

ALINE APARECIDA FERREIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE REFRACTILIDADE PLAQUETÁRIA
EM PACIENTES ONCO-HEMATOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração "Patologia Clínica", da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

DEZEMBRO/2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

A Deus

Orientador Supremo e Sublime para o Caminho, a Verdade e a Vida.

Dedico este trabalho aos meus pais Vânia, Adair e Aristeu pelo amor, instrução e confiança,
e aos meus irmãos Alex, Lili e Dudu pelo apoio e ternura.

Agradecimentos

A todos que contribuíram para a concretização deste trabalho:

Ao meu orientador, por abrir caminhos, ensinar a andar por eles e me fazer acreditar que era capaz de percorrê-los até o fim.

À minha “orientadora”, Prof^a Dra. Sheila Soares, pela idéia inicial do trabalho, conhecimento compartilhado e por ser, acima de tudo, amiga.

A esta Universidade e este Curso de Pós-Graduação em Patologia, cujos professores e funcionários me proporcionaram acesso ao conhecimento.

À Fundação HEMOMINAS, pelo trabalho conjunto e disponibilização de serviços e recursos para a realização do trabalho.

À FAPEMIG, pelo apoio e incentivo à pesquisa.

Ao Programa de Pesquisa do SUS (PP-SUS), principal fonte financiadora, mas principalmente, louvável pelos seus objetivos.

À Fátima, do Laboratório de Controle de Qualidade do Hemocentro Regional de Uberaba (HRU), colaboradora que me ensinou nos primeiros passos de bancada e que sempre esteve pronta a ajudar com informações construtivas e palavras de apoio.

A todos os profissionais e amigos dos setores de Fracionamento, Prova Cruzada e Ambulatório do HRU, que me cederam espaço, tempo e atenção para a coleta de amostras e dados, sem os quais seria impossível realizar este trabalho.

Às amigas do Laboratório de Coagulação, pelo apoio durante as aulas para as turmas de Biomedicina, pelo repasse do saber e carisma no ambiente de trabalho.

Agradecimentos

Aos amigos de todos os setores do HRU, pelas informações, disposição, companheirismo e amizade, especialmente, à Maria Célia.

Aos médicos e residentes da Hematologia da UFTM que se integraram na realização do trabalho e foram as principais pontes de acesso aos pacientes.

Aos enfermeiros e técnicos de enfermagem que colaboraram na obtenção de amostras.

Aos integrantes do Laboratório de Imunologia Plaquetária da UNICAMP que não se limitaram em oferecer suporte e colaboração para a concretização do estudo, especialmente à Bia.

Aos setores de Coleta, Histocompatibilidade e Marcadores Celulares do Hemocentro da UNICAMP, pelo profissionalismo e apoio na execução e análise dos testes.

Aos demais alunos do curso de Pós-Graduação que compartilharam conhecimento e dúvidas, principalmente à Fernanda, Ivana, Andreza, Márcia, Vitor e Cristiane.

Aos amigos da Biblioteca que sempre me atenderam com simpatia e atenção.

Aos familiares e amigos que amorteceram a caminhada e que souberam entender minhas ausências.

Àqueles que são especiais e que passaram a ser parte da minha vida compartilhando os momentos mais importantes: Tatiane, Sara, Mariele, Francisco e Luiz Otávio.

Aos examinadores, pela disposição de tempo e atenção e pelas sugestões que certamente contribuirão para que as idéias aqui expostas venham a ser divulgadas de forma mais clara e precisa.

Linhas emaranhadas...

Ser ou não ser?

Estenda e enrole.

Eis o diagnóstico!

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS	21
1.2. RESPOSTA À TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS	23
1.3. ALOIMUNIZAÇÃO PLAQUETÁRIA	26
1.3.1. ALOIMUNIZAÇÃO HLA	28
1.3.2. ALOIMUNIZAÇÃO HPA	31
1.4. JUSTIFICATIVA	32
2. OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVO GERAL	34
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. INDIVÍDUOS	36
3.2. AVALIAÇÃO DOS CONCENTRADOS DE PLAQUETAS (CPS)	36
3.2.1. CONTAGEM DE PLAQUETAS	36
3.2.2. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS	37

3.3. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA À TRANSFUSÃO	38
3.3.1. CONTAGEM DE PLAQUETAS DO RECEPTOR ANTES E APÓS A TRANSFUSÃO	38
3.3.2. CÁLCULO DO INCREMENTO PLAQUETÁRIO	39
3.4. INVESTIGAÇÃO DAS CAUSAS DE REFRATARIEDADE À TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS	40
3.5. AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE ALOIMUNIZAÇÃO PLAQUETÁRIA E IDENTIFICAÇÃO DE ALOANTICORPOS HLA CLASSE I ENVOLVIDOS	41
3.5.1. TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA PLAQUETÁRIA (PIFT)	41
3.5.2. PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA CLASSE I	45
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
4. RESULTADOS	50
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	51
4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS TRANSFUSÕES AVALIADAS	53
4.3. IDENTIFICAÇÃO DE REFRATARIEDADE PLAQUETÁRIA	55
4.4. IDENTIFICAÇÃO DE REFRATARIEDADE PLAQUETÁRIA E CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	57

SUMÁRIO

4.5. IDENTIFICAÇÃO DE REFRATARIEDADE PLAQUETÁRIA E DETECÇÃO DE ALOANTICORPOS	59
4.6. IDENTIFICAÇÃO DE ALOANTICORPOS E CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	61
4.7. IDENTIFICAÇÃO DE REFRATARIEDADE PLAQUETÁRIA E FATORES NÃO IMUNES	65
4.8. CARACTERIZAÇÃO DOS CASOS DE REFRATARIEDADE PLAQUETÁRIA	67
5. DISCUSSÃO	69
5.1. A REFRATARIEDADE PLAQUETÁRIA E A QUALIDADE DO CONCENTRADO DE PLAQUETAS	70
5.2. A REFRATARIEDADE PLAQUETÁRIA E O PACIENTE	71
5.2.1. O PACIENTE E SUA CONDIÇÃO IMUNE: IMUNOSSUPRESSÃO E ALOIMUNIZAÇÃO	72
5.2.2. A ALOIMUNIZAÇÃO E OS TESTES SOROLÓGICOS	77
5.3. O PACIENTE E SUA CONDIÇÃO CLÍNICA	79
5.4. O TRATAMENTO DA REFRATARIEDADE PLAQUETÁRIA	81
6. CONCLUSÃO	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	

RESUMO

A refratariedade plaquetária é um grave problema que dificulta o tratamento de pacientes onco-hematológicos. Avaliou-se no presente estudo a ocorrência de refratariedade plaquetária em 16 desses pacientes atendidos pelo Hemocentro Regional de Uberaba e Hospital de Clínicas da UFTM pelo cálculo corrigido do incremento (CCI). As condições clínicas dos pacientes foram estudadas a partir de seus prontuários e a identificação de aloanticorpos antiplaquetários foi feita através dos testes de PIFT e PRA HLA. Foram avaliados 44 episódios transfusionais e a refratariedade plaquetária foi confirmada em três pacientes (18,75%). A mediana da idade mostrou-se menor no grupo refratário. Identificaram-se aloanticorpos em nove pacientes (56,25%) e dois deles foram refratários (22%). Os resultados do PIFT e HLA PRA foram discordantes em 62,5% dos casos. De sete pacientes com história gestacional, três apresentaram aloanticorpos (43%) sendo duas pacientes refratárias (29%). A maioria dos pacientes (87,5%) já havia sido exposta previamente a algum tipo de hemocomponente e nove deles (56%) apresentaram testes positivos para aloanticorpos, dos quais, dois foram refratários (22%). Observou-se maior frequência de incremento insatisfatório nos episódios em que foram transfundidos CPs obtidos por PRP (64%) do que naqueles com CPs obtidos por aférese (37,5%). As três pacientes refratárias apresentavam condições que favoreciam a refratariedade. Uma apresentou febre e PIFT inconclusivo e não tinha gestações ou transfusões prévias; outra apresentou febre, infecção, esplenomegalia, uso de Anfotericina B e Vancomicina e PIFT positivo; e a terceira apresentou sangramento transvaginal importante, bacteremia, uso de vancomicina e positividade para aloanticorpos por PIFT e PRA HLA. Não foram observadas diferenças estatísticas nas comparações dos resultados, contudo, é preciso considerar o pequeno tamanho da amostra. A concomitância de fatores que interferem na resposta à

transfusão dificulta o entendimento sobre os mecanismos envolvidos em cada caso. Contudo, é possível notar que a refratariedade plaquetária é um problema clínico comum e relevante. Mais estudos são necessários para avaliação do real impacto da refratariedade e direcionamento na criação de protocolos de atendimento diferenciado e viabilização da seleção de doadores compatíveis para pacientes refratários à transfusão de plaquetas.

ABSTRACT

The platelet refractoriness is a serious problem that hinders the treatment of onco-hematology. Was evaluated in this study the occurrence of platelet refractoriness in these 16 patients enrolled in Hemocentro Regional de Uberaba and Hospital de Clinicas/UFTM the corrected count increment (CCI). The clinical conditions of patients were studied from their records and identification of platelet alloantibodies was performed by testing PIFT and PRA- HLA Class I. We evaluated 44 transfusions and platelet refractoriness was confirmed in three patients (18.75%). The median age was lower in the refractory group. Alloantibodies were identified in nine patients (56.25%) and two of them were refractory (22%). The results of PIFT and PRA-HLA were discordant in 62.5% of cases. Of seven patients with a history of pregnancy, three had alloantibodies (43%), two refractory patients (29%). Most patients (87.5%) had previously been exposed to some type of blood component and nine of them (56%) tested positive for alloantibodies, of which two were refractory (22%). A higher frequency of unsatisfactory growth in episodes that were transfused PCs obtained by PRP (64%) than in those with PCs obtained by apheresis (37.5%). The three patients had refractory conditions that increased reporting. One had fever and PIFT inconclusive and had no previous pregnancies or transfusions, and another presented with fever, infection, splenomegaly, use of amphotericin B and vancomycin and PIFT positive and the third had significant vaginal bleeding, bacteremia, vancomycin and positive for alloantibodies PIFT and PRA-HLA. There were no statistical differences in comparisons of results, however, we must consider the small sample size. Concomitant factors that influence the response to transfusion complicates the understanding of the mechanisms involved in each case. However, it is possible to note that the platelet refractoriness is a common clinical problem and relevant. More studies are needed to assess the

real impact of refractoriness and guidance in setting up protocols for distinguished service and making the selection of suitable donors for patients refractory to platelet transfusion.

LISTA DE TABELAS

TÍTULO		PÁGINA
Tabela 1.	Caracterização da amostra	51
Tabela 2.	Descrição das transfusões quanto às características dos CPs e Incremento Plaquetário	54
Tabela 3.	Identificação de Refratariedade Plaquetária em relação ao número de avaliações e evolução clínica	56
Tabela 4.	Identificação de Refratariedade Plaquetária em relação às características demográficas	58
Tabela 5.	Relação entre a ocorrência de Refratariedade Plaquetária e detecção de aloanticorpos pelo <i>PIFT</i> e <i>PRA-HLA</i>	60
Tabela 6.	Relação entre presença de aloanticorpos detectados pelo <i>PIFT</i> e/ou <i>PRA-HLA</i> e características demográficas	62
Tabela 7.	Relação entre presença de aloanticorpos detectados pelo <i>PIFT</i> e <i>PRA-HLA</i> e características demográficas	64
Tabela 8.	Identificação de Refratariedade Plaquetária quanto às condições clínicas capazes de interferir na resposta à transfusão de plaquetas.....	66
Tabela 9.	Caracterização dos indivíduos com refratariedade plaquetária	67

LISTA DE FIGURAS

TÍTULO	PÁGINA
Figura 1 Marcação da população plaquetária analisada.....	43
Figura 2 Marcação de plaquetas com IgG FITC. Exemplo de resultado negativo (mediana <R1)	44
Figura 3 Marcação de plaquetas com IgG FITC. Exemplo de resultado positivo (mediana >R2)	45
Figura 4 Comparação entre tipo de CP, número de transfusões e número de transfusões com ICC insatisfatório.....	53
Figura 5 Distribuição dos pacientes quanto ao diagnóstico de Refratariedade plaquetária.....	55

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Por cento
°C	Grau Celsius
μl	Microlitro
AGH	Antiglobulina Humana
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>BC</i>	<i>Buffy Coat</i>
BCN	Bead Controle Negativo
BT	<i>Bead</i> Teste - microesfera teste
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
cm	Centímetro
CP	Concentrado de Plaquetas
CREG	<i>Cross Reactive Group</i> - Grupo de Reatividade Cruzada
CTI	Centro de Terapia Intensiva
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Dietilenoaminotetracético
ELISA	<i>Enzime-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FITC	Fluorescence Isothiocianate
FS	Foward Scatter
FVII	Fator VII da coagulação
GPs	Glicoproteínas
HEMOMINAS	Hemorrede de Minas Gerais
Hist.	História
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> - Antígenos Leucocitários Humanos
HPA	<i>Human Platelet Antigen</i> - Antígenos Plaquetários Humanos
ICC	Incremento Corrigido da Contagem
IgG	Imunoglobulina G
IP	Incremento Plaquetário
Kg	Kilograma
L	Litro

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

LA	Leucose Aguda
LCT	<i>Lymphocytotoxic Test</i> - Teste de Linfocitotoxicidade
LFL	Logaritmo da fluorescência
LIFT	<i>Lymphocyte Immunofluorescence Test</i> - Teste de imunofluorescência de linfócito
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mielocítica Aguda
LNH	Linfoma Não-Hodgking
log	Logaritmo
LSS	<i>Log Side Scatter</i>
m ²	Metro quadrado
MAILA	<i>Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Lymphocyte Antigens Assay</i> - Teste de imobilização com anticorpos monoclonais específicos de antígenos linfocitários
MAIPA	<i>Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Platelet Antigens Assay</i> - Teste de imobilização com anticorpos monoclonais específicos de antígenos plaquetários
Max	Máximo
mín	Mínimo
mL	Mililitro
MM	Mieloma Múltiplo
N°	Número de pacientes
<i>p</i>	Valor de probabilidade
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> - Solução tamponada com fosfato
PCR-RFLP	<i>Polimerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PCR-SSP	<i>Polimerase Chain Reaction - Sequence-Specific Priming</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i> - Ficoeritrina

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<i>PIFT</i>	<i>Platelet Immunofluorescence Test</i> - Teste de imunofluorescência de plaquetas
Plaq	Plaqueta
Pós-tx	Pós-transfusão
Pqts	Plaquetas
PRA	<i>Panel Reactive Antibody</i> - Anticorpos reativos contra painel de antígenos
Pré-tx	Pré-transfusão
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PT	Plaquetas Transfundidas
R1	média + 1DP/média
R2	média + 2DP/média
RBN	Razão de <i>Background</i> Normalizado
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RP	Recuperação de Plaquetas
rpm	Rotações por minuto
SC	Superfície Corporal
SCN	Soro Controle Negativo
SMD	Síndrome Mielodisplásica
Transf	Transfusão
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Luz Ultravioleta
VS	Volume Sanguíneo

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A transfusão de plaquetas é uma terapia muito útil na prevenção e tratamento de hemorragias em pacientes plaquetopênicos em decorrência de doenças medulares ou terapias citotóxicas (SCHIFFER et al, 2001). Antes da instituição da transfusão de plaquetas, as hemorragias contribuíam para a morte de 67% dos pacientes com leucemias. Após instituição dessa terapia, a incidência de hemorragias fatais caiu para 37% e vem diminuindo cada vez mais devido ao aperfeiçoamento do tratamento médico no suporte transfusional terapêutico e profilático com concentrados de plaquetas (CP) (BAYER et al., 1992).

Graças aos atuais métodos de estocagem, milhões de transfusões de plaquetas são realizadas por ano em todo o mundo (FISCHER et al., 2006). Em Minas Gerais, de acordo com levantamentos da Fundação HEMOMINAS, no ano de 2008 foram produzidos 700.634 hemocomponentes dos quais 173.446 (24,8%) eram concentrados de plaquetas e destes, 109.358 (63,1%) foram efetivamente transfundidos.

No Hemocentro Regional de Uberaba, em 2008, produziu-se 10.814 concentrados de plaquetas, dos quais, 10.638 (98,37%) eram concentrados de plaqueta simples e 176 (1,63%) foram obtidos por aférese. No período, foram transfundidas 4.813 unidades deste hemocomponente, o que representou 44,50% de aproveitamento.

Apesar da grande produção de CPs, o seu aproveitamento é limitado e por vezes há falta desse hemocomponente nos Hemocentros e Agências Transfusionais. Com isso, ainda é um desafio a esses serviços a obtenção de CPs em quantidade e qualidade suficientes para atender a demanda de todos os pacientes que necessitam desta terapia e reduzir o desperdício desse hemocomponente (CAMERON et al., 2007).

1.1 Transfusão de Plaquetas

As plaquetas são produzidas pela fragmentação do citoplasma de megacariócitos, células grandes e poliplóides que se desenvolvem na medula óssea e no baço (LEEKSMA e COHEN, 1955). Ao serem liberadas na circulação sanguínea, exercem um papel essencial na hemostasia, cicatrização de feridas e processos de fibrose (SOARES et al., 2007). Em humanos, são produzidas diariamente 1×10^{11} plaquetas que apresentam sobrevida média de dez dias e são retiradas da circulação pelo sistema retículo endotelial, principalmente no fígado e no baço (MASON et al., 2007).

Quando há um desbalanço com queda na produção de plaquetas ou aumento de consumo ou destruição periférica, observa-se um quadro de plaquetopenia. A plaquetopenia por falência medular está relacionada a doenças hematológicas, oncológicas ou onco-hematológicas e ao tipo de tratamento (radioterapia e/ou quimioterapia). Nesses casos, a transfusão de plaquetas é a principal terapia utilizada na prevenção e tratamento de hemorragias.

Embora existam controvérsias sobre quando a transfusão profilática de plaquetas se faz necessária, geralmente, é realizada quando a sua concentração está abaixo de 10×10^9 plaquetas/L na ausência de febre e $\leq 20 \times 10^9$ /L para pacientes febris ou com infecção, em transplante de células tronco, com mucosite e, em casos particulares, quando os pacientes se encontram em tratamento anticoagulante ou antes de serem submetidos a procedimentos invasivos ou cirúrgicos. As transfusões terapêuticas referem-se aos casos de sangramento ativo (HEIM et al., 2008).

As plaquetas a serem transfundidas podem ser obtidas a partir de unidades de sangue total, pelo método de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) ou de *Buffy Coat* (BC). Por estes métodos, cada unidade de concentrado de plaquetas (CP), unitárias ou randômicas, contém aproximadamente $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas em 50 - 60 mL de plasma. Outro método de obtenção de CP é o procedimento de aférese em que as plaquetas são coletadas de um único doador. Neste, obtém-se 3×10^{11} plaquetas em 200 a 300 mL de plasma, o equivalente a cerca de 6 a 12 unidades de PRP ou BC, porém, é um método de maior custo (MAURER-SPUREJ e CHIPPERFIELD, 2007).

Falhas nos processos de obtenção, conservação, manipulação e infusão dos hemocomponentes podem desencadear danos nos componentes celulares e plasmáticos, gerando incidentes e acidentes transfusionais graves (ROSSI, 2002). Para manter a boa qualidade na produção e estocagem de plaquetas, três fatores devem ser considerados: redução da ativação de plaquetas durante a coleta, preparo e estocagem; atividade glicolítica mínima e disponibilidade de glicose durante todo o período de estocagem (GULLIKZZON, 2003).

Desde 1980, tem sido adotada pelos serviços de hemoterapia a estocagem dos produtos plaquetários à temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) por no máximo cinco dias (SIMONSEN et al., 2006) e alguns protocolos estabelecem pH mínimo de 6,4 e máximo de 7,4 (STRASBOURG: COUNCIL OF EUROPE, 2005). A recuperação média após cinco dias de estocagem é de 63% e a sobrevida média é de 160,8 horas (DUMONT et al., 2002). Muitas pesquisas têm buscado estender o período de estocagem, melhorando as condições de armazenamento para diminuir o risco de crescimento bacteriano. Essa extensão pode aperfeiçoar a disponibilidade de componentes plaquetários e reduzir o desperdício dos mesmos (SIMONSEN et al., 2006).

Uma estratégia frequentemente utilizada para redução do risco de transmissão de doenças é a redução no número de leucócitos por filtração, irradiação e pelo uso de concentrados obtidos por aférese. Além disso, esses métodos de desleucocitação contribuem para a diminuição do risco de aloimunização a antígenos leucocitários humanos (*HLA - Human Leukocyte Antigen*), condição que pode afetar a resposta à transfusão (CAMERON et al., 2007; NAKAZAWA et al., 2007). O que se tem preconizado é que o número de leucócitos por bolsa seja menor que 5×10^6 (KAO et al., 1995).

1.2. Resposta à transfusão de plaquetas

Habitualmente, é de responsabilidade do serviço de hemoterapia a captação de doadores, triagem clínica, coleta de sangue, processamento, armazenamento, triagem sorológica, tipagem imuno-hematológica, provas de compatibilidade e controle de qualidade dos hemocomponentes. Contudo, a eficácia do procedimento hemoterápico fica restrita à avaliação do médico assistente.

Enquanto o controle da eficácia da transfusão de concentrados de hemácias é realizado pelo incremento da hemoglobina ou hematócrito, facilmente avaliados através das suas dosagens, o controle da transfusão de plaquetas é feito pelo cálculo do Incremento Corrigido da Contagem (ICC) ou da porcentagem de Recuperação Plaquetária. Prática raramente observada nos centros hemoterápicos brasileiros.

O cálculo do ICC é definido como a diferença entre a contagem encontrada no paciente após a transfusão (N° Pós-tx) e a observada antes da transfusão (N° Pré-tx), multiplicada pela superfície corporal (SC) e dividida pelo número de plaquetas transfundidas (N° Pqts)

(YANKEE; GRUMET e ROGENTINE, 1969; THE TRAP STUDY GROUP, 1997; ARNOLD et al., 2006). Então:

$$ICC = \frac{(N^{\circ} \text{ Pós-tx} - N^{\circ} \text{ Pré-tx})/\mu\text{L} \times SC \text{ (m}^2\text{)}}{N^{\circ} \text{ Pqts} \times 10^{-11}}$$

A área de superfície corporal em m² foi estimada por DuBois e DuBois (1916), em que a altura (cm)^{0,725} é multiplicada pelo peso (Kg)^{0,425} e por 0,00718 (DAVIS et al., 1999).

O cálculo da Recuperação Plaquetária é definido como a diferença entre a contagem encontrada no paciente após a transfusão (N^o Pós-tx) e a observada antes da transfusão (N^o Pré-tx), multiplicada pelo volume sanguíneo (VS) e dividida pelo número de plaquetas transfundidas (N^o Pqts) (DAVIS et al., 1999). Logo:

$$\text{Recuperação Plaquetária} = \frac{(N^{\circ} \text{ Pós-tx} - N^{\circ} \text{ Pré-tx})/\mu\text{L} \times 10^{-6} \times VS \text{ (mL)}}{N^{\circ} \text{ Pqts} \times 10^{-11}}$$

Dessa forma, o ICC e a RP ajustam o número de plaquetas transfundidas para o volume de sangue do paciente e são consideradas ferramentas úteis na comparação mais precisa da resposta à transfusão, uma vez que as diferenças no ICC e na RP podem ocorrer com produtos que tenham a mesma dose, mas diferentes qualidades (DAVIS et al., 1999; SLICHTER et al., 2005).

Quando o incremento é insatisfatório, o paciente é denominado como refratário à transfusão de plaquetas. Como este incremento pode oscilar em decorrência de fatores clínicos e farmacológicos, a confirmação é feita mediante resultados insatisfatórios em duas ou três transfusões consecutivas (REBULLA, 2005; DZIK, 2007).

De forma geral, a refratariedade é definida de acordo com os valores do incremento corrigido com 10-60 minutos e com 18-24 horas após a transfusão e devem ser iguais ou inferiores a 5.000 e 2.500 plaquetas/ μL , respectivamente (BISHOP et al., 1992; SCHIFFER et al., 2001). Os valores que indicam refratariedade apresentam porcentagem de RP menor que 20% até uma hora ou menor que 10% com 16 horas (DAVIS et al., 1999; NOVOTNY, 1999). Enquanto a contagem de plaquetas uma hora após a transfusão avalia, principalmente, a resposta imediata à transfusão, a contagem com 24 horas monitora a sobrevivência das plaquetas (SECORD E GOLDFINGER, 2004).

A definição do limiar de refratariedade à transfusão de plaquetas com base no ICC e no RP é muito útil, desde que os resultados sejam bem interpretados (DAVIS et al., 1999). No contexto clínico, é considerado importante o aumento maior ou igual a 20% no ICC (5×10^9 plaquetas/L com uma hora e $2,4 \times 10^9$ plaquetas/L com 24 horas) e no intervalo até a próxima transfusão ($\geq 8,4$ horas). Em pacientes trombocitopênicos não refratários, a recuperação média é de 60 (± 15) % da dose transfundida (HANSON e SLICHTER, 1985). Como aproximadamente 30 a 35% das plaquetas encontram-se retidas no baço, pacientes hipersplênicos apresentam recuperação plaquetária diminuída enquanto que indivíduos sem o baço podem apresentar recuperação superior a 90% (BISHOP et al., 1988; FRIEDBERG et al., 1993; DOUGHTY et al., 1994; BOCK et al., 1996).

O ICC é uma avaliação essencial para o sucesso da transfusão de plaquetas, principalmente, para os pacientes que estão recebendo transfusões profiláticas. Observa-se diminuição progressiva no intervalo entre as transfusões quando há diminuição nos valores do ICC, o que indica menor sobrevivência das plaquetas (SLICHTER et al., 2005). Além disso, a falta de resposta satisfatória parece estar relacionada à maior incidência de complicações

hemorrágicas e à menor sobrevida do paciente, provavelmente, em decorrência de um maior grau de dano endotelial (KERKHOFFS et al., 2008).

Assim, além da presença ou ausência de sangramento, o monitoramento da efetividade da transfusão de plaquetas com base na contagem de plaquetas pós-transfusional apresenta maior repercussão na prática diária dos Centros de Terapia Intensiva (CTI), direcionando as decisões do clínico quanto à necessidade de transfusões adicionais ou precaução quanto a procedimentos invasivos (ARNOLD et al., 2006).

Existem diversas condições clínicas que podem influenciar a sobrevida das plaquetas após a transfusão e comprometer o incremento plaquetário. Essas condições podem ser de causas imunes ou não imunes. Dentre as não imunes, que representam cerca de 80% das causas de refratariedade, destacam-se: sepse, febre, esplenomegalia, transplante de medula óssea e de células progenitoras de sangue periférico, coagulação intravascular disseminada, doença do enxerto contra o hospedeiro, doenças vaso-oclusivas, plaquetopenia pelo uso de medicamentos (quinidina, penicilina, sulfas, heparina, diuréticos e vancomicina) e hemorragias. Estes fatores podem encurtar a sobrevida de plaquetas, com queda significativa no ICC de 24 horas, porém com pouco efeito sobre o ICC de uma hora (SLICHTER et al., 2005; CAMERON et al., 2007). Deve se considerar também que cada paciente pode ser muito sensível a determinado fator e relativamente insensível a outros (FRIEDBERG et al., 1993).

As causas imunes se relacionam com a necessidade de maior número de transfusões e em intervalos menores devido à persistência de trombocitopenia decorrente da presença de anticorpos contra antígenos presentes na membrana plaquetária do doador.

1.3. Aloimunização plaquetária

As plaquetas apresentam antígenos do sistema ABO em sua membrana e também podem adsorver esses antígenos do plasma. A refratariedade por anticorpos anti-ABO pode ser contornada pela transfusão de plaquetas ABO compatíveis. Embora seja clara a interferência de anticorpos anti-A e anti-B nos incidentes de hemólise intravascular, permanece em discussão o quanto a transfusão de plaquetas ABO incompatíveis pode influenciar a resposta à transfusão de plaquetas (SHEHATA et al., 2009).

Fung, Downes e Shulman (2007) mostraram que cerca de 50% dos serviços de hemoterapia norte-americanos providenciam plasmas ou plaquetas ABO incompatíveis quando não há disponibilidade de produtos compatíveis. Desses, 17% não realizam monitoramento no uso de plaquetas ABO incompatíveis.

Os dois sistemas de antígenos mais envolvidos na aloimunização plaquetária são: os antígenos leucocitários humanos (*Human Leukocyte Antigen – HLA*), presentes na membrana das plaquetas e também em outros tecidos e células sanguíneas, e os antígenos plaquetários humanos (*Human Platelet Antigen – HPA*) específicos das plaquetas (DELAFLOR-WEISS; MINTZ, 2002; TINMOUTH et al., 2006).

A aloimunização a estes antígenos ocorre devido à sensibilização prévia durante a gestação, transfusões ou transplantes. Também depende de diversos fatores tais como o tipo de produto plaquetário transfundido, o número de transfusões recebidas e estado imunológico do paciente (MEENU et al., 2005). O principal tipo de concentrado de plaquetas transfundido, especialmente em nosso país, é o de *pool* de plaquetas de doadores randomizados, não desleucocitadas, de cinco a seis doadores. Neste caso, os pacientes são expostos a um maior número de antígenos de doadores aumentando o risco de aloimunização.

A aloimunização por antígenos *HLA* é mais comum que por antígenos *HPA* e acredita-se que se deva, principalmente, à contaminação dos produtos plaquetários com leucócitos (CLAAS et al., 1981). Ainda, observa-se que os pacientes *HLA*-aloimunizados são os que mais frequentemente desenvolvem anticorpos contra antígenos plaquetários específicos (KICKLER et al., 1990).

Quanto ao tratamento dos pacientes aloimunizados, alguns centros selecionam os doadores cujos concentrados apresentaram um incremento satisfatório, mas em alguns casos pode não ser possível a identificação de um doador compatível. Nestes casos, é inaceitável continuar a terapia profilática se o paciente não apresentar sangramento. Quando há sangramento recomenda-se o emprego de *pool* de vários doadores, esperando que algum deles seja compatível e ajude a melhorar o incremento (NEGASAWA, KIM e BALDINI, 1978).

A infusão de imunoglobulina G (IgG) também é utilizada para modular a aloimunização, mas há controvérsias quanto ao seu emprego, pois alguns estudos mostram ineficácia em pacientes refratários, sendo necessário retomar as transfusões de *pools* de plaquetas (SCHIFFER et al., 1984; LEE et al., 1987). Quanto à esplenectomia, há estudos que mostram ineficiência na correção do incremento, sugerindo que as plaquetas também sejam destruídas em outros sítios, como o fígado (HOGGE et al., 1984).

1.3.1. Aloimunização *HLA*

O sistema *HLA* origina-se do complexo de histocompatibilidade principal que codifica proteínas polimórficas da superfície celular responsáveis pela apresentação de antígenos. As plaquetas podem sintetizar antígenos *HLA* de Classe I (SANTOSO et al., 1993) e também

adsorver antígenos *HLA* solúveis no plasma e com isso, o número de antígenos *HLA* na superfície de plaquetas é relativamente alto em comparação às células vermelhas e granulócitos (LALEZARI e DRISCOLL, 1982).

O que se tem estabelecido para a prevenção da aloimunização *HLA* é que a quantidade de leucócitos nos produtos sanguíneos seja menor que um milhão (padrões europeus) ou cinco milhões (padrão nos Estados Unidos) (REBULLA, 2005). As principais estratégias empregadas são a redução no número de leucócitos por filtração, irradiação gama ou UV, ou pelo uso de concentrados obtidos por aférese (CAMERON et al., 2007; NAKAZAWA et al., 2007).

Considerando-se a dominância do sistema *HLA* e que as complicações transfusionais podem ser resolvidas em aproximadamente dois terços dos casos quando é feita a tipagem *HLA* ou identificação cruzada (REBULLA, 2005), o caminho óbvio para a prevenção da aloimunização parece ser a seleção de doadores que compartilhem todos os antígenos de histocompatibilidade com o receptor. No entanto, a única compatibilidade total será entre gêmeos idênticos. Em todos os outros casos, os indivíduos serão incompatíveis e é provável que ocorram reações aloimunes (CLASS, 2002).

Há uma enorme dificuldade em se encontrar doadores totalmente compatíveis devido às diversas variações polimórficas do sistema *HLA*. Por esta razão, muitos pacientes recebem órgãos, plaquetas ou células-tronco de doadores incompatíveis (CLAAS, 2002).

No caso da transfusão de plaquetas, tais procedimentos podem levar à refratariedade plaquetária. O único meio de contornar este problema é selecionando doadores com base em provas cruzadas negativas. Assim, a transfusão é realizada somente se o paciente não contém aloanticorpos contra os antígenos *HLA* ou específicos de plaquetas do doador. Num primeiro

momento isto parece impossível devido à grande variação polimórfica do sistema *HLA*; no entanto, o que vários estudos mostram é que existem incompatibilidades mais ou menos prováveis de induzirem aloimunização (MARUYA et al., 1993; DOXIADIS et al., 1996). Em geral, os enxertos incompatíveis para antígenos *HLA* Classe I permissíveis apresentam sobrevida similar à de enxertos *HLA* idênticos. Para tanto, vêm sendo estabelecidos programas especiais de avaliação de incompatibilidades aceitáveis, como estudado pelo grupo do Euro Transplante (DANKERS et al., 2004).

Observa-se que existem muitos estudos voltados para o valor da compatibilidade *HLA* no transplante, mas faltam estudos similares na avaliação da compatibilidade na transfusão de plaquetas, uma vez que a incompatibilidade pode ser responsável por reações aloimunes e sensibilização prévia com influência para pacientes onco-hematológicos que geralmente são candidatos a um transplante de medula óssea ou de células progenitoras de sangue periférico.

O que se espera é que o monitoramento aprofundado dos pacientes, com diferentes testes *in vitro*, permita identificar parâmetros ideais na predição da presença ou ausência de resposta aloimune prejudicial no transplante e na transfusão.

A compatibilidade *HLA* pode ser avaliada por ensaios de linfocitotoxicidade, ELISA e ensaios fluorescentes (DZIK, 2007). A literatura tem mostrado que os testes de linfocitotoxicidade (*Lymphocytotoxic Test - LCT*) e *LCT* antiglobulina humana adaptado (AGH-*LCT*) (ARAKI et al., 1995) têm sido implementados em muitos laboratórios para detecção de anticorpos contra antígenos *HLA* Classe I. Estes anticorpos, contudo, podem não ser detectados pelo *LCT* ou AGH-*LCT*, devido à baixa sensibilidade, resultando em falta de reconhecimento de refratariedade à transfusão de plaquetas.

Novos testes têm sido introduzidos alternativamente como o *Labscreen PRA-HLA Class I*, *FlowPRA Class I (One Lambda, Canoga Park, CA)* (MOSES et al., 2000), o teste de imunofluorescência indireta de linfócito por citometria de fluxo (*Lymphocyte Immunofluorescence Test - LIFT*) (LUBENKO et al., 2001; LEVIN et al., 2003) e a imobilização com anticorpos monoclonais específicos de antígenos linfocitários (*Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Lymphocyte Antigens Assay - MAILA*) (KURZ et al., 2001). Os testes com citometria de fluxo (*LIFT* e *FlowPRA Class I*) são descritos como mais sensíveis que o *LCT* para a detecção de anticorpos *HLA* no plasma. Sato e colaboradores (2005) observaram que os métodos baseados em citometria de fluxo são mais efetivos que o *AHG-LCT* na detecção de anticorpos *HLA*.

1.3.2. Aloimunização HPA

A membrana plaquetária apresenta receptores celulares representados por complexos de glicoproteínas (GPs) que são fundamentais para a função hemostática plaquetária normal. Algumas glicoproteínas plaquetárias são polimórficas, podendo existir na população sob duas ou mais formas alélicas diferentes, resultantes da substituição de um único nucleotídeo que provoca, conseqüentemente, a mudança de aminoácidos (ROZMAN, 2002; CASTRO et al., 2007).

Os polimorfismos das GPs plaquetárias são determinantes antigênicos denominados como antígenos plaquetários humanos ou *HPAs*. Aloanticorpos contra esses aloantígenos podem surgir durante a gravidez ou transfusão conduzindo à trombocitopenia aloimune neonatal, púrpura pós-transfusional, e refratariedade plaquetária transfusional. Os anticorpos

anti-plaquetários aderem à superfície plaquetária e esse imunocomplexo é fagocitado pelas células mononucleares resultando em diminuição do número de plaquetas (ERTEL et al., 2005).

A investigação destes aloantígenos é importante na seleção de doadores de plaquetas em casos de refratariedade plaquetária e pode ser realizada por técnicas que utilizam anticorpos monoclonais (*Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Platelet Antigens Assay - MAIPA*) e biologia molecular (PCR-RFLP e PCR-SSP). Dados da prevalência desses antígenos plaquetários humanos em uma dada população são importantes para o diagnóstico de trombocitopenias imunes, o planejamento de programas de *screening* em mulheres com risco de trombocitopenia aloimune neonatal, consulta genética e terapia adequada para pacientes com anticorpos anti-*HPA*. Além de apresentarem impacto prático na realização de transfusão de plaquetas, estes dados podem contribuir com o entendimento das relações de evolução e oferecer informações da expansão demográfica (ROZMAN, 2002).

1.4. Justificativa

Considerando que há escassez de dados sobre a ocorrência de refratariedade plaquetária e de suas causas nos serviços que oferecem suporte hemoterápico em nosso país, propusemos realizar este estudo para ampliar o conhecimento do problema nesses serviços e gerar informações relevantes para a implementação de medidas apropriadas para melhoria do atendimento ao paciente e racionalização no uso de concentrados de plaquetas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi identificar a ocorrência e as causas de refratariedade à transfusão de plaquetas em pacientes onco-hematológicos submetidos a esta terapia no ambulatório do Hemocentro Regional de Uberaba e no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a resposta à transfusão de plaquetas;
2. Determinar as causas de refratariedade;
3. Avaliar a frequência de aloimunização plaquetária e dos aloanticorpos *HLA* Classe I envolvidos;
4. Avaliar a associação entre aloimunização plaquetária e desenvolvimento de refratariedade à transfusão.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Indivíduos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e ao Comitê de Ética da Fundação HEMOMINAS recebendo parecer favorável de ambas as instituições para a realização do mesmo (anexos 1 e 2).

Foram incluídos no estudo: indivíduos com idade superior a 18 anos, com diagnóstico onco-hematológico, atendidos pelo Hospital de Clínicas da UFTM e Hemocentro Regional de Uberaba e submetidos à transfusão de Concentrados de Plaquetas. As amostras de sangue e dados do prontuário eram coletados após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 3).

3.2. Avaliação dos Concentrados de Plaquetas (CPs)

3.2.1. Contagem de plaquetas

Avaliaram-se os CPs obtidos pelo método de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e por Aférese, transfundidos aos pacientes inclusos na pesquisa, através de amostras homogêneas para a contagem manual de plaquetas. O macarrão da bolsa era selado a 10 cm da extremidade, garantindo a não abertura do sistema, para separação de aproximadamente 2 mL do CP. Nos casos de transfusões de CPs obtidos por PRP, preparava-se um *pool* das amostras das bolsas a

serem transfundidas ao paciente em questão. Todas as amostras eram homogeneizadas por no mínimo cinco minutos e a contagem plaquetária realizada em duplicata. Para tanto, as amostras foram diluídas na proporção de 1:200 em solução de oxalato de amônia a 1%, (10µL da amostra para 1990 µL de solução). Após homogeneização por inversão manual, eram pipetados 10 µL da diluição em câmara de Neubauer e deixado em repouso em câmara úmida por 15 minutos.

A quantificação de plaquetas se fez pela contagem de plaquetas no quadrante central da câmara de Neubauer em aumento de 500 vezes. A média da contagem em duplicata era então submetida ao seguinte cálculo:

$$\text{Plaq}/\mu\text{L} = \text{N}^\circ \text{ Plaq. no quadrante central} \times 10 \times \text{fator de diluição (200)} \times 5.$$

Os resultados foram convertidos em N° de plaquetas/bolsa pela fórmula:

$$\text{Plaquetas/bolsa} = \text{Plaqueta}/\mu\text{L} \times 1000 \times \text{volume da bolsa}$$

3.2.2. *Contagem de leucócitos*

Para avaliar a concentração de leucócitos, as amostras homogeneizadas eram diluídas em solução de Turk na proporção de 1:5 (100 µL de amostra para 400 µL de solução). Após homogeneização por inversão manual era deixado em repouso por 10 minutos. A análise de amostras de CPs obtidos por PRP fez-se em câmara de Neubauer e para CPs de aférese, em

câmara de Nageot. Eram pipetados 10 μL de cada amostra na câmara e deixado em repouso por 15 minutos. A análise se fez em aumento de 500 vezes. O número de leucócitos/ μL foi obtido pelo cálculo:

$$\text{N}^\circ \text{ de leucócitos}/\mu\text{L} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de leucócitos} \times \text{Fator de diluição (\%)} \times 10}{\text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados}}$$

O número de leucócitos/bolsa foi calculado pela fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de leucócitos/bolsa} = \text{N}^\circ \text{ de leucócitos } /\mu\text{L} \times 1000 \times \text{volume da bolsa}$$

3.3. Avaliação da resposta à transfusão

A avaliação da resposta terapêutica à transfusão foi feita pela contagem de plaquetas 01 hora antes da transfusão e com 01 e 24 horas após a transfusão. Foram considerados refratários os pacientes que apresentaram duas contagens seguidas do incremento plaquetário pós-transfusão menor que 5.000 na primeira hora e menor 2.500 nas 24 horas (SLICHTER et al., 2005).

3.3.1. Contagem de plaquetas do receptor antes e após a transfusão

As amostras para contagem de plaquetas foram obtidas em 5mL de sangue total colhido em tubo contendo o anticoagulante EDTA. Após homogeneização eram tomados 10 μ L de sangue para diluição em 990 μ L de solução diluente (1:100). A solução diluente era preparada previamente na proporção de 100 mg de oxalato de amônio, 10 mL de água destilada e 50 μ L de Azul de Metileno 1%. Após homogeneização, 10 μ L da solução eram pipetados em câmara de Neubauer e deixados em repouso por no mínimo 15 minutos em câmara úmida.

A quantificação de plaquetas se fez em duplicata pela contagem de plaquetas no quadrante central da câmara de Neubauer com aumento de 500 vezes. A média de cada contagem foi submetida ao seguinte cálculo:

$$\text{Plaq}/\mu\text{L} = \text{N}^\circ \text{ Plaq. no quadrante central} \times \text{fator de diluição (100)} \times 10.$$

3.3.2. Cálculo do incremento plaquetário

O Incremento Corrigido da Contagem (ICC) foi obtido pelo seguinte cálculo:

$$\text{ICC} = \frac{\text{IP} \times \text{SC}}{\text{PT} (\times 10^{11})}$$

Onde:

- IP: incremento plaquetário ($\times 10^9/\text{L}$);
- SC: superfície corporal (m^2);

- PT: plaquetas transfundidas

3.4. Investigação das causas de refratariedade à transfusão de plaquetas

Para a investigação de causas não-imunológicas e imunológicas em pacientes refratários foram levantados dados sobre:

a) Qualidade dos produtos plaquetários transfundidos:

- Método de preparação;
- Tempo de estocagem;
- pH;
- Compatibilidade ABO;
- Número de unidades transfundidas e
- Número de plaquetas administradas por transfusão.

b) Dados clínicos do paciente (obtidos dos prontuários):

- Dados demográficos: idade, gênero, peso, altura;
- Condições clínicas: febre, CIVD, esplenomegalia, infecção, sangramento;
- Diagnóstico e indicação;
- Medicações em uso;

- História de sensibilização prévia: número de exposições prévias a plaquetas, células vermelhas, plasma e/ou transplantes e história gestacional.

3.5. Avaliação da frequência de aloimunização plaquetária e identificação de aloanticorpos HLA Classe I envolvidos

Foram coletadas amostras de sangue em tubos sem anticoagulante para pesquisa de anticorpos em todos os pacientes. A técnica empregada para a pesquisa inespecífica de anticorpos antiplaquetários foi o teste de imunofluorescência plaquetária conhecido como *PIFT* (*Platelet Immunofluorescence Test*) utilizando citometria de fluxo e, para a pesquisa e identificação de anticorpos anti-*HLA* Classe I utilizou-se *kits* para detecção de anticorpos *HLA* de Classe I - *Labscreen*TM (*LS1PRA*, marca One Lambda) utilizando-se a citometria de fluxo, aqui denominado como *PRA-HLA*.

3.5.1. Teste de Imunofluorescência Plaquetária (*PIFT*)

Para a pesquisa inespecífica de anticorpo ligado à plaqueta preparou-se a cada bateria de testes um *pool* de plaquetas de dois doadores do grupo sanguíneo O e Rh negativo. A separação de plasma rico em plaquetas foi feita por centrifugação a 800 rpm por 20 minutos. Após serem transferidas para outro tubo, as plaquetas eram lavadas por ressuspensão em PBS/EDTA 0,1% (± 2 mL), centrifugação a 3000 rpm por dez minutos e retirada do sobrenadante. Após a terceira lavagem, eram ressuspensas em 1,5 mL de PBS/EDTA 0,1%. A

concentração de plaquetas era ajustada após contagem automática para 100.000 plaquetas/ μ L, aproximadamente.

No preparo das amostras para a análise por citometria de fluxo, para cada teste, pipetou-se 50 μ L do *pool* de plaquetas em tubo para citômetro e adicionou-se 50 μ L do soro a ser testado. Além do soro teste, a cada bateria de exames realizava-se concomitantemente o teste de um soro controle negativo e um soro controle positivo (soros previamente identificados e aliqüotados). As preparações eram então incubadas por 30 minutos a 37°C. Decorrido esse tempo, eram lavadas por três vezes consecutivas com PBS/EDTA 0,1% (\pm 2 mL) seguindo-se a ressuspensão das mesmas e centrifugação a 3000 rpm por cinco minutos.

Na última lavagem, o sobrenadante era retirado e fazia-se a homogeneização do tubo por agitação em *vórtex* e pipetagem. Em seguida, eram pipetados 60 μ L do *Anticorpo Policlonal de Coelho fração F(ab')₂ Anti-Imunoglobulina G Humana - Cadeia Gama conjugado à Fluoresceína Isotiocianato (FITC)* (INVITROGEN lote 366090A) previamente diluído em água autoclavada (1:50). As amostras eram deixadas à temperatura ambiente por 45 minutos ao abrigo de luz. Após incubação, seguia-se novamente a lavagem com PBS-EDTA 0,1% (\pm 2 mL) ressuspendendo e centrifugando a 3000 rpm por cinco minutos. Após retirar o sobrenadante a amostra era ressuspendida em uma solução com 500 μ L PBS-EDTA 0,1%.

Fez-se a leitura em citômetro de fluxo, aparelho *FASCalibur Becton Dickison*, através do Software *CellQuest*. A estabilidade e reprodutibilidade do citômetro eram periodicamente checadas com o kit *Calibrite™ beads* (BECTON DICKISON).

Os parâmetros relacionados a seguir foram pré-estabelecidos no computador do sistema para permitir uma uniformização de análise de cada amostra. O programa visou: a quantificação de partículas analisadas, a estabilização do raio laser, a padronização da região

dos histogramas onde as plaquetas estariam representadas graficamente, a estabilização das fluorescências, a determinação do “gating”, que consiste na demarcação da população a ser estudada.

Foram considerados como parâmetros: o número de partículas contadas e fluxo da amostra. Os histogramas das análises foram obtidos da seguinte forma:

Histograma 1: Forward Scatter (FS - ordenada) x Log Side Scatter (LSS - abscissa)

Histograma 2: Logaritmo da Fluorescência 1 (LFL1) – (abscissa)

A região demarcada no histograma 1(FS x LSS) correspondia à população plaquetária a ser analisada.

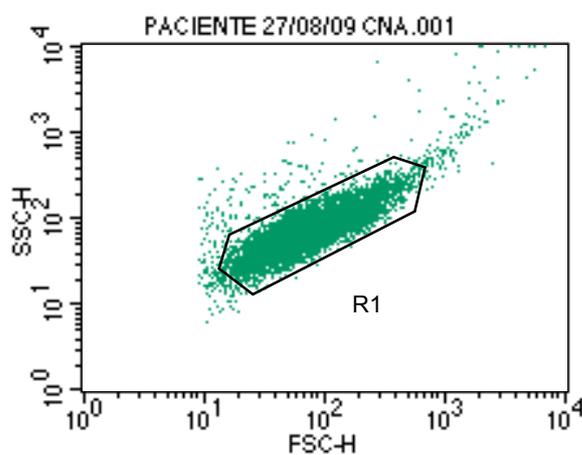


Figura 1. Marcação da população plaquetária analisada

Foi estabelecido que, durante a análise gráfica das amostras, a região correspondente à negatividade da curva de fluorescência cuja região foi considerada como autofluorescência de partículas, *debris* celulares, interferências do aparelho, (“ruídos”) e a grande maioria da fluorescência inespecífica do anticorpo ligado às plaquetas da amostra controle.

Para a padronização do anticorpo utilizado, realizou-se a pesquisa de anticorpos no soro de 24 doadores de sangue do Hemocentro da UNICAMP, todos masculinos e sem história de exposição prévia a transfusões ou transplantes, para caracterização da fluorescência em uma curva padrão. Após verificação da homogeneidade e normalidade dos resultados, verificou-se que a média de fluorescência foi de 3,47, mediana de 3,41 e desvio padrão de $\pm 0,57$. Determinaram-se intervalos de corte para determinação de resultados negativos, inconclusivos e positivos. Valores inferiores ao R1 (média + 1DP/média) foram considerados como resultados negativos; valores entre R1 e R2 (média + 2 DP/média), inconclusivos, e, valores superiores ao R2, positivos.

Com estas medidas, procurou-se eliminar a fluorescência inespecífica através de soros controles negativos. Portanto, para cada amostra teste, avaliou-se, previamente, uma amostra controle. Foram contados 10.000 eventos por amostra.

A Figura 1 apresenta a Fluorescência de um paciente com resultado negativo cuja mediana de fluorescência (4.91) esteve abaixo do valor de R1 (1,16).

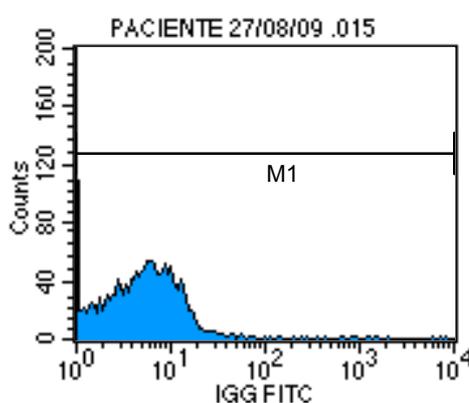


Figura 2. Marcação de plaquetas com IgG FITC.
Exemplo de resultado negativo (mediana <R1)

A Figura 2 apresenta o resultado de Fluorescência de uma amostra de paciente positiva cuja mediana de fluorescência (33,98) esteve acima do valor de R2 (1,33).

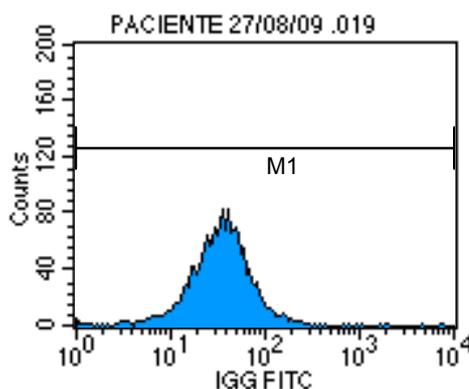


Figura 3. Marcação de plaquetas com IgG FITC.
Exemplo de resultado positivo (mediana >R2)

3.5.2. Pesquisa e identificação de anticorpos anti-*HLA* Classe I

A identificação de anticorpos específicos contra antígenos *HLA* Classe I foi realizada através de técnicas de citometria de fluxo utilizando kits para detecção de anticorpos *HLA* de Classe I - *Labscreen*TM (LS1PRA, marca One Lambda) seguindo as orientações do fabricante.

As amostras de soro dos pacientes eram colhidas antes da transfusão em tubos sem anticoagulante com gel de separação e centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos. Após separação, o soro era estocado em freezer à temperatura de -80°C. Os testes foram realizados no laboratório *HLA* da UNICAMP em agosto de 2009.

As amostras eram descongeladas imediatamente antes do ensaio e novamente centrifugadas a 10000g por dez minutos para separação de possíveis grumos. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços onde eram pipetados 5 µL das *beads Labscreen*

(homogeneizadas por suave agitação em *vórtex* antes do uso) e 20 μL do soro teste, o soro controle negativo sempre pipetado no primeiro poço da placa. Em seguida, a placa era incubada por 30 minutos a 20 – 25°C com agitação suave.

Após incubação adicionava-se 150 μL do tampão de lavagem em cada poço, agitado e centrifugado a 1300g por 5 minutos e descartado o sobrenadante por inversão. A lavagem procedeu-se por mais duas vezes e, então, adicionado a diluição do conjugado PE anti-humano IgG. A placa era novamente agitada e deixada incubar no escuro por 30 minutos a 20-25 °C com agitação suave. Após esta segunda incubação, a placa era novamente lavada por três vezes seguindo-se a adição do tampão, centrifugação a 1300g por 5 minutos e inversão. Por último, adicionava-se 80 μL de PBS em cada poço, agitava-se em *vórtex* e prosseguiu-se a aquisição de dados e análises pelo aparelho.

O aparelho utilizado para a aquisição de dados LabScan 100A era regularmente revisado e calibrado diariamente utilizando-se microesferas calibradoras (Classification CAL1 e Reporter CAL2) com propriedades de dispersão de luz conhecidas e também com intensidades conhecidas de fluorescência nas faixas dos comprimentos de onda avaliados pelo aparelho.

Antes da aquisição dos dados, fez-se a escolha da planilha de leitura lote-específica (*Template*) respectiva ao catálogo e número lote do kit utilizado. Esta planilha apresenta dados referentes ao padrão de combinações de antígenos presentes sobre a superfície das *beads*, o que permite caracterizar a especificidade do aloanticorpo pesquisado. O *Template* é disponibilizado pelos produtores da One Lambda pelo *web site* <http://download.onelambda.com>. Após criar o

arquivo e ajustá-lo de acordo com o template e dados referentes às amostras, procedeu-se a leitura da placa pelo aparelho segundo as instruções do fabricante.

O teste de rastreio LS1PRA utiliza um painel de antígenos *HLA* Classe I purificados e agrupados por suspensão em 100 micro-pérolas (*beads*) diferentes (esferas de 2 a 4 µm de diâmetro) para identificação de anticorpos anti-*HLA* Imunoglobulina G da Classe I em um único teste. O teste fornece reagentes pré-calibrados para a detecção rápida da porcentagem de reatividade contra o painel de antígenos (*PRA – Panel-Reactive-Antibody*) no soro humano, por meio do Sistema de Ensaio Lambda Multi-Analítico de Pérolas (LABMAS – Lambda Array Beads Multi-Analyte System), o qual caracteriza o analisador de fluxo LABScan 100 para aquisição de dados e análise.

Em cada suspensão de *beads* encontram-se *beads* controle-negativo (não revestidas com antígenos *HLA* Classe I) e *beads* controle-positivo (revestidas com IgG humano purificado). Além disso, a cada ensaio, utiliza-se o soro controle negativo para estabelecer o valor de *background* para cada *bead* em uma bateria de testes. Após a incubação do soro teste com as *beads* *Labscreen*, qualquer anticorpo anti-*HLA* Classe I presente no soro liga-se aos antígenos. A ligação é identificada pela marcação fluorescente com um anticorpo Imunoglobulina G de cabra anti-humano conjugado com R-ficoeritrina (PE). O soro positivo para IgG anti-*HLA* apresenta um desvio no canal fluorescente quando comparado com o soro negativo. A *PRA* é representada pela porcentagem de esferas que reagem de forma positiva ao mesmo soro.

A reatividade dos soros testados é calculada, segundo instruções do fabricante, com base na mediana do sinal fluorescente de cada *bead* revestida com antígenos *HLA* depois da

normalização para ligações não específicas à *bead* controle negativa (*beads* não revestidas com antígenos) e correção dos resultados obtidos com base no soro controle negativo.

Para validação do teste o aparelho deve ler no mínimo 100 unidades de *beads* de cada combinação específica de antígenos. Com base nas 100 leituras de uma determinada combinação antigênica, faz-se o cálculo da mediana do sinal fluorescente e em seguida a normalização com base na mediana do sinal fluorescente das *beads* controle-negativo.

A correção para ligações inespecíficas (*background*) é feita pela relação entre a mediana do sinal fluorescente da *bead* teste e a mediana da *bead* testada com o soro controle negativo.

Assim, a força da reatividade anti-*HLA* é calculada pela razão de *background* normalizado:

$$\text{RBN} = \frac{\text{BT/BCN}}{\text{BT do SCN/ BCN do SCN}}$$

Onde:

- RBN: Razão de *Background* Normalizado;
- BT: *Bead* Teste;
- BCN: *Bead* Controle Negativo;
- SCN: Soro Controle-Negativo.

A força de reatividade do soro teste pode ser distinguida em diferentes faixas de acordo com um sistema de escore para cada especificidade antigênica testada. De acordo com a padronização do fabricante para o soro controle negativo (Lat # LS-NC One Lambda), o teste é considerado positivo quando a razão RBN apresentar valor maior que 1,5. Além disso, para a validação do teste, deverá haver: contagem de no mínimo 50 *beads* de cada especificidade (comumente o valor é maior que 100); valor médio de fluorescência das *beads* controle-negativo sempre menor que 1500 e menor ou igual que a metade do valor das *beads* controle-positivo e valor médio de fluorescência das *beads* do controle positivo maior que 500.

3.6 Análises Estatísticas

Para análise estatística utilizou-se o programa R versão 2.9.1. Todas as variáveis foram submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar se os valores apresentavam distribuição normal e ao teste Levene para testar a homogeneidade das variâncias. Nas variáveis categóricas aplicou-se o Teste Exato de Fisher e para as variáveis numéricas os testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon. O nível de significância para rejeição da hipótese nula (H_0) foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

4. Resultados

4.1. Caracterização da amostra

Participaram do estudo 16 pacientes avaliados em 44 episódios transfusionais de concentrados de plaquetas realizados no período de março de 2008 a maio de 2009. As características dos pacientes incluídos no estudo são descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização da amostra.

Parâmetros	N (%)
Número de pacientes	16
Número de avaliações	44
ICC insatisfatório	
1 hora	19 (43,2%)
24 horas	5 (11,2%)
Diagnóstico	
LMA	05 (31,25%)
LNH	04 (25%)
LLC	02 (12,5%)
LLA	01 (6,25%)
LA	01 (6,25%)
MM	01 (6,25%)
SMD	02 (12,5%)
Idade (mediana/ mín. e Max.)	53 anos (20 – 83)
Gênero	
Masculino	09 (56,25%)
Feminino	07 (43,75%)
Com transfusões prévias	14 (87,5%)
Nº de Hemocomponentes transfundidos (Mediana (mín.-máx.))	15,5 (2 – 184)
História Gestacional	07 (43,75%)

ICC= Incremento Corrigido da Contagem; LMA= Leucemia Mielocítica Aguda; LNH= Linfoma Não-Hodgking; LLC= Leucemia Linfocítica Crônica; LLA= Leucemia Linfocítica Aguda; LA= Leucose Aguda; MM= Mieloma Múltiplo; SMD= Síndrome Mielodisplásica.

Dos 44 episódios avaliados, 19 (43,2%) apresentaram incremento insatisfatório na primeira hora após a transfusão e cinco (11,4%) apenas com 24 horas após a transfusão.

Os diagnósticos dos pacientes foram os seguintes: 05 com Leucemia Mielocítica Aguda; 04, Linfoma Não-Hodgking; 02, Leucemia Linfocítica Crônica; 01, Leucemia Linfocítica Aguda; 01, Leucose Aguda não classificada; 01 com Mieloma Múltiplo e 02 com Síndrome Mielodisplásica.

A idade dos pacientes variou de 20 a 83 anos com mediana de 53 anos, sendo nove do gênero feminino (56,25%) e sete do masculino (43,75%). Todos os pacientes apresentavam risco de aloimunização plaquetária por sensibilização prévia por transfusão e/ou gestação. A exposição prévia por transfusão ocorreu em 14 casos com mediana de 15,5 unidades de componentes sanguíneos por indivíduo, variando de 2 a 184. Quanto à história gestacional, sete das nove mulheres tinham história gestacional variando de uma a seis gestações.

4.2. Caracterização das transfusões avaliadas

Os 44 episódios transfusionais foram caracterizados quanto ao tipo de CP utilizado: PRP ou aférese, processamento por irradiação e/ou desleucocitação, número de leucócitos, compatibilidade ABO e resposta à transfusão de acordo com os valores do ICC. A Figura 4 mostra a comparação entre número total de transfusões e número de transfusões com incremento insatisfatório de acordo com o tipo de CP. A descrição dos dados está apresentada na Tabela 2.

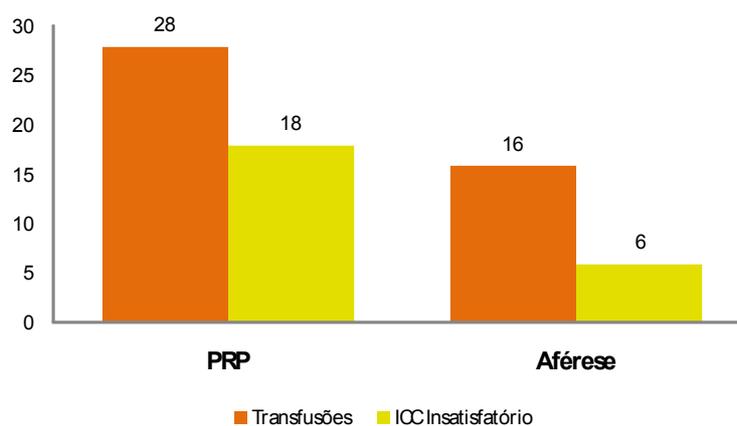


Figura 4. Comparação entre tipo de CP, número de transfusões e número de transfusões com ICC insatisfatório.

Tabela 2. Descrição das transfusões quanto às características dos CPs e Incremento Plaquetário.

Parâmetros	Número de Transfusões (%)
PRP	28 (64%)
Unidades/transusão (Média ± DP)	6,96 ±1,07
Filtrados	22 (79%)
Irradiados	22 (79%)
Filtrados e Irradiados	18 (64%)
Média de Leucócitos	86,32 x 10 ⁶
ABO incompatíveis	0 (0%)
ICC Insatisfatório	
1 hora	15 (54%)
24 horas	3 (11%)
Aférese	16 (36%)
Irradiados	16 (100%)
Média de Leucócitos	0,215 x 10 ⁶
ABO incompatíveis	3 (19%)
ICC Insatisfatório	
1 hora	4 (25%)
24 horas	2 (12,5%)

CP= Concentrado de Plaquetas; ICC= Incremento Corrigido da Contagem; DP= Desvio Padrão.

Os concentrados de plaquetas transfundidos eram, em sua maioria, randômicos obtidos pelo método de PRP (28 episódios, 64%). Foram transfundidos em média 6,96 ±1,07 unidades por episódio. Em dois episódios esses CPs não foram processados por irradiação nem filtração, em quatro episódios apenas irradiados, em outros quatro apenas filtrados e em 18 filtrados e irradiados. A filtração empregada foi a de *beira de leite* e a contagem de leucócitos antes da filtração foi em média de 86,3 milhões ±80,04. Todos os 28 CPs eram ABO compatíveis.

Dessas transfusões, 15 episódios (53,57%) apresentaram incremento insatisfatório na primeira hora após a transfusão e três (10,71%) apenas com 24 horas.

Em 16 episódios (36%), foram transfundidos CPs obtidos de doador único por aférese, portanto filtrados e todos irradiados. O pH desses CPs variou entre 6,5 e 7,5 e o número de leucócitos por bolsa esteve abaixo de 2,8 milhões. Quatro episódios (25%) apresentaram incremento insatisfatório já na primeira hora após a transfusão e dois (12,5%) apenas com 24 horas. Três CPs eram ABO incompatíveis, mas todos os três tiveram resposta satisfatória.

4.3. Identificação de refratariedade plaquetária

A Figura 5 representa a distribuição dos pacientes sem confirmação de refratariedade plaquetária, não refratários e refratários.

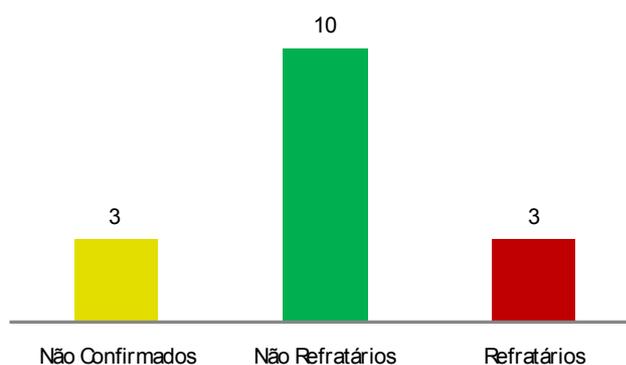


Figura 5. Distribuição dos pacientes quanto ao diagnóstico de Refratariedade plaquetária.

A Tabela 3 apresenta a classificação detalhada dos pacientes quanto ao diagnóstico de refratariedade plaquetária, número de avaliações realizadas e evolução durante o seguimento.

Tabela 3. Identificação de Refratariedade Plaquetária em relação ao número de avaliações e evolução clínica.

Parâmetros	Não Confirmados	Não Refratários	Refratários
Número de pacientes (%)	10 (62,50)	3 (18,75)	3 (18,75)
Número de avaliações			
01	08	0	0
02	01	01	0
03	01	0	01
04	0	02	01
≥ 05	0	0	01
Evolução			
Óbito	5 (50)	1 (33)	2 (67)
Recuperação	3 (30)	2 (67)	1 (33)
Perda de seguimento	2 (20)	0 (0)	0 (0)

Os três pacientes que apresentaram refratariedade plaquetária, foram avaliados em três, quatro e 14 episódios; um deles recuperou a contagem de plaquetas e dois evoluíram para óbito.

Não foi possível confirmar a ocorrência ou não de refratariedade em 10 pacientes devido à falta de seguimento, pois cinco foram a óbito, três se recuperaram não recebendo novas transfusões e dois não foram avaliados por questões logísticas. Para oito pacientes realizou-se a avaliação de apenas um episódio transfusional, quatro deles apresentaram incremento insatisfatório. Em dois outros casos apesar de terem sido avaliados em mais de um

episódio, os pacientes apresentaram incremento insatisfatório apenas no último episódio avaliado.

Dos três pacientes que responderam satisfatoriamente às transfusões, um foi avaliado em dois episódios e dois deles em quatro episódios, dois recuperaram a contagem plaquetária e um evoluiu para óbito.

4.4. Identificação de refratariedade plaquetária e características demográficas

As comparações entre as características demográficas e a identificação de refratariedade plaquetária estão demonstradas na Tabela 4.

Tabela 4. Identificação de Refratariedade Plaquetária em relação às características demográficas.

Parâmetros	Não Confirmados	Não Refratários	Refratários	<i>p</i>
Número de pacientes (%)	10 (62,50)	3 (18,75)	3 (18,75)	
Idade				
Mediana (mín-máx)	53 (20 – 83)	66 (51 – 71)	48 (34 - 67)	0,591
Gênero				
Feminino	5 (50)	2 (67)	3 (100)	0,377
Masculino	5 (50)	1 (33)	0 (0)	
História gestacional				
Sim	4 (40)	1 (33)	2 (67)	0,802
Não	6 (60)	2 (67)	1 (33)	
Transfusões prévias				
Sim	7 (70)	3 (100)	1 (33)	0,279
Não	3 (30)	0 (0)	2 (67)	
Reação Transfusional				
Sim	1 (10)	0 (0)	2 (67)	0,143
Não	9 (90)	3 (100)	1 (33)	

A mediana da idade foi menor no grupo de indivíduos refratários (48 anos, mínima de 34 e máxima de 67), no entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p= 0,591$).

Nos três casos de refratariedade, os indivíduos eram do gênero feminino; no grupo não refratário, dois femininos e um masculino; no grupo não confirmado, cinco femininos e cinco masculinos. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p= 0,377$). Dentre as oito pacientes do estudo, sete tinham história gestacional, das quais duas foram

refratárias, quatro sem confirmação e uma não refratária. Também não se observou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p= 0,802$).

Com relação à exposição prévia por transfusão, onze dos 16 pacientes haviam sido expostos a algum hemocomponente no mínimo 10 dias antes do episódio avaliado. Desses, três não foram refratários, sete sem confirmação e um refratário. Não houve diferenças significativas entre os grupos quanto à exposição prévia ($p= 0,279$). Nenhum dos indivíduos do estudo havia recebido transplante de órgãos ou tecidos.

Duas pacientes refratárias e uma sem confirmação de refratariedade apresentavam história de reação transfusional, mas não se encontrou diferenças significativas quanto a essa variável ($p= 0,143$).

4.5. Identificação de refratariedade plaquetária e detecção de aloanticorpos

A Tabela 6 apresenta a relação entre aloanticorpos e refratariedade.

Tabela 5. Relação entre a ocorrência de Refratariedade Plaquetária e detecção de aloanticorpos pelo *PIFT* e *PRA-HLA*.

Parâmetros	Não Confirmados	Não Refratários	Refratários	Total (%)	<i>p</i>
Número de pacientes (%)	10 (62,50)	3 (18,75)	3 (18,75)	16 (100)	
Aloanticorpos					
Negativo	4	0	0	4 (25)	0,385
Inconclusivo	2	0	1	3 (19)	
Positivo	4	3	2	9 (56)	
<i>PIFT</i>					
Negativo	4	1	0	5 (31)	0,780
Inconclusivo	2	0	1	3 (19)	
Positivo	4	2	2	8 (50)	
<i>PRA-HLA</i>					
Positivo	1	1	1	3 (19)	0,304
Negativo	9	2	2	13 (81)	

PIFT= Teste de Imunofluorescência Plaquetária; *PRA-HLA*= Pesquisa de Anticorpos Reativos contra painel de Antígenos Leucocitários Humanos Classe I.

Os resultados *PIFT* e *PRA-HLA* foram concordantes para 37,5% dos pacientes, sendo dois pacientes positivos e quatro negativos para ambos os testes. Em seis pacientes o *PIFT* foi positivo com *HLA* negativo; três *PIFT* inconclusivo com *HLA* negativo e apenas um *HLA* positivo com *PIFT* negativo.

Dos 16 pacientes, em nove foram identificados aloanticorpos (56,25%) pelas técnicas do *PIFT* e/ou *PRA-HLA*. Desses nove, dois foram refratários (22%), um com *PIFT* e *PRA-HLA* positivos e um apenas *PIFT* positivo.

Dos dez pacientes que não tiveram refratariedade confirmada, um paciente masculino apresentou positividade para aloanticorpos tanto no *PIFT* quanto no *PRA-HLA* e outra paciente, sem história gestacional, foi positiva somente pelo *PIFT*. Ambos apresentaram incremento insatisfatório, mas a refratariedade não foi confirmada por falta de uma segunda avaliação. Quanto à exposição prévia, haviam recebido previamente 133 e 101 unidades de hemocomponentes. A única condição clínica relevante foi esplenomegalia pelo paciente masculino. Adicionalmente, dois outros pacientes tinham *PIFT* inconclusivo e um deles incremento insatisfatório; dois eram positivos pelo *PIFT* e tinham incremento satisfatório; dois não tinham aloanticorpos nem incremento insatisfatório e dois sem aloanticorpo mas com incremento insatisfatório.

Dos pacientes não refratários, dois foram positivos apenas pelo *PIFT* e um apenas pelo *PRA-HLA*.

4.6. Identificação de aloanticorpos e características demográficas

A identificação de aloanticorpos foi comparada às características demográficas dos pacientes e ao risco de sensibilização prévia por transfusão e/ou gestação. Os dados estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 6. Relação entre presença de aloanticorpos detectados pelo *PIFT* e/ou *PRA-HLA* e características demográficas.

	Negativo	Inconclusivo	Positivo	<i>p</i>
Número pacientes (%)	4 (25)	3 (19)	9 (56)	
Idade				
Mediana (mín-máx)	67 (36-83)	53 (38-67)	50,5 (20-71)	0,437
Gênero (%)				
Feminino	4 (45)	2 (22)	3 (33)	0,802
Masculino	1 (14)	1 (14)	5 (72)	
Hist.Gestacional				
Sim	3 (43)	1 (14)	3 (43)	0,266
Não	1(11)	2 (22)	6 (67)	
Transf. Prévias				
Sim	2 (18)	1 (9)	8 (73)	0,147
Não	2 (40)	2 (40)	1 (20)	
Reação à Transf.				
Sim	0	0	3 (100)	0,357
Não	4 (31)	3 (23)	6 (46)	

Transf.= Transfusão; *PIFT*= Teste de Imunofluorescência Plaquetária; *PRA-HLA*= Pesquisa de Anticorpos Reativos contra painel de Antígenos Leucocitários Humanos Classe I.

Observou-se que a mediana da idade foi menor entre os indivíduos com resultado positivo para aloanticorpos, embora sem diferenças estatisticamente significativas. A maior parte dos pacientes femininos apresentou resultados negativos para a presença de aloanticorpos, enquanto que a maioria dos masculinos apresentou resultados positivos, porém não houve diferença estatisticamente significante. Ao avaliar a história gestacional não foi possível observar tendências quanto aos testes realizados.

Quanto aos pacientes com história de transfusões prévias, a maioria (73%) apresentou resultados positivos na detecção de aloanticorpos, mas sem diferenças significativas.

Todos os pacientes que apresentavam história de reação transfusional tiveram resultados positivos para aloanticorpos.

A Tabela 8 apresenta os resultados por tipo de teste empregado quanto às características dos pacientes estudados.

Tabela 7. Relação entre presença de aloanticorpos detectados pelo *PIFT* e *PRA-HLA* e características demográficas.

	<i>PIFT</i> Negativo	<i>PIFT</i> Inconclusivo	<i>PIFT</i> Positivo	<i>PRA-HLA</i> Negativo	<i>PRA-HLA</i> Positivo
Número de pacientes (%)	5 (31)	3 (19)	8 (50)	13 (81)	3 (19)
Idade					
Mediana (mín-máx)	61 (36-83)	53 (38-67)	50,5 (20-71)	61 (48 – 53)	51 (20 – 83)
Gênero (%)					
Feminino	4 (45)	2 (22)	3 (33)	7 (78)	2 (22)
Masculino	1 (14)	1 (14)	5 (72)	6 (86)	1 (14)
História gestacional	4 (57)	1 (14)	2 (29)	5 (71)	2 (29)
Transfusões prévias	3 (27)	1 (9)	7 (64)	9 (82)	2 (18)

PIFT= Teste de Imunofluorescência Plaquetária; *PRA-HLA*= Pesquisa de Anticorpos Reativos contra painel de Antígenos Leucocitários Humanos Classe I.

Observou-se que, tanto pelo *PIFT* quanto pelo *PRA-HLA*, a mediana da idade foi menor nos resultados positivos, embora não tenham sido encontradas diferenças estatisticamente significativas. Quanto ao gênero, houve maior porcentagem de masculinos positivos que femininos na análise pela técnica *PIFT*. Para o *PRA-HLA*, houve maior porcentagem de mulheres com resultado positivo. A maior porcentagem das mulheres com história gestacional apresentou *PIFT* e *PRA-HLA* negativos. Considerando-se as transfusões prévias, a maior porcentagem dos indivíduos apresentou resultado positivo pelo *PIFT* (64%), mas não pelo

PRA-HLA (18%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das comparações citadas.

4.7. Identificação de refratariedade plaquetária e fatores não imunes

Para o estudo das possíveis causas não imunes de refratariedade plaquetária, foram consideradas as seguintes condições clínicas: sangramento, febre, infecção, esplenomegalia e uso de medicamentos (Anfotericina B, Heparina e Vancomicina). Os dados são demonstrados na Tabela 5.

Tabela 8. Identificação de Refratariedade Plaquetária quanto às condições clínicas capazes de interferir na resposta à transfusão de plaquetas.

Parâmetros	Não Confirmados	Não Refratários	Refratários	<i>p</i>
Número de pacientes (%)	10 (62,50)	3 (18,75)	3 (18,75)	
Sangramento	3	0	1	0,777
Febre	1	0	2	0,143
Infecção	4	1	1	1,000
Esplenomegalia	1	0	1	0,625
Uso de Medicação				
Anfotericina B	1	0	1	0,625
Heparina	0	1	0	0,375
Vancomicina	2	1	1	1,000
Total de condições observadas	12	3	7	

Observou-se que os indivíduos refratários apresentaram maior número de condições clínicas por paciente e, além disso, ocorrência de todas as condições estudadas, exceto uso de Heparina. No grupo de indivíduos não confirmados, observou-se também ocorrência de todas as condições estudadas, exceto uso de Heparina e concomitância de condições em alguns pacientes. Dos três indivíduos não refratários, um paciente estava em uso de Heparina e Vancomicina e outro apresentava infecção, enquanto um paciente não apresentava qualquer das condições avaliadas. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

4.8. Caracterização dos casos de refratariedade plaquetária

Os dados referentes aos três casos de refratariedade são demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9. Caracterização dos indivíduos com refratariedade plaquetária.

Parâmetros	Paciente 01	Paciente 02	Paciente 03
Idade	67	34	48
Gênero	Feminino	Feminino	Feminino
História gestacional	Não	Sim	Sim
Transfusões prévias	Sim	Sim	Não
Reação transfusional	Não	Sim	Sim
Diagnóstico	LMA	LNH	LMA
Sangramento	Não	Não	Sim
Febre	Sim	Sim	Não
Infecção	Não	Sim	Sim
Esplenomegalia	Não	Sim	Não
Uso de Medicação			
Anfotericina B	Não	Sim	Não
Heparina	Não	Não	Não
Vancomicina	Não	Sim	Sim
<i>PIFT</i>	Inconclusivo	Positivo	Positivo
<i>PRA-HLA</i>	Negativo	Negativo	Positivo

PIFT= Teste de Imunofluorescência Plaquetária; *PRA-HLA*= Pesquisa de Anticorpos Reativos contra painel de Antígenos Leucocitários Humanos Classe I.

A Paciente 01 apresentava febre como condição clínica que favorecia o desenvolvimento de refratariedade, e, no *PIFT*, resultado inconclusivo para pesquisa de aloanticorpos. Nos dois episódios com incremento insatisfatório, a paciente recebeu um CP de aférese irradiada e filtrada e seis unidades randômicas irradiadas e não filtradas (190 milhões de leucócitos). A paciente não apresentava história gestacional e havia recebido previamente

três concentrados de hemácias desleucocitados e irradiados e dezoito concentrados de plaquetas irradiadas no decorrer de dois dias antes da transfusão.

A Paciente 02 apresentava história de exposição prévia a aloantígenos plaquetários por transfusão (23 transfusões) e gestação (02 gestações) e cinco condições clínicas (febre, infecção, esplenomegalia, Anfotericina B e Vancomicina), que favorecem a refratariedade plaquetária, além de um resultado positivo para o *PIFT*.

A Paciente 03 foi avaliada em 14 episódios transfusionais e apresentou febre como manifestação de reação transfusional em seu primeiro episódio. Veio a apresentar incremento insatisfatório 24 horas após a transfusão, na segunda e na terceira avaliação e a partir da quarta avaliação passou a apresentar ICC insatisfatório em todas as avaliações uma hora após a transfusão. A paciente tinha história gestacional, mas não transfusional ao iniciar seu tratamento. Contudo, durante o período de estudo (12/02/2009 a 05/05/2009) foram transfundidos 204 unidades de hemocomponentes. A pesquisa de aloanticorpos foi inconclusiva pelo *PIFT* nos dois primeiros episódios avaliados e positiva do terceiro ao décimo quarto. Na análise pelo *PRA-HLA* houve reatividade desde a primeira avaliação indicando sensibilização gestacional. Inicialmente, a reatividade contra o painel de antígenos testados pelo *PRA-HLA* foi de 38% na primeira avaliação e foi aumentando progressivamente até uma hiper-reatividade de 98%, caindo na última para 67%. Com relação às condições clínicas, a paciente apresentava sangramento transvaginal importante e persistente, fez uso de Vancomicina e apresentou testes com hemocultura positiva para infecção por *Klebsiella pneumoniae* a partir do sexto episódio avaliado.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A refratariedade plaquetária é um grave problema para pacientes em tratamento de doenças onco-hematológicas. A aplasia medular e o dano endotelial causados pelo tratamento quimioterápico acarretam trombocitopenia intensa e persistente em decorrência da falta de produção e consumo aumentado (NEVO et al., 1999; SLICHTER et al., 2005; KERKHOFFS et al., 2008). Com isso, esses pacientes recebem repetidas transfusões de plaquetas aumentando a demanda que nem sempre pode ser atendida pelos serviços de hemoterapia. A necessidade de mais transfusões é agravada quando há refratariedade plaquetária e isso pode se complicar ainda mais se o paciente vier a desenvolver refratariedade aloimune.

Avaliou-se no presente estudo a ocorrência de refratariedade plaquetária e a presença de aloanticorpos em indivíduos trombocitopênicos onco-hematológicos, por ser um grupo de pacientes que requer repetidas transfusões de plaquetas e, ainda, pela escassez de tais estudos no Brasil.

Dos 16 pacientes incluídos e avaliados em 44 episódios transfusionais, três apresentaram refratariedade plaquetária confirmada (18,75%). A frequência observada esteve próxima daquelas relatadas na literatura que foram de 27%, 27,6% e 34% (LEGLER et al., 1997; NOVOTNY et al., 1999; SLICHTER et al., 2005).

5.1. A Refratariedade Plaquetária e a Qualidade do Concentrado de Plaquetas

A restituição da contagem de plaquetas depende de vários fatores entre eles a qualidade do CP transfundido, pois durante a produção e a estocagem pode haver lesão das plaquetas

com perda da viabilidade e funcionalidade.

Desde 1980, tem sido adotada pelos serviços de hemoterapia a estocagem dos produtos plaquetários à temperatura ambiente ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) por no máximo cinco dias (SIMONSEN et al., 2006) e alguns protocolos estabelecem pH mínimo de 6,4 e máximo de 7,4 (STRASBOURG: COUNCIL OF EUROPE, 2005). A recuperação média após cinco dias de estocagem é de 63% e a sobrevida média é de 160,8 horas (DUMONT et al., 2002).

De forma geral, desleucocitação e menor tempo de estocagem diminuem a frequência de reações transfusionais e também melhora a eficácia da transfusão de plaquetas (ENRIGHT et al., 2003; SLICHTER et al., 2005; HEIM et al., 2008). No presente estudo, todos os CPs foram estocados em condições adequadas, conforme os critérios de qualidade da Resolução da Diretoria Colegiada 153 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária de 2004 (RDC/ANVISA 153/04). Quanto ao número de plaquetas em cada concentrado, este fator não influenciou as comparações uma vez que a avaliação foi baseada no incremento corrigido.

5.2. A Refratariedade Plaquetária e o Paciente

Por outro lado, os fatores inerentes ao paciente representam os principais determinantes da falta de resposta à transfusão de plaquetas independente de fatores relacionados à qualidade de CP (KERKHOFFS et al., 2006).

Portanto, o paciente deve ser avaliado quanto às suas características clínicas, como CIVD, esplenomegalia, febre, infecção, sangramento, interferência de medicações e também quanto a sua condição imune: imunossupressão ou aloimunização a antígenos plaquetários. Todos esses fatores podem dificultar o tratamento com CPs em pacientes com trombocitopenia

por influenciarem negativamente a resposta à transfusão de plaquetas.

5.2.1. O Paciente e sua condição Imune: Imunossupressão e Sensibilização

No nosso estudo notou-se que a mediana da idade dos pacientes foi menor no grupo refratário e maior no não refratário, ainda que essas diferenças não tenham sido estatisticamente significativas. A senescência do sistema imune com o aumento da idade parece favorecer a resposta transfusional por haver menor efetividade na retirada de plaquetas da circulação (THE TRAP STUDY GROUP, 1997 SLICHTER et al., 2005; HEIM, et al., 2008).

O pequeno tamanho da amostra limitou as comparações estatísticas quanto ao gênero. A literatura mostra que, homens apresentam maior risco de desenvolver refratariedade quando comparados com mulheres nulíparas. Nenhum indivíduo masculino teve refratariedade plaquetária confirmada em nosso estudo.

Por outro lado, observou-se neste estudo que dos três casos de refratariedade, dois tinham história gestacional (duas e três gestações) representando 29% das pacientes com história gestacional. A paciente refratária sem história gestacional apresentou resultado inconclusivo no *PIFT* e negativo no *PRA-HLA*. Conforme a literatura, a refratariedade plaquetária é mais freqüente em mulheres com duas ou mais gestações e, provavelmente, isto se deva à presença de aloanticorpos antiplaquetários desenvolvidos por sensibilização durante a gestação (THE TRAP STUDY GROUP, 1997 SLICHTER et al., 2005; HEIM, et al., 2008).

Das sete pacientes com história gestacional, três apresentavam aloanticorpos (43%), três foram positivas pelo *PIFT* e duas pelo *PRA-HLA*. Bajpai e colaboradores (2005) observaram que mulheres com história gestacional apresentam maior incidência de

aloanticorpos (83%) em relação às sem história gestacional (60,5%), mas os resultados não foram estatisticamente significativos.

Observou-se que a maioria dos pacientes (87,5%) já havia sido exposta a algum tipo de hemocomponente até dez dias antes do episódio avaliado e o número mediano de hemocomponentes recebidos pelos pacientes foi de 15,5 (de duas a 184 unidades). Um importante estudo multicêntrico mostrou que, quanto maior o número de transfusões prévias, maiores as chances de uma resposta inadequada (SLICHTER et al., 2005).

Dos 14 indivíduos com história transfusional, nove (56%) apresentavam testes positivos para aloanticorpos e destes, apenas duas pacientes foram refratárias. Tem sido questionada a variação individual para o desenvolvimento de aloanticorpo e também se este irá ocasionar refratariedade (SAYEH et al., 2004).

Das três pacientes refratárias, uma havia sido exposta há mais de dez dias além de ter história de duas gestações (paciente 02) e apresentou positividade para a pesquisa de aloanticorpos antiplaquetários pelo *PIFT*. Outra (paciente 03), não tinha história transfusional, mas história de três gestações prévias já com detecção positiva de aloanticorpos. No entanto, chegou a receber 284 unidades até o final do estudo e a positividade para aloanticorpos antiplaqueta e anti-*HLA* Classe I aumentou no decorrer do período avaliado.

As pacientes apresentavam história de exposição prévia a aloantígenos e desenvolveram aloanticorpos que podem ter interferido negativamente na resposta à transfusão. Bajpai e colaboradores (2005) mostraram que pacientes com transfusões prévias tiveram maior positividade para anticorpos (91,7%) em relação aos sem história (57,9%), mas não encontraram correlação entre o número de transfusões e formação de anticorpos ou doença de base.

A principal causa de ausência de resposta à transfusão de plaquetas por fatores imunes é a produção de aloanticorpos direcionados contra a molécula de *HLA*. Na tentativa de prevenir a aloimunização *HLA*, o que se faz é a remoção de leucócitos dos concentrados por filtração, irradiação UV e uso de plaquetas de um único doador por aférese para reduzir a exposição a múltiplos antígenos (THE TRAP STUDY GROUP, 1997).

Alguns autores comentam que as taxas de anticorpos parecem ser menores mesmo em pacientes com exposição prévia por gestação ou transfusão quando recebem componentes desleucocitados (ANDREU, DEWAILLY, 1994). Mas deve-se considerar que a redução de leucócitos ajuda a prevenir a imunização primária, mas não uma resposta anamnésica como no caso de pacientes já sensibilizados (BRAND et al., 1988; SINTNICOLAAS et al., 1995).

Na maioria dos nossos casos foram transfundidos CPs obtidos por PRP (64%). Observou-se maior ocorrência de incremento insatisfatório entre as transfusões com CPs obtidos por PRP do que por aqueles obtidos por aférese que eram todos irradiados e filtrados (64,28% versus 37,5%).

Esses achados podem ser relacionados com o fato de que a desleucocitação e irradiação removem e inativam células que expressam aloantígenos e os CPs obtidos por aférese reduzem a exposição a múltiplos antígenos *HLA* favorecendo a resposta transfusional (THE TRAP STUDY GROUP, 1997).

O uso na rotina de concentrados de plaquetas desleucocitados tem diminuído a incidência de aloimunização *HLA* na população geral de 70 para aproximadamente 25%. Quanto à frequência de refratariedade aloimune que é de cerca de 15% entre pacientes sob tratamento quimioterápico, há uma queda para 5% ou menos quando leucócitos são removidos ou inativados (THE TRAP STUDY GROUP, 1997).

A carga antigênica dos CPs não desleucocitados também se relaciona com reações transfusionais e há controvérsias sobre o quanto esta reação pode interferir na resposta à transfusão (ENRIGHT et al., 2003; SLICHTER et al., 2005; HEIM et al., 2008).

No presente estudo, duas das pacientes refratárias apresentaram reação transfusional no primeiro episódio avaliado, uma ao receber oito unidades de CPs irradiados e filtrados e outro ao receber uma unidade de aférese ABO incompatível. Ambas tiveram resultados positivos para aloanticorpos. Contudo, o incremento plaquetário foi satisfatório.

Houve ainda outro paciente que recebeu transfusão ABO incompatível e este também apresentou incremento satisfatório. As plaquetas expressam uma variedade de antígenos destacando-se os antígenos do sistema ABO, *HLA* Classe I e *HPAs*. Dos pacientes estudados, dois receberam CPs de aférese ABO incompatíveis e apresentaram incremento satisfatório.

Levin e colaboradores (2004) observaram que 83% tiveram resposta satisfatória nas transfusões ABO compatíveis contra 69% nas transfusões ABO incompatíveis, mas não houve diferenças estatisticamente significativas. De forma geral, os estudos mostram que a compatibilidade ABO favorece uma boa resposta (SLICHTER et al., 2005, HEIM et al., 2008).

Ainda não está claro o quanto a incompatibilidade ABO nos concentrados plaquetários interfere na mortalidade, eventos hemorrágicos ou reações transfusionais. Observa-se um aumento significativo dos títulos de anticorpos anti-A e anti-B em 54% dos pacientes com leucemia aguda que recebem plaquetas ABO incompatíveis. A magnitude e frequência desse aumento é significativamente menor que em controles normais, sugerindo que o tratamento e/ou doença de base produzem um efeito imunossupressor nesses pacientes (SCHIFFER et al., 1976).

No presente estudo, observou-se que 56,25% dos pacientes estudados apresentavam

aloanticorpos. Outros estudos também com pacientes onco-hematológicos mostraram freqüências de aloimunização de 7%; 19%; 66% (NANU, TANEJA, 1992; NOVOTNY et al., 1995; BAJPAI et al., 2005). Um estudo brasileiro encontrou uma freqüência de aloimunização *HLA* de 28,6% nos pacientes com Síndrome Mielodisplásica (ARRUDA et al., 2008).

Dois estudos que avaliaram a resposta à transfusão de plaquetas mostraram freqüências maiores de aloanticorpos (25% e 42,9%) em pacientes refratários (DOUGHTY et al, 1994; KIEFEL et al., 2001).

Em nosso estudo, encontramos incidência de aloanticorpos mais alta que a incidência de refratariedade, sendo que, 56,25% dos pacientes eram aloimunizados enquanto que apenas 22% deles foram refratários. Para alguns pacientes, o desenvolvimento de aloanticorpos plaquetários não resulta necessariamente em refratariedade à transfusão de plaquetas (THE TRAP STUDY GROUP, 1997).

O estudo TRAP mostrou que 71,4% dos pacientes aloimunizados não apresentaram resposta satisfatória à transfusão de plaquetas enquanto que apenas 26,6% dos pacientes não aloimunizados, não responderam satisfatoriamente à transfusão.

Embora os anticorpos *HLA* possam se originar quatro dias após a exposição repetida ao antígeno, 10 dias após uma nova re-exposição, ou em média de três a quatro semanas após exposição ao produto celular, nem todos os pacientes produzem anticorpo anti-*HLA* Classe I após exposição ao antígeno. As diferenças podem ser devido aos variados graus de imunossupressão e alteração imunológica da doença de base ou da terapia imunossupressora empregada.

Cerca de 30% dos pacientes *HLA* aloimunizados irão exibir o mínimo da amplitude de sua aloimunização, ou pela perda transiente de exposição antigênica ou pelo desenvolvimento

de anticorpo anti-idiotípicos (LEE, SCHIFFER, 1987). Esse grupo mais tarde pode exibir tolerância aos antígenos *HLA* para os quais foram previamente intolerantes.

Wernet e colaboradores (1993) observaram que 17% dos pacientes onco-hematológicos apresentavam aloanticorpos específicos de plaquetas e todos os que apresentavam aloanticorpo anti-*HPA* detectado pelo *PIFT* também apresentavam anti-*HLA* Classe I. As transfusões parecem induzir diferentes especificidades de anticorpos quando comparado com a incompatibilidade materno-fetal.

O anticorpo *HLA* pode ser detectado em 25 – 70% dos pacientes que recebem produtos não desleucocitados (DUTCHER 1981; BRUBAKER e ROMINE, 1987).

Ainda não foi possível prever contra qual *HLA* incompatível um paciente irá produzir aloanticorpos e nem se anticorpos *HLA* não detectados em um teste, mas detectados em outro, têm capacidade de encurtar a sobrevivência de plaquetas transfundidas. Estudos que avaliaram a especificidade de aloanticorpos encontraram que 72 a 90% reagem contra *epítomos* públicos com ou sem anticorpos privados para antígenos únicos (MACPHERSON, HAMMOND, MANISCALCO, 1986; RODEY et al., 1994).

Vários estudos sugerem que o transplante com *HLA* incompatível que pertence a um grupo de reatividade cruzada (CREG) com os antígenos próprios do paciente têm menor chance de induzir anticorpos. No entanto, transplante com um doador que tenha antígenos de reatividade cruzada, não é garantia de que nenhum anticorpo será formado e certamente não é uma garantia de que células T alorreativas não irão reagir (CLAAS et al., 2002).

5.2.2. A Aloimunização e os Testes Sorológicos

Em nosso estudo, o *PIFT* e o *HLA* não apresentaram resultados concordantes na maioria dos casos. Outros estudos mostram discrepância em 11% dos resultados do *PIFT* e *HLA* (*LIFT*) (LEVIN et al., 2004).

Com relação às diferentes técnicas empregadas, o *PRA-HLA* e o *PIFT* são considerados como possíveis de prever a refratariedade mais precocemente que testes celulares de linfocitotoxicidade. Por muitos anos, o *LCT* foi o padrão para identificação de anticorpos *HLA*, contudo, estudos recentes mostram que sua sensibilidade é inferior a de testes utilizando microesferas revestidas com antígenos *HLA* classe I (KURZ et al., 2001; LEVIN et al., 2003; FONTÃO-WENDEL et al., 2007).

Encontramos maior número de indivíduos positivos pelo *PIFT* do que pelo *PRA-HLA*, Fontão-Wendel e colaboradores (2007) avaliaram a discordância entre *LCT*, *PIFT*, *MAIPA* e Flow *PRA* mostraram que somente 8,1% das amostras eram positivas nos quatro testes e 46% em apenas um dos testes. Também mostraram que o *PIFT* detectou aloanticorpos com maior frequência que as técnicas *LCT*, *MAIPA* e Flow *PRA*.

O *PIFT* é um teste amplamente utilizado por sua execução rápida e fácil quando há a disponibilidade de citômetro de fluxo. O *PIFT* detecta anticorpo anti-*HLA* e antiplaqueta, portanto, é mais sensível que o *LCT* (LUBENKO et al., 2001; LEVIN et al., 2003). No entanto, o *PIFT* não demonstrou uma significativa correlação entre o resultado do teste e a recuperação média à transfusão *HLA* compatível (LEVIN et al., 2004).

Deve-se lembrar que as técnicas *PIFT* e *PRA-HLA* são complementares por se basearem em alvos bem diferentes, pois o *PRA-HLA* identifica aloanticorpos que se ligam especificamente a peptídeos *HLA* Classe I ligados às microesferas, enquanto que o *PIFT*, detecta qualquer aloanticorpo que se estiver ligado às plaquetas de um *pool*, o que inclui outros

aloanticorpos além do *HLA* Classe I que podem ser específicos de plaquetas, autoanticorpos e possíveis complexos imunes (FONTÃO-WENDEL et al., 2007).

Anticorpos específicos de plaquetas também podem ser a causa de refratariedade à transfusão de plaquetas (KOHLENER et al., 1996). Mas, embora a aloimunização *HPA* ocorra, raramente é o único fator aloimune responsável pela refratariedade plaquetária (BAJPAI et al., 2005).

O *MAIPA* tem sido considerado como padrão ouro para detecção de anticorpos *HPA* (BESSOS et al., 2005), mas os principais anticorpos envolvidos na refratariedade imune são os *HLA* Classe I. Na continuidade deste estudo, os soros positivos pelo *PIFT* serão testados pelo *MAIPA* por ser um teste mais específico que poderá complementar as análises.

5.3. O Paciente e sua Condição Clínica

Em resumo, dos 16 pacientes avaliados em 44 episódios transfusionais, três do gênero feminino foram refratárias (18,75%). Todas apresentavam alguma manifestação clínica capaz de ocasionar refratariedade plaquetária. Além disso, uma paciente foi positiva tanto pelo *PIFT* quanto pelo *PRA-HLA*; uma positividade apenas pelo *PIFT* e a outra, resultado inconclusivo.

A concomitância dessas condições dificulta o entendimento sobre os mecanismos que interferem na resposta à transfusão (PETZ et al., 2000).

Apesar de um resultado inconclusivo na pesquisa de aloanticorpos antiplaquetários, a febre apresentada pela paciente refratária 01 pareceu ser o único fator relevante na tentativa de explicar a refratariedade. Vários trabalhos mostraram que a febre esteve significativamente associada a baixo incremento (SLICHTER et al., 2005; HEIM et al., 2008). Contudo, a

refratariedade pareceu ser transiente, pois embora o incremento tenha sido insatisfatório nos dois primeiros episódios, veio a ser satisfatório no terceiro episódio avaliado.

A paciente refratária 02 apresentou positividade para aloanticorpos apenas pelo *PIFT* e cinco diferentes complicações clínicas foram somadas a este fator. Uma condição importante apresentada foi a esplenomegalia. Cerca de 85% das plaquetas são destruídas no baço na presença de esplenomegalia enquanto que em indivíduos normais ocorre a destruição de 61%. A quantidade de plaquetas recuperadas na circulação cai de 59% para 26% nestas condições (ASTER, 1966; HIEL-ZOBEL et al., 1986).

A paciente refratária 03 apresentou como condições clínicas, sangramento transvaginal importante e persistente, infecção e uso de Vancomicina por alguns períodos. Chamou atenção a positividade para aloanticorpos pelo *PIFT* e pelo *PRA-HLA* que certamente contribuiu para a piora do quadro de refratariedade. A paciente foi a óbito após um quadro de choque séptico.

Kurz e colaboradores (1996) ao avaliarem refratariedade em 81 pacientes onco-hematológicos, 46 eram refratários e 32 apresentavam condições clínicas ou estavam em uso de drogas conhecidas por afetarem o ICC. Em 24 casos, a refratariedade foi associada com infecção, a maioria tinha aloanticorpos contra plaquetas que foram mais frequentes em pacientes com possível imunização prévia e naqueles que manifestaram refratariedade.

As complicações hemorrágicas em pacientes que recebem tratamento quimioterápico têm sido associadas com a redução da sobrevida do paciente (NEVO et al., 2007; KERKHOFFS et al., 2008). No entanto, o sangramento e a resposta insatisfatória à transfusão de plaquetas e o sangramento não parecem estar causalmente relacionados aos óbitos, mas ao nível do dano da célula endotelial. O dano endotelial causado pelo tratamento citotóxico ou complicações relacionadas à doença contribuem por um mecanismo incerto para a diminuição

na sobrevivência de plaquetas (NEVO et al., 1999; SLICHTER et al., 2005; KERKHOFFS et al., 2008).

Kerkhoffs e colaboradores (2008) não encontraram correlação direta entre contagem plaquetária e complicações hemorrágicas, observaram apenas que pacientes com sangramento mantinham contagens inferiores a 30×10^9 plaquetas/L por mais dias. Slichter e colaboradores (2005) mostraram associação entre complicações hemorrágicas e maior risco de resposta insatisfatória.

A produção de aloanticorpos pode ser estimulada apenas durante um episódio de infecção (MCGRATH et al., 1988), o que nos faz questionar se esse mecanismo estaria relacionado com a maior ocorrência de refratariedade em pacientes com infecção.

De forma geral, outros estudos mostram que os principais fatores relacionados ao paciente que influenciam negativamente a eficácia da transfusão são: positividade para aloanticorpos, gênero feminino com duas gestações ou mais, febre, infecção, uso de drogas como anfotericina B e Heparina e sangramento (DOUGHTY et al., 1994; THE TRAP STUDY GROUP, 1997; SLICHTER et al., 2005).

No presente estudo não se observou diferenças estatisticamente significativas nas variáveis estudadas, provavelmente devido ao pequeno tamanho da amostra. Contudo, a frequência de refratariedade de quase 20% deve ser considerada como importante e mostra que a ocorrência desta complicação deve ser investigada.

5.4. O Tratamento da Refratariedade Plaquetária

Para a conduta terapêutica nos pacientes aloimunizados, várias estratégias podem ser

utilizadas, o mais lógico seria a seleção de doadores compatíveis. É necessário avaliar a importância da identificação de aloanticorpos na resposta à transfusão de plaquetas. Os doadores de plaquetas não são rotineiramente genotipados para *HLA* e *HPA* devido à baixa prevalência de aloanticorpos anti-*HLA* e anti-*HPA* e pela dificuldade em se encontrar CPs *HLA* e *HPA* compatíveis (BISHOP et al., 1988; LEGLER et al., 1997).

É necessário um banco de aproximadamente 3000 doadores para que se possa encontrar um doador adequado (BOLGIANO, LARSON, SLICHTER, 1989). As chances de seleção de um doador podem aumentar ao selecionarem-se indivíduos que apresentem antígenos *HLA* de determinados grupos antigênicos como o *HLA* B12 que é encontrado em aproximadamente 25% da população, considerando-se que até 70% dessas incompatibilidades viáveis apresentam ICC satisfatório (SCHIFFER, O'CONNEL, LEE, 1989).

Uma ferramenta atualmente disponível para a avaliação da compatibilidade *HLA* é o *HLAMatchmaker*, um software algorítmico desenvolvido que identifica *epítomos* imunogênicos que se expressam em regiões da molécula *HLA* acessíveis aos aloanticorpos (DUQUESNOY, 2008).

Na indisponibilidade, pode-se fazer o *crossmatching*, uma vez que, um *crossmatching* positivo representa a chance de ICC insatisfatório em 70 a 100% dos casos e um *crossmatching* negativo apresenta valor preditivo negativo com ICC satisfatório em 80 a 92% dos casos.

Na falta de plaquetas compatíveis, a infusão mais frequente de plaquetas é o mais recomendado (NARVIOS et al., 2005). Além disso, parece que o uso de antifibrinolíticos (KALMADI et al., 2006) e de FVII ativado recombinante também controla o sangramento em pacientes trombocitopênicos aloimunizados (HEUER e BLUMENBERG, 2005). A esplenectomia e o uso de gamaglobulina intravenosa não parecem resolver de forma

significativa a falta de resposta (HOGGE et al., 1984 e RATKO et al., 1995).

A aloimunização e a refratariedade plaquetária são um problema clínico comum e relevante. São necessários mais estudos e com maior amostragem para definição de novas estratégias para transfusão de concentrados de plaquetas e avaliação da resposta à transfusão de plaquetas.

Além disso, ainda não se sabe qual é o real impacto da aloimunização e quais são os seus efeitos na resposta à transfusão de plaquetas, como ela exerce influência e como essa influência pode ser minimizada.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

A ocorrência de refratariedade à transfusão de plaquetas em quase 20% dos pacientes onco-hematológicos avaliados no presente estudo demonstra a relevância desta condição clínica, ainda que não tenham sido encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Todos os indivíduos refratários manifestavam alguma causa não imunológica que pudesse estar envolvida na refratariedade. As principais complicações clínicas observadas foram: febre, infecção, esplenomegalia, uso de medicamentos antibióticos e antifúngicos e sangramento. Além disso, estiveram presentes causas imunológicas caracterizadas pela presença de aloanticorpos.

A frequência de aloimunização foi relativamente alta (56,25%) entre os pacientes estudados. No entanto, a maioria era positiva apenas no teste inespecífico para identificação de aloanticorpos plaquetários, sendo que apenas três pacientes (33%) foram positivos na identificação específica de aloanticorpos *HLA* Classe I.

A aloimunização foi mais frequente que a refratariedade plaquetária, indicando que o desenvolvimento de aloanticorpos plaquetários não resulta necessariamente em refratariedade à transfusão de plaquetas. A sensibilização prévia por gestação ou transfusão parece ser um fator importante e essa aloimunização pode favorecer o desenvolvimento de refratariedade à transfusão, principalmente se os componentes não forem desleucocitados.

Os resultados demonstram a importância de se instituir um protocolo de identificação de refratariedade nos centros de atendimento para auxiliar o reconhecimento clínico de suas causas e instigar a implantação de medidas como a seleção de doadores compatíveis e, certamente, contribuir para redução da morbi-mortalidade dos pacientes onco-hematológicos.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREU G, DEWAILLY J. Prevention of *HLA* alloimmunization by using leukocyte-depleted components. **Curr Stud Hematol Blood Transfus**; p. 29–40, 1994.
2. ARAKI, N. et al. Anti-HLA antibody screening with extracted platelet HLA antigens by the mixed passive hemagglutination method. *Vox Sanguinis*; v. 69, p.222-230, 1995.
3. ARNOLD, D. M. et al. Utilization of platelet transfusions in the intensive care unit: indications, transfusion triggers, and platelet count responses **Transfusion**; v.46, p.1286-1291, 2006.
4. ARRUDA, D.M.M. et al. Aloimunidade contra antígenos HLA de Classe I em pacientes com Síndromes Mielodisplásicas e Anemias Aplásticas. **Rev. Bras. Hematol. Hemot**; v. 30 (01), p. 18-23, 2008.
5. ASTER, R.H. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of ‘hypersplenic’ thrombocytopenia. **J Clin Invest**; v. 45, p. 645–657, 1966.
6. BAJPAI, M. et al. Platelet alloimmunization in multitransfused patients with haemato-oncological disorders. **Natl Med J India**; v.18, p.134-136, 2005.
7. BAYER, W.L. et al. Use of platelets and other transfusion products in patients with malignancy. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**; v.18, p.380-391, 1992.
8. BESSOS, H. et al. Report on the 12th International Society of Blood Transfusion platelet immunology workshop. **Vox Sang**; v.89, p.105-113, 2005.
9. BISHOP, J. F. et al. The definition of refractoriness to platelet transfusions. **Transfus Med**; v.2, p.35-41, 1992.
10. BISHOP, J. F. et al. Clinical factors influencing the efficacy of pooled platelet transfusions. **Blood**; v.71, p.383-7, 1988.
11. BOCK, M. et al. Influence of antibiotics on post transfusion platelet increment. **Transfusion**; v.36, p.952-4, 1996.
12. BOLGIANO, D.C., LARSON, E.B., SLICHTER, S.J. A model to determine required pool size for *HLA*-typed community donor apheresis programs. **Transfusion**; v.29, p.306-310, 1989.

13. BRASIL. **Resolução nº 153, de 14 de junho de 2004.** Diário Oficial da União. Agência Nacional de Vigilância. Aprova o Regulamento Técnico para os procedimentos de hemoterapia para coleta, processamento, testagem, armazenamento, transporte, utilização e controle de qualidade do sangue e seus componentes obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea para uso humano.
14. BRAND, A. et al. Alloimmunization after leukocyte-depleted multiple random donor platelet transfusions. **Vox Sang**; v. 54, p. 160, 1988.
15. BRUBAKER, D.B., ROMINE, M. Relationship of *HLA* and platelet-reactive antibodies in alloimmunized patients refractory to platelet therapy. **American Journal of Hematology**; v.26, p.341-352, 1987.
16. CAMERON, B. et al. Evaluation of platelet transfusion triggers in a tertiary-care hospital. **Transfusion**; v.47, p.206-211, 2007.
17. CASTRO, V. et al. A prospective study on the prevalence and risk factor for neonatal thrombocytopenia and platelet alloimmunization among 9332 unselected Brazilian newborns. **Transfusion**; v.47, p.59-66, 2007.
18. CLAAS, F.H.J. Predictive parameters for in vivo alloreactivity. **Transplant Immunology**; v.10, p.137-142, 2002.
19. CLAAS, F.H.J et al. Alloimmunization against the MHC antigens after platelet transfusions is due to contaminating leukocytes in the platelet suspension. **Exp Hematol**; v.9, p.84-89, 1981.
20. DANKERS, M.K.A. et al. The *HLA*-DR Phenotype of the Responder is Predictive of Humoral Response Against *HLA* Class I Antigens. **Human Immunology**; v.65, p.13-19, 2004.
21. DAVIS, K. B. et al. Corrected count increment and percent platelet recovery as measures of posttransfusion platelet response: problems and a solution. **Transfusion**; v.39, p.586-592; 1999.
22. DELAFLOR-WEISS, E.; MINTZ, P. D. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. **Transfus Med Rev**; v.14, p.180-96, 2002.
23. DOUGHTY, H. A. et al. Relative importance of immune and non-immune causes of platelet refractoriness. **Vox Sang**; v.66, p.200-5, 1994.

24. DOXIADIS, I.I.N. et al. Association between specific *HLA* combinations and probability of kidney allograft loss: the taboo concept. **Lancet**; v.348(9031), p.850 – 853, 1996.
25. DUBOIS, D.; DUBOIS, E.F. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. **Arch Intern Med**; v.17, p.863-71, 1916.
26. DUMONT, L.J. et al. Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. **Transfusion**; v.4, p.847-54, 2002.
27. DUQUESNOY, R.J. Structural epitope matching for *HLA*-alloimmunized thrombocytopenic patients: a new strategy to provide more effective platelet transfusion support? **Transfusion**; v.48, p.221-227, 2008.
28. DUTCHER, J.P., SCHIFFER, C.A., AISNER, J., WIERNIK, P.H. Long-term follow-up of patients with leukemia receiving platelet transfusions: Identification of a large group of patients who do not become alloimmunized. **Blood**; v. 58, p.1007, 1981.
29. DZIK, S. How I do it: platelet support for refractory patients. **Transfusion**; v.47, p.374-378, 2007.
30. ENRIGHT, H. et al. Factors influencing moderate to severe reactions to PLT transfusions: experience of the TRAP multicenter clinical trial. **Transfusion**; v.43, p.1545-1552, 2003.
31. ERTEL, Katharina et al. Rlevance of the *HPA*-15 (gov) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. **Transfusion**; v.45, p.366-373, 2005
32. FISCHER, T. H. et al. Primary and secondary hemostatic functionalities of rehydrated, lyophilized platelets. **Transfusion**; v.46, p.1943-50, 2006.
33. FONTÃO-WENDEL, R. et al. Incidence of transfusion-induced platelet-reactive antibodies evaluated by specific assays for the detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies. **Vox Sang**; v.93, p.241-249, 2007.
34. FRIEDBERG, R. C. et al. Clinical and blood bank factors in the management of platelet refractoriness and alloimmunization. **Blood**; v. 81, p. 3428-34, 1993.
35. FUNG, M.K., DOWNES, K.A., SHULMAN, I.A. Transfusion of platelets containing ABO-incompatible plasma. A survey of 3156 North American laboratories. **Arch Pathol Lab Med**; v. 131, p. 909–16, 2007.
36. GULLIKSSON H. Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. **Transfus Med Rev**; v.17(3), p.209-15, 2003.

37. HANSON, S. R.; SLICHTER, S. S. Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: evidence for a fixed platelet requirement. **Blood**; v.5, p.1105-9, 1985.
38. HEIM, D. et al. Patient and product factors affecting platelet transfusion results. **Transfusion**; v.48, p. 681-7, 2008.
39. HEUER, L., BLUMENBERG, D. Management of bleeding in a multi-transfused patient with positive *HLA* Class I alloantibodies and thrombocytopenia associated with platelet dysfunction refractory to transfusion of cross-matched platelets. **Blood coagulation and Fibrinolysis**; v.16, p.287-290, 2005.
40. HILL-ZOBEL, R.L.. et al. Organ distribution and fate of human platelets: studies of asplenic and splenomegalic patients. **American Journal of Hematology**; v.23, p.231-238, 1986.
41. HOGGE, D. E. et al. The ineffectiveness of random donor platelet transfusion in splenectomized, alloimmunized recipients. **Blood**; v.62, p.253–256, 1984.
42. KALMADI, S. et al. Epsilon aminocaproic acid reduces transfusion requirements in patients with thrombocytopenic hemorrhage. **Cancer**; v.107, p.136-140, 2006.
43. KAO, K.J. et al. White cell reduction in platelet concentrates and packed red cells by filtration: a multicenter clinical trial. **Transfusion**; v.35, p.13–19, 1995.
44. KERKHOFFS, J.L. et al. A multicenter randomized study of efficacy of transfusions with platelets stored in platelet additive solution II versus plasma. **Blood**; v.108, p.3210-15, 2006.
45. KERKHOFFS, J.L. et al. The clinical impact of platelet refractoriness: correlation with bleeding and survival. **Transfusion**; v.48(9), p.1959-65, 2008.
46. KICKLER, T., KENNEDY, S.D., BRAINE, H.G. Alloimmunization to platelet-specific antigens on glycoproteins IIb-IIIa and Ib/IX in multiply transfused thrombocytopenic patients. **Transfusion**; v. 30, p. 622-625, 1990.
47. KIEFEL, V. et al. Platelet alloantibodies in transfused patients. **Transfusion**; v.41, p.766-770, 2001.
48. KOHLER, M. et al. Flow cytometric detection of platelet-reactive antibodies and application in platelet crossmatching. **Transfusion**; v.36, p.250-255, 1996.
49. KURZ M. et al. Specificities of antiplatelet antibodies in multitransfused patients with haematooncological disorders. **Br J Haematol**; v.95, p.564-9, 1996.
50. KURZ, M. et al. Platelet-reactive *HLA* antibodies associated with low posttransfusion platelet increments: a comparison between the monoclonal antibody-specific

- immobilization of platelet antigens assay and the lymphocytotoxicity test. **Transfusion**; v.41, p.771-774, 2001.
51. LALEZARI, P.; DRISCOLL, A.M. Ability of thrombocytes to acquire *HLA* specificity from plasma. **Blood**; v.59, p.167-170, 1982.
 52. LEE, E.J., SCHIFFER, C.A. Serial measurement of lymphocytotoxic antibody and response to nonmatched platelet transfusions in alloimmunized patients. **Blood**; v. 70, p. 1727–1729, 1987.
 53. LEE, E. J.; NORRIS, D.; SCHIFFER, C.A. Intravenous immune globulin for patients alloimmunized to random donor platelet transfusion. **Transfusion**; v.27(3), p.245–247, 1987.
 54. LEEKSMA, C.H., COHEN, J.A. Determination of the life of human blood platelets using labelled diisopropylfluorophosphanate. **Nature**; v.26, p.552-3, 1955.
 55. LEGLER, T.J. et al. Frequency and causes of refractoriness in multiply transfused patients. **Ann Hematol**; v.74, p. 185-189, 1997.
 56. LEVIN, M.D. et al. Screening for alloantibodies in the serum of patients receiving platelet transfusions: a comparison of the ELISA, lymphocytotoxicity, and the indirect immunofluorescence method. **Transfusion**; v.43, p.72-77, 2003.
 57. LEVIN, M.D. et al. The value of crossmatch tests and panel tests as a screening tool to predict the outcome of platelet transfusion in a nonselected haematological population of patients. **Vox Sanguinis**; v. 87, p. 291-298, 2004.
 58. LUBENKO, A.; RODI, K.M.; JOHNSON, A.C. Screening for WBC antibodies by lymphocyte indirect immunofluorescence flow cytometry: superior to cytotoxicity and ELISA? **Transfusion**; v.41, p.1147-1153, 2001.
 59. MACPHERSON, B.R., HAMMOND, P.B., MANISCALCO, C.A. Alloimmunization to public *HLA* antigens in multitransfused platelet recipients. **Ann Clin Lab Sci**; v. 16, p. 38–44, 1986.
 60. MARUYA, E.; TAKEMOTO, S.; TERASAKI, P.I. *HLA* matching: identification of permissible *HLA* mismatches. **Clin Transplant**; p.511–520, 1993.
 61. MASON K.D. et al: Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. **Cell**; v.128, p.1173-1186, 2007.
 62. MAURER-SPUREJ, E.; CHIPPERFIELD, K. Past and future approaches to assess the quality of platelets for transfusion. **Transfus Med Rev**; v.21, p.295-306; 2007.

63. MCGRATH, K. et al. Transient platelet and *HLA* antibody formation in multitransfused patients with malignancy. **Br J Haematol**; v.68, p.345-350, 1988.
64. MEENU, B. et al. Platelet alloimmunization in multitransfused patients with haemato-oncological disorders. **Natl Med J India**; v.18, p.134-136; 2005.
65. MOSES, L.A. et al. Detection of *HLA* antibodies by using flow cytometry and latex beads coated with *HLA* antigens. **Transfusion**; v.40, p.861-866, 2000.
66. NAKAZAWA, Y. et al. A possible role for the production of multiple *HLA* antibodies in fatal platelet transfusion refractoriness after peripheral blood progenitor cell transplantation from the mother in a patient with relapsed leukemia. **Transfusion**; v.47, p.326-334, 2007.
67. NANU, A. TANEJA, A. Alloimmunization to platelet transfusions in the India patients. **Indian J Med Res**; v.96, p.112-114, 1992.
68. NARVIOS, A. et al. slow infusion of platelets: a possible alternative in the management of refractory thrombocytopenic patients. **American Journal of Hematology**; v.79, p.80, 2005.
69. NEGASAWA, T.; KIM, B. K.; BALDINI, M. G. Temporary suppression of circulating antiplatelet alloantibodies by the massive infusion of fresh, stored, or lyophilized platelets. **Transfusion**; v.18, p.429, 1978.
70. NEVO, S. et al. Acute bleeding after allogeneic bone marrow transplantation: association with graft versus host disease and effect on survival. **Transplantation**; v.67, p.681-9, 1999.
71. NEVO, S. et al. Profound thrombocytopenia and survival of hematopoietic stem cell transplant patients without clinically significant bleeding, using prophylactic platelet transfusion triggers of 10×10^9 or 20×10^9 per L. **Transfusion**; v.47, p.1700-9, 2007.
72. NOVOTNY, V. M. J. Prevention and management of platelet transfusion refractoriness. **Vox Sang**; v.76, p.1-13, 1999.
73. NOVOTNY, V. M. J. et al. Occurrence of allogeneic *HLA* and non-*HLA* antibodies after transfusion of prestorage filtered platelets and red blood cells: a prospective study **Blood**; v. 85 (7), p. 1736-1741, 1995.
74. PETZ, L.D. et al. Selecting donors of platelets for refractory patients on the basis of *HLA* antibody specificity. **Transfusion**; v. 40, p. 1446–1456, 2000.
75. RATKO, T. A. et al. Recommendations for off-label use of intravenously administered immunoglobulin preparations University Hospital Consortium Expert Panel for

- Off-Label Use of Polyvalent Intravenously Administered Immunoglobulin Preparations. **JAMA**; v.273, p.1865-1870, 1995.
76. REBULLA, P. A mini-review on platelet refractoriness. **Haematologica**; v.90, p.247-253, 2005.
77. RODEY, G.E. et al. Epitope specificity of *HLA* Class I alloantibodies: I. Frequency analysis of antibodies to private versus public specificities in potential transplant recipients. **Hum Immunol**; v. 39, p. 272–280, 1994.
78. ROSSI, E. **Principles of transfusion medicine**. 3rded. 2002
79. ROZMAN, Primoz. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (*HPA*) in blood transfusion and transplantation. **Transplant Immunology**; v.10, p.165-181, 2002.
80. SANTOSO, S. The presence of messenger RNA for *HLA* class I in human platelets and its capability for protein biosynthesis. **British Journal of Haematology**; v.84, p.451-456, 1993.
81. SATO, S. et al. Earlier detection of *HLA* alloimmunization in platelet transfusion refractoriness by flow cytometric analysis. **Transfusion**; v.45, p.1399-1401, 2005.
82. SAYEH, E. et al. IgG antiplatelet immunity is dependent on an early innate natural killer cell-derived interferon-gamma response that is regulated by CD8⁺T cells. **Blood**; v. 103, p. 2705-2709, 2004.
83. SCHIFFER, C. A. et al. Antibody response in patients with acute nonlymphocytic leukemia. **Cancer**; v.37, p.2177-2182, 1976.
84. SCHIFFER, C. A. et al. High-dose intravenous gammaglobulin in alloimmunized platelet transfusion recipients. **Blood**; v.64(4), p.937–940, 1984.
85. SCHIFFER, C. A., O'CONNELL, B., LEE, E.J. Platelet transfusion therapy for alloimmunized patients: selective mismatching for *HLA* B12, an antigen with variable expression on platelets. **Blood**; v.74, p.1172-76, 1989.
86. SCHIFFER, C. A. et al. (American Society of Clinical Oncology.) Platelet transfusion for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol**; v.19, p.1519–1538, 2001.
87. SECORD A, GOLDFINGER D. Refractoriness to platelet transfusion therapy. UpToDate [serial online] 2004. Available from: <http://patients.uptodate.com/print.asp?print=true&file=transfus/11322>.

88. SHEHATA, N. et al. ABO-identical versus nonidentical platelet transfusion: a systematic review. **Transfusion**; v.49, p.2242-2453, 2009.
89. SIMONSEN, A.C. et al. Transfusion of 7-day-old amotosalen photochemically treated buffy-coat platelets to patients with thrombocytopenia: a pilot study. **Transfusion**; v.46, p.424-433, 2006.
90. SINTNICOLAAS, K. et al. Leukocyte depletion of random single-donor platelet transfusions does not prevent secondary human leukocyte antigen-alloimmunization and refractoriness: a randomized prospective study. **Blood**; v. 85 (3), p. 824-828, 1995.
91. SLICHTER, S. J. et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. **Blood**; v.105, p.4106-14, 2005.
92. SOARES, S. et al. Participação das plaquetas no processo de fibrose dos pacientes com esquistossomose mansônica. **Rev Soc Br Med Trop**; v.40, p.321-325, 2007.
93. GUIDE TO THE PREPARATION, USE AND QUALITY ASSURANCE OF BLOOD COMPONENTS, 12th edn. **Strasbourg: Council of Europe Publishing**; 2006.
94. The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. **N Engl J Med**; v.337, p.1861-9, 1997.
95. TINMOUTH, A.T. et al. Platelet immunopathology and therapy: a Canadian Blood Services Research and Development Symposium. **Transfusion Medicine Reviews**; v.20, p.294-314, 2006.
96. WERNET, D. et al. Serological screening, using three different test systems of platelet-transfused patients with hematologic-oncologic disorders. **Vox Sanguinis**; v.65, p.108-113, 1993.
97. YANKEE, R. A.; GRUMET, F. C.; ROGENTINE, G. N. Platelet transfusion therapy. The selection of compatible platelet donors for refractory patients by lymphocyte *HLA* typing. **N Engl J Med**; v.32, p.1208-12, 1969.

Anexos

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)