

ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS HUMANOS HPA1, HPA3 E HPA5 E RISCO DE EVENTOS VASO-OCCLUSIVOS EM PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME DE SALVADOR – BAHIA

HUMAN PLATELETS ANTIGENS HPA1, HPA3 AND HPA5 AND RISK OF EVENTS OCCLUSIVE VASCULAR IN CARRIERS OF SICKLE CELL ANEMIA OF SALVADOR-BAHIA

Elisângela Vitória Adorno, Handerson Fabrício Costa de Almeida, Débora Santana Laranjeira, Mari Ney Tavares Almeida, Marilda Souza Gonçalves

Faculdade de Farmácia da UFBA; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brasil

A anemia falciforme (AF) é caracterizada por manifestações clínicas heterogêneas, provenientes da hemólise e fenômenos de vaso-oclusão (VO). Atualmente, a ativação e expressão de moléculas de adesão em leucócitos, plaquetas e células endoteliais têm sido associadas à gênese da VO. Assim, o presente estudo investigou polimorfismos gênicos em glicoproteínas de membrana plaquetária (GP) associando-os aos dados hematológicos e perfil clínico dos pacientes. A casuística foi de 77 indivíduos com AF, com mediana de idade de nove anos (0 a 17 anos). Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários médicos; as avaliações moleculares foram realizadas por reação em cadeia da polimerase seguida pela digestão com endonucleases de restrição (PCR-RFLP) e as análises estatísticas no programa EPINFO, versão 6.04. Nesse grupo, 59 (76,6%) indivíduos apresentaram internações hospitalares, 41 (52,3%) utilizaram hemoderivados e 60 (77,9%) apresentaram pelo menos um evento VO. A análise para o polimorfismo Hpa1 localizado no gene da GP IIIa demonstrou 53 (68,8%) homocigotos para o alelo a, 23 (29,9%) heterocigotos e um (1,3%) homocigoto b; a pesquisa do polimorfismo Hpa3 (GPIIb) foi identificada em 70 indivíduos, demonstrando 27 (38,6%) homocigotos a, 35 (50,0%) heterocigotos e oito (11,4%) homocigotos b; o polimorfismo Hpa5 (GPIa) revelou 54 (70,1%) homocigotos a e 23 (29,9%) heterocigotos. Os resultados não demonstraram associação entre os polimorfismos e o perfil clínico dos portadores de AF de Salvador, Bahia. Entretanto, consideramos de fundamental importância a associação desses polimorfismos com a expressão de moléculas de adesão em plaquetas, de maneira a testar diretamente uma possível participação destes no fenômeno VO.

Palavras-chave: anemia falciforme, plaquetas, polimorfismo genético.

The sickle cell anemia (SCA) is characterized by clinical manifestations heterogeneous, proceeding from hemolytic and vaso-occlusive events (VOE). Currently, the molecule activation and expression of adhesion in leukocytes, platelets and endothelial cells have been associates to the VOE. Thus, the present study it investigated genetic polymorphisms in glycoproteins gene of platelets (GP) associating them it the hematological data and clinical profile of the patients. The casuistry was of 77 individuals with SCA and medium of age of nine years (the 0 17 years). The clinical data had been gotten of medical handbooks; the molecular evaluations had been carried through by reaction in chain of polymerase followed by the digestion with enzymes of restriction (RCP-RFLP) and the statistical analyses in the program EPINFO, version 6.04. In this group, 59 (76.6%) individuals had presented hospitalization, 41 (52.3%) had blood transfusion and 60 (77.9%) had presented at least a vaso-occlusive event. The analysis for the polymorphism Hpa1 located in the GPIIIa gene demonstrated 53 (68.8%) homozygous for allele, 23 (29.9%) heterozygous and one (1.3%) homozygous b; the research of the polymorphism Hpa3 (GPIIb) was identified in 70 individuals, demonstrating 27 (38.6%) homozygous, the 35 (50.0%) heterozygous and eight (11.4%) homozygous b; the polymorphism Hpa5 (GPIa) demonstrated the 54 (70.1%) homozygous and 23 (29.9%) heterozygous. The results had not demonstrated to association between the polymorphisms and the clinical profile of the carriers of SCA of Salvador, Bahia State. However, we consider of basic importance the association of these polymorphisms with the molecule expression of adhesion in platelets, in way to directly test a possible participation of these in vaso-occlusive phenomenon.

Keywords: sickle cell anemia, platelets, genetic polymorphism.

A anemia falciforme (AF) é caracterizada pela homocigose para a hemoglobina S (Hb S), decorrente de uma mutação pontual no sexto códon do gene da globina β (GAG→GTG),

levando à substituição do ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia polipeptídica beta⁽¹⁸⁾. A população do Estado da Bahia apresenta a maior incidência brasileira para a HbS, sendo descrita pela associação de pais e amigos dos excepcionais do Estado da Bahia (APAE), aproximadamente, 1 : 650 recém-nascidos com AF⁽²⁾; resultados que confirmaram os achados de Azevêdo et al.⁽⁴⁾ e de Adorno et al.⁽¹⁾, que descreveram a frequência de 7,4% do genótipo AS em 1.200 crianças em idade escolar e 9,8% de heterocigotos AS; 0,9% de heterocigotos duplos SC e 0,2% de portadores de AF entre recém-nascidos de Salvador - Bahia, respectivamente. A AF

Recebido em 26/6/2010

Aceito em 11/10/2010

Endereço para correspondência: Profa. Elisângela Vitória Adorno, Faculdade de Farmácia – UFBA, R. Barão de Jeremoabo, s/nº, Campus Universitário de Ondina da UFBA, Ondina, 40170-115 Salvador, Bahia, Brasil. C-elo: liuadorno@hotmail.com. Fontes de Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

apresenta distribuição mundial elevada, sendo caracterizada por manifestações clínicas heterogêneas provenientes da hemólise contínua e de fenômenos de vaso-oclusão (VO). A diversidade dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes com anemia falciforme está fortemente relacionada à interação de fatores genéticos, ambientais e sócio-econômicos, sendo considerado um problema de saúde pública⁽¹⁸⁾. Vários fatores são descritos por alterarem o quadro clínico da doença, tais como as variações nos níveis da hemoglobina fetal (HbF), tipo de haplótipo ligado ao grupo de genes da globina β e presença da talassemia α ^(18,21).

Atualmente, a ativação e expressão de moléculas de adesão em leucócitos, plaquetas e células endoteliais têm sido associadas à gênese dos fenômenos VO em indivíduos com AF^(16,19). Além disso, o estado inflamatório crônico presente nesses indivíduos aumenta a atividade trombótica e de hipercoagulação, elevando os níveis de trombina, consumindo proteínas anticoagulantes e aumentando a contagem e ativação das plaquetas⁽¹³⁾. Da mesma forma, outras anormalidades da via de coagulação parecem estar associadas à alteração da hemostasia, tais como a presença do fator V Leiden, mutação no gene da metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR) e no gene da protrombina^(21,24).

Os complexos de glicoproteínas (GPs) de membrana de plaqueta ou sistemas de antígeno plaquetário humano (Hpa) estão associados à adesão, ativação, agregação plaquetária, estando correlacionados ao aumento do risco de doença coronariana e doença oclusiva arterial cerebral, além de aloimunização. Atualmente, são conhecidos vários sistemas de Hpa bialélicos distintos, sendo que uma distribuição heterogênea de alelos Hpa tem sido descrita entre os grupos étnicos diferentes, com relato de aproximadamente 24 aloantígenos específicos de plaqueta^(5,11,20).

Os polimorfismos em gene da GPs de plaquetas parecem estar relacionados a alterações na densidade e função desse receptor na membrana, influenciando na ocorrência de eventos trombóticos, através da ativação e agregação plaquetárias. Alguns polimorfismos têm sido considerados fatores de risco para doença arterial oclusiva cerebral e coronariana, principalmente os alelos Hpa2-b no gene GPIb e o Hpa-1b no GPIIIa, além do Hpa-5a e do polimorfismo silencioso 807C>T no gene GPIa^(3,6,12).

Desta forma, o objetivo desse estudo foi investigar a presença de polimorfismos no gene GPs de membrana plaquetária em indivíduos com AF de Salvador - BA, associando-os aos dados hematológicos e o perfil clínico desses indivíduos.

Material e Métodos

Casuística

Foi realizado estudo de corte transversal em 77 indivíduos com AF atendidos no ambulatório de Hematologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA) e no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia – UFBA. O estudo foi aprovado pelo

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Maternidade Climério de Oliveira – UFBA (CEP-MCO-UFBA) sob número 159 (CAAE – 0145.0.054.000-06) e está em acordo com a Declaração de Helsinki de 1975 e sua revisão de 2000. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os dados clínicos foram obtidos após preenchimento de questionário epidemiológico e consulta aos prontuários de acompanhamento dos pacientes.

Análises hematológicas e de hemoglobinas

As análises hematológicas foram realizadas em contador eletrônico de células *CellDyn 3.700* (Illinois, EUA) e a confirmação do perfil de hemoglobinas foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) no equipamento *Variant Hemoglobin Analyzer* (Bio-Rad, Berkeley, Califórnia, EUA).

Análises moleculares

As determinações moleculares foram realizadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos sintéticos específicos, seguidos pela digestão com endonucleases de restrição (RFLP). Os fragmentos obtidos por RFLP foram visualizados após corrida eletroforética em gel de agarose e poliacrilamida, corados pelo brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta utilizando fotodocumentador *L Pix* (Loccus Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software* EPI-INFO versão 6.04. Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

Resultados

No presente estudo foram investigados 77 indivíduos com AF em atendimento no ambulatório de Hematologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA). Os pacientes apresentaram mediana de idade de 9 anos, variando de 0 a 17 anos, sendo 49,4% do sexo feminino. O padrão hematológico revelou valores médios para hemácias (Hm) de $3,24 \times 10^6/\text{mL}$ ($\pm 0,89$); hemoglobina (Hb) de $8,9\text{g}/\text{dL}$ ($\pm 1,99$); hematócrito (Ht) de 27,5% ($\pm 6,1$); volume corpuscular médio (VCM) de $86,8\text{fL}$ ($\pm 10,6$); hemoglobina corpuscular média (HCM) de $28,2\text{pg}$ ($\pm 3,8$); concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de $32,5\%$ ($\pm 1,3$); plaquetas de $411 \times 10^3/\text{mL}$ (± 199); contagem de leucócitos (Leuco) de $12,7 \times 10^3/\text{mL}$ ($\pm 5,3$) e HbF de $7,5\%$ ($\pm 6,1$). Entre os pacientes estudados 41 (52,3%) utilizaram hemoderivados; 59 (76,6%) apresentaram histórico de internações hospitalares; 41 (53,2%) desenvolveram pneumonia; 14 (18,2%) esplenomegalia; cinco (6,5%) tiveram episódios de acidente vascular cerebral (AVC); 59 (76,6%) apresentaram crises dolorosas e seis (16,7%)

indivíduos do sexo masculino tiveram história de episódios de priapismo (Tabela 1). Entre os indivíduos estudados 60 (77,9%) apresentaram pelo menos um evento vaso-oclusivo.

Tabela 1. Dados hematológicos e características clínicas dos pacientes com anemia falciforme participantes do estudo.

DADOS HEMATOLÓGICOS	Valores médios \pm DP
• Leucócitos ($\times 10^3$ / mL)	12,7 \pm 5,4
• Hemácias ($\times 10^6$ / mL)	3,24 \pm 0,89
• Hemoglobina (g/dL)	8,9 \pm 1,99
• Hematócrito (%)	27,5 \pm 6,1
• Volume corpuscular médio (fL)	86,8 \pm 10,6
• Hemoglobina corpuscular média (pg)	28,2 \pm 3,8
• Concentração de hemoglobina corpuscular média (%)	32,5 \pm 1,3
• Plaquetas ($\times 10^3$ / mL)	411 \pm 199
• Hemoglobina fetal (%)	7,5 \pm 6,1
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	Nº de pacientes (%)
• História de transfusão sanguínea	41 (52,3)
• Internações anteriores	59 (76,6)
• Pneumonia	41 (52,3)
• Esplenomegalia	14 (18,2)
• Acidente vascular cerebral	05 (6,5)
• Crises de dor	59 (76,6)
• Priapismo (grupo masculino)	6 (16,7)

(*) DP = desvio padrão.

A análise molecular para os genes de GP de membrana plaquetária demonstrou para o polimorfismo Hpa1 53 (68,8%) homocigotos para o alelo a, 23 (29,9%) heterocigotos para os alelos a e b e um (1,3%) homocigoto b; a pesquisa do polimorfismo Hpa3 foi realizada em 70 pacientes com 27 (38,6%) homocigotos para o alelo a, 35 (50,0%) heterocigotos e oito (11,4%) homocigotos para o alelo b; o polimorfismo Hpa5 foi descrito em 54 (70,1%) pacientes homocigotos e 23 (29,9%) heterocigotos para o alelo a (Tabela 2).

A análise de associação entre os polimorfismos de GPs e o perfil clínico dos portadores de AF revelou a ocorrência de eventos VO entre 17 (77,3%), 32 (80,0%) e 17 (77,3%) indivíduos portadores do alelo b para os sistemas Hpa1, Hpa3 e Hpa5, respectivamente. O alelo b para os polimorfismos estudados foi encontrado em todos os indivíduos que desenvolveram priapismo, estando o sistema Hpa3b presente em cinco (83,3%) dos seis casos

Tabela 2. Distribuição do genótipo e frequência alélica para os polimorfismos Hpa1, Hpa3 e Hpa5 nos genes de glicoproteínas (GP) de membrana plaquetária em indivíduos com anemia falciforme.

Polimorfismo de GP	Genótipo, n (%)			Frequência alélica	
	aa	ab	bb	a	b
Hpa 1	53 (68,8)	23 (29,9)	1 (1,3)	0,838	0,162
Hpa 3	27 (38,6)	35 (50,0)	8 (11,4)	0,636	0,364
Hpa 5	54 (70,1)	23 (29,9)	0	0,851	0,149

descritos. Entre os cinco portadores de AF que desenvolveram AVC, quatro (80%) apresentaram o alelo b em pelo menos um dos polimorfismos Hpa 1, 3 e 5 estudados. Entretanto, não foram encontradas significâncias estatísticas nas análises descritas.

Discussão

O presente estudo avaliou a frequência de polimorfismos no gene GPs de membrana plaquetária em um grupo de indivíduos com AF de Salvador – Bahia, associando-os aos dados clínicos e hematológicos.

O sistema Hpa1 está localizado na GP IIIa da membrana plaquetária, membro da família de integrinas, a qual participa da formação do complexo IIb/IIIa que apresenta papel fundamental na agregação e ativação plaquetária, atuando como receptor para ligação do fibrinogênio e fator de von Willebrand⁽¹⁴⁾. Polimorfismos em genes relacionados a proteínas presentes nesse sistema têm sido associados à ocorrência de púrpura trombocitopênica aloimune neonatal entre caucasianos; além disso, o alelo Hpa1 b parece estar associado ao aumento de risco de doença coronariana e doença oclusiva arterial cerebral^(12 17 22 23). O aumento da prevalência do alelo Hpa1 b tem sido observado entre indivíduos negros com hipertensão, porém sem correlação com doença vascular, entretanto esse polimorfismo parece estar associado ao risco de derrame entre mulheres caucasianas de Baltimore, Washington – EUA⁽²⁵⁾. O estudo realizado por Kastrati *et al.*⁽¹⁴⁾ sugere que a presença, em homocigose, desse polimorfismo pode estar associada com o risco aumentado de eventos adversos após colocação de *stent* coronário. No presente estudo, a análise do polimorfismo Hpa1 demonstrou apenas um indivíduo portador do alelo b em homocigose, confirmando os dados descritos por Castro *et al.*⁽⁹⁾ que estudaram a frequência genotípica do Hpa1 em diferentes grupos étnicos, encontrando prevalência diminuída do genótipo bb entre a população afro-descendente da Bahia e de origem caucasiana de São Paulo, bem como ausência entre índios da Amazônia. No presente estudo, o polimorfismo Hpa1 em heterocigose ab foi descrito em 29,9% da população estudada, diferindo dos resultados descritos por Castro *et al.*⁽⁹⁾ que encontraram 15,4% para esse genótipo na população geral afro-brasileira. Entretanto, esses resultados corroboram os achados de Castro *et al.*⁽⁷⁾, que estudaram a frequência do sistema Hpa1 entre portadores de AF de São Paulo e encontraram a frequência de 2,25% para o alelo b em homocigose e 28,9% em heterocigose, porém sem associação com a ocorrência de vaso-oclusão.

O sistema Hpa3 tem sido associado à ocorrência de trombocitopenia aloimune neonatal, causado, principalmente, pela incompatibilidade ligada ao alelo Hpa3a, descrevendo-se uma gravidade semelhante à doença causada por incompatibilidade do alelo Hpa1a⁽¹¹⁾; entretanto, em estudo envolvendo mulheres da Argélia observou-se frequência elevada do alelo Hpa3b, associado ao risco aumentado de aloimunização por esse sistema⁽⁵⁾. A frequência do

polimorfismo Hpa3 (GPIIb) descrita no presente estudo demonstrou similaridade entre os dados descritos por Castro et al.⁽⁹⁾ no trabalho envolvendo negros brasileiros. Em nosso estudo, os eventos de VO foram descritos em 80,0% dos indivíduos que apresentaram o alelo Hpa3b; esse mesmo alelo também esteve presente entre 83,3% dos indivíduos que desenvolveram priapismo, embora sem significância estatística.

O sistema Hpa5 (GPIa) do complexo $\alpha_1\beta_2$ é um receptor para colágeno, essencial para a formação do trombo, através da adesão e agregação plaquetárias, podendo ser encontrado em células endoteliais, fibroblastos e linfócitos ativados, tendo sido associado a 19% dos casos de Púrpura trombocitopênica aloimune neonatal (NATP) em caucasianos^(8 12 16 17 19). Nós encontramos uma frequência de 70,1% para os homocigotos aa e 29,9% para os heterocigotos ab, resultados que confirmam a frequência descrita na população geral de negros brasileiros⁽⁷⁾. Entretanto, estudo realizado na população de portadores de AF de São Paulo⁽⁹⁾ revelou a presença de 8,8% do alelo Hpa5 b em homocigose, sendo associado à ocorrência de VO, diferente dos dados descritos no presente estudo, onde não foram descritos casos de homocigose para esse alelo.

Embora, o alelo Hpa 5a tenha sido associado ao aumento de risco de doença coronariana e doença oclusiva arterial cerebral^(15 16), Castro et al.⁽⁷⁾ descreveram a correlação entre a presença do alelo Hpa 5b e o risco genético para o desenvolvimento de VO em pessoas com AF de São Paulo, porém sem associação com um tipo específico de evento. Além disso, estudos recentes revelaram que o alelo b está associado ao aumento do número de moléculas de GPIa na superfície das plaquetas, bem como a um risco aumentado de desenvolvimento de doença renal grave em indivíduos hipertensos^(3 10). Em nosso estudo, a presença do alelo Hpa5 b esteve presente em 77,3% dos indivíduos que desenvolveram eventos VO.

A maioria dos indivíduos com anemia falciforme que apresentou o alelo b em homocigose ou heterocigose para qualquer um dos três polimorfismos Hpa 1, 3 ou 5, desenvolveu eventos VO (77,6%), sendo que 80% dos AF que tinham desenvolvido AVC eram portadores do alelo b para um dos três polimorfismos estudados.

Dessa forma, o presente estudo, embora não tenha encontrado associação estatística entre a clínica e a presença de polimorfismos do sistema Hpa (1, 3, 5), sugere uma participação importante desse sistema nos eventos VO.

Diante dos resultados encontrados, consideramos que seria de fundamental importância a associação da presença desses polimorfismos gênicos com a expressão de moléculas de adesão em plaquetas, de maneira a testar diretamente uma possível participação destes no fenômeno VO. Estudos que explorem essas vias de sinalização poderão contribuir para a instituição de novas modalidades terapêuticas no acompanhamento clínico desses pacientes.

Referências

- Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JP, Menezes JF, Rêgo M, Reis MG, Gonçalves MS. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad Saude Publica* 21: 292-298, 2005.
- Almeida AM, Godinho, TM, Teles MS, Rehem APP, Jalil HM, Fukuda TG, Araújo EP, Matos EC, Muritiba Júnior DC, Dias CPF, Pimentel HM, Fontes MIMM, Acosta, AX. Avaliação do Programa de Triagem Neonatal na Bahia no ano de 2003. *Rev Bras Saude Mater Infant* 6: 85-91, 2006.
- Antoniades C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Stefanadi E, Marinou K, Stefanadis C. Genetic polymorphisms of platelet glycoprotein Ia and the risk for premature myocardial infarction: effects on the release of sCD40L during the acute phase of premature myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 47: 1959-1966, 2006.
- Azevêdo ES, Alves AF, Da Silva MC, Souza MG, Muniz Dias Lima AM, Azevêdo WC. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil *Am J Phys Anthropol* 53: 509-512, 1980.
- Brouk H, Halle L, Bertrand G, Neche FZ, Ouelaa H, Kaplan C. Human platelet antigen allele frequencies in different Algerian populations. *Tissue Antigens* 9: 1-6, 2010.
- Carlsson LE, Greinacher A, Spitzer C, Walther R, Kessler C. Polymorphisms of the human platelet antigens HPA-1, HP 2, HPA-3, and HPA-5 on the platelet receptors for fibrinogen (GPIIb/IIIa), von Willebrand factor (GPIb/IX), and collagen (GPIa/IIa) are not correlated with an increased risk for stroke. *Stroke* 28: 1392-1395, 1997.
- Castro V, Alberto FL, Costa RN, Lepikson-Neto J, Gualandro SF, Figueiredo MS, Annichino-Bizzacchi JM, Saad ST, Costa FF. Polymorphism of the human platelet antigen-5 system is a risk factor for occlusive vascular complications in patients with sickle cell anemia. *Vox Sang* 87: 118-123, 2004.
- Castro V, Oliveira GB, Origa AF, Annichino-Bizzacchi JM, Arruda VR. The human platelet alloantigen 5 polymorphism as a risk for the development of acute idiopathic thrombocytopenia purpura. *Thromb Haemost* 84: 360-361, 2000.
- Castro V, Origa AF, Annichino-Bizzacchi JM, Soares M, Menezes RC, Gonçalves MS, Costa FF, Arruda VR. Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1-5 in three distinct ethnic groups in Brazil. *Eur J Immunogenet* 26: 355-360, 1999.
- Chiras T, Papadakis ED, Katopodi A, Chatzianesti E, Fourtounas K, Papakonstantinou S, Theodoropoulos I, Dakouras A, Zerefos N, Valis D, Tzanos-Exarchou H. Platelet GP IIIA polymorphism HPA-1 (PLA1/2) is associated with hypertension as the primary cause for end-stage renal disease in hemodialysis patients from Greece. *In Vivo* 23: 177-181, 2009.
- Glade-Bender J, McFarland JG, Kaplan C, Porcelijn L, Bussel JB. Anti-HPA-3A induces severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *J Pediatr* 138: 862-867, 2001.
- Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Corral J, Iniesta JA, Moraleda JM, Vicente V. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease. *Blood* 92: 2771-2776, 1998.
- Ibanga IA. Significance of platelet activation in sickle cell anaemia. *Niger J Med* 15: 148-150, 2006.
- Kastrati A, Koch W, Gawaz M, Mehili J, Böttiger C, Schömig K, von Beckerath N, Schömig A. PIA polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of adverse events after coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 36: 84-89, 2000.
- Kroll H, Gardemann A, Fechter A, Haberbosch W, Santoso S. The impact of the glycoprotein Ia collagen receptor subunit A1648G gene polymorphism on coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 83: 392-396, 2000.
- Kunicki TJ, Nugent DJ. The influence of platelet glycoprotein polymorphisms on receptor function and risk for thrombosis. *Vox Sang* 83: 85-90, 2002.

17. Mueller-Eckhardt G, Pawelec G, Haas R, Otto C, Kiefel V, Odum N, Mueller-Eckhardt C. HLA-DP antigens in patients with chronic autoimmune thrombocytopenia (AITP). *Tissue Antigens* 34: 121-126, 1989.
18. Nagel RL, Steinberg MH. Genetics of the β^s gene: origins, genetic epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL (eds), *Disorders hemoglobin –genetics, pathophysiology, and clinical management*. NY, USA, p. 711-755, 2001.
19. Pontiggia L, Lassila R, Pederiva S, Schmid HR, Burger M, Beer JH. Increased platelet-collagen interaction associated with double homozygosity for receptor polymorphisms of platelet GPIa and GPIIIa. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 2093-2098, 2002.
20. Skouri H, Gandouz R, Kraiem I, Dridi H, Bibi M, Khairi H, Jemmali M, Bierling P. Platelet-specific alloantigens and antibodies in Tunisian women after three or more pregnancies. *Transfus Med* 19: 269-273, 2009.
21. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 129: 465-481, 2005.
22. Streifler JY, Rosenberg N, Chetrit A, Eskaraev R, Sela BA, Dardik R, Zivelin A, Ravid B, Davidson J, Seligsohn U, Inbal A. Cerebrovascular events in patients with significant stenosis of the carotid artery are associated with hyperhomocysteinemia and platelet antigen-1 (Leu33Pro) polymorphism. *Stroke* 32: 2753-2758, 2001.
23. Sucker C, Schmitz M, Hetzel GR, Grabensee B, Maruhn-Debowski B, Ostojic L, Scharf RE, Zotz RB. Are prothrombotic variants of platelet glycoprotein receptor polymorphisms involved in the pathogenesis of thrombotic microangiopathies? *Clin Appl Thromb Hemost* 15: 402-407, 2009.
24. Tomer A. Platelet activation as a marker for in vivo prothrombotic activity: detection by flow cytometry. *J Biol Regul Homeost Agents* 18: 172-177, 2004.
25. Wagner KR, Giles WH, Johnson CJ, et al. Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism P1A2 and ischemic stroke risk: the Stroke Prevention in Young Women Study. *Stroke* 29: 581-585, 1998.