

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO DOS LINFÓCITOS T REGULADORES
NA PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA IMUNE DA
INFÂNCIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

KARINA LORENZI MARRAMARCO MAZZUCCO

Porto Alegre, Brasil
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO DOS LINFÓCITOS T REGULADORES
NA PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA IMUNE DA
INFÂNCIA**

KARINA LORENZI MARRAMARCO MAZZUCCO

**Orientador: Prof. Dr. Paulo José Cauduro Marostica
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Liane Esteves Daudt**

A apresentação dessa dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

25 / julho / 2012

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Profª Drª Mariana Bohns Michalowski

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profª Drª Lúcia Mariano da Rocha Silla

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profº Drº Lauro José Gregianin

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Mazzucco, Karina Lorenzi Marramarco
Avaliação dos linfócitos T reguladores na púrpura
trombocitopênica imune da infância / Karina Lorenzi
Marramarco Mazzucco. -- 2012.
103 f.

Orientador: Paulo José Cauduro Marostica.
Coorientadora: Liane Esteves Daudt.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,
Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Hematologia Pediátrica. 2. Púrpura Imune. 3.
Trombocitopenia. I. Marostica, Paulo José Cauduro,
orient. II. Daudt, Liane Esteves, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Aos meus pais, Rejane e Salvatore, por serem instrumentos de Deus na minha existência.

Ao meu esposo Juliano e à nossa filha Juliana, por serem a expressão do que há de mais belo a ser vivido.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Profº Dr Paulo Jose Cauduro Marostica**, pela oportunidade de realizar este projeto de pesquisa num campo de atuação tão distante do seu. À minha co-orientadora **Profª Drª Liane Esteves Daudt**, pelo grande exemplo profissional e pelo incentivo em todos os momentos de realização deste projeto. A esses dois profissionais, o meu sincero agradecimento pela confiança depositada no meu trabalho e pelo incentivo de continuar nesse caminho.

À **Profª Drª Lucia Mariano da Rocha Silla**, que acolheu a idéia do projeto de pesquisa ser realizado no Laboratório de Cultura Celular e Análise Molecular de Células Hematopoiéticas do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

À **Fernanda de Oliveira e Maria Aparecida Lima da Silva** pela disposição na realização deste projeto e a todos os estagiários do Laboratório de Cultura Celular e Análise Molecular de Células Hematopoiéticas do HCPA que contribuíram de alguma forma para a realização deste, em especial, ao **Lauro Moraes Júnior**, à **Nathália Emerim** e à **Natália Kersting**, que estiveram sempre a frente com a preparação, aquisição das amostras e a análise da citometria de fluxo.

À **Drª Christina Bittar** pelo auxílio incessante na tarefa de análise das citometrias de fluxo.

À **Drª Cristina Dornelles** pelo auxílio e esclarecimentos pertinentes à análise estatística dos dados da pesquisa.

Aos meus amados pais, Rejane e Salvatore, por serem exemplo de pessoas que muito

buscaram na vida profissional e pessoal, sendo incentivadores desde sempre na minha vida acadêmica. E, sem dúvida, pelo apoio logístico direto à realização deste trabalho, no transporte das amostras até o laboratório de pesquisa.

Ao meu esposo Juliano, pelo amor, compreensão e cuidado carinhoso com nossa filha Juliana nos momentos em que precisei estar ausente na nossa família. A vocês, o meu eterno agradecimento por fazerem parte da minha vida e torná-la cada dia mais alegre.

Às técnicas de enfermagem do Hospital da Criança Santo Antônio, pelas inúmeras coletas de sangue realizadas com presteza nas crianças durante todo o projeto de pesquisa.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Hospital da Criança Santo Antônio, junto aos seus programas de pós-graduação.

À minha querida família (pai, mãe, esposo, filha, irmão, cunhadas e cunhados, sobrinhos e sogros) e aos amigos fiéis, obrigada pelo carinho e pelo incentivo na concretização deste projeto. Nos momentos mais difíceis e solitários para mim - na ausência de vocês - sei que estavam torcendo pelo meu sucesso. Vocês são a garantia da presença de Deus em minha vida – uma bênção.

A todos os pacientes que participaram deste projeto, o meu profundo agradecimento por cooperarem com a pesquisa clínico-laboratorial em nosso país; vocês foram o incentivo maior para a busca de respostas do meu trabalho.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a frequência das células T reguladoras (Tregs) em crianças com diagnóstico novo de Púrpura Trombocitopênica Imune (PTI) e a sua associação com a contagem de plaquetas na ocasião, comparando os achados com os de controles saudáveis.

Pacientes e Métodos: Foi realizado um estudo caso-controle, no qual foram incluídos 19 pacientes com diagnóstico novo de PTI e 19 controles. Para cada um dos casos, foram coletadas quatro amostras de sangue em períodos distintos, sendo eles ao diagnóstico – antes da instituição de qualquer terapêutica – e após um, três e seis meses do mesmo. Para os controles, utilizou-se amostra de sangue de 19 pacientes saudáveis, coletadas eletivamente. Em todas as amostras de sangue foi realizada contagem de plaquetas através de hemograma e avaliação dos linfócitos Tregs (CD4+ CD25+ Foxp3) por citometria de fluxo.

Resultados: A idade média ao diagnóstico de PTI foi de $6,53 \pm 4,14$ anos. Dos 17 pacientes tratados, 13 receberam apenas corticosteróide oral e quatro pacientes receberam corticosteróide e imunoglobulina endovenosa associada em algum momento do tratamento. Em relação à evolução da doença, 14 crianças apresentaram remissão completa, duas remissão e três PTI crônica. Houve diferença estatisticamente significativa no número de plaquetas entre os grupos caso e controle nas amostras 1 e 4. Não houve diferença significativa na contagem de Tregs entre os casos e os controles em nenhum momento de coleta. Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre Tregs e o número de plaquetas entre os casos e os controles, nem nos pacientes do grupo caso ou do grupo controle analisados separadamente. Não houve diferença na contagem de células Tregs entre os grupos de pacientes crônicos e não crônicos.

Conclusão: Os achados deste estudo não nos permitiu evidenciar correlação estatisticamente significativa entre Tregs e o número de plaquetas nos grupos caso e controle. As células T CD4+ CD25+ Foxp3 (Tregs) parecem não desempenhar um papel crucial na regulação da auto-imunidade em pacientes pediátricos com diagnóstico de PTI, provavelmente, devido à existência de outros mecanismos responsáveis pela auto-imunidade em crianças, ainda não identificados.

Palavras chave: Púrpura trombocitopênica imune – Infância – Hematologia pediátrica – Trombocitopenia

ABSTRACT

Objective: To assess the frequency of regulatory T cells (Tregs) in children with a new diagnosis of Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP), and its association with the counts of platelets on the occasion, and compare with healthy controls.

Patients and Methods: A case-control study was conducted, in which 19 patients with new diagnosis of ITP and 19 controls were included. For each case, four blood samples were collected at different point times, that is, at the diagnosis – before the establishment of any treatment – and after one, three and six months. For the controls, electively collected blood samples from 19 healthy patients were used. For all blood samples, platelets were counted through a CBC and assessment of Treg lymphocytes (CD4+ CD25+ Foxp3) by flow cytometry.

Results: The mean age at the ITP diagnosis was 6.53 ± 4.14 years. Of 17 treated patients, 13 received oral corticosteroid only, and four patients received corticosteroid and associated intravenous human immunoglobulin at some point in the treatment. Regarding the disease course, 14 children showed full remission, two partial remission, and three chronic ITP. There was a statistically significant difference in the number of platelets between the case and control groups in the samples 1 and 4. There was no significant difference in the counts of Tregs between cases and controls at any collection time. No statistically significant correlation was found between Tregs and number of platelets between cases and controls, neither in patients in the case group nor in the control group who were analyzed separately. There was no difference in the counts of Treg cells between the groups of chronic and non-chronic patients.

Conclusion: The findings of this study did not show any statistically significant correlation between Tregs and number of platelets in the case and control groups. The T cells CD4+ CD25+ Foxp3 (Tregs) seems did not play a key role in the regulation of self-immunity in pediatric patients diagnosed with ITP. Other mechanisms, which aren't still identified, are likely to account for self-immunity in children.

Keywords: Immune Thrombocytopenic Purpura – Childhood – Pediatric Hematology – Thrombocytopenia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da Literatura

Figura 1 - Petéquias, equimoses e hematomas	21
Figura 2 - Manejo das crianças com PTI em oito grupos geográficos	26
Figura 3 - Imunidade natural e adquirida	27
Figura 4 - As fases de indução e efetora da imunidade mediada por células	29
Figura 5 - Funções de diferentes células apresentadoras de antígeno	30
Figura 6 - Funções efectoras dos anticorpos	32
Figura 7 - Funções do complemento	34
Figura 8 - Características fenotípicas das Tregs	35
Figura 9 - Mecanismo de maturação e diferenciação das células T	37

Metodologia

Figura 10 - Preparação da amostra de sangue periférico – diluição inicial com PBS	56
Figura 11 - Separação das células mononucleares	57
Figura 12 – Material utilizado na separação das células mononucleares e preparação da análise por citometria de fluxo	57

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura

Tabela 1 - Definições quanto às fases da doença 24

Tabela 2 – Definições quanto aos critérios de resposta ao tratamento 24

Tabelas do Artigo em Português

Tabela 1 - Dados demográficos da amostra 79

Tabela 2 - Comparação de T_{reg} e número de plaquetas entre os grupos caso e controle 80

Tabela 3 - Coeficientes de correlação entre T_{reg} e número de plaquetas 81

Tabela 4 - Comparação de T_{reg} e número de plaquetas, entre os grupos crônico e não crônico 82

Tabelas do Artigo em Inglês

Table 1 - Sample profile 95

Table 2 - Comparison of T_{reg} and platelet counts in the case and control groups 96

Table 3 - Coefficients of correlation between T_{reg} and platelet counts 97

Table 4 - Comparison between T_{reg} and platelet counts in the chronic and non-chronic IT 98

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	<i>Antigen presenting cells</i>
CBC	<i>Complete blood count</i>
CD4+ CD25+	<i>Cluster of differentiation 4+ e 5+</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
Foxp3	<i>Transcription factor forkhead box protein 3</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i>
GPIIb/IX	Glico-proteína Ib/IX
GPIIb/IIIa	Glico-proteína IIb/IIIa
H pylori	<i>Helicobacter Pylori</i>
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA-DR	<i>Human leucocitary antigen – subclass DR</i>
ICIS	<i>Intercontinental Childhood ITP Study</i>
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IV Anti-D	Imunoglobulina Anti-D endovenosa
IVIg	Imunoglobulina endovenosa humana
IWG	<i>International Work Group</i>
MHC	Major Histocompatibility Complex

mL	Mili-litro
MO	Medula óssea
NK	<i>Natural killer</i>
NR	Não-remissão
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PTI	Purpura Trombocitopênica Imune
R	Remissão
RC	Remissão completa
RNA _m	<i>Ribonucleic acid messenger</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-beta1	<i>Tumor growth factor-beta1</i>
Th1	<i>T helper 1</i>
Tregs	Linfócitos T reguladores
μL	Micro-litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 HISTÓRIA	19
2.2 INCIDÊNCIA	20
2.3 DIAGNÓSTICO	21
2.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	22
2.5 DEFINIÇÕES	23
2.6 TRATAMENTO	25
2.7 SISTEMA IMUNOLÓGICO NATURAL E ADQUIRIDO	26
2.8 FISIOPATOGENIA DA AUTO-IMUNIDADE – CÉLULAS TREGS	34
2.9 CÉLULAS TREGS E A PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA IMUNE	39
3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	44
4 OBJETIVOS	46
4.1 GERAL	47
4.2 ESPECÍFICOS	47
5 HIPÓTESE DE TRABALHO	48
6 POPULAÇÃO E MÉTODOS	50
6.1 DELINEAMENTO	51
6.2 POPULAÇÃO	51
6.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA	52
6.4 VARIÁVEIS ANALISADAS	52
6.5 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	53
6.6 LOGÍSTICA DO ESTUDO	53
6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	58
6.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	58
7 REFERÊNCIAS	60
8 ARTIGO: AVALIAÇÃO DOS LINFÓCITOS T REGULADORES NA PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA IMUNE DA INFÂNCIA	65

RESUMO	67
ABSTRACT	68
INTRODUÇÃO	69
MÉTODOS	70
Delineamento	70
Cálculo do tamanho da amostra e População	70
Preparação das células mononucleares e análise das Tregs pela citometria de fluxo	71
Análise estatística	71
RESULTADOS	72
DISCUSSÃO	74
REFERÊNCIAS	77
9 PAPER: ASSESSMENT OF REGULATORY T CELLS IN CHILDHOOD IMMUNE THROMBOCYTOPENIC PURPURA	83
ABSTRACT	85
INTRODUCTION	86
METHODS	87
RESULTS	88
DISCUSSION	90
REFERENCES	93
10 APÊNDICES	99
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	100
APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO DE PESQUISA	102

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Púrpura Trombocitopênica Imune ou Idiopática (PTI) é uma doença hemorrágica imuno-mediada que ocorre tanto na condição auto limitada aguda como na forma recorrente ou crônica. Fisiopatologicamente, caracteriza-se pela destruição precoce das plaquetas e a subsequente remoção das mesmas pelo sistema **monocítico-macrofágico**. A PTI tanto pode se apresentar isoladamente, sem que um agente causal **específico** seja identificado, como associada a infecções virais ou bacterianas, doenças do tecido conjuntivo ou ocorrer após transfusão sanguínea ou transplante de medula óssea ou ainda, ser induzida por medicamentos (IMBACH, 2006).

A maioria das crianças com PTI são previamente híidas, sendo vítimas de seu próprio sistema de defesa exuberante. Estudos recentes revelam que, em resposta a um desencadeante imune (infecção viral ou bacteriana algumas semanas antecedentes ao início do quadro) cria-se um estado pró-inflamatório associado à disfunção das células T propiciando o surgimento de auto-anticorpos plaquetários, com a consequente destruição das plaquetas através da formação do complexo antígenos de superfície das plaquetas – auto-anticorpos plaquetários (MOUZAKI *et al*, 2002).

As células T CD4+CD25+ (linfócitos T reguladores – Tregs) exercem um papel crucial na indução e manutenção da tolerância periférica, evitando a ativação e a proliferação de células T potencialmente auto-reativas que escaparam à deleção tímica. A deficiência dessas células T reguladoras pode levar ao fracasso da tolerância periférica com consequente desenvolvimento de auto-imunidade (KUWANA & IKEDA, 2006).

Tem sido proposto que os linfócitos T reguladores (CD4+ CD25+ FOXP3) possam não estar maduros em crianças entre 2 e 5 anos de idade, permitindo a produção dos auto-

anticorpos e a apresentação de antígenos pelos linfócitos B que escaparam à deleção tímica devido à reação cruzada com antígenos virais (ROARK *et al*, 2002)).

O presente estudo avaliou a quantidade de linfócitos T reguladores (TRegs – CD4+ CD25+ Foxp3+) em crianças com PTI aguda na busca de uma associação entre estes e a contagem plaquetária ao hemograma, através da análise por citometria de fluxo ao diagnóstico e até seis meses após o mesmo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRIA DA PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA IMUNE

Desde o tempo de Hipócrates, múltiplos sinais de sangramento cutâneo eram descritos como púrpura. Em 1557, Amatus Lusitanus mencionou a condição “morbus pulicaris absque febre”, referindo-se a um menino com máculas negras, lembrando picadas de pulgas, sem febre e com distúrbios hemorrágicos por vários dias, recuperando-se espontaneamente (IMBACH et al, 2002).

Em 1735, Werlhof descreveu uma doença da coagulação a qual chamou “morbus maculosus hemorrhagicus”. Em 1883, Krauss observou diminuição de plaquetas e em 1890, Hayem estabeleceu a primeira contagem plaquetária. A primeira esplenectomia em PTI foi realizada com sucesso em Praga, no ano de 1916, tornando-se o tratamento de escolha para a doença devido à falta de conhecimento acerca de sua fisiopatologia até então (IMBACH et al, 2002).

Desde 1950, tem havido um aumento nas evidências clínicas de mecanismos imunopatogênicos envolvidos na PTI. Em 1951, Harrington et al observaram que recém-nascidos de mães com PTI crônica apresentaram diminuição transitória na contagem de plaquetas, sugerindo a transferência de fatores anti-plaquetários humorais da mãe para o bebê ainda no período intra-uterino. A partir de 1975, técnicas de laboratório permitiram demonstrar aumento de plaquetas associado à imunoglobulina G (IgG) na maioria dos pacientes com trombocitopenia. Assim, em 1980, Imbach et al observou que a administração endovenosa de IgG aumentava a contagem de plaquetas em pacientes com PTI aguda e crônica.

Em 1982, Van Leeuwen et al evidenciou a presença de auto-anticorpos na PTI crônica. Em 1991, Semple e Freedman documentaram que a PTI crônica estava associada a defeito nas células T-helper CD4+ no qual as células T do sangue periférico secretavam interleucinas (IL-2) ao serem estimuladas por plaquetas autólogas. Entre 2006 e 2007, Lui B et al e Sakakura M et al, respectivamente, descreveram a associação entre as células T reguladoras (CD4+ CD25+) e a PTI (IMBACH, 2006).

2.2 INCIDÊNCIA

Considerada uma doença relativamente rara, a PTI ocorre em cerca de uma criança a cada 25.000, anualmente (LILLEYMAN JS, 1999). Segundo dados prospectivos do *Intercontinental Childhood ITP Registry*, estabelecido pelo *Intercontinental Childhood ITP Study (ICIS)* - entre junho de 1997 e maio de 2000 e que contou com dados de 2031 crianças com PTI diagnosticada entre 4 meses e 16 anos, em 136 instituições de 38 países – incluindo Brasil e Argentina da América do Sul, que colaboraram com dados de 215 pacientes - a idade média das crianças foi de 5,7 anos, sendo menores de 1 ano, 7% das crianças e maiores de 5 anos, 46% delas. 54,8% das crianças (1104) eram meninos e 45,2% eram meninas (909). O mesmo estudo registrou ainda um pico de incidência no diagnóstico de PTI na primavera e início do verão e uma queda no diagnóstico nos meses do outono (KUHNE T et al, 2001).

2.3 DIAGNÓSTICO

O padrão de apresentação da PTI em crianças inclui o surgimento súbito de hematomas, equimoses, petéquias e sangramento em mucosas (oral, nasal ou do trato gastrointestinal) associado à trombocitopenia (plaquetas abaixo de $100.000/\mu\text{L}$) de grau variável com mínimo ou nenhum trauma, vide Figura 1. O restante do hemograma (eritrócitos e leucócitos) costuma ser normal, assim como o exame físico, exceto pelas alterações já mencionadas. A incidência de hemorragia grave com risco de vida é rara (entre 0,2 e 0,9% dos casos) podendo, porém, ser fatal quando em órgãos vitais. A maioria das crianças – até 75% dos casos - apresenta recuperação espontânea em 4 a 6 meses (NUGENT, 2006).



Figura 1 - Petéquias, equimoses e hematomas (Fonte: medfoco.com.br. March 18th, 2012 Eduardo de Carvalho)

O exame da medula óssea (biópsia e aspirado de medula óssea) geralmente não é necessário para o diagnóstico da PTI. No entanto, se houver mais de uma série hematológica

alterada no hemograma (além da plaquetopenia) ou exame clínico do paciente apresentar outras alterações além das compatíveis com plaquetopenia como esplenomegalia ou linfadenomegalias, a medula óssea deverá ser obrigatoriamente avaliada antes da instituição de qualquer tipo de tratamento, para auxiliar no diagnóstico diferencial, visto a possibilidade de o corticosteróide confundir e retardar o diagnóstico de leucemia ou desencadear a síndrome de lise tumoral (NUGENT, 2006). Ainda, a avaliação da medula óssea está indicada nos casos de doença refratária ou com falha de resposta ao tratamento após 3-6 meses da instituição do mesmo (RODEGHIERO et al, 2009).

Conforme dados do ICIS, a contagem plaquetária média das crianças ao diagnóstico foi de 15.400/ μ L e 6 meses após o diagnóstico foi de 209.700/ μ L. A PTI crônica foi estabelecida em 31% das crianças, em igual incidência entre meninos e meninas, sendo apenas 5% em menores de 1 ano (KUHNE et al, 2001).

2.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Deve-se considerar no diagnóstico diferencial de PTI da infância as seguintes situações:

- a) Trombocitopenia por aumento da destruição plaquetária: Wiskott-Aldrich, infecção por Vírus da Imuno-Deficiência Humana (HIV), coagulação intravascular disseminada, púrpura trombocitopênica trombótica, síndrome hemolítico-urêmica, hiperesplenismo, síndrome linfoproliferativa auto-imune, púrpura pós-transfusional, drogas (por exemplo, heparina, quinino).
- b) Trombocitopenia por diminuição da produção plaquetária: infecções virais, toxicidade por etanol, deficiência de folato ou vitamina B12, amegacariocitose,

anemia aplásica, mielodisplasia, mielofibrose, leucemia aguda, linfoma e doença metastática.

A elucidação diagnóstica se faz importante visto a diferente abordagem terapêutica de cada uma das patologias citadas (IMBACH, 2006).

O diagnóstico de PTI primária permanece um diagnóstico de exclusão tanto de causas não auto-imunes como de causas secundárias, o que pode, muitas vezes, ser difícil para o médico assistente. Para tanto, faz-se necessário o rastreamento de patologias virais agudas, como HIV, **citomegalovirus**, toxoplasmose, Epstein-Bar vírus e lues, através das respectivas sorologias na investigação inicial. Estima-se que nos Estados Unidos, cerca de 20% dos diagnósticos de PTI em adultos tenham causas secundárias como, por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome anti-fosfolípideo, deficiências imunológicas variáveis, leucemia linfocítica crônica, síndrome linfoproliferativa auto-imune, infecção por HIV ou vírus da hepatite C (HCV), pós-vacinação, pós-transplante de medula óssea (MO) ou órgão sólido (CUKER, 2010).

2.5 DEFINIÇÕES

Em março de 2009, o *International Work Group (IWG)* publicou uma sugestão de padronização para as terminologias, definições e critérios de desfecho para a PTI em adultos e crianças, na tentativa de facilitar a análise de diversos estudos que vem sendo realizados acerca deste tema, principalmente em relação ao tratamento de doença refratária. No presente trabalho, portanto, serão utilizadas as definições sugeridas pelo *IWG*, conforme a Tabela 1:

Tabela 1: Definições quanto às fases da doença.

	Definição
Diagnóstico Novo de PTI	Até 3 meses do diagnóstico
PTI Persistente	Entre 3 e 12 meses do diagnóstico; incluindo pacientes que não adquiriram remissão espontânea ou não mantiveram a resposta após o tratamento
PTI Crônica	Duração maior que 12 meses
PTI Severa	Presença de sangramento relevante
PTI Refratária	Falha na aquisição da remissão após esplenectomia e presença de doença severa ou com risco de sangramento que necessite ser tratado
Adaptado de RODEGHIERO et al, 2009	

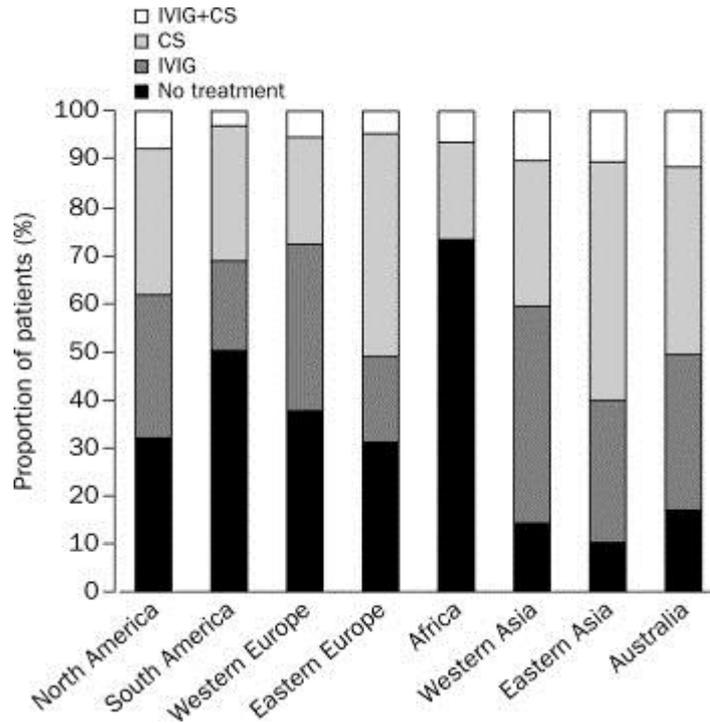
Tabela 2: Definições quanto aos critérios de resposta ao tratamento.

	Definição
Remissão Completa (RC)	Contagem de plaquetas acima de 100.000/ μ L e ausência de sangramento
Remissão (R)	Contagem de plaquetas acima de 30.000/ μ L e aumento, pelo menos, duas vezes maior que o nível basal de plaquetas e ausência de sangramento
Não Remissão (NR)	Contagem de plaquetas abaixo de 30.000/ μ L ou aumento menor que duas vezes o nível basal
Perda da Remissão Completa	Contagem de plaquetas abaixo de 100.000/ μ L ou sangramento
Perda da Remissão	Contagem de plaquetas abaixo de 30.000/ μ L ou aumento menor que duas vezes o nível basal de plaquetas ou sangramento
Adaptado de RODEGHIERO et al, 2009	

2.6 TRATAMENTO

Apenas 3% das crianças com PTI apresentam sintomatologia significativa como epistaxe severa ou sangramento do trato gastro-intestinal, este último geralmente ocorrendo com contagem de plaquetas abaixo de $10.000/\mu\text{L}$ (PROVAN et al, 2010). As preferências quanto às drogas utilizadas no tratamento de crianças com PTI variam conforme o centro de tratamento, a disponibilidade da medicação e a experiência do profissional que a está utilizando. No entanto, há consenso quanto à necessidade de tratamento para todas as crianças com sangramento severo, devendo-se considerar o tratamento naquelas com sangramento moderado ou com risco aumentado de sangramento, como por exemplo, as crianças com intensa atividade física e expostas a traumatismos de toda a espécie, cujo repouso domiciliar é ineficaz (BEARDSLEY, 2006).

Cerca de dois terços das crianças irão melhorar espontaneamente num período de até 6 meses, podendo ficar sob observação e sem necessidade de tratamento. As opções de tratamento inicial para crianças com PTI são: imunoglobulina Anti-D endovenosa - indisponível no Brasil para utilização endovenosa (IV Anti-D), imunoglobulina endovenosa humana (IVIg) e prednisona oral. Já para os casos de PTI persistente ou crônica, são opções de tratamento: Dexametasona, altas doses de Metilprednisolona (endovenosa), Rituximab (anticorpo monoclonal anti-CD20) e esplenectomia. Ainda, regimes combinados ou não das seguintes drogas: Ciclosporina A, Azatioprina, Prednisona, IV Anti-D, IVIg, Vincristina, Danazol (PROVAN et al, 2010). No *ICIS*, das 1976 crianças avaliadas quanto ao tratamento, 31% não necessitaram tratamento medicamentoso, enquanto, entre as tratadas, 29% receberam imunoglobulina endovenosa, 33% receberam corticosteróide e 7% receberam imunoglobulina endovenosa e corticosteróide (KUHNE et al, 2001). A Figura 2 ilustra os tipos de tratamentos realizados conforme a região geográfica.



IVIG=intravenous immunoglobulin, CS=corticosteroids. Management consisted of no treatment and treatment - ie, intravenous immunoglobulin, corticosteroids, or both.

Figura 2: Manejo das crianças com PTI em oito grupos geográficos (Rodeghiero et al, 2009)

Cabe ressaltar que em nosso meio, a medicação de escolha para tratamento inicial da PTI tem sido geralmente, a Prednisona oral visto a relação custo-benefício em comparação com as demais opções de tratamento.

2.7 SISTEMA IMUNOLÓGICO NATURAL E ADQUIRIDO

A função do nosso sistema imunológico é a defesa contra microorganismos infecciosos. No entanto, até substâncias estranhas não-infecciosas podem desencadear uma resposta imunológica. A imunidade natural (ou inata) é a linha de defesa inicial contra os

microorganismos, consistindo em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção. Os principais elementos do sistema imunológico natural são: as barreiras físicas e químicas (como o epitélio e as substâncias antibacterianas presentes na superfície epitelial); as células fagocitárias (neutrófilos, macrófagos) e as células NK (*natural killer*); proteínas do sangue (frações de sistema complemento e outros mediadores inflamatórios); proteínas denominadas citocinas, que regulam e coordenam várias atividades celulares (FLAJNIK & PASQUIER, 2004).

Já a imunidade adquirida, se desenvolve em resposta à infecção e consiste numa especificidade extraordinária para distinguir as diferentes moléculas e de se “lembrar” e responder com mais intensidade a exposições subsequentes ao mesmo organismo. Os principais componentes da imunidade adquirida são os linfócitos e seus produtos, como os anticorpos. O sistema imunológico adquirido age sob dois tipos de resposta: celular e humoral (ABBAS et al, 2008), vide Figura 3.

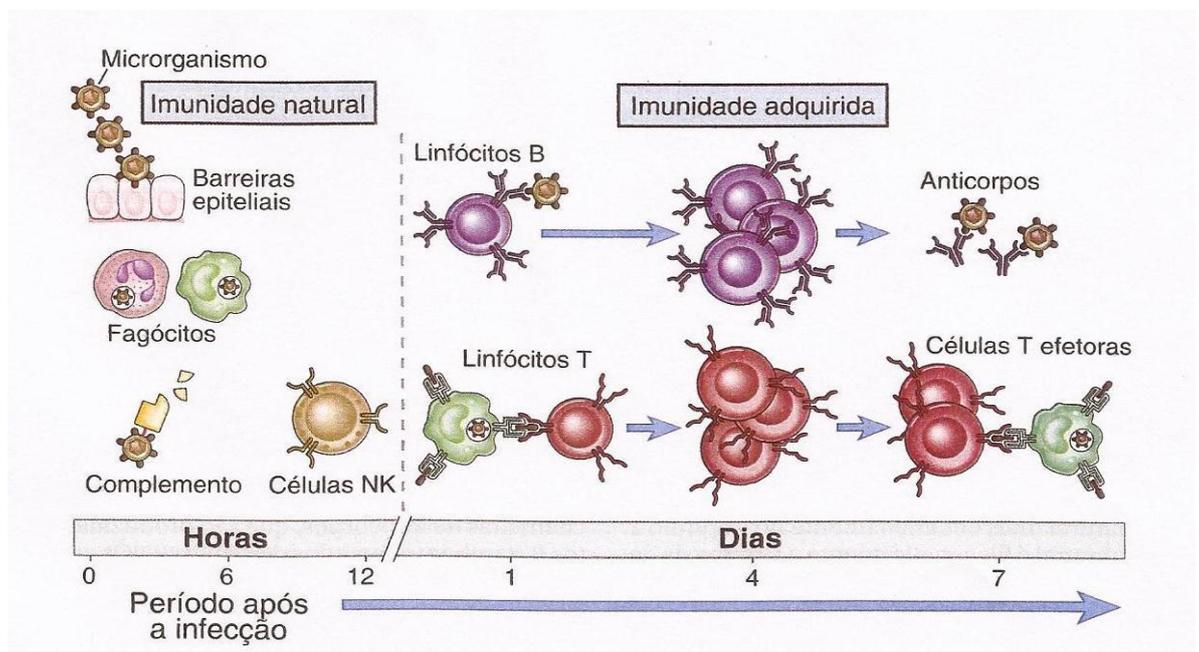


Figura 3: Imunidade natural e adquirida. Os mecanismos da imunidade natural fornecem a defesa inicial contra infecções. As respostas imunológicas adquiridas se desenvolvem posteriormente e consistem na ativação dos linfócitos. A cinética das respostas imunológicas natural e adquirida é uma estimativa e pode variar em diferentes infecções (Adaptado de ABBAS et al, 2008).

A imunidade celular é mediada pelos linfócitos T e serve como mecanismo de defesa contra microorganismos que sobrevivem e se replicam dentro de fagócitos ou células não-fagocíticas. Os linfócitos T reconhecem antígenos protéicos de microorganismos intracelulares que são apresentados na superfície de células infectadas (pelas APCs – antigen presenting cells) como peptídeos ligados a moléculas do MHC (major histocompatibility complex). Os linfócitos T CD4+ reconhecem antígenos ligados ao MHC Classe II e agem ativando macrófagos para destruir o microorganismo fagocitado, enquanto os linfócitos T CD8+, que reconhecem os antígenos ligados ao MHC Classe I, destroem diretamente as células infectadas por microorganismos intracelulares (ACKERMAN & CRESSWELL, 2004),ilustrado pela Figura 4.

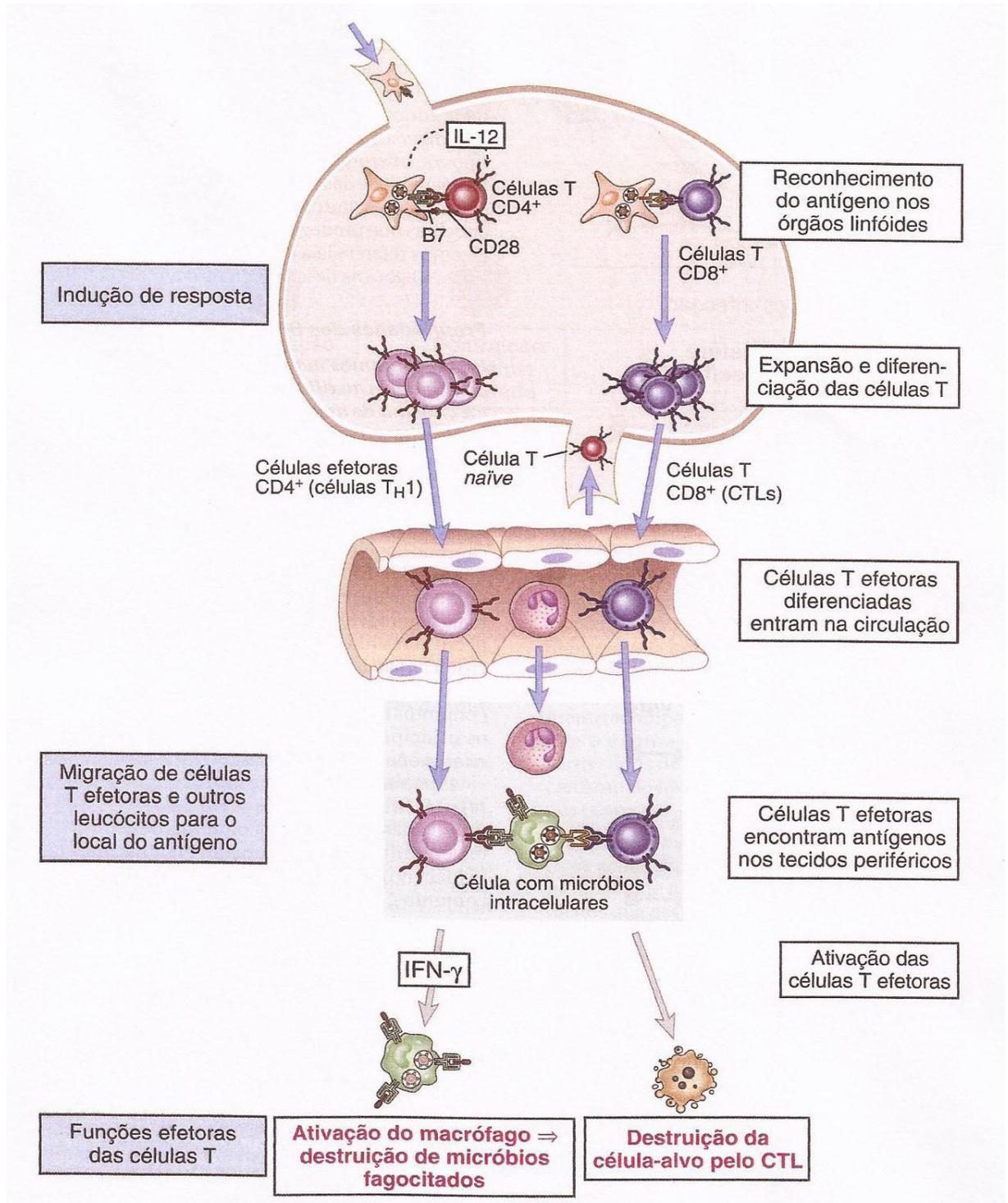


Figura 4: As fases de indução e efetora da imunidade mediada por células. As células T CD4+ e as células T CD8+ reconhecem peptídeos que são derivados de antígenos protéicos e apresentados por APCs profissionais nos órgãos linfóides periféricos. Os linfócitos T são estimulados a proliferar e se diferenciar e as células efectoras entram na circulação. Migração das células T efectoras e outros leucócitos para o local do antígeno as células T efectoras e outros leucócitos migram pelos vasos sanguíneos nos tecidos periféricos por ligação às células endoteliais que foram ativadas pelas citocinas produzidas em resposta à infecção nesses tecidos. Função efetora das células T: as células T efectoras reconhecem o antígeno nos tecidos e respondem secretando citocinas que ativam os fagócitos para erradicar a infecção. As células T CD8+ também migram para os tecidos e destroem as células infectadas (Adaptado de ABBAS et al, 2008).

As APCs especializadas (como as células dendríticas, macrófagos e linfócitos B) capturam antígenos protéicos extracelulares, interiorizam-nos e os processam, além de exibirem peptídeos associados à Classe II do MHC às células T CD4+. Todas as células nucleadas podem apresentar peptídeos derivados de proteínas **citossolicas** associados ao MHC (STERN et al, 2006), conforme ilustra a Figura 5.

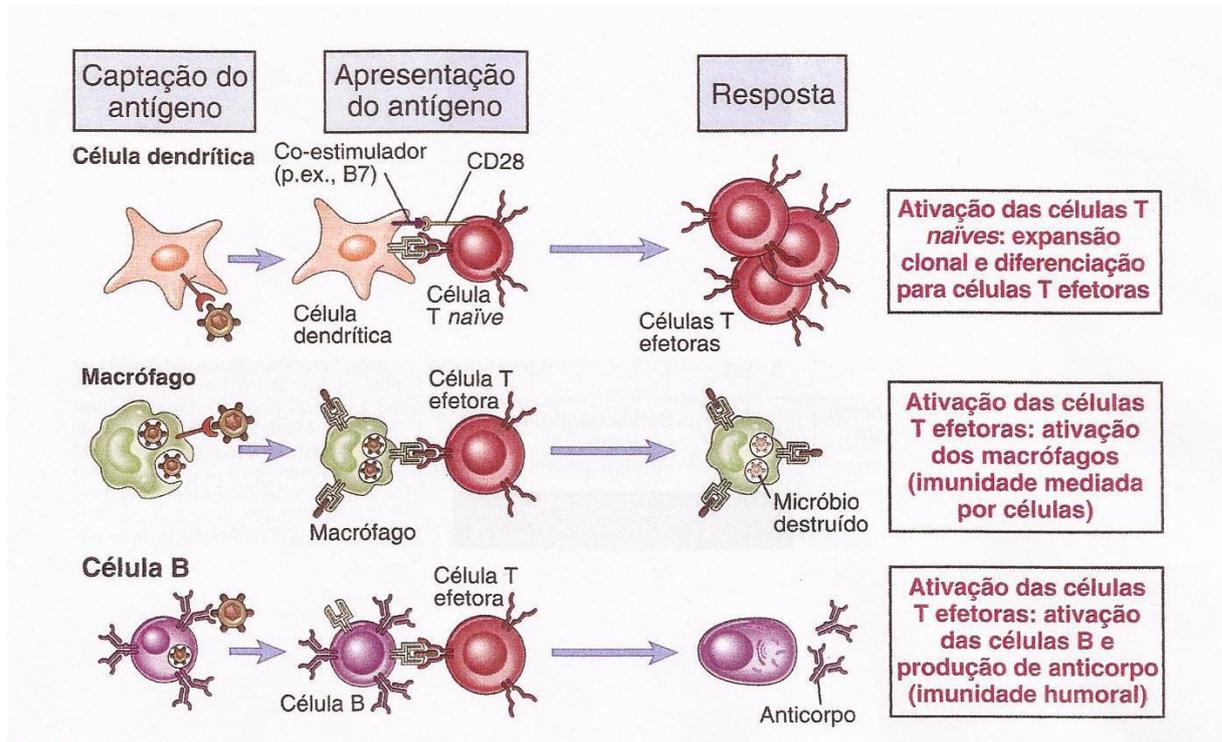


Figura 5: Funções de diferentes células apresentadoras de antígeno. Os três principais tipos de APCs para células T CD4+ funcionam exibindo antígenos em diferentes estágios e em diferentes tipos de respostas imunológicas. Observe que as células T efetoras ativam macrófagos e linfócitos B por meio da produção de citocinas e pela expressão de moléculas de superfície (Adaptado de ABBAS et al, 2008).

As reações imunológicas mediadas por células podem ocorrer de duas formas:

1) A resposta imunológica adquirida a microorganismos que residem dentro dos fagossomos dos fagócitos é mediada por linfócitos T CD4+, denominados Th1 (T helper 1), que reconhecem antígenos microbianos e ativam os fagócitos a destruir os microorganismos ingeridos. Por meio da secreção de citocinas, as células T estimulam a função e evidenciam a

atividade de células efectoras inespecíficas da imunidade natural (fagócitos), convertendo essas células em agentes da imunidade adquirida.

2) A resposta imunológica adquirida a microorganismos que infectam e se replicam no citoplasma de vários tipos celulares, incluindo células não-fagocíticas, é mediada por linfócitos T citotóxicos CD8+, que eliminam células infectadas e os reservatórios da infecção. Se as células infectadas não têm capacidade de eliminar microorganismos, a infecção só poderá ser erradicada pela destruição dessas células.

A imunidade humoral é mediada por anticorpos e sua função é a defesa contra microorganismos extracelulares e toxinas microbianas (como por exemplo, bactérias extracelulares, fungos vírus). Os anticorpos são produzidos pelos linfócitos B e plasmócitos nos órgãos linfóides (linfonodos e baço) e na medula óssea, desempenhando suas funções em locais distantes daqueles nos quais foram produzidos, uma vez que têm a capacidade de circular pelo sangue para qualquer lugar onde o antígeno esteja localizado (ABBAS et al, 2008), vide Figura 6.

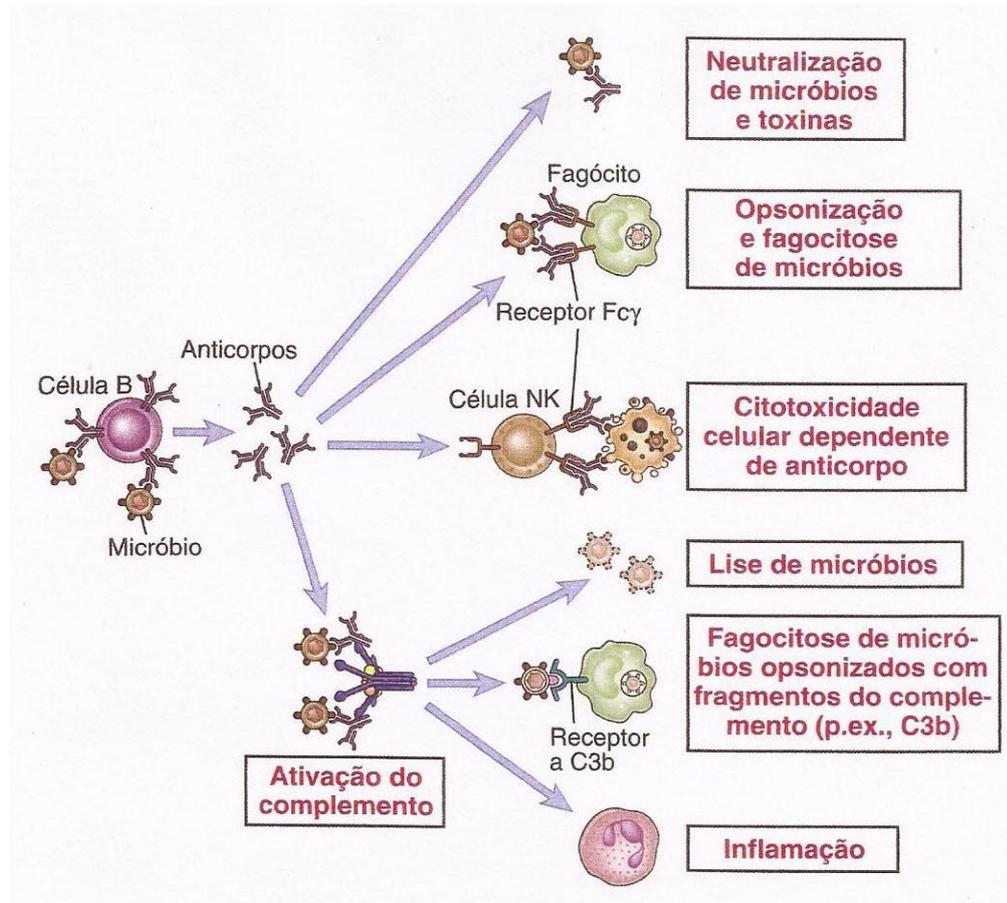


Figura 6: Funções efetoras dos anticorpos. Os anticorpos contra microorganismos (e as suas toxinas) neutralizam estes agentes, opsonizam-lhes para a fagocitose, os sensibilizam para a citotoxicidade dependente de anticorpos e ativam o sistema do complemento. Essas várias funções efetoras podem ser mediadas por diferentes isótipos de anticorpos (Adaptado de ABBAS et al, 2008).

Os fagócitos mononucleares e os neutrófilos ingerem microorganismos objetivando sua morte e degradação intracelular; os fagócitos expressam receptores para as porções Fc dos anticorpos IgG que se ligam especificamente a partículas opsonizadas (recobertas por anticorpo). Ainda, os microorganismos podem ser opsonizados por um produto de ativação do complemento (C3b), sendo fagocitados pela ligação a um receptor leucocitário para C3b. Os receptores Fc dos fagócitos promovem a fagocitose de partículas opsonizadas pelo anticorpo IgG, ocorrendo a liberação de sinais que estimulam as atividades microbicidas desse fagócito. As células NK e outros leucócitos são capazes de se ligar a antígenos opsonizados (recobertos por anticorpo) por meio de receptores Fc, destruindo-os (CARROL, 2004; CARCAO, 2003).

O sistema do complemento consiste em proteínas séricas e de superfície celular - normalmente inativas - que são ativadas apenas sob condições particulares de modo a interagir umas com as outras ou com outras moléculas do sistema imunológico de uma maneira altamente regulada para gerar produtos que eliminem os microorganismos agressores.

As vias de ativação do complemento diferem entre si na forma como são iniciadas, mas todas resultam na geração de complexos enzimáticos capazes de clivar a proteína mais abundante do complemento, a C3. A via clássica é ativada por certos isótipos de anticorpos ligados a antígenos; a via alternativa é ativada na superfície das células microbianas na ausência de anticorpos e a via da lecitina é ativada por uma lecitina plasmática que se liga a resíduos de manose nos microorganismos.

As principais funções efetoras do sistema complemento na imunidade natural e humoral específica são: a) promover a fagocitose de microorganismos nos quais o complemento está ativado; b) estimular a inflamação; c) induzir a lise desses microorganismos. Isso tudo, mediado pela ligação de fragmentos de proteínas do complemento a vários receptores da superfície celular. Ainda, produtos da ativação do complemento facilitam a ativação dos linfócitos B e a conseqüente produção de anticorpos (CARROL, 2004), conforme ilustra a Figura 7.

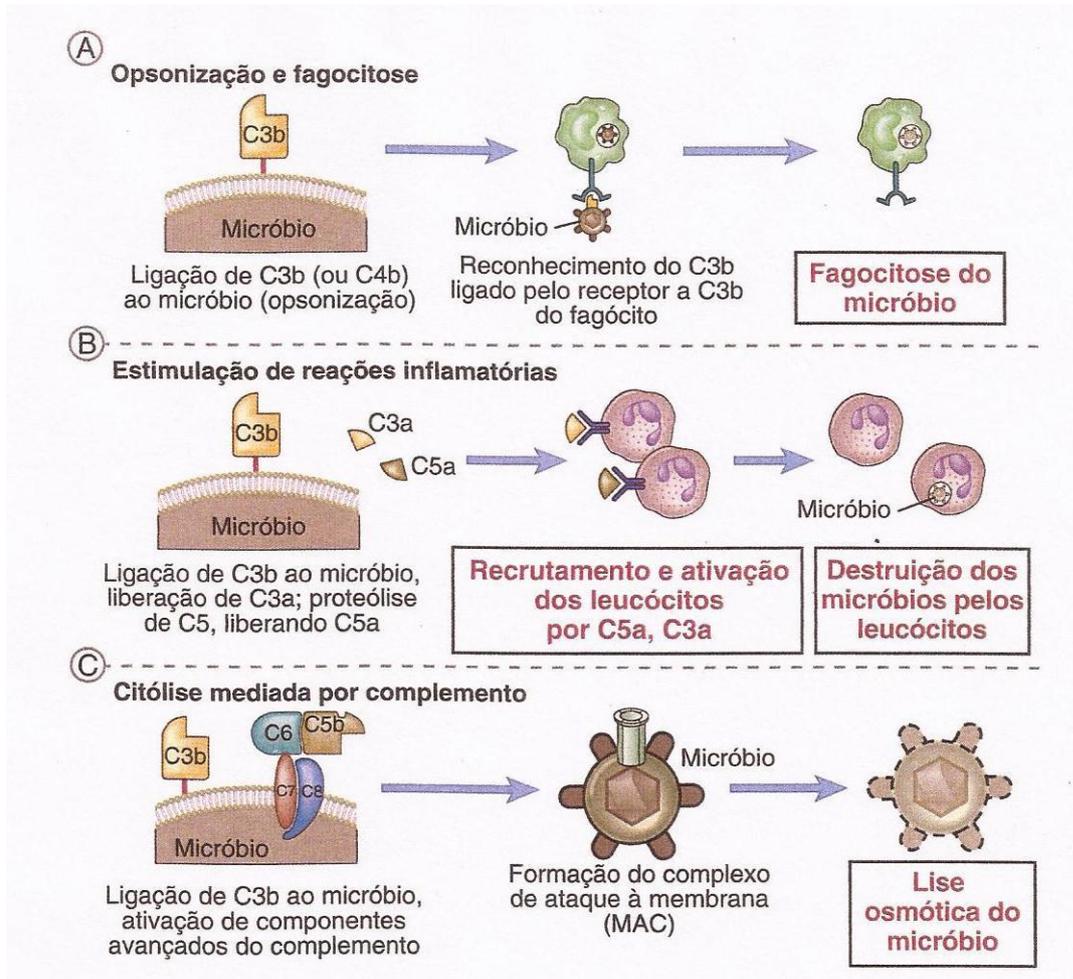


Figura 7: Funções do complemento. São exibidas as principais funções do sistema do complemento na defesa do hospedeiro. O C3b ligado à célula é uma opsonina que promove a fagocitose de células recobertas (A); os produtos proteolíticos C5a, C3a e (em menor escala) C4a estimulam o recrutamento de leucócitos e a inflamação (B); e o MAC lisa as células (C) (Adaptado de ABBAS et al, 2008).

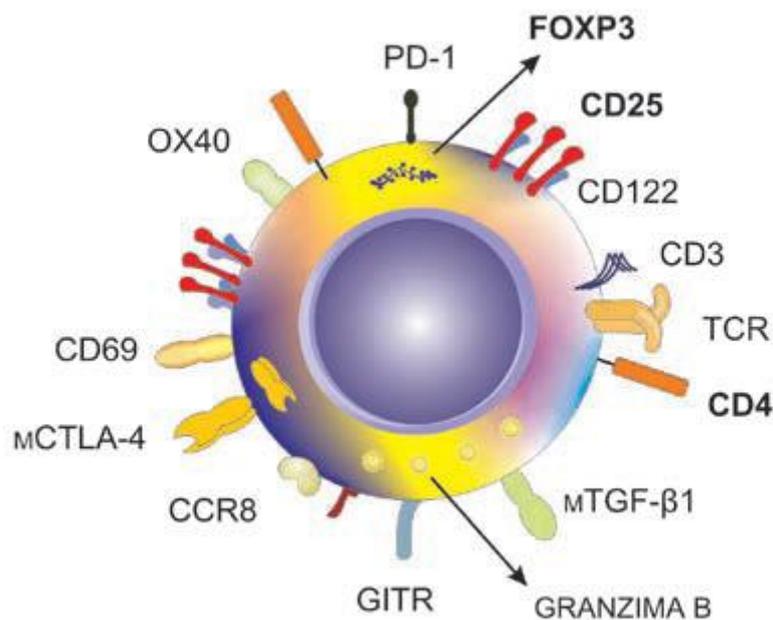
2.8 FISIOPATOGENIA DA AUTO-IMUNIDADE – CÉLULAS T REGULADORAS

A auto-imunidade é uma causa importante de doença no homem e se estima que afete pelo menos, 2 a 5% da população nos Estados Unidos. Apesar dos conhecimentos sobre auto-imunidade terem aumentado muito nas últimas décadas, a etiologia da maioria das doenças auto-ímmunes continua obscura, sendo ainda um grande desafio para a imunologia (ABBAS et al, 2008).

O sistema imune sadio precisa conseguir manter o equilíbrio entre a capacidade de responder a agentes infecciosos externos e sustentar a auto-tolerância, ou seja, impedir que o

sistema seja indevidamente ativado contra antígenos próprios. A ausência de resposta adequada submete o indivíduo aos efeitos deletérios da invasão por patógenos, enquanto que o sistema respondendo de modo exacerbado pode gerar respostas inflamatórias prejudiciais como doenças auto-imunes. Atualmente, já se sabe que a auto-imunidade é ativamente regulada por subtipos particulares de linfócitos T – os chamados linfócitos T reguladores (Tregs), que representam cerca de 5% dos linfócitos CD4⁺ do sangue periférico e se caracterizam pela expressão constitutiva de moléculas Foxp3 (*transcription factor forkhead box protein 3*), GITR (*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) e altos níveis de CD25, conforme apresentado na Figura 8 (CRUVINEL et al, 2008; ABOUL-FOTOH et al, 2011).

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS TREGS



(CRUVINEL WM, 2008)

Figura 8: Características fenotípicas das Tregs. As Tregs representam em torno de 5% do total das células T CD4⁺ no sangue periférico e são encontradas em outros tecidos. Apresentam alta expressão da cadeia α do receptor da IL-2. Foram avaliadas inicialmente pela co-expressão dos receptores CD4 e CD25 sendo que, atualmente, para sua identificação se faz necessária a pesquisa do transcrito primário, associada a baixa expressão de CD127 (CRUVINEL et al, 2008).

Para desempenhar essa função protetora adequada, os precursores linfóides T migram da medula óssea (seu local de origem) para o timo onde passam por rigoroso processo de seleção e maturação. Isto se dá mediante o reconhecimento de peptídeos próprios ligados a moléculas do MHC. Dessa forma, timócitos auto-reativos que reconhecem antígenos próprios com elevada afinidade são eliminados por deleção clonal ainda no timo. A capacidade de distinção entre antígenos próprios e não-próprios é definida como tolerância imunológica e é fundamental para evitar o auto-reconhecimento de modo intenso, que ocasionaria respostas auto-ímmunes patológicas. Ainda assim, algumas células auto-reativas podem evadir essa barreira no timo, saindo para a periferia onde são ativadas e capazes de gerar auto-ímmunidade. De forma semelhante à tolerância que ocorre no timo, a tolerância periférica refere-se às células maduras reativas que escaparam à deleção tímica e são suprimidas do sangue periférico por células imunorregulatórias, as Tregs (NUGENT, 2006; CRUVINEL et al, 2008), conforme ilustrado na Figura 9.

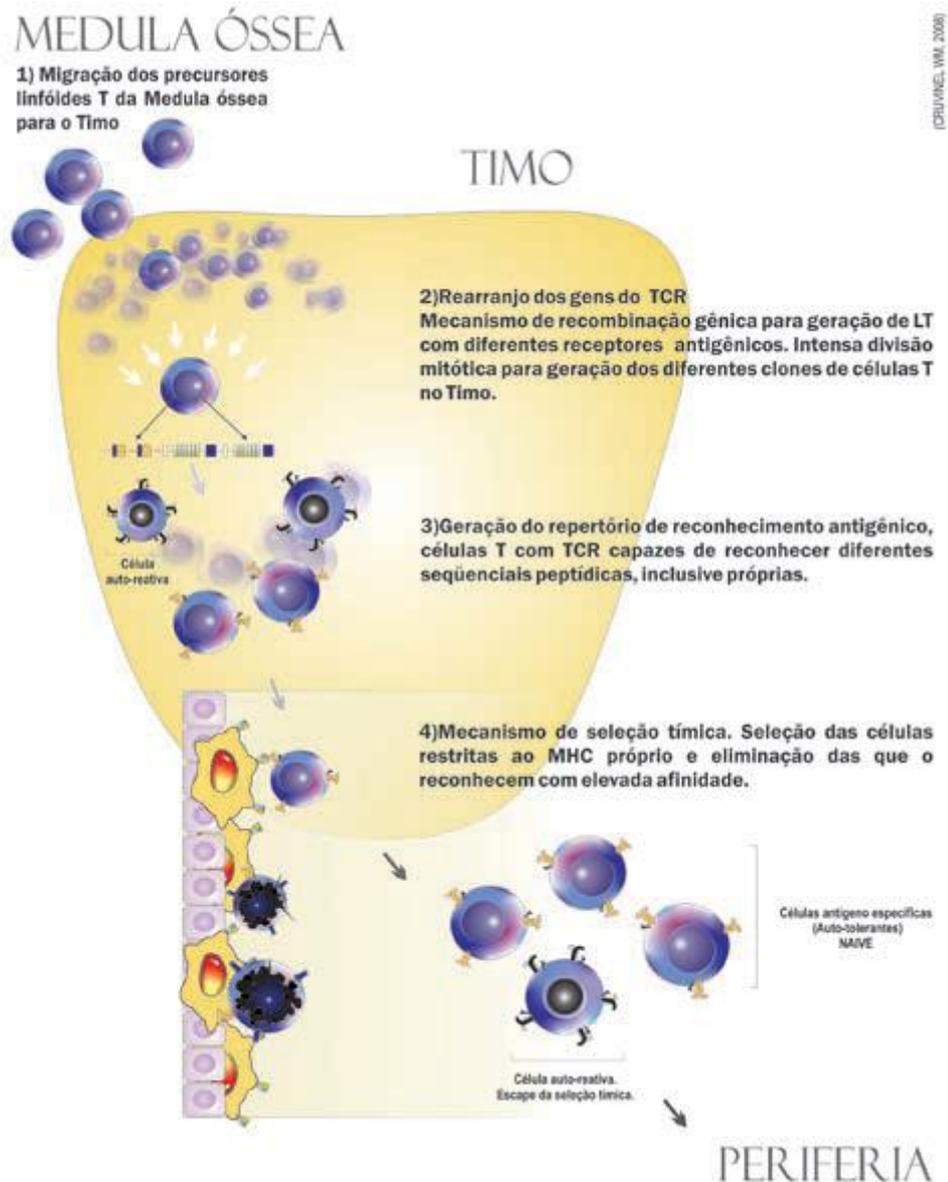


Figura 9: Mecanismo de maturação e diferenciação das células T. Migração dos precursores do linfócito T da MO para o timo e a maturação do linfócito T. Rearranjos no córtex tímico para geração do TCR, evento que gera além das células específicas para os antígenos exógenos, clones auto-reativos. Esquema do mecanismo de tolerância central para eliminação das células auto-reativas. A falha na tolerância central permite a saída para a periferia das células auto-reativas que serão controladas pelo mecanismo da tolerância periférica, entre as células T regulatórias (Adaptado de CRUVINEL et al, 2008).

Vários estudos têm documentado o importante papel do timo na produção de células T CD4⁺ CD25⁺ bem como o papel destas na prevenção da auto-imunidade. Sullivan et al, avaliaram uma população de crianças com hipoplasia tímica secundária à deleção no cromossomo 22q11.2, que resulta em síndrome DiGeorge. Aproximadamente 80% dos

pacientes com a referida deleção cromossômica apresentavam imunodeficiência devido à hipoplasia tímica e diminuição marcada nas células T CD4⁺ CD25⁺ (SULLIVAN et al, 2002).

As células T reguladoras (CD4⁺ CD25⁺) desempenham papel chave na manutenção da tolerância imunológica e controle negativo de uma variedade de respostas imunes fisiológica e patológica. A depleção completa da expressão de Foxp3 nas células Tregs é responsável pela ativação de clones de células T auto-reativas, induzindo à severa e disseminada doença auto-imune / inflamatória. Além da Foxp3 e IL-2/receptor IL-2, a deficiência ou alteração funcional de outras moléculas expressas pelas células T ou não-T pode afetar o desenvolvimento e o funcionamento das células Tregs ou células T auto-reativas e, conseqüentemente, interferir no balanço entre as duas populações na direção da auto-imunidade (SAKAGUCHI S et al, 2006).

As células Tregs têm sido bastante pesquisadas na imunologia dos transplantes quanto à doença do enxerto contra o hospedeiro e rejeição crônica do enxerto. Liu et al comparou a proporção de Tregs com a contagem absoluta destas em sangue periférico de 42 pacientes transplantados renais há mais de cinco anos, sendo que 10 deles apresentavam rejeição crônica do enxerto. Constatou que a proporção de células Tregs não foi significativamente diferente entre os grupos com rejeição crônica, grupo com enxerto estável e grupo controle; no entanto, a análise da contagem celular indicou que os pacientes estáveis apresentaram um número significativamente maior de células Tregs quando comparados ao grupo com rejeição crônica (LIU et al, 2012).

Pastore et al publicou recentemente estudo que incluiu 65 pacientes submetidos à alo-transplante de células tronco de sangue periférico de doador HLA-idêntico, no qual a relação CD3/Tregs do doador foi calculada no momento da infusão. Foi evidenciada uma diminuição significativa na incidência de doença do enxerto contra o hospedeiro (graus II-IV) no grupo

com baixa relação CD3/Tregs. Assim, concluiu que a relação CD3/Tregs do doador é capaz de prever o risco de desenvolvimento de doença do enxerto contra o hospedeiro no momento da infusão das células (PASTORE et al, 2012).

Ainda, as células T reguladoras têm sido avaliadas em pacientes infectados por *Helicobacter pylori*. Sugere-se que a erradicação da bactéria *H pylori* acompanharia a recuperação na contagem das plaquetas em aproximadamente 50% dos pacientes adultos com PTI crônica (STASI and PROVAN, 2008). Estudo de Satoh et al evidenciou que a porcentagem de células T CD4+CD25+ de sangue periférico em pacientes infectados por *H pylori* era significativamente maior que nos controles; entretanto, quando analisadas as células T CD4+CD25+Foxp3+, não houve diferença entre os pacientes infectados e os pacientes do grupo controle (SOTOH et al, 2011).

2.9 CÉLULAS T REGULADORAS E A PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA IMUNE

Tem sido proposto que nas crianças entre 2 e 5 anos de idade, os linfócitos T reguladores (CD4+, CD25+) possam não estar totalmente maduros, permitindo assim a produção de anticorpos auto-ímmunes e apresentação de antígenos (pelos linfócitos B) que tenham escapado à deleção tímica devido à reação cruzada com antígenos virais (NUGENT, 2006).

Enquanto indivíduos saudáveis são protegidos das células T auto-reativas plaqueta-específica que são suprimidas na periferia, pacientes com PTI possuem células T auto-reativas anti-plaquetárias e desequilíbrio de citocinas, sugerindo perda da tolerância periférica (SAKAGUCHI, 2008). As células T reguladoras (TRegs) tem um papel importante na manutenção da tolerância periférica e são caracterizadas pela expressão de marcador de

superfície CD25 e intracitoplasmático Foxp3, perfazendo 5-10% do total da população de células T CD4+. Os epítomos antigênicos mais comuns para os anticorpos anti-plaquetários na PTI são os receptores plaquetários GPIIb/IIIa e GPIb/IX. Ligando-se a esses sítios específicos da superfície plaquetária, os anticorpos opsonizam as plaquetas através do sistema retículo-endotelial, primariamente, no baço (ABOUL-FOTOH et al, 2011).

As células T CD4+CD25+ são responsáveis pela indução e manutenção da tolerância periférica, evitando a ativação e a proliferação de células T potencialmente auto-reativas que escaparam à deleção tímica. A deficiência dessas células T reguladoras pode levar ao grande risco de fracasso da tolerância periférica com conseqüente desenvolvimento de auto-imunidade (KUWANA M & IKEDA Y, 2006).

Na PTI, a manutenção da tolerância imune e da resposta imune efetiva pode ser alterada na presença de um processo inflamatório direcionado a outras células-alvo que não as plaquetas. Múltiplos defeitos relacionados à imunidade celular têm sido descritos nos pacientes com PTI, dentre eles níveis aumentados de HLA-DR na PTI aguda e níveis aumentados de IL-2 e IL-10 na PTI crônica (SEMPLE JW et al, 1991).

Sakakura M et al, postularam em seu estudo de 2007 que os mecanismos que mantêm a tolerância imunológica do próprio indivíduo ocorrem no sangue periférico (tolerância passiva – anergia) e no timo (seleção negativa – deleção clonal das células T auto-reativas). Entretanto, células T auto-reativas potencialmente patogênicas que escapam a estes mecanismos estão presentes no sangue periférico de indivíduos saudáveis. Os linfócitos T reguladores CD4+ CD25+ (Tregs) teriam um papel crucial na regulação destas células auto-reativas, segundo investigações recentes em modelos animais (SAKAKURA et al, 2007).

Um estudo desenvolvido por Bin Liu e Hui Zhao em 2006 com pacientes adultos com PTI evidenciou que a porcentagem de células Tregs foi significativamente menor em pacientes com PTI ativa ($5,79 \pm 1,22\%$) quando comparados aos pacientes em remissão

($11,63 \pm 4,56\%$), assim como a porcentagem entre os pacientes em remissão e os controles saudáveis ($12,68 \pm 3,59\%$) não foi significativamente diferente. Foi observado o perfil das células Tregs através de citometria de fluxo de amostra de sangue periférico de 19 pacientes com PTI ativa e 13 pacientes com PTI em remissão, tendo sido utilizados como controles células do baço de 8 pacientes com esferocitose hereditária submetidos à esplenectomia. Os resultados demonstraram que as células Tregs estão significativamente diminuídas em número e função quando os pacientes apresentam doença ativa ou em não-remissão (LIU B & ZHAO H, 2006). A diminuição do número das células Tregs pode ser responsável pelo aumento da proliferação de células mononucleares no sangue periférico e produção de IL-2 e maior produção de anticorpos anti-plaquetários (SEMPLE JW & FREEDMAN J, 1991).

Em contrapartida, Sakakura evidenciou grande variação no número de células T CD4+ CD25+ em pacientes adultos com PTI; não houve diminuição significativa no número de células Tregs no grupo de pacientes com baixa contagem de plaquetas, sugerindo que o número destas células não esteja relacionado ao início do quadro de PTI. Entretanto, o número de células Tregs foi significativamente elevado em pacientes com plaquetas $> 100.000/\mu\text{L}$. Estes achados sugerem que as células Tregs tenham um papel importante na recuperação da contagem de plaquetas; ressalta-se que 30 dos 44 pacientes do estudo foram tratados antes da avaliação das células Tregs. (SAKAKURA et al, 2007).

Neste mesmo estudo, a expressão dos níveis de Foxp3 foi significativamente alta nos casos de recuperação das contagens plaquetárias, concluindo-se que as células CD4+ CD25+ estão intimamente correlacionadas com a Foxp3. Interessantemente, o número de células CD4+ CD25+ mostrou-se significativamente elevado nos pacientes submetidos à esplenectomia como forma de tratamento (SAKAKURA et al, 2007).

Num estudo egípcio, a população de células T CD4+ CD25+ e a expressão de RNAm de TGF-beta1 foi avaliada no sangue periférico de crianças com PTI a fim de investigar a

possibilidade de prever a severidade da doença e a resposta à terapia. Foram estudadas 33 crianças com PTI (13 aguda e 20 crônica) e 10 controles saudáveis. A frequência das células Tregs esteve significativamente diminuída nos pacientes com PTI aguda e crônica em comparação aos controles. Pacientes com PTI aguda apresentaram uma porcentagem menor de células Tregs em relação aos com PTI crônica. Alta frequência de células Tregs foi encontrada em pacientes com PTI crônica e contagem de plaquetas acima de 100.000/ μ L comparados aos pacientes com plaquetas abaixo de 100.000/ μ L e em pacientes com resposta aos corticosteróides quando comparados aos não-responsivos a tal terapêutica. Os níveis de RNAm de TGF- β 1 foram significativamente menores na PTI aguda e crônica comparados aos controles e na PTI crônica com plaquetas abaixo de 100.000 comparado aos pacientes com plaquetas acima de 100.000/ μ L. Assim, foi proposta uma correlação positiva significativa entre a porcentagem de células Tregs CD4⁺ CD25⁺ e a expressão de TGF- β 1 RNAm em pacientes com PTI crônica (FAHIM NM & MONIR E, 2006).

Aboul-Fotoh et al publicou em 2011 os resultados de um estudo no qual investigou o papel das células Tregs em crianças com PTI, correlacionando com os diferentes estágios da doença. Foram incluídas 30 crianças com diagnóstico de PTI, sendo 10 casos agudos, 10 pacientes em remissão completa e 10 pacientes crônicos, além de 15 controles saudáveis. O estudo encontrou uma diminuição altamente significativa na contagem das plaquetas e de linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ nos pacientes com doença aguda quando comparados aos demais grupos e aos controles. Houve uma diminuição significativa na contagem de linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ nos doentes crônicos quando comparados aos doentes em remissão. Também foi encontrada diminuição significativa na contagem de linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ os pacientes em remissão quando comparados ao grupo controle. Ainda, houve correlação positiva entre a contagem de linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ e a contagem plaquetária em todos os

grupos, sendo significativa nos pacientes com doença aguda e não-significativa nos grupos de pacientes em remissão e com doença crônica (ABOUL-FOTOH et al, 2011).

Por fim, Yu et al observaram em estudo com 17 pacientes (entre 14 e 83 anos de idade) com PTI crônica que a frequência de Foxp3 e CD25+ em células CD4+ (Tregs) comparada a um grupo controle não evidenciou diferença estatisticamente considerável (YU et al, 2008).

3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A púrpura trombocitopênica imune é uma doença de evolução indefinida, sem marcadores conhecidos capazes de prever quais pacientes apresentarão evolução aguda, crônica ou refratária. Acredita-se que a melhor compreensão de seus mecanismos fisiopatogênicos permitiria indicar a melhor opção terapêutica, individualizando o tratamento dos pacientes acometidos pela doença.

Trabalhos recentemente publicados evidenciaram que os linfócitos T reguladores (CD4+ CD25+ Foxp3) parecem ter uma associação direta com o número de plaquetas e a resposta ao corticosteróide sistêmico na PTI. O presente estudo se propôs a traçar um perfil destes marcadores imunológicos e avaliar sua possível associação com a contagem plaquetária em crianças com diagnóstico novo de PTI, virgens de tratamento e até 6 meses após o seu diagnóstico.

4 OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar a frequência das células T reguladoras (Tregs) em crianças com diagnóstico novo de PTI e a sua associação com a contagem de plaquetas na ocasião, comparando com controles saudáveis.

4.2 ESPECÍFICOS

4.2.1 Quantificar as células Tregs em crianças com diagnóstico novo de PTI no momento do diagnóstico, em 1 mês, 3 meses e 6 meses após o diagnóstico comparando os dados encontrados nos pacientes doentes com controles saudáveis.

4.2.2 Determinar a relação existente entre a contagem de linfócitos T reguladores e a contagem de plaquetas nos períodos acima citados.

4.2.3 Descrever a população em estudo quanto à idade ao diagnóstico, apresentação clínica, terapêutica instituída e o desfecho da doença, comparando com os dados da literatura internacional.

5 HIPÓTESE DE TRABALHO

5 HIPÓTESE DE TRABALHO

As células T reguladoras - responsáveis pela auto-regulação imunológica - apresentam-se significativamente reduzidas em crianças com diagnóstico de PTI.

6 POPULAÇÃO E MÉTODOS

6 POPULAÇÃO E MÉTODOS

6.1 DELINEAMENTO:

Caso-controle prospectivo com 19 pacientes entre um e 15 anos de idade com diagnóstico novo de PTI que foi acompanhado por um período de seis meses através de hemograma completo e imunofenotipagem de sangue periférico em intervalos de tempo pré-determinado. Foram utilizados como controles, 19 pacientes saudáveis.

6.2 POPULAÇÃO

6.2.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes entre um e 15 anos de idade, internados ou avaliados ambulatorialmente no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Hospital da Criança Santo Antônio com suspeita clínica de PTI e hemograma com plaquetopenia.

6.2.2 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

- Diagnóstico de outras patologias auto-imunes prévias ou concomitantes ao diagnóstico de PTI como HIV, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide.

6.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados pacientes com diagnóstico novo de PTI atendidos na Emergência Pediátrica ou no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital da Criança Santo Antônio, no período de junho de 2010 a março de 2012. Os pais ou responsáveis dos pacientes foram entrevistados pela pesquisadora, conforme o Protocolo de Pesquisa apresentado em anexo e incluídos no estudo mediante concordância em participar do projeto de pesquisa e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), em anexo.

Os pacientes do grupo controle foram selecionados retrospectivamente, através da revisão de prontuários de pacientes com hemograma coletado de forma eletiva (como por exemplo, exames pré-operatórios da cirurgia pediátrica ou de procedimentos otorrinolaringológicos ou ainda, exames periódicos de revisão de pacientes hígidos acompanhados no ambulatório de pediatria geral). Foram excluídos desta seleção aqueles pacientes que apresentaram algum critério de exclusão conforme descrito anteriormente.

6.4 VARIÁVEIS ANALISADAS

6.4.1 VARIÁVEIS PRINCIPAIS

- Contagem de plaquetas (hemograma completo).
- Imunofenotipagem de sangue periférico por citometria de fluxo para as Tregs (CD4, CD25 e Foxp3).

6.4.2 VARIÁVEIS SECUNDÁRIAS:

- Desfecho (remissão, remissão completa, remissão parcial, doença refratária).
- Opções terapêuticas utilizadas (corticosteróide, IVIg, corticosteróide e IVIg, outras).
- Apresentação clínica ao diagnóstico (sangramento mucocutâneo, sangramento severo, assintomático).
- Sintomatologia prévia ao diagnóstico (quadro viral ou bacteriano).
- Painel de imunofenotipagem ampliado, com marcadores para células T (CD3, CD8, CD27) e células B (CD19, CD20).

6.5 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi calculado em 34 indivíduos (17 casos e 17 controles), considerando o nível de significância de 0,05 e um poder de 90% (WinPepi), para uma diferença das médias de Tregs de 1,3.

6.6 LOGÍSTICA DO ESTUDO

6.6.1 INCLUSÃO DOS PACIENTES NO ESTUDO

Os pacientes com suspeita clínica de PTI cujo hemograma apresentava plaquetopenia (abaixo de $100.000/\mu\text{L}$) admitidos no serviço de emergência pediátrica ou no ambulatório de hematologia pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital da Criança Santo Antônio eram considerados possíveis objetos do estudo. A pesquisadora era contatada

por telefone e, então, deslocava-se até o local onde o paciente estava. Ali, avaliava se o paciente preenchia os critérios de inclusão e exclusão e, se avaliação positiva, conversava com os pais ou responsáveis a respeito do objetivo do projeto de pesquisa, suas quatro coletas de sangue - que seguiriam as mesmas datas de coletas de hemograma para as consultas de revisão - e apresentava-lhes o TCLE. Após a leitura e assinatura do termo, a pesquisadora preenchia com os pais ou responsáveis os dados iniciais do Questionário de Pesquisa, conforme anexo.

6.6.2 COLETA DA PRIMEIRA AMOSTRA DE SANGUE PERIFÉRICO

Na coleta de sangue periférico ainda no setor de emergência ou na internação – na qual seriam incluídas sorologias virais e repetido hemograma, caso este fosse proveniente de outro laboratório que não o do hospital onde se encontrava o paciente - era coletado um frasco de 3 ml em EDTA a mais para a citometria de fluxo. Esse sangue era armazenado em recipiente termicamente isolado, na geladeira, por no máximo, 3 horas até a chegada no Laboratório de Cultura Celular e Análise Molecular de Células Hematopoiéticas do HCPA onde seria realizada a separação das células mononucleares para posterior análise por citometria de fluxo. Esse procedimento de coleta e análise de sangue periférico se repetiu por mais três vezes para cada um dos pacientes com diagnóstico de PTI, sendo elas: um, três e seis meses após o diagnóstico, coincidindo com os mesmos dias de coleta para hemograma da rotina do seguimento ambulatorial dos pacientes com PTI.

Os pacientes do grupo controle foram selecionados de forma retrospectiva, tendo sido utilizada apenas uma amostra de cada um deles, conforme exposto anteriormente.

6.6.3 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES PARA A ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

O material coletado (3 ml de sangue periférico em frasco com EDTA) era mantido sob refrigeração por um período máximo de 3 horas até sua chegada ao laboratório para processamento. As amostras passaram pelos seguintes procedimentos:

- 1- Diluição da amostra de sangue na proporção de 1:1 com PBS (solução salina), vide Figura 10.
- 2- Adição de FICOLL na proporção de 1:3 (FICOLL:amostra).
- 3- Centrifugação a 400G por 30 minutos a fim de separar as células mononucleares das plaquetas/eritrócitos/plasma.
- 4- Coleta da camada de polimorfonucleares com pipeta, vide Figura 11.
- 5- Lavagem para remoção do FICOLL através da adição de PBS na proporção 1:10 (amostra:PBS).
- 6- Remoção do sobrenadante e adição de 2 ml de PBS, re-suspendendo as células, para realização de contagem celular em um volume conhecido.
- 7- Contagem celular no ABX MICROS 60 ou ADVIA ou Sysmex. Início dos procedimentos de marcação celular com anticorpos monoclonais.
- 8- Colocação de 100 a 140 μ L de suspensão celular nos tubos de ensaio.
- 9- Adição de 3 μ L de anticorpos monoclonais (anti-CD4 FITC, anti CD25 PE-CY7, anti-Foxp3 PE – BD Biosciences, San Jose, California, USA); incubação por 15 minutos; lavagem das células com 2 ml de PBS e centrifugação para remoção de anticorpos monoclonais não ligados a receptores; despreza-se o sobrenadante; aos tubos com marcadores somente de superfície adiciona-se 300 μ L de paraformaldeído; aos tubos com necessidade de marcação intracitoplasmática há adição dos permeabilizantes com incubação de 10 minutos e adição do marcador monoclonal Foxp3 e incubação de 10 min; após esse tempo adiciona-se 2

ml de PBS para lavagem e retirada das soluções permeabilizantes com centrifugação por 10 min; descarta-se o sobrenadante e adiciona-se 300ul de paraformaldeído.

10- Realizada a marcação com anticorpos monoclonais se processa a aquisição das células no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, USA), através do Cellquest Pro (software), vide Figura 12.

11- Análise da citometria de fluxo.



Figura 10: Preparação da amostra de sangue periférico – diluição inicial com PBS.

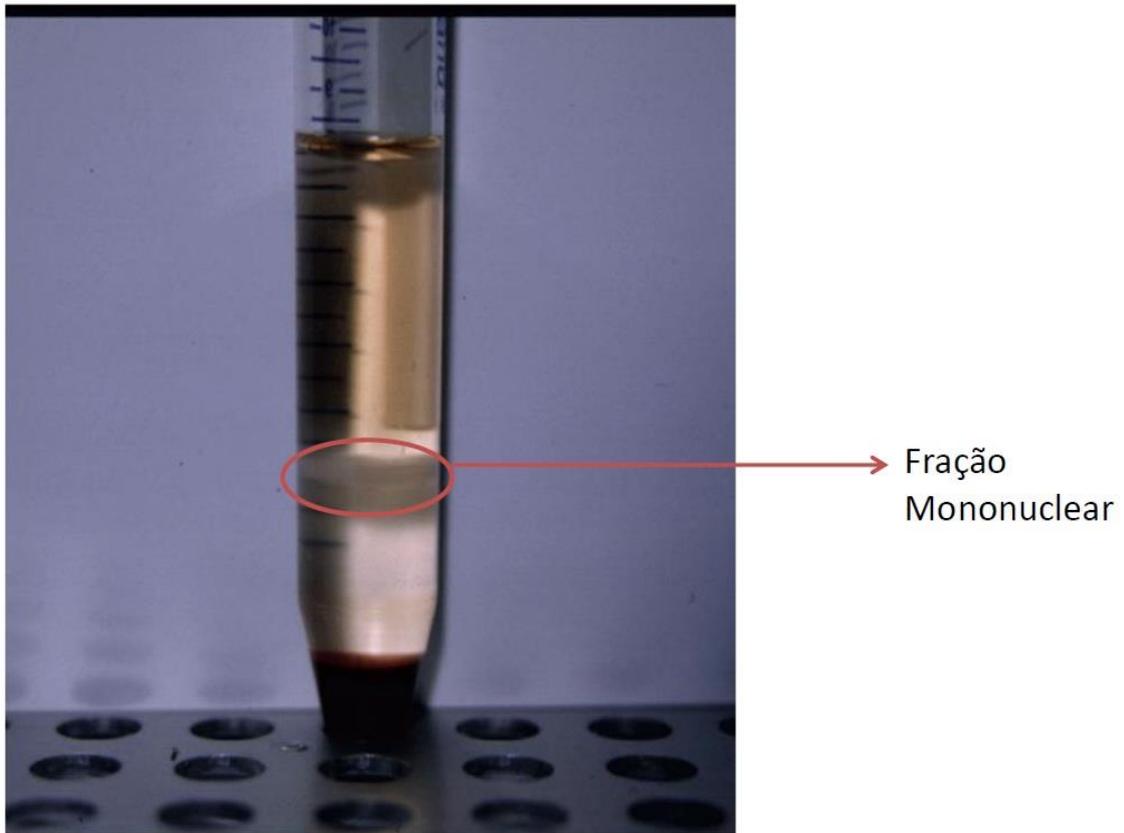


Figura 11: Separação das células mononucleares.



Figura 12: Material utilizado na separação das células mononucleares e preparação da análise por citometria de fluxo

6.6.4 DADOS COMPLEMENTARES

Foi realizada citometria de fluxo com outros anticorpos monoclonais além dos Tregs (CD3, CD8, CD27, CD19, CD20), conforme citado anteriormente, que serão analisados em trabalho futuro.

6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

- Teste de Mann-Whitney, utilizado para a comparação de Tregs e do número de plaquetas entre os grupos caso e controle.
- Teste de Friedman. É a ANOVA não-paramétrica de Friedman, utilizado para a comparação de Tregs e do número de plaquetas nos quatro momentos de coleta.
- Coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a correlação entre Treg e o número de plaquetas.

Os testes estatísticos foram realizados no SPSS 20.0, de forma bicaudal, considerando-se como estatisticamente significativos os valores $P \leq 0,05$.

6.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Complexo Hospitalar Santa Casa, obtendo aprovação de ambos para a realização do estudo.

Todos os pacientes receberam explicações individuais, junto a seus pais ou responsáveis, acerca da realização do estudo, tendo sido incluídos apenas após leitura e assinatura do TCLE.

O projeto de pesquisa elaborado para o desenvolvimento deste estudo foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, conforme consta na resolução do projeto número 08-309 e da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, sob projeto número 3065/09.

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Mecanismos efetores da imunidade celular. In *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008: 321-48.
2. Aboul-Fotoh LEM, Raheem MMA, El-Deen MAB, Osman AMM. Role of CD4+ CD25+ Cels in Chldren with Idiopatic Thrombocytopenic Purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011; 33: 81-85.
3. Ackerman AL, Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 2004; 5 (7): 678-84.
4. Beardsley DS. ITP in the 21st Century. In *American Society of Hematology. Hematology* 2006; 402-07.
5. Carcao MD, Blanchette VS, Wakefield CD. Fogamma receptor IIa e IIIb polymorphisms in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2003; 120: 135-41.
6. Carrol MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* 2004; 5 (10): 981-6.
7. Cruvinel WM, Mesquita DJ, Araujo JAP, Salmazi KC, Kallas EG, Andrade LEC. Natural regulatory T cells in rheumatic diseases. *Rev Bras Reumatol* 2008; 48: 342-55.
8. Cuker A, Cines DB. Immune Thrombocytopenia. *Hematology* 2010; 377-84.
9. Fahim NM, Monir E. Functional role of CD4+ CD25+ regulatory T cells and transforming growth factor-beta 1 in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Egypt J Immunol* 2006; 13 (1): 173-87.
10. Flajnik MF, Du PasquierL. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol* 2004; 25 (12): 640-4.

11. Imbach P, Kuhne T, Signer E. Historical aspects and present knowledge of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2002; 119 (4): 894-900.
12. Imbach P . Idiopathic thrombocytopenic purpura. In Arceci RJ, Hann IM, Smith OP. *Pediatric Hematology*. Massachusetts: Blakwell Publishing 2006. p. 526-47.
13. Kuhne T, Imbach P, Bolton-Maggs PHB, Berchtold W, Blanchette V, Buchanan GR for the Intercontinental Childhood ITP Study Group. Newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: an observational study. *Lancet* 2001; 358: 2122-5.
14. Kuwana M, Ikeda Y. Helicobacter pylori and immune thrombocytopenic purpura: unsolved questions and controversies. *Int J Hematol* 2006; 84: 309-15.
15. Lilleymann JS. Management of childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1999; 105: 871-75.
16. Liu B, Zhao H, Poon MC, Han Z, Gu D, Xu M, Jia H, Yang R, Han ZC. Abnormality of CD4+ CD25+ regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic pupura. *Eur Journal Haematology* 2006; 78: 139-43.
17. Liu L, Deng S, Teng L, Fu Q, Wang C, He X. Absolute CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cell count rather than its ratio in peripheral blood is related to long-term survival of renal allografts. *Transplant Proc* 2012; 44: 284-6.
18. Mouzaki A, Theodoropoulou M, Gianakopoulous I, Vlaha V, Kyrtsionis MC, Maniatis A. Expression Patterns of Th1 and Th2 cytokines genes in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (IPT) at presentation and their modulation by intravenous immunoglobulin G (IVIg)) treatment: their role in prognosis. *Blood* 2002; 100: 1774-79.
19. Nugent DJ. Thrombocytopenic Purpura in Childhood. *Hematology* 2006; 97-103.
20. Pastore D, Delia M, Mestice A, Carluccio P, Perrone T, Gaudio F, Curci P, Rossi AR, Ricco A, Specchia G. CD3+/Tregs ratio in donor graft is linked to acute graft-versus-host disease and immunologic recovery after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18: 887-93.

21. Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VC, Bolton-Maggs P, Bussel JB, Chong BH, Cines DB, Gernsheimer TB, Godeau B, Grainger J, Greer I, Hunt BJ, Imbach PA, Lyons G, McMillan R, Rodeghiero F, Sanz MA, Tarantino M, Watson S, Young J, Kuter DJ. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2010; 115 (2): 168-86.
22. Roark JH, Bussel JB, Cines DB, Siegel DL. Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation. *Blood*, July 2002; 100: 1388-98.
23. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Cines CB, Chong BH, Cooper N, Godeau B, Lechner K, Mazzucconi MG, McMillan R, Sanz MA, Imbach P, Blanchette V, Kuhne T, Ruggeri M, George JN. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009; 113: 2386-93.
24. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133 (5): 775-87.
25. Sakaguchi SOM, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212: 8-27.
26. Sakakura M, Wada H, Tawara I, Nobori T, Sugiyama T, Saagawa N, Shiku H. Reduced CD4⁺ CD25⁺ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thrombosis Research* 2007; 120: 187-93.
27. Satoh Y, Ogawara H, Kawamura O, Kusano M, Murakami H. Clinical significance of peripheral blood T lymphocyte subsets in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Gastroenterol Research Pract* 2012; 1-6.
28. Semple JW, Bruce S, Freedman J. Suppressed natural killer cell activity in patients with chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1991; 37: 258-62.
29. Semple JW, Freedman J. Increased antiplatelet T helper lymphocyte reactivity in patients with autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1991; 78: 2619-25.

30. Stsi R, Provan D. Helicobacter pylori and chronic IPT. Hematology 2008; 206-11.
31. Stern LJ, Potoicchio I, Santambrogio L. MHC class II compartment subtypes: structure and function. Curr Opin Immunol 2006; 18 (1): 64-9.
32. Sullivan KE, McGinn DM, Zackai EH. CD4+ CD25+ T-Cell Production in Healthy and in Patients with Thymic Hypoplasia. Clin Diag Lab Immunol 2002; 9: 1129-31.
33. Yu J, Heck S, Patel V, Levan J, Yu Y, Bussel JB, Yazdanbakhsh K. Defective circulating CD25 regulatory cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. Blood 2008; 112 (4): 325-28.

8 ARTIGO

AValiação dos Linfócitos T Reguladores na Púrpura Trombocitopênica Imune da Infância

Karina L. M. Mazzucco ¹, Lauro M. Júnior ², Liane E. Daudt ³, Paulo J. C. Marostica ⁴

¹ Aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Médica contratada do Serviço de Onco-Hematologia do Hospital da Criança Santo Antônio – Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁽²⁾ Biomédico do Laboratório de Cultura Celular e Análise Molecular de Células Hematopoiéticas, Centro de Pesquisa, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

⁽³⁾ Prof^a Adjunta do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFRGS; Prof^a do Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da UFRGS; Chefe do Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁽⁴⁾ Prof^o Associado do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFRGS; Prof^o do Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da UFRGS; Médico-Chefe da Emergência Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Projeto de pesquisa financiado pelo FIPE / HCPA.

Endereço para correspondência:

Karina Lorenzi Marramarco Mazzucco

Hospital da Criança Santo Antônio

Av Independência, 155 CEP 90035-074

Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: (51) 3214-8728 / (51) 8457-0893

E-mail: karinamazzucco@gmail.com

RESUMO

Introdução: As células T reguladoras (Tregs) parecem desempenhar importante papel na manutenção da auto-tolerância periférica, impedindo a proliferação de células T auto-reativas que, eventualmente, tenham escapado à deleção tímica. A deficiência de células Tregs estaria diretamente associada à emergência de doenças auto-imunes, entre elas a Púrpura Trombocitopênica Imune (PTI).

Objetivo: Avaliar a frequência das células T reguladoras (Tregs) em crianças com diagnóstico novo de PTI e a sua associação com a contagem de plaquetas na ocasião, comparando os achados com os de controles saudáveis.

Pacientes e Métodos: Foi realizado um estudo caso-controle, no qual foram incluídos 19 pacientes com diagnóstico novo de PTI e 19 controles. Para cada um dos casos, foram coletadas quatro amostras de sangue em períodos distintos, sendo eles ao diagnóstico – antes da instituição de qualquer terapêutica – e após um, três e seis meses do mesmo. Para os controles, utilizou-se amostra de sangue de 19 pacientes saudáveis, coletadas eletivamente. Em todas as amostras de sangue foi realizada contagem de plaquetas através de hemograma e avaliação dos linfócitos Tregs (CD4+ CD25+ Foxp3) por citometria de fluxo.

Resultados: A idade média ao diagnóstico de PTI foi de $6,53 \pm 4,14$ anos. Dos 17 pacientes tratados, 13 receberam apenas corticosteróide oral e quatro pacientes receberam corticosteróide e imunoglobulina humana endovenosa associada em algum momento do tratamento. Em relação à evolução da doença, 14 crianças apresentaram remissão completa, duas remissão e três, PTI crônica. Houve diferença estatisticamente significativa no número de plaquetas entre os grupos caso e controle nas amostras 1 e 4. Não houve diferença significativa na contagem de Tregs entre os casos e os controles em nenhum momento de coleta ($P > 0,05$). Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre Tregs e o número de plaquetas entre os casos e os controles. Não houve diferença na contagem de células Tregs entre os grupos de pacientes crônicos e não crônicos.

Conclusão: Os achados deste estudo não nos permitiram evidenciar correlação estatisticamente significativa entre Tregs e o número de plaquetas nos grupos caso e controle. As células T CD4+ CD25+ Foxp3 (Tregs) parecem não desempenhar um papel crucial na regulação da auto-imunidade em pacientes pediátricos com diagnóstico de PTI, provavelmente devido a existência de outros mecanismos responsáveis pela auto-imunidade em crianças, ainda não identificados.

Palavras chave: Púrpura trombocitopênica imune – Infância – Hematologia pediátrica – Trombocitopenia

ABSTRACT

Introduction: The regulatory T cells (Tregs) seems to have a crucial function in maintenance of peripheral auto-tolerance, preventing proliferation of T cells auto-reactive who eventually escaped to timic deletion. Tregs cells deficiency may be associate to emergence of auto-immune diseases like an Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP).

Objective: To assess the frequency of regulatory T cells (Tregs) in children with a new diagnosis of ITP, and its association with the counts of platelets on the occasion, and compare with healthy controls.

Patients and Methods: A case-control study was conducted, in which 19 patients with new diagnosis of ITP and 19 controls were included. For each case, four blood samples were collected at different times, that is, at the diagnosis – before the establishment of any treatment – and after one, three and six months. For the controls, electively collected blood samples from 19 healthy patients were used. For all blood samples, platelets were counted through a CBC and assessment of Treg lymphocytes (CD4+ CD25+ Foxp3) by flow cytometry.

Results: The mean age at the ITP diagnosis was 6.53 ± 4.14 years. Of 17 treated patients, 13 received oral corticosteroid only, and four patients received corticosteroid and associated intravenous human immunoglobulin at some point in the treatment. Regarding the disease course, 14 children showed full remission, two remission, and three chronic ITP. There was a statistically significant difference in the number of platelets between the case and control groups in the samples 1 and 4. There was no significant difference in the counts of Tregs between cases and controls at any collection time ($P>0.05$). No statistically significant correlation was found between Tregs and number of platelets between cases and controls ($P=0.373$), neither in patients in the case group nor in the control group who were analyzed separately ($P=0.997$ and $P=0.918$, respectively). There was no difference in the counts of Treg cells between the groups of chronic and non-chronic patients ($P>0.05$).

Conclusion: The findings of this study did not show any statistically significant correlation between Tregs and number of platelets in the case and control groups. The T cells CD4+ CD25+ Foxp3 (Tregs) seems did not play a key role in the regulation of self-immunity in pediatric patients diagnosed with ITP. Other mechanisms, which aren't still identified, are likely to account for self-immunity in children.

Keywords: Immune Thrombocytopenic Purpura – Childhood – Pediatric Hematology – Thrombocytopenia

INTRODUÇÃO

A Púrpura Trombocitopênica Imune (PTI) é uma doença hemorrágica imuno-mediada que afeta cerca de uma criança a cada 25.000 ao ano [1, 2], ocorrendo tanto na condição auto limitada aguda como na forma recorrente ou crônica. Caracteriza-se pela destruição precoce das plaquetas e a subsequente remoção das mesmas pelo sistema fagocítico mononuclear [3]. Cerca de 75% dos casos apresenta recuperação espontânea em 4 a 6 meses [4]. A maioria das crianças com PTI são previamente hígdas, sendo vítimas de seu próprio sistema de defesa exuberante [5].

Nas últimas duas décadas, muitos estudiosos têm contribuído para o melhor conhecimento dos mecanismos fisiopatogênicos desta doença no intuito de se identificar uma opção terapêutica individualizada para o tratamento dos pacientes acometidos pela doença.

A capacidade de distinção entre antígenos próprios e não-próprios é definida como tolerância imunológica e é fundamental para evitar o auto-reconhecimento de modo intenso, que ocasionaria respostas auto-íunes patológicas [6,7]. A tolerância periférica refere-se às células maduras reativas que escaparam à deleção tímica e são suprimidas do sangue periférico por células imunorregulatórias, as Tregs [4,6, 8]. As Tregs representam cerca de 5% dos linfócitos T CD4+ do sangue periférico e se caracterizam pela expressão constitutiva de moléculas Foxp3 (*transcription factor forkhead box protein 3*) e altos níveis de CD25 [9].

Estudos recentes demonstraram que pacientes com PTI possuem células T auto-reativas anti-plaquetárias e desequilíbrio de citocinas, sugerindo perda da tolerância periférica [10]. A deficiência de células T reguladoras pode levar ao fracasso da tolerância periférica com conseqüente desenvolvimento de auto-imunidade [11]. Ainda, a manutenção da tolerância imune e da resposta imune efetiva pode ser alterada na presença de um processo inflamatório direcionado a outras células-alvo que não as plaquetas [12].

O objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência das células T reguladoras (Tregs) em crianças com diagnóstico novo de PTI e a sua associação com a contagem de plaquetas na ocasião, comparando com achados em controles saudáveis.

Será utilizada a sugestão de padronização para as terminologias, definições e critérios de desfecho para a PTI do *International Work Group (IWG)*, conforme segue: diagnóstico novo de PTI - até 3 meses do diagnóstico; PTI persistente – entre 3 e 12 meses do diagnóstico; PTI crônica – duração maior que 12 meses; PTI refratária – falha de remissão após esplenectomia e presença de doença severa ou com risco de sangramento que necessite ser tratado; PTI severa – presença de sangramento relevante. Quanto aos Critérios de Resposta ao Tratamento: Remissão Completa (RC): contagem de plaquetas acima de 100.000/ μL e ausência de sangramento; Remissão (R): contagem de plaquetas acima de 30.000/ μL e aumento, pelo menos, duas vezes maior que o nível basal de plaquetas e ausência de sangramento; Não Remissão (NR): plaquetas abaixo de 30.000/ μL ou aumento menor que duas vezes o nível basal de plaquetas ou sangramento [13].

MÉTODOS

Delineamento: Estudo caso-controle prospectivo.

Cálculo de tamanho da amostra: O tamanho a amostra foi calculado em 34 indivíduos (17 casos e 17 controles), considerando o nível de significância de 0,05 e um poder de 90%, para uma diferença das médias das Tregs de 1,3 [9].

População: Foram incluídas no estudo 19 crianças ente um e 15 anos de idade com suspeita clínica de PTI e trombocitopenia (hemograma com $< 100.000/\mu\text{L}$ plaquetas) admitidas na emergência pediátrica de dois hospitais terciários de Porto Alegre, no período de junho de 2010 a março de 2012. Foram excluídos pacientes com outras doenças auto-ímmunes

concomitantes, como HIV, LES e artrite reumatóide. Esses pacientes foram acompanhados por um período de 6 meses, realizando coletas de amostra de sangue periférico para contagem de plaquetas através de hemograma e imunofenotipagem por citometria de fluxo para quantificação das células Tregs no diagnóstico e em um, três e seis meses após o mesmo, consideradas respectivamente, como amostras 1, 2, 3 e 4 na descrição dos resultados. Foram utilizados como controles, amostras retrospectivas de 19 pacientes hígidos da mesma faixa etária que os pacientes satisfazendo os critérios de exclusão citados acima, através da revisão de prontuários, tendo sido obtida apenas uma amostra de cada controle. O presente estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos dois hospitais nos quais foi realizado. Foi obtido termo de consentimento livre e esclarecido de todos os pais ou responsáveis dos pacientes participantes.

Preparação dos linfócitos e análise das Tregs por citometria de fluxo: Os linfócitos foram preparados através da adição de FICOLL e a marcação celular feita com anticorpos monoclonais (anti-CD4 FITC, anti-CD25 PE-CY7, anti-Foxp3 PE – BD Biosciences, San Jose, Califórnia, USA). A aquisição das células foi feita no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, USA) através do software Cellquest Pro.

Análise estatística: Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para a comparação das Tregs com o número de plaquetas entre os grupos caso e controle, na comparação de Tregs e do número de plaquetas entre os pacientes crônicos e não crônicos e na comparação dos Tregs entre os pacientes com $< 100.000/\mu\text{L}$ plaquetas e pacientes com $> 100.000/\mu\text{L}$ ao hemograma. O teste de Friedman foi utilizado para a comparação entre as Tregs e o número de plaquetas nos quatro momentos de testagem. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a força de associação entre as Tregs e o número de plaquetas. .

RESULTADOS

Foram avaliados 19 pacientes ao diagnóstico, tendo sido coletada amostra de sangue de todos esses pacientes antes da instituição de qualquer tipo de terapia medicamentosa, na chamada *amostra 1*. Quinze deles coletaram as 4 amostras de sangue em tempo adequado (ao diagnóstico, 1 mês, 3 meses e 6 meses depois) e 4 pacientes não tiveram todas as suas amostras coletadas, por motivo de abandono do projeto de pesquisa.

A idade média ao diagnóstico de PTI foi de $6,53 \pm 4,14$ anos e a mediana foi 6,33 anos, onde oito pacientes tinham idade entre 1 ano e 4 anos e 11 meses, 7 pacientes entre 5 anos e 9 anos e 11 meses e 4 pacientes tinham entre 10 e 15 anos. Ainda, 79% dos pacientes tinham entre 1 e 10 anos de idade ao diagnóstico. O grupo caso foi composto por 63% de meninas. Os dados demográficos da população do estudo estão representados na tabela 1, a seguir.

Quanto ao tratamento recebido, dois pacientes apresentaram resolução espontânea da trombocitopenia sem necessidade de tratamento medicamentoso. Dos 17 pacientes tratados, 11 receberam apenas corticosteróide oral por um período de 2 a 3 semanas e dois pacientes receberam corticosteróide por mais de 4 semanas. Quatro pacientes receberam corticosteróide e imunoglobulina humana endovenosa associada em algum momento do tratamento, sendo que 3 destes evoluíram para esplenectomia por PTI crônica. Não foi utilizada imunoglobulina isoladamente em nenhum paciente.

Em relação à evolução da PTI nas 19 crianças estudadas, 14 apresentaram remissão completa, duas remissão e três PTI crônica. Dos casos crônicos, dois entraram em remissão após esplenectomia e apenas um apresentou quadro de doença refratária.

A análise global das variáveis analisadas (Tregs e número de plaquetas) é apresentada na tabela 2, a seguir.

Houve diferença estatisticamente significativa no número de plaquetas entre os grupos caso e controle nas amostras 1 e 4. Não houve diferença significativa estatisticamente na contagem de Tregs entre os casos e os controles em nenhum dos quatro momentos de coleta ($P > 0,05$).

O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a força da correlação entre as variáveis Tregs e o número de plaquetas, nos grupos caso e controle, nos quatro momentos de coleta. Esses dados são apresentados na tabela 3, a seguir. Não houve correlação estatisticamente significativa entre Tregs e o número de plaquetas nos grupos caso e controle ($P = 0,373$), nem nos pacientes do grupo caso ou do grupo controle analisados separadamente ($P = 0,997$ e $P = 0,918$, respectivamente).

O grupo de casos foi reclassificado em casos crônicos ($n = 3$) e não crônicos ($n = 16$). Neste novo grupo foram comparadas as variáveis Tregs e o número de plaquetas através do teste de Mann-Whitney. Os dados são apresentados na tabela 4, a seguir. Não houve diferença significativa estatisticamente na contagem de células Tregs entre os grupos de pacientes crônico e não crônico ($P > 0,05$). Em relação às plaquetas, houve diferença significativa nas amostras 3 (3 meses após o diagnóstico) e 4 (6 meses após o diagnóstico), onde $P = 0,007$ e $P = 0,004$, respectivamente.

Os resultados das variáveis Treg (Treg1, Treg2, Treg3, Treg4) e número de plaquetas (plaquetas 1, plaquetas 2, plaquetas 3, plaquetas 4) obtidos nas quatro amostras, tanto do grupo de pacientes casos como de controles, foram agrupados, totalizando 85 observações.

Este novo grupo foi reclassificado pelo número de plaquetas, em até $100.000/\mu\text{L}$ (Grupo 1) e acima de $100.000/\mu\text{L}$ (Grupo 2), na tentativa de se encontrar alguma associação clinicamente relevante. A variável Treg foi comparada entre os grupos, através do teste de Mann-Whitney. Não houve diferença significativa entre a porcentagem de células Tregs nos

pacientes com plaquetas acima de 100.000/ μ L ou abaixo de 100.000/ μ L (dados não apresentados).

DISCUSSÃO

Apesar de parecer estar bem estabelecido o papel das células T reguladoras na tolerância imunológica de indivíduos normais, o que levaria a pensar que uma falha nesse sistema seria capaz de desencadear quadros de auto-imunidade [4, 6, 7, 8, 10, 18], ainda não está bem consolidado o papel das Tregs na PTI em crianças.

Estudos publicados nos últimos 10 anos são discordantes nos resultados quanto à possível relação existente entre as células Tregs e o número de plaquetas, tanto em adultos como em crianças e considerando tanto doença aguda como crônica.

Em 2006, Bin Liu e Hui Zhao publicaram estudo onde pacientes adultos com PTI aguda ou em não remissão apresentaram porcentagem significativamente menor de células Tregs quando comparados aos pacientes em remissão, sem haver diferença significativa entre as células Tregs de pacientes em remissão comparados aos controles saudáveis [14]. No mesmo ano, Fahim e Monir concluíram que a frequência das células Tregs estava significativamente diminuída em pacientes pediátricos com PTI aguda e crônica em comparação aos controles e que houve alta frequência de células Tregs em pacientes com PTI crônica e contagem de plaquetas acima de 100.000/ μ L comparados aos pacientes com plaquetas abaixo de 100.000/ μ L e em pacientes com resposta aos corticosteróides quando comparados aos não-responsivos a tal terapêutica [15].

Sakakura *et al*, evidenciaram em 2007 uma grande variação no número de células Tregs em pacientes adultos com PTI; em pacientes com baixa contagem de plaquetas, não houve diminuição significativa no número de células Tregs. Entretanto, o número de células Tregs foi significativamente elevado em pacientes com plaquetas $> 100.000/\mu$ L comparado a

controles saudáveis. Estes achados sugeriram um papel importante das células Tregs na recuperação da contagem de plaquetas; ressalta-se que apenas 7 dos 44 pacientes do estudo apresentaram diagnóstico novo; os demais pacientes apresentavam doença crônica. [16]. Yu *et al*, não evidenciaram diferença estatisticamente considerável entre a frequência de Foxp3 e CD25+ em células CD4+ (Tregs) em pacientes adultos com PTI crônica comparados a um grupo controle [17].

Os achados deste estudo não nos permitem afirmar que exista diferença estatisticamente significativa entre Tregs e o número de plaquetas nos grupos caso e controle ($P=0,373$), nem correlação com a contagem de plaquetas nos pacientes do grupo caso ou do grupo controle analisados separadamente ($P=0,997$ e $P=0,918$, respectivamente). Nosso objetivo foi avaliar a frequência das células Tregs em pacientes com diagnóstico novo de PTI na busca de uma associação com a contagem de plaquetas. Essa associação não se confirmou em nenhuma das quatro amostras coletadas. Esses achados não nos permitem avançar quanto à identificação de possíveis fatores preditores de cronicidade, nem na busca de um tratamento individualizado para uma deficiência específica de cada paciente. Provavelmente, porque existam outros mecanismos envolvidos no processo de auto-imunidade de crianças com PTI que não as Tregs.

A população deste estudo era bem definida quanto à faixa etária pediátrica (um a 15 anos) e, principalmente, quanto ao diagnóstico novo de PTI. No momento da primeira coleta de sangue periférico, todos os pacientes do grupo caso apresentavam-se sem a utilização de qualquer tipo de tratamento que pudesse mascarar a contagem real das células Tregs. Não se têm dados demonstrando a interferência do corticosteróide e da imunoglobulina endovenosa humana, por exemplo, na recuperação das células Tregs a curto e longo prazo. Ainda não é possível estabelecer se a contagem de células Tregs aferida em pacientes crônicos ou em não remissão em vigência de algum tipo de tratamento é real ou super/subestimada. Também não

é possível estabelecer se a expressão das células Tregs em adultos pode ser transponível para as crianças e vice-e-versa até o presente momento.

As células Tregs (CD4+, CD25+, Foxp3) têm sido descritas como células imunorregulatórias, capazes de suprimir células auto-reativas que escaparam à tolerância imunológica no timo e quando ativadas na periferia são capazes de desencadear o processo de auto-imunidade. A falha quantitativa das células Tregs justificaria essa hipótese. No entanto, o presente estudo não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre as Tregs e o número de plaquetas nos grupos caso e controle ($P=0,373$), como descrito por alguns autores nos últimos anos [14-16]. Resta a possibilidade de alguma falha qualitativa das células Tregs em crianças ser a responsável pelo desencadeamento do processo de auto-imunidade na PTI. A função das células Tregs além da sua contagem também poderia estar afetada nas crianças acometidas por PTI, sendo capaz de comprometer a regulação da tolerância imunológica periférica nas crianças doentes. Ou ainda, algum outro mecanismo desconhecido seria o responsável pelo desencadeamento do processo de auto-imunidade em crianças além das células Tregs. Mais estudos são necessários acerca da fisiopatogenia da PTI em crianças, uma vez que este trabalho não confirma a hipótese de diminuição das células Tregs nas crianças com doença em fase aguda, crônica ou refratária em comparação com crianças saudáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Imbach P, Kuhne T, Signer E. Historical aspects and present knowledge of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2002;119:894-900.
2. Lilleyman JS. Management of childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1999;105:871-875.
3. Imbach P. Idiopathic thrombocytopenic purpura. In: Arceci RJ, Hann IM, Smith OP, editors. *Pediatric Hematology*. Massachusetts: Blakwell Publishing; 2006. p. 526-547.
4. Nugent DJ. Immune thrombocytopenic purpura of childhood. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:97-103.
5. Mouzaki A, Theodoropoulou M, Gianakopoulos I, Vlaha V, Kyrtsolis MC, Maniatis A. Expression patterns of Th1 and Th2 cytokine genes in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) at presentation and their modulation by intravenous immunoglobulin G (IVIg) treatment: their role in prognosis. *Blood* 2002;100:1774-1779.
6. Cruvinel WM, Mesquita Jr. D., Araújo JAP, Salmazi KC, Kállas EG, Andrade LEC. Natural regulatory T cells in rheumatic diseases. *Rev Bras Reumatol* 2008;48:342- 355.
7. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212:8-27.
8. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Mecanismos Efetores da Imunidade Celular. Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 321-348.
9. Aboul-Fotoh Lel M, Abdel Raheem MM, El-Deen MA, Osman AM. Role of CD4+CD25+ T cells in children with idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011;33:81-85.
10. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775-787.

11. Kuwana M, Ikeda Y. Helicobacter pylori and immune thrombocytopenic purpura: unsolved questions and controversies. *Int J Hematol* 2006;84:309-315.
12. Semple JW, Bruce S, Freedman J. Suppressed natural killer cell activity in patients with chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1991;37:258-262.
13. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009;113:2386-2393.
14. Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Zackai EH. CD4(+) CD25(+) T-cell production in healthy humans and in patients with thymic hypoplasia. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1129-1131.
15. Liu B, Zhao H, Poon MC, Han Z, Gu D, Xu M, et al. Abnormality of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2007;78:139-143.
16. Fahim NM, Monir E. Functional role of CD4+CD25+ regulatory T cells and transforming growth factor-beta1 in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Egypt J Immunol* 2006;13:173-187.
17. Sakakura M, Wada H, Tawara I, Nobori T, Sugiyama T, Sagawa N, et al. Reduced Cd4+Cd25+ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res* 2007;120:187-193.
18. Yu J, Heck S, Patel V, Levan J, Yu Y, Bussel JB, et al. Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 2008;112:1325-1328.

Tabela 1: Dados demográficos da amostra

Grupo	Idade (em anos)	Gênero Feminino
Geral (n=38)	8,31±4,16 (1 a 15)	19 (50,0%)
Casos (n=19)	6,53±4,14 (1 a 15)	12 (63,2%)
Controles (n=19)	10,08±3,43 (2 a 14)	7 (36.8 %)

Idade apresentada em média±desvio padrão; (idade mínima a idade máxima)
Gênero apresentado número absoluto (percentual)

Tabela 2: Comparação de Treg e número de plaquetas entre os grupos caso e controle

Variável	Casos	Controles	Valor P
Treg 1 (n=19)	0,11 (0,06 a 0,26)	0,22 (0,01 a 0,40)	0,908
Plaquetas 1 (n=19)	12.473 (4.000 a 13.000)	300.000 (240.000 a 375.000)	<0,0001
Treg 2 (n=16)	0,13 (0,05 a 0,31)	0,22 (0,01 a 0,40)	0,987
Plaquetas 2 (n=16)	215.687 (91.250 a 338.750)	300.000 (240.000 a 375.000)	0,076
Treg 3 (n=16)	0,13 (0,02 a 0,23)	0,22 (0,01 a 0,40)	0,659
Plaquetas 3 (n=16)	215.812 (81.000 a 348.000)	300.000 (240.000 a 375.000)	0,066
Treg 4 (n=15)	0,10 (0,03 a 0,16)	0,22 (0,01 a 0,40)	0,410
Plaquetas 4 (n=15)	248.000 (113.000 a 315.000)	300.000 (240.000 a 375.000)	0,033

Dados apresentados em mediana (intervalo interquartil), valores em percentual.
Valor P referente ao teste de Mann-Whitney

Treg1 = % Tregs na 1ª amostra (ao diagnóstico)

Treg2 = % Tregs na 2ª amostra (1 mês)

Treg3 = % Tregs na 3ª amostra (3 meses)

Treg4 = % Tregs na 4ª amostra (6 meses)

Pla1 = contagem de plaquetas na 1ª amostra (ao diagnóstico)

Pla2 = contagem de plaquetas na 2ª amostra (1 mês)

Pla3 = contagem de plaquetas na 3ª amostra (3 meses)

Pla4 = contagem de plaquetas na 4ª amostra (6 meses)

Tabela 3: Coeficientes de correlação entre Treg e número de plaquetas

Variáveis	Coeficiente de correlação	Valor P
Casos e Controles Treg 1 e Plaquetas 1 (n=38)	0,149	0,373
Controles Treg 1 e Plaquetas 1 (n=19)	-0,025	0,918
Casos Treg 1 e Plaquetas 1 (n=19)	0,001	0,997
Casos Treg 2 e Plaquetas 2 (n=16)	0,108	0,535
Casos Treg 3 e Plaquetas 3 (n=16)	0,020	0,911
Casos Treg 4 e Plaquetas 4 (n=15)	0,131	0,460

Treg1 = % Tregs na 1ª amostra (ao diagnóstico)

Treg2 = % Tregs na 2ª amostra (1 mês)

Treg3 = % Tregs na 3ª amostra (3 meses)

Treg4 = % Tregs na 4ª amostra (6 meses)

Pla1 = contagem de plaquetas na 1ª amostra (ao diagnóstico)

Pla2 = contagem de plaquetas na 2ª amostra (1 mês)

Pla3 = contagem de plaquetas na 3ª amostra (3 meses)

Pla4 = contagem de plaquetas na 4ª amostra (6 meses)

Tabela 4: Comparação de Treg e número de plaquetas, entre os grupos crônico e não crônico

Variável	Crônico	Não crônico	Valor P
Treg 1 (n=19)	0,09 (0,02 a 0,11)	0,12 (0,06 a 0,33)	0,254
Plaquetas 1 (n=19)	5.000 (4.000 a 13.000)	6.000 (4.000 a 13.000)	0,793
Treg 2 (n=16)	0,10 (0,04 a 0,14)	0,15 (0,05 a 0,36)	0,364
Plaquetas 2 (n=16)	136.000 (22.000 a 256.000)	252.000 (104.500 a 341.500)	0,364
Treg 3 (n=16)	0,10 (0,06 a 0,73)	0,16 (0,02 a 0,22)	0,704
Plaquetas 3 (n=16)	24.000 (15.000 a 81.000)	275.000 (138.000 a 370.500)	0,007
Treg 4 (n=15)	0,08 (0,03 a 0,10)	0,11 (0,04 a 0,21)	0,448
Plaquetas 4 (n=15)	21.000 (17.000 a 30.000)	254.500 (184.250 a 316.500)	0,004

Dados apresentados em mediana (intervalo interquartil), valores em percentual.
Valor P referente ao teste de Mann-Whitney

Treg1 = % Tregs na 1ª amostra (ao diagnóstico)

Treg2 = % Tregs na 2ª amostra (1 mês)

Treg3 = % Tregs na 3ª amostra (3 meses)

Treg4 = % Tregs na 4ª amostra (6 meses)

Pla1 = contagem de plaquetas na 1ª amostra (ao diagnóstico)

Pla2 = contagem de plaquetas na 2ª amostra (1 mês)

Pla3 = contagem de plaquetas na 3ª amostra (3 meses)

Pla4 = contagem de plaquetas na 4ª amostra (6 meses)

9 PAPER

Assessment of regulatory T cells in childhood immune thrombocytopenic purpura

Karina L. M. Mazzucco¹, Lauro M. Júnior², Liane E. Daudt³, Paulo J. C. Marostica⁴

¹Master's candidate, Graduate Program in Child and Adolescent Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) School of Medicine, Porto Alegre, RS, Brazil. Staff physician, Department of Oncology and Hematology, Hospital da Criança Santo Antônio – Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Biomedical of Cellular Culture Laboratory and Molecular Analysis of Stem Cells, Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil.

³Adjunct Professor, UFRGS Department of Pediatrics of School of Medicine, Porto Alegre, RS, Brazil; Professor, Graduate Program in Child and Adolescent Health of UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil; Chief of Hematology and Bone Marrow Transplant Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Associate Professor, UFRGS Department of Pediatrics of School of Medicine, Porto Alegre, RS, Brazil. Professor, Graduate Program in Child and Adolescent Health of UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. Chief of Pediatric Emergency Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author

Karina L. M. Mazzucco

Hospital da Criança Santo Antônio, Av Independência, 155

Porto Alegre, RS, Brazil - CEP 90035-074

Fone: (51) 3214-8728 / (51) 8457-0893

E-mail: karinamazzucco@gmail.com

The authors have no conflicts of interest.

ABSTRACT

Objective: To assess the frequency of T_{regs} in children newly diagnosed with ITP and ascertain whether an association exists between T_{regs} and platelet counts, by means of a comparison with healthy controls.

Patients and Methods: This case-control study included 19 patients newly diagnosed with ITP - whose blood samples were collected at four points in time: before any therapy and 1, 3, and 6 months after diagnosis - and 19 healthy controls. T_{regs} ($CD4^+ CD25^+ \text{Foxp3}$ T cells) were evaluated by flow cytometry.

Results: Mean age at diagnosis of ITP was 6.53 ± 4.14 years. There was a statistically significant difference in platelet count between the case and control groups in samples 1 and 4. There were no significant differences in T_{reg} counts between cases and controls at any point during the course of the study and no difference in T_{reg} counts between the chronic and non-chronic groups and no significant correlation between T_{regs} and platelet counts in the case and control groups.

Conclusion: The findings of this study did not show any statistically significant correlation between T_{regs} and number of platelets in the case and control groups. T_{regs} cells seems did not play a role in the regulation of autoimmunity in children with ITP. This autoimmunity is likely mediated by other mechanisms, which have yet to be established.

Keywords: Immune thrombocytopenic purpura; Childhood; Pediatric hematology; Thrombocytopenia.

INTRODUCTION

Immune thrombocytopenic purpura (ITP) is an immune-mediated hemorrhagic condition that affects approximately 1 in 25,000 children every year (1,2), and may present both as an acute, self-limiting condition and in recurrent (chronic) form. ITP is characterized by premature destruction and clearance of platelets by mononuclear phagocytes (3). Approximately 75% of patients recover spontaneously within 4 to 6 months (4). Most children with ITP are previously healthy, and are in fact the victims of their own exuberant defenses (5).

Over the last two decades, several investigators have contributed to an improved understanding of the pathophysiology of this condition in an attempt to develop an individualized treatment approach for affected patients.

The ability to distinguish between self and non-self antigens is known as immune tolerance, and plays an essential role in preventing intense self-recognition, which would produce pathological autoimmune responses (6,7). The term “peripheral tolerance” refers to mature reactive cells that escaped negative selection in the thymus and are suppressed from peripheral blood by a particular class of immunoregulatory cells, T_{regs} (4,6,8). T_{regs} account for approximately 5% of circulating CD4+ T cells and are characterized by constitutive expression of Foxp3 (transcription factor forkhead box protein 3) molecules and high CD25 levels (9).

Recent studies have shown that patients with ITP exhibit anti-platelet self-reactive T cells and an imbalance in cytokine levels, which suggests loss of peripheral tolerance (10). Regulatory T cell deficiency can lead to failure of peripheral tolerance and subsequent development of autoimmunity (11). Furthermore, maintenance of immune tolerance and the effective immune response may be altered in the presence of an inflammatory process directed to target cells other than platelets (12).

The objective of this study was to evaluate the frequency of regulatory T cells (T_{regs}) in children with newly diagnosed ITP and the association between T_{regs} and platelet counts at the time of assessment, by means of a comparison with healthy controls.

The standardized terminology, definitions and outcome criteria for ITP proposed by the International Work Group (IWG) shall be used throughout, as follows: newly diagnosed ITP, within 3 months from diagnosis; persistent ITP, between 3 to 12 months from diagnosis; chronic ITP, lasting for more than 12 months; refractory ITP, failure to achieve remission after splenectomy and presence of severe ITP or risk of bleeding that requires therapy; severe ITP, presence of major bleeding symptoms. Quality of response was defined as follows: complete remission (CR), platelet count $\geq 100,000/\mu\text{L}$ and absence of bleeding; remission (R), platelet count $\geq 30,000/\mu\text{L}$, at least a twofold increase from the baseline count, and absence of bleeding; non-remission (NR), platelet count $< 30,000/\mu\text{L}$ or less than a twofold increase from the baseline count or bleeding (13).

METHODS

This prospective case-control study included 19 children between the ages of 1 and 15 years who were admitted to the pediatric emergency departments of two tertiary referral centers in Porto Alegre, Brazil, between June 2010 and March 2012, due to clinical suspicion of ITP and thrombocytopenia (platelet count $< 100,000/\mu\text{L}$). Patients with other autoimmune diseases, such as HIV, SLE, and rheumatoid arthritis, were excluded from analysis. The minimum sample size had been calculated as 34 subjects (17 cases and 17 controls), for a significance level of 0.05, a statistical power of 90%, and a mean difference in T_{reg} counts of 1.3 [9].

All patients were followed for at least 6 months and underwent peripheral blood sampling for platelet counting and flow cytometry-based quantification of T_{regs} . Samples were

obtained at diagnosis and 1, 3, and 6 months later and designated *sample 1*, *sample 2*, *sample 3*, and *sample 4* respectively. The control group was composed of retrospective blood samples that had been obtained from 19 healthy, age-matched children meeting the exclusion criteria described above. Children were identified by means of a chart review and only one sample was obtained from each control.

The study was approved by the Research Ethics Committees of both centers where it was conducted, and the parents or legal guardians of all patients provided written informed consent for participation.

Blood samples were analyzed for T_{regs} by means of the following procedure: lymphocytes were prepared by Ficoll addition and then tagged with monoclonal antibody conjugates (anti-CD4 FITC, anti-CD25 PE-CY7, and anti-Foxp3 PE - BD Biosciences, San Jose, California, USA). Cells were acquired in the flow cytometer FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, California, USA) by Cellquest Programm.

Statistical analyses were performed with the Mann–Whitney U test for comparison of T_{regs} and platelet counts in the case and control groups, comparison of T_{regs} and platelet counts in the chronic and non-chronic subgroups, and comparison of T_{regs} in patients with platelet counts $< 100,000/\mu\text{L}$ and $> 100,000/\mu\text{L}$. The Friedman test was used for comparison between T_{regs} and platelet counts at the four time points determined for sampling. The Spearman correlation coefficient was used to assess the strength of association between T_{reg} and platelet counts.

RESULTS

Nineteen patients were assessed at the time of diagnosis, with collection of blood samples prior to any pharmacological therapy (*Sample 1*). All four samples were collected in a

timely manner (on diagnosis and at 1 month, 3 months, and 6 months) from 15 patients. Four patients withdrew from the study before all samples could be collected.

Mean age at diagnosis of ITP was 6.53 ± 4.14 years (median, 6.33 years). Eight patients were aged 1 year to 4 years 11 months, seven patients were aged 5 years to 9 years 11 months, and four were between the ages of 10 and 15 years. The vast majority of patients (79%) were between the ages of 1 and 10 at the time of diagnosis. Most patients in the case group (63%) were female. A demographic profile of the study sample is shown in Table 1 below.

Two patients achieved spontaneous remission of thrombocytopenia without any treatment. Of the 17 treated patients, 11 received a 2- to 3-week course of oral corticosteroids and two received corticosteroids for over 4 weeks. Four patients received both corticosteroids and intravenous immunoglobulin (IVIG) in combination at some point during treatment; three of these patients later required splenectomy due to chronic ITP. No patients received IVIG as monotherapy.

Of the 19 patients recruited at the start of the study, 14 achieved CR, two achieved R, and three progressed to chronic ITP. Of these, two achieved remission after splenectomy and only one developed refractory disease.

An overall analysis of the variables of interest (T_{regs} and platelet counts) is shown in Table 2 below.

There was a statistically significant difference in platelet counts between the case and control groups in samples 1 and 4. There were no statistically significant differences in T_{reg} counts between the case and control groups at any point in time ($P > 0.05$).

The Spearman correlation coefficient was used to assess the strength of association between T_{reg} and platelet counts in the case and control groups as measured in samples 1, 2, 3, and 4. These data are shown in Table 3 below. There was no significant correlation between

T_{reg} and platelet counts in the case and control groups ($P=0.373$), nor in the case or control groups when analyzed separately ($P=0.997$ and $P=0.918$ respectively).

The case group was further stratified into chronic ($n=3$) and non-chronic patients ($n=16$). The Mann–Whitney U was used for comparison of T_{reg} and platelet counts between these two subgroups. Results are shown in Table 4 below. There were no statistically significant differences in T_{reg} counts between the chronic and non-chronic subgroups ($P>0.05$). There was, however, a significant difference between platelet counts in samples 3 (obtained 3 months after diagnosis) and 4 (obtained 6 months after diagnosis) ($P=0.007$ and $P=0.004$ respectively).

T_{reg} and platelet counts measured in all four samples (T_{reg1} , T_{reg2} , T_{reg3} , T_{reg4} and Platelet 1, Platelet 2, Platelet 3, and Platelet 4 respectively) were pooled for a total of 85 measurements.

This new subgroup was then stratified by platelet count— $\leq 100.000/\mu\text{L}$ (Group 1) or $>100.000/\mu\text{L}$ (Group 2)—in an attempt to detect any clinically relevant associations. The Mann–Whitney U was used for a between-group comparison of T_{reg} counts. There were no significant differences between T_{reg} counts in patients with platelet counts of $>100.000/\mu\text{L}$ or $\leq 100.000/\mu\text{L}$ (data not shown).

DISCUSSION

Although the role of regulatory T cells in immune tolerance in healthy individuals appears to be well established, which would lead to the hypothesis that failure of the regulatory T cell system might induce autoimmunity (4,6-8,10,14), the role of T_{regs} in childhood ITP has yet to be fully elucidated.

Studies published over the last 10 years have reported discordant results as to the potential association between T_{reg} and platelet counts, both in adults and in children, and in acute and chronic ITP alike.

In 2006, Bin Liu and Hui Zhao published a study in which adult patients with acute ITP or non-remission exhibited significantly lower relative T_{reg} counts as compared with patients who had achieved remission, with no significant difference between the T_{reg} counts of patients in remission and those of healthy controls (15). Also in 2006, Fahim and Monir concluded that relative T_{reg} counts were significantly lower in pediatric patients with acute and chronic ITP as compared with healthy controls, that patients with chronic ITP and platelet counts $>100,000/\mu\text{L}$ had higher T_{reg} counts than patients with thrombocytopenia ($<100,000/\mu\text{L}$), and that corticosteroid-responsive patients also had higher T_{reg} counts than nonresponsive patients (16).

In 2007, Sakakura *et al* reported wide variation in T_{reg} counts among adult ITP patients; in those with low platelet counts, there was no significant reduction in the number of T_{regs} . However, T_{reg} counts were significantly elevated in patients with platelet counts $>100,000/\mu\text{L}$ as compared with healthy controls. These findings suggested that T_{regs} play an important role in platelet count recovery. It bears stressing that only seven of the 44 patients included in the study were newly diagnosed; all others had chronic ITP (17). Yu *et al.* found no statistically significant difference in the frequency of $\text{CD4}^+\text{CD25}^{(hi)}\text{Foxp3}^+\text{T}_{regs}$ in adult patients with chronic ITP and in controls (18).

The present study, there was no significant difference between T_{reg} and platelet counts in the case and control groups ($P=0.373$), and no significant correlation between T_{reg} and platelet counts in either group on separate analysis ($P=0.997$ and $P=0.918$ respectively). The objective of the study was to assess the frequency of T_{regs} in patients with newly diagnosed ITP and ascertain whether an association exists between this frequency and platelet counts. No such association was found on diagnosis or in blood samples collected 1 month, 3 months, and 6 months after diagnosis. These findings do not contribute to the identification of potential predictors of progression to chronic ITP, nor do they advance the search for

individualized treatment of specific cell deficiencies in ITP patients. Most probably, mechanisms other than T_{regs} are involved in the pathogenesis of autoimmunity in childhood ITP.

The population of this study was well-defined in terms of age range (1 to 15 years) and, particularly, in terms of newly diagnosed status. At the time of initial blood collection, none of the patients in the case group were receiving any form of therapy that might have masked actual T_{reg} cell counts. There are no data on the potential interference of corticosteroids and IVIG, for instance, on T_{reg} count recovery in the short and long term. As yet, there is no way of determining whether T_{reg} cell counts measured in patients with chronic or non-remitted ITP who are undergoing active treatment are representative or over- or underestimate actual counts. There is also no way of establishing whether expression of T_{regs} in adults can be extrapolated to pediatric populations or vice-versa.

T_{regs} ($CD4^+CD25^+Foxp3$ T lymphocytes) have been described as immunoregulatory cells capable of suppressing self-reactive cells that escape negative selection in the thymus. If activated, these cells are liable to trigger autoimmunity. Quantitative failure of T_{regs} would justify this hypothesis. However, in this study, there was no significant association between T_{regs} and platelet counts in the case or control groups ($P=0.373$), as described by some authors in recent years (15-17). The possibility remains that a qualitative rather than quantitative failure of T_{regs} might trigger autoimmunity in children who develop ITP, that is, the function as well as the quantity of T_{regs} might be affected in children with ITP, thus potentially jeopardizing the regulation of peripheral tolerance. Conversely, another yet-unknown mechanism may account for the development of autoimmunity in children. As this study did not confirm the hypothesis that T_{reg} counts would be decreased in children with acute, chronic, or refractory ITP, further research on the pathophysiology and pathogenesis of this condition is required.

REFERENCES

1. Imbach P, Kuhne T, Signer E. Historical aspects and present knowledge of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2002;119:894-900.
2. Lilleyman JS. Management of childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1999;105:871-875.
3. Imbach P. Idiopathic thrombocytopenic purpura. In: Arceci RJ, Hann IM, Smith OP, editors. *Pediatric Hematology*. Massachusetts: Blakwell Publishing; 2006. p. 526-547.
4. Nugent DJ. Immune thrombocytopenic purpura of childhood. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:97-103.
5. Mouzaki A, Theodoropoulou M, Gianakopoulos I, Vlaha V, Kyrtsolis MC, Maniatis A. Expression patterns of Th1 and Th2 cytokine genes in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) at presentation and their modulation by intravenous immunoglobulin G (IVIg) treatment: their role in prognosis. *Blood* 2002;100:1774-1779.
6. Cruvinel WM, Mesquita Jr. D., Araújo JAP, Salmazi KC, Kállas EG, Andrade LEC. Natural regulatory T cells in rheumatic diseases. *Rev Bras Reumatol* 2008;48:342- 355.
7. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212:8-27.
8. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Mecanismos Efetores da Imunidade Celular. Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 321-348.
9. Aboul-Fotoh Lel M, Abdel Raheem MM, El-Deen MA, Osman AM. Role of CD4+CD25+ T cells in children with idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011;33:81-85.

10. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775-787.
11. Kuwana M, Ikeda Y. Helicobacter pylori and immune thrombocytopenic purpura: unsolved questions and controversies. *Int J Hematol* 2006;84:309-315.
12. Semple JW, Bruce S, Freedman J. Suppressed natural killer cell activity in patients with chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1991;37:258-262.
13. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009;113:2386-2393.
14. Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Zackai EH. CD4(+) CD25(+) T-cell production in healthy humans and in patients with thymic hypoplasia. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1129-1131.
15. Liu B, Zhao H, Poon MC, Han Z, Gu D, Xu M, et al. Abnormality of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2007;78:139-143.
16. Fahim NM, Monir E. Functional role of CD4+CD25+ regulatory T cells and transforming growth factor-beta1 in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Egypt J Immunol* 2006;13:173-187.
17. Sakakura M, Wada H, Tawara I, Nobori T, Sugiyama T, Sagawa N, et al. Reduced Cd4+Cd25+ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res* 2007;120:187-193.
18. Yu J, Heck S, Patel V, Levan J, Yu Y, Bussel JB, et al. Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 2008;112:1325-1328.

Table 1. Sample profile.

Group	Age (years)	Female sex
Overall (n=38)	8.31±4.16 (1–15)	19 (50.0%)
Case (n=19)	6.53±4.14 (1–15)	12 (63.2%)
Control (n=19)	10.08±3.43 (2–14)	7 (36.8 %)

Age expressed as mean ±standard deviation (range).

Sex expressed as n (%).

Table 2. Comparison of T_{reg} and platelet counts in the case and control groups

Variable	Case group	Control group	P-value*
T _{reg} 1 (n=19)	0.11 (0.06–0.26)	0.22 (0.01–0.40)	0.908
Platelet 1 (n=19)	12,473 (4,000–13,000)	300,000 (240,000–375,000)	<0.0001
T _{reg} 2 (n=16)	0.13 (0.05–0.31)	0.22 (0.01–0.40)	0.987
Platelet 2 (n=16)	215,687 (91,250–338,750)	300,000 (240,000–375,000)	0.076
T _{reg} 3 (n=16)	0.13 (0.02–0.23)	0.22 (0.01–0.40)	0.659
Platelet 3 (n=16)	215,812 (81,000–348,000)	300,000 (240,000–375,000)	0.066
T _{reg} 4 (n=15)	0.10 (0.03–0.16)	0.22 (0.01–0.40)	0.410
Platelet 4 (n=15)	248,000 (113,000–315,000)	300,000 (240,000–375,000)	0.033

Platelet counts expressed as median (interquartile range), T_{reg} counts as percentages.

*Mann–Whitney *U*.

Table 3. Coefficients of correlation between T_{reg} and platelet counts

Variable	Correlation coefficient	P-value
Cases + Controls, T_{reg} 1 and Platelet 1 (n=38)	0.149	0.373
Controls, T_{reg} 1 and Platelet 1 (n=19)	-0.025	0.918
Cases, T_{reg} 1 and Platelet 1 (n=19)	0.001	0.997
Cases, T_{reg} 2 and Platelet 2 (n=16)	0.108	0.535
Cases, T_{reg} 3 and Platelet 3 (n=16)	0.020	0.911
Cases, T_{reg} 4 and Platelet 4 (n=15)	0.131	0.460

Table 4. Comparison between T_{reg} and platelet counts in the chronic and non-chronic ITP subgroups

Variable	Chronic	Non-chronic	P-value*
T _{reg} 1 (n=19)	0.09 (0.02–0.11)	0.12 (0.06–0.33)	0.254
Platelet 1 (n=19)	5,000 (4,000–13,000)	6,000 (4,000–13,000)	0.793
T _{reg} 2 (n=16)	0.10 (0.04–0.14)	0.15 (0.05–0.36)	0.364
Platelet 2 (n=16)	136,000 (22,000–256,000)	252,000 (104,500–341,500)	0.364
T _{reg} 3 (n=16)	0.10 (0.06–0.73)	0.16 (0.02–0.22)	0.704
Platelet 3 (n=16)	24,000 (15,000–81,000)	275,000 (138,000–370,500)	0.007
T _{reg} 4 (n=15)	0.08 (0.03–0.10)	0.11 (0.04–0.21)	0.448
Platelet 4 (n=15)	21,000 (17,000–30,000)	254,500 (184,250–316,500)	0.004

Platelet counts expressed as median (interquartile range), T_{reg} counts as percentages.

*Mann–Whitney *U*.

10 APÉNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Avaliação dos Linfócitos T Reguladores (CD4+ CD25+ FOXP3+) na Púrpura Trombocitopênica Imune da Infância – Casos

A Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI) é uma manifestação comum de doença auto-imune em crianças. Ocorre mais frequentemente em crianças entre 1 e 7 anos de idade, caracterizando-se pelo rápido aparecimento de manchas roxas ou pequenas manchinhas vermelhas na pele ou na boca sem história de queda ou traumatismo, porém associada à diminuição importante no número das plaquetas (em exame de sangue). A maioria das crianças apresenta recuperação espontânea em 4 a 6 meses, porém algumas persistem com sintomas de sangramentos e com as plaquetas diminuídas após esse período, sendo considerados casos crônicos. Estudos recentes evidenciaram que adultos com PTI apresentam menor frequência de linfócitos T reguladores em comparação com pessoas saudáveis e que isso, possivelmente, estaria também associado à resposta ao tratamento. Sabe-se que o comportamento imunológico das crianças é diferente dos adultos e este estudo tem por objetivo investigar a frequência dos linfócitos T reguladores em crianças com PTI e compará-la aos dados de crianças saudáveis.

Para a realização desse estudo é necessária apenas a coleta de exame de sangue – cerca de 6 ml – no momento do diagnóstico, em 4 semanas e, em 3 e 6 meses. Essa quantidade de sangue não acarretará deficiências ao paciente uma vez que as coletas ocorrerão num longo intervalo de tempo (no período de 6 meses). O exame de sangue é pouco desconfortável em relação à dor, mesmo em crianças, pois é rapidamente coletado. Mesmo sem participar deste estudo, o paciente coletaria hemograma completo de rotina nos períodos acima citados.

Os resultados desse estudo serão divulgados apenas para fins de pesquisa e o nome dos participantes será mantido em sigilo. Optando por participar deste estudo, os resultados serão informados posteriormente por correspondência se for de seu interesse. No caso de não querer participar, isso não prejudicará em nada o tratamento e o acompanhamento do paciente.

Este estudo é importante para visualizarmos novas perspectivas terapêuticas para os pacientes com PTI aguda ou crônica.

Eu, abaixo assinado, fui informado dos objetivos e dos procedimentos da pesquisa, e autorizo meu filho (a) _____ a ser avaliado para a frequência dos linfócitos T reguladores.

Assinatura do Paciente: _____

Nome do Responsável: _____

Assinatura do Responsável: _____

Endereço: _____

Telefone (s): _____

Pesquisador Responsável: Dra. Karina L. M. Mazzucco Fone: (51) 2101-8317

Testemunha: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Porto Alegre, ____/____/____

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DE PESQUISA

Nome: _____ N° Pesquisa: _____

Origem: () HCPA () HCSA

Nome do responsável: _____

Fone(s): _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Sexo: () Feminino () Masculino

Raça: () Branca () Negra () Parda

Entrevista com os Pais: ____/____/____

Consentimento Informado: ____/____/____

Data do Diagnóstico de PTI: ____/____/____

Painel Imunológico:

	Ao Diagnóstico	1 Mês	3 Meses	6 Meses
Data				
Plaquetas				
CD4				
CD25				
FOXP3				
CD3				
CD8				
CD27				
CD19				
CD20				

Observações:

Tratamentos utilizados no período de 1 ano:

Corticóide Oral: () Sim () Não

Período(s) : ____/____/____ a ____/____/____

OBS.: _____

Corticóide Endovenoso (pulso): () Sim () Não

Período: ____/____/____ a ____/____/____

OBS.: _____

IVIg: () Sim () Não

Período: ____/____/____ a ____/____/____

OBS.: _____

Ciclosporina: () Sim () Não

Período: ____/____/____ a ____/____/____

OBS.: _____

Intercorrências em Relação ao Tratamento:
