCYTOPENIA. L. Porcelijn*, C.C. Folman*, M. C. Haas*, H.H.H. Kanhai, M.F. Murphy, A.E.G. Kr. von dem Borne, J.B. Busse CLB, Blood Supply Foundation, Amsterdam; Gynecology department, Academic Medical Center, Leiden; Hematology department, Academic Medical Center Amsterdam, The Netherlands; Hematology department, John Radcliff Hospital Oxford; Pediatric department, Cornell Medical Center, New York, USA.

Thrombopoietin (TPO) is the main hematopoietic growth factor for platelet production. Plasma TPO levels in autoimmune thrombocytopenic patients are normal or slightly elevated. Because of this relative deficiency TPO may prove to be an important therapeutic drug for this disorder.

This could also apply for neonatal or fetal alloimmune thrombocytopenia (AITP) patients. Therefore, plasma TPO levels were determined in 43 umbilical cord samples of 43 AITP fetuses before treatment, 63 umbilical cord samples of 5 AITP fetuses after treatment, 16 peripheral blood samples of untreated AITP newborns and 21 umbilical cord samples of 14 non thrombocytopenic fetuses with hemolytic disease due to red blood cell alloimmunization (RBCAI). Treatment consisted of IVIg, corticosteroids and in utero platelet transfusions.

The platelet count was $37 \pm 34 \times 10^9/L$ (mean $\pm$ sd) in pre-treatment fetal samples, $76 \pm 61 \times 10^9/L$ in post-treatment fetal samples, $68 \pm 28 \times 10^9/L$ in neonatal samples and $190 \pm 53 \times 10^9/L$ in the RBCAI fetal samples. Gestation age was 23 ± 3 weeks for the pre-treatment samples, 33 ± 4 weeks for the post-treatment samples and 28 ± 4 weeks for the RBCAI samples. The neonatal sample was from day one to day seven post partum.

Plasma TPO levels were 24 ± 15 A.U./ml (range 4-79) in pre-treatment fetal samples, 26 ± 17 A.U./ml (range 6-97) in post-treatment fetal samples, 21 ± 1 A.U./ml (range 9-47) in neonatal samples and 18 ± 8 A.U./ml (range 5-34) in the RBCAI fetal samples.

In conclusion, plasma TPO levels in all AITP samples were normal or only slightly elevated if compared to the levels in the control group (RBCAI fetal samples) and in healthy adults (normal values 4-34 A.U./ml) which suggests normal megakaryocyte and platelet production. Hence, TPO could be considered for therapy of AITP patients.