



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Instituto de Ciências da Saúde

ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA E OUTROS FATORES CONDICIONANTES DA RESPOSTA À TRANSFUÇÃO DE PLAQUETAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública

por

DINA GUIOMAR QUINTEIRO HORTELÃO

Porto, setembro de 2012



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Instituto de Ciências da Saúde

ATIVACÃO PLAQUETÁRIA E OUTROS FATORES CONDICIONANTES DA RESPOSTA À TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde
da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre em
Análises Clínicas e Saúde Pública, especialidade – Hematologia e Imunohemoterapia.

Trabalho realizado por

DINA GUIOMAR QUINTEIRO HORTELÃO

sob a orientação da Professora Doutora Margarida Lima

Porto, setembro de 2012

Resumo

As transfusões de plaquetas (TP) desempenham um papel muito importante no tratamento dos doentes hemato-oncológicos com trombocitopenia, nomeadamente pela sua contribuição em suportar os regimes terapêuticos. Contudo, a resposta é variável e depende de múltiplos fatores relativos às plaquetas e ao doente, e em alguns casos desenvolve-se um estado de refratariedade.

Na prática clínica a avaliação da eficácia da TP baseia-se principalmente na resposta clínica e no aumento contagem plaquetária no sangue após a transfusão, utilizando o incremento da contagem plaquetária corrigido (ICPC) e a percentagem de recuperação plaquetária, não sendo avaliados aspetos funcionais das plaquetas transfundidas. A selectina-P (CD62P) parece ser um bom indicador da ativação plaquetária. Esta proteína encontra-se na membrana dos grânulos α das plaquetas não ativadas e, após ativação, com a secreção dos grânulos, passa a ser expressa na membrana plaquetária, o que leva ao reconhecimento e destruição das plaquetas pelos macrófagos. A expressão de CD62P na superfície das plaquetas correlaciona-se positivamente com a ativação e desgranulação plaquetária e com a destruição acelerada das plaquetas circulantes.

Neste trabalho foi feita uma revisão da literatura sobre os aspetos estruturais e funcionais das plaquetas, as causas subjacentes à trombocitopenia e a preparação de concentrados de plaquetas para transfusão, assim como sobre os fatores condicionantes da resposta à TP, a avaliação dessa mesma resposta e o desenvolvimento de refratariedade à transfusão. Para além disso, investigou-se se a eficácia da transfusão plaquetária, avaliada pelo ICPC, tinha relação com perfil demográfico e clínico e com as características das plaquetas transfundidas. Relativamente a este último aspeto analisaram-se, para além de outros, o tempo de armazenamento, a similaridade e compatibilidade de grupos sanguíneos entre dadores e recetores, o estado basal de ativação plaquetária e a resposta das plaquetas à ativação induzida pela trombina, avaliada, entre outros, pela expressão de selectina-P nas plaquetas, quantificada por citometria de fluxo.

Foram estudados 30 doentes hemato-oncológicos, dos quais 20% evidenciaram refratariedade à TP. Não se observou associação estatisticamente significativa entre o ICPC uma hora após a transfusão com os fatores demográficos e clínicos analisados. Por outro lado, verificou-se que a ativação das plaquetas transfundidas era superior ao esperado, o que pode ter resultado do método de processamento, e que a resposta das plaquetas à trombina diminuía com o tempo de armazenamento das plaquetas transfundidas. Constatou-se ainda que existia uma correlação positiva entre a capacidade de resposta à trombina por parte das plaquetas transfundidas e a capacidade de resposta à trombina das plaquetas do sangue venoso colhido uma hora após transfusão.

Palavras-chave: Plaquetas, Trombocitopenia, Transfusão plaquetária, Ativação plaquetária, Refratariedade à transfusão, Citometria de fluxo, Glicoproteínas plaquetárias, Selectina-P.

Abstract

Platelet transfusions (PT) play an important role in the treatment of hemato-oncological patients with thrombocytopenia, in particular for their contribution in supporting the therapy. However, the response to PT is highly variable and often multifactorial, depending on platelet-related or patient-related variables. In some cases, the clinical success is very limited, as patients develop a state of platelet refractoriness.

In clinical daily practice, assessment of the effectiveness of platelets transfusion in thrombocytopenic patients is based primarily on the clinical response as well as on the evaluation of the increase in platelet counts, using the corrected increment count and the percentage of platelets recovery, but the functional aspect of the transfused platelets are usually not taken in consideration. P-selectin (CD62P) is a good indicator of platelet activation. In quiescent platelets, this protein is located on the inner wall of the α -granules. Platelet activation results in “membrane flipping” where the platelet releases α granules and the inner walls of the granules are exposed on the outside of the platelet; because of that, CD62P becomes expressed on the platelet membrane, leading to recognition and destruction of platelets by macrophages. Thus, CD62P expression on the platelet surface correlates with platelet activation and the accelerated destruction of circulating platelets.

In this work, we reviewed the literature on the platelet structural and functional aspects, the causes of thrombocytopenia, the preparation of platelet concentrates, as well as the factors affecting the response to platelet transfusion, the evaluation of this response and the development of a refractoriness state. In addition, we have also investigated whether the effectiveness of platelet transfusion, as measured by the corrected platelet count increment, is related to the clinical and demographic profile of transfused patients, and with the characteristics of the transfused platelets. For the latter, we have analyzed, amongst other aspects, the storage time, the similarity and compatibility between blood groups from donors and recipients as well as, the baseline platelet activation and the platelet response to thrombin, evaluated, among others, by the expression of CD62P quantified by flow cytometry.

Thirteen hemato-oncological patients were studied, from which 20% were refractory to platelet transfusion. Regarding the increase in corrected platelet count increment 1 hour after transfusion, there was no statistically significant association with the demographic and clinical factors analyzed. Moreover, the activation of the transfused platelets was higher than expected, probably as a consequence of the processing method, and their responsiveness to thrombin decreased with the storage time. It was further observed that there was a positive correlation between the responsiveness to thrombin of the transfused platelets and the responsiveness to thrombin of the platelets from venous blood collected 1 hour after PT.

Key-words: Platelets, Thrombocytopenia, Platelet transfusion, Platelet activation, Platelet refractoriness, Flow cytometry, Platelet glycoproteins, P-selectin

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof. Doutora Margarida Lima, pela sua orientação, dedicação e partilha de conhecimentos.

Ao Alexandre Salvador, pela ideia inicial do trabalho, pelo incentivo, pelo conhecimento compartilhado e pelo seu apoio na concretização deste estudo.

Ao Prof. Doutor Fernando Araújo, pela colaboração e apoio na realização deste estudo.

A todos os médicos, enfermeiros e aos assistentes operacionais da Unidade de Hemato-Oncologia e da Unidade de Doentes Neutropénicos, pelo apoio dado na recolha das amostras e na obtenção de dados clínicos.

A todos os meus colegas do serviço de Imunohemoterapia, que de uma forma ou outra me apoiaram, em especial:

- Às minhas colegas do laboratório de Imunohematologia, Branca Alves, Fátima Baía, Helena Rodrigues, Helena Sousa, Joana Lemos, Leonor Bolhão e Teresa Ventura, pela amizade e colaboração na selecção dos doentes a estudar.
- Aos meus colegas do sector de Processamento da Dádiva, Fábio Guimarães, Elsa Meireles, Estela Abreu e Vítor Cunha, pela amizade, colaboração, apoio e incentivo.
- Às minhas colegas, Célia Almeida, Edite Guedes, Graça Barros e Sandra Abrunhosa, pela amizade, apoio e por tornarem melhores os momentos mais difíceis.

Aos meus familiares, especialmente às minhas irmãs e ao Nuno, pela amizade, carinho, compreensão e apoio incondicionais em todos os momentos.

A todos os que algum modo contribuíram para a realização deste estudo.

Muito Obrigado.

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Características demográficas dos doentes incluídos neste estudo..... | 35 |
| Tabela 2. Diagnóstico dos doentes incluídos neste estudo..... | 35 |
| Tabela 3. Descrição dos aspetos clínicos dos doentes incluídos neste estudo | 36 |
| Tabela 4. Caracterização das transfusões plaquetárias quanto à identidade e compatibilidade dos grupos sanguíneos ABO e Rh (D) de dadores e recetores | 37 |
| Tabela 5. Caracterização dos “pools” de concentrados de plaquetas quanto à quantidade de plaquetas, à percentagem de células CD41a+ e CD42b+ e à intensidade de expressão destas moléculas nas plaquetas..... | 38 |
| Tabela 6. Caracterização dos “pools” de concentrados de plaquetas quanto ao tempo de armazenamento..... | 38 |
| Tabela 7. Caracterização dos “pools” de concentrados de plaquetas quanto à percentagem de plaquetas ativadas (CD62P+) e à intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas, antes e após adição de trombina..... | 39 |
| Tabela 8. Ativação basal das plaquetas em função do tempo de armazenamento | 40 |
| Tabela 9. Ativação das plaquetas induzida pela trombina em função do tempo de armazenamento..... | 41 |
| Tabela 10. Resposta à transfusão de plaquetas avaliada pelo incremento da contagem plaquetária e pelo incremento da contagem plaquetária corrigido | 42 |
| Tabela 11. Incremento da contagem plaquetária corrigido em doentes refratários e não refratários à transfusão de plaquetas..... | 43 |
| Tabela 12. Percentagem de plaquetas ativadas (CD62P+) e intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas, antes e após adição de trombina, no sangue venoso dos doentes colhido uma hora após transfusão..... | 44 |
| Tabela 13. Ativação basal das plaquetas no sangue venoso colhido uma hora após transfusão e a activação basal das plaquetas transfundidas..... | 44 |
| Tabela 14. Correlação entre a ativação das plaquetas transfundidas e a ativação das plaquetas do sangue venoso colhido 1 hora após a transfusão | 45 |
| Tabela 15. Ativação basal das plaquetas no sangue venoso dos doentes colhido uma hora após a transfusão em função do tempo de armazenamento das plaquetas transfundidas | 46 |
| Tabela 16. Ativação induzida pela trombina das plaquetas no sangue venoso dos doentes colhido uma hora após a transfusão em função do tempo de armazenamento das plaquetas transfundidas..... | 46 |
| Tabela 17. Incremento da contagem de plaquetas corrigido em função das variáveis demográficas e clínicas..... | 47 |
| Tabela 18. Incremento da contagem de plaquetas corrigido em função da semelhança e compatibilidade entre grupos sanguíneos ABO e Rh de dadores e recetores..... | 48 |
| Tabela 19. Incremento da contagem de plaquetas corrigido em função do tempo de armazenamento das plaquetas transfundidas | 49 |
| Tabela 20. Correlação entre a ativação das plaquetas transfundidas e o incremento da contagem de plaquetas corrigido | 50 |
| Tabela 21. Correlação entre a ativação das plaquetas do sangue venoso colhido uma hora após transfusão e o incremento da contagem de plaquetas corrigido..... | 51 |

| | |
|---|----|
| Tabela 22. Refratariedade à transfusão de plaquetas e características demográficas e clínicas | 52 |
| Tabela 23. Refratariedade à transfusão de plaquetas e identidade e compatibilidade de grupos sanguíneos entre dadores e recetores | 53 |
| Tabela 24. Refratariedade à transfusão de plaquetas e tempo de armazenamento das plaquetas. | 53 |
| Tabela 25. Refratariedade à transfusão de plaquetas e ativação das plaquetas transfundidas | 54 |
| Tabela 26. Refratariedade à transfusão de plaquetas e ativação das plaquetas do sangue venoso colhido uma hora após a transfusão | 55 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Percentagem de casos com (ICPC $<7.5 \times 10^9$ plaquetas/L) e sem (ICPC $>7.5 \times 10^9$ plaquetas/L) refratariedade à transfusão. | 43 |
|--|----|

Lista de Abreviaturas e Símbolos

- Ac, Anticorpos
- AcAp, Anticorpos anti-plaqueta
- AcMo, Anticorpos monoclonais
- ADN, Ácido desoxirribonucleico
- ADP, Adenosina difosfato
- ADPase, Difosfohidrolase da adenosina difosfato (*Nucleoside diphosphohydrolase*)
- Ag, Antigénio
- APC, Células apresentadoras de antígenos (*Antigen presenting cells*)
- ATP, Adenosina trifosfato
- BC, *Buffy coat*
- CD, Cluster de diferenciação (*Cluster of differentiation*)
- CE, Concentrado de eritrócitos
- Células NK, Células “assassinas” naturais (*Natural killer*)
- CF, Citometria de fluxo
- CIC, Complexos imunes circulantes
- CID, Coagulação intravascular disseminada
- CMH, Complexo major de histocompatibilidade
- CMV, Citomegalovirus
- CP, Concentrado de plaquetas
- CUP, Componente unitário de plaquetas
- DHL, Desidrogenase láctica (*Lactic dehydrogenase*)
- DPA, Desleucocitação pré-armazenamento
- EBV, Vírus de Epstein Barr (*Epstein Barr vírus*)
- EDTA, Ácido etileno-diamino-tetra-acético
- FITC, Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)
- fL, Fentolitros
- FS ou FSC, Luz dispersa no plano frontal (*Forward Scatter, Forward Scatter Chanel*)
- FvW, Fator de von Willebrand
- Gp, Glicoproteína
- GVHD, Doença do enxerto contra o hospedeiro (*Graft versus host disease*)
- Hb, Hemoglobina
- HE, *High Expressers*
- HLA, Antígenos Leucocitários Humanos (*Human Leukocyte Antigens*)
- HPA, Antígenos Plaquetários Humanos (*Human Platelet Antigens*)

HTLV-I e II, Vírus Linfotrópicos Humanos tipos I e II (*Human T Lymphotropic Virus Type I and II*)

IC, Intervalo de confiança

ICP, Incremento da contagem plaquetária

ICPC, Incremento da contagem plaquetária corrigido

IMF, Intensidade média de fluorescência

LE, *Low expressers*

mL, Mililitros

MO, Medula óssea

NO, Óxido nítrico (*Nitric oxid*)

PE, Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)

PerCP-Cy5.5, Proteína peridina clorofila – Cianina 5.5 (*Peridinin Chlorophyll protein-Cyanine 5.5*)

PF4, Fator plaquetário 4 (*Platelet factor 4*)

PFA-100, Ensaio de função plaquetária (*Platelet function assay*)

PGI2, Prostaglandina I2

PRP, Plasma rico em plaquetas

RI, Resposta imune

RTFNH, Reação transfusional febril não hemolítica

RTP, Refratariedade à transfusão de plaquetas

SCA, Sistema canalicular aberto

SHC, Serviço de Hematologia Clínica

SS ou SSC, Dispersão da luz no plano lateral (*Side Scatter, Side Scatter Chanel*)

ST, Sangue total

STD, Sistema tubular denso

TP, Transfusão de plaquetas

TRALI, Lesão pulmonar aguda relacionada com a transfusão

TxA2, Tromboxano A2

u.a.f., unidades arbitrárias de fluorescência

UDN, Unidade de doentes neutropénicos

UHO, Unidade de hemato-oncologia

Índice

| | |
|---|------------|
| Resumo | i |
| Abstract..... | iii |
| Agradecimentos | v |
| Lista de Tabelas | vii |
| Lista de Figuras..... | ix |
| Lista de Abreviaturas e Símbolos..... | x |
| Capítulo 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1. PLAQUETAS..... | 3 |
| 1.1 Estrutura plaquetária | 3 |
| 1.1.1 Membrana externa ou Glicocálice | 3 |
| 1.1.2 Citosqueleto | 3 |
| 1.1.3 Sistema canalicular aberto | 3 |
| 1.1.4 Sistema tubular denso | 4 |
| 1.1.5 Grânulos plaquetários..... | 4 |
| 1.2 Glicoproteínas da membrana plaquetária | 4 |
| 1.2.1 Complexo Gp IIb/IIIa (CD41/CD61) | 4 |
| 1.2.2 Complexo Gp Ib/IX/V (CD42b/CD42a/CD42d) | 5 |
| 1.2.3 Selectina-P (CD62P)..... | 5 |
| 1.3 Função plaquetária | 5 |
| 1.3.1 Fases de formação do trombo plaquetário | 5 |
| 2. CONTAGEM PLAQUETÁRIA | 7 |
| 2.1 Trombocitose | 7 |
| 2.2 Trombocitopenia | 7 |
| 2.2.1 Trombocitopenia nos doentes hemato-oncológicos..... | 7 |
| 3. TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS | 9 |
| 3.1 Preparação de concentrados de plaquetas..... | 9 |

| | |
|--|----|
| 3.1.1 Método do plasma rico em plaquetas..... | 9 |
| 3.1.2 Método do “ <i>buffy-coat</i> ”..... | 9 |
| 3.1.3 Método de aférese..... | 9 |
| 4. FATORES CONDICIONANTES DA RESPOSTA À TRANSFUSÃO PLAQUETÁRIA | 10 |
| 4.1 Fatores intrínsecos às plaquetas..... | 10 |
| 4.1.1 Número reduzido de plaquetas..... | 10 |
| 4.1.2 Contaminação com leucócitos..... | 10 |
| 4.1.3 Aumento do tempo de armazenamento | 10 |
| 4.1.4 Viabilidade plaquetária diminuída..... | 11 |
| 4.2 Fatores extrínsecos às plaquetas, de natureza não imune..... | 12 |
| 4.2.1 Febre, infecção grave, sépsis..... | 12 |
| 4.2.2 Coagulação intravascular disseminada..... | 12 |
| 4.2.3 Transplante com células progenitoras hematopoiéticas | 12 |
| 4.2.4 Esplenomegalia e hiperesplenismo | 13 |
| 4.2.5 Hemodiluição | 13 |
| 4.2.6 Causas farmacológicas | 13 |
| 4.3 Fatores extrínsecos às plaquetas, de natureza imune..... | 13 |
| 4.3.1 Complexos imunes circulantes | 14 |
| 4.3.2 Aloimunização plaquetária..... | 14 |
| 5. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS TRANSFUSÕES DE PLAQUETAS | 17 |
| 5.1 Recuperação da contagem plaquetária..... | 17 |
| 5.1.1 Incremento da contagem plaquetária | 17 |
| 5.1.2 Incremento da contagem plaquetária corrigido | 17 |
| 5.1.3 Percentagem de recuperação plaquetária | 17 |
| 5.2 Avaliação da função plaquetária | 18 |
| 5.3 Avaliação da forma plaquetária | 18 |
| 5.4 Avaliação do tempo de hemorragia..... | 18 |
| 5.5 Estudos de agregação plaquetária..... | 18 |
| 5.6 Doseamento de moléculas solúveis | 18 |
| 5.7 Estudo das glicoproteínas da membrana plaquetária..... | 19 |
| 5.7.1 Complexo Gp IIb/IIIa (CD41/CD61) | 19 |
| 5.7.2 Complexo Gp Ib/IX/V (CD42b/CD42a/CD42d)..... | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 5.7.3 Selectina-P (CD62P)..... | 19 |
| 6. REFRATARIEDADE ÀS TRANSFUSÕES DE PLAQUETAS..... | 21 |
| 6.1 Definição..... | 21 |
| 6.2 Critérios de diagnóstico..... | 21 |
| Capítulo 2. OBJETIVOS..... | 23 |
| Capítulo 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 27 |
| 1. Amostras..... | 29 |
| 2. Metodologia..... | 29 |
| 2.1 Procedimentos..... | 29 |
| 2.1.1 Preparação do <i>pool</i> de plaquetas para transfusão..... | 29 |
| 2.1.2 Colheitas de sangue..... | 29 |
| 2.1.3 Recolha de dados dos doentes..... | 30 |
| 2.1.4 Estudos laboratoriais..... | 30 |
| 3. Análise estatística..... | 31 |
| 3.1 Variáveis quantitativas contínuas..... | 31 |
| 3.2 Variáveis qualitativas..... | 31 |
| Capítulo 4. RESULTADOS..... | 33 |
| 1. Características da população estudada..... | 35 |
| 2. Características das plaquetas transfundidas..... | 37 |
| 2.1 Compatibilidade ABO e Rh..... | 37 |
| 2.2 Quantidade de plaquetas..... | 37 |
| 2.3 Tempo de armazenamento..... | 38 |
| 2.4 Ativação plaquetária..... | 38 |
| 2.5 Relação entre a ativação plaquetária e tempo de armazenamento..... | 39 |
| 2.5.1. Ativação plaquetária basal e tempo de armazenamento..... | 39 |
| 2.5.2 Ativação plaquetária induzida pela trombina e tempo de armazenamento..... | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Resposta à transfusão de plaquetas..... | 42 |
| 3.1 Incremento da contagem de plaquetas | 42 |
| 3.2 Refratariedade à transfusão de plaquetas | 42 |
| 3.3 Ativação das plaquetas após transfusão..... | 43 |
| 4. Fatores condicionantes da resposta à transfusão | 47 |
| 4.1. Relação com as características demográficas e clínicas dos doentes | 47 |
| 4.2. Relação com as características das plaquetas transfundidas | 47 |
| 4.2.1 Grupos sanguíneos..... | 47 |
| 4.2.2 Tempo de armazenamento dos concentrados de plaquetas | 49 |
| 4.2.3 Ativação plaquetária | 49 |
| 5. Fatores condicionantes da refratariedade à transfusão..... | 52 |
| 5.1. Relação com as características demográficas e clínicas dos doentes | 52 |
| 5.2. Relação com as características das plaquetas transfundidas | 52 |
| 5.2.1 Grupos sanguíneos..... | 52 |
| 5.2.2 Tempo de armazenamento dos concentrados de plaquetas | 53 |
| 5.2.3 Ativação plaquetária | 53 |
| Capítulo 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES | 57 |
| Referências Bibliográficas | i |
| Anexos | i |
| Anexo 1: Formulário de recolha de dados | iii |
| Anexo 2: Imunomarcagem das plaquetas | iv |

Capítulo 1. INTRODUÇÃO

1. PLAQUETAS

1.1 Estrutura plaquetária

As plaquetas foram identificadas em 1882, por Bizzozero, contudo só em 1970 a sua relação com a hemostase se tornou evidente.(1) São pequenas células anucleadas de forma discóide, com cerca de 2-3 µm diâmetro e 7-11 fl de volume, que se formam na medula óssea (MO) a partir da fragmentação do citoplasma dos seus precursores, os megacariócitos. A sua produção aumenta em resposta à trombopoietina, uma hormona produzida fundamentalmente no fígado, e o seu tempo de vida em circulação é de cerca de 10 dias. (2-5) Apesar de serem células anucleadas, apresentam uma estrutura complexa, em que se destacam vários componentes.

1.1.1 Membrana externa ou Glicocálice

A membrana externa das plaquetas é uma camada lipoproteína que integra glicoproteínas (Gp) com um papel muito importante na função plaquetária. Muitas destas moléculas funcionam como recetores, aos quais se ligam moléculas de adesão, agregação, inibição e fatores procoagulantes. Entre estas salientam-se os recetores das famílias das selectinas (como a selectina-P ou CD62P), das integrinas (como as Gp IIb e IIIa), dos recetores ricos em leucina (como as Gp Ib, V e IX) e da superfamília das imunoglobulinas (como a Gp VI), assim como os recetores para agentes agonistas (como a adenosina difosfato, ADP), colagénio, epinefrina e trombina).(4)

1.1.2 Citoesqueleto

O citoesqueleto plaquetário é uma rede tridimensional de microfilamentos (constituídos por actina e outras proteínas acessórias como a filamina), microtúbulos (constituídos fundamentalmente por tubulina) e outros filamentos (que incluem proteínas como a vimentina ou a laminina). Na periferia das plaquetas existe um conjunto marginal de microtúbulos que apoia o citoesqueleto e que mantém a sua estrutura discóide, no seu estado de repouso. Durante a ativação, o citoesqueleto contrai e, conseqüentemente as plaquetas tornam-se esféricas e emitem pseudópodes.(3)

1.1.3 Sistema canicular aberto

O sistema canicular aberto (SCA) consiste em invaginações da membrana plasmática que constituem não só uma via de acesso de moléculas plasmáticas ao interior das plaquetas mas também uma reserva de membrana, para que durante a ativação possa ocorrer a

mudança de forma e a emissão de pseudópodes. Permite a libertação para o exterior de componentes contidos nos grânulos.

1.1.4 Sistema tubular denso

O sistema tubular denso (STD) é o principal local de armazenamento de cálcio no interior das plaquetas.

1.1.5 Grânulos plaquetários

Para além de mitocôndrias, lisossomas e peroxissomas, que têm características e funções semelhantes aos de outras células, as plaquetas contêm, distribuídas no seu citoplasma, grânulos específicos de diferentes tipos.

1.1.5.1 Grânulos alfa

Os grânulos alfa são os grânulos de maior tamanho (~200-400nm), os mais heterogéneos e mais abundantes, em número de 50 a 60 por plaqueta. Contêm fator plaquetário 4 (PF4), selectina-P, trombospondina, β -tromboglobulina, fatores que intervêm na coagulação (factor V, XI, XIII, fibrinogénio, fator von Willebrand (FvW) e cininogénios de alto peso molecular) e moléculas de adesão, como a fibronectina e a vitronectina.

1.1.5.2 Grânulos densos

Os grânulos densos são, como o próprio nome indica, grânulos com grande densidade electrónica, devido à grande quantidade de cálcio. São mais pequenos (~150nm), existem em menor número (3 a 8 grânulos densos/plaqueta) e contêm, para além de cálcio, adenosina trifosfato (ATP), ADP e serotonina.(3)

1.1.5.3 Lisossomas

Os grânulos lisossomais têm um tamanho intermédio entre os grânulos α e os grânulos densos (~200-250nm) e contêm sobretudo hidrolases ácidas e CD63.

1.2 Glicoproteínas da membrana plaquetária

1.2.1 Complexo Gp IIb/IIIa (CD41/CD61)

O complexo Gp IIb/IIIa é o complexo de Gp mais abundante da superfície plaquetária (cerca de 50.000 moléculas por plaqueta) e as proteínas que o constituem pertencem à família das integrinas. Atua como um recetor na interação entre plaquetas e entre estas e o sub-endotélio vascular, decisivos no processo de adesão e de agregação. Isto porque a ativação plaquetária desencadeia mudanças conformacionais na Gp IIb/IIIa, que, para além de funcionar

como recetor para o FvW, fibronectina e vibronectina, após ativação, passa também a funcionar como recetor para o fibrinogénio, essencial para a agregação.

1.2.2 Complexo Gp Ib/IX/V (CD42b/CD42a/CD42d)

Este complexo contém Gp ricas em leucina, atua como receptor para o FvW e é essencial para a adesão das plaquetas aos vasos sanguíneos lesados. Está presente na membrana plaquetária, em número de 25.000 moléculas por plaqueta, encontrando-se também no SCA, nos grânulos α e densos.

1.2.3 Selectina-P (CD62P)

A selectina-P, ou CD62P, encontra-se na membrana dos grânulos α das plaquetas não ativadas. Após a ativação, com a secreção dos grânulos α , passa a ser expressa na membrana plaquetária, em resultado da fusão da membrana dos grânulos com a membrana da plaqueta.

1.3 Função plaquetária

As plaquetas são multifuncionais ou seja, actuam ao nível da regulação do tónus vascular, na resposta inflamatória, no sistema imunológico, na biologia tumoral e na trombose e hemostase. (2) Em condições fisiológicas, circulam no sangue no estado inativo, uma vez que as células endoteliais secretam fatores que inibem a ativação plaquetária. (6) Exemplos destes fatores são a prostaglandina (PGI_2), o óxido nítrico (NO), e o CD39/ADPase, um componente na superfície das células endoteliais que hidrolisa os vestígios de ADP, que poderiam ativar as plaquetas. (7) Quando ativadas, as plaquetas agregam e catalizam a formação de um coágulo estável, via cascata da coagulação, protegendo rapidamente da hemorragia. (6)

1.3.1 Fases de formação do trombo plaquetário

De acordo com o modelo clássico da hemostase primária, a formação de um trombo plaquetário estável após uma lesão vascular, ocorre em 3 fases distintas: **iniciação** (adesão de plaquetas), **extensão** (ativação, adesão e agregação) e **estabilização** (estabilização do trombo).

1.3.1.1 Fase de iniciação

Durante a fase de “iniciação”, as plaquetas circulantes interagem com moléculas do sub-endotélio vascular e sua forma altera-se de discoide para esférica, formando-se uma monocamada de plaquetas ativadas. Esta adesão é mediada pela interação entre o complexo Gp Ib/V/IX presente na superfície das plaquetas com o FvW e entre as Gp VI e Ia com o colagénio no local da lesão. (6)

1.3.1.2 Fase de extensão

A fase de “extensão” caracteriza-se pela secreção, por parte das plaquetas ativadas, de vários agonistas como o tromboxano A2 (TxA2), a ADP, a serotonina, o colagénio e a trombina que levam à adesão de mais plaquetas. A libertação de ADP e TxA2 contribui não só para o recrutamento de mais plaquetas, como também para a mudança da sua forma, aumento da expressão de moléculas pró-inflamatórias (incluindo a selectina-P ou CD62P), expressão da actividade pró-coagulante e ativação do complexo Gp IIb/IIIa, permitindo a agregação plaquetária.

1.3.1.3 Fase de estabilização

Na fase de “estabilização” o fibrinogénio forma pontes entre as plaquetas ativadas estabilizando o trombo plaquetário (interação plaqueta – plaqueta). (7)

2. CONTAGEM PLAQUETÁRIA

A contagem normal de plaquetas no sangue periférico varia entre 150 e $350 \times 10^9/L$. Dentro deste intervalo, o número de plaquetas circulantes, é adequado à hemostase. (1, 8) Dado que as plaquetas têm um tempo de vida em circulação de cerca de 10 dias e que cerca de um terço das plaquetas são retidas no baço, estima-se que sejam produzidas cerca de 100×10^9 plaquetas por dia, a fim de manter uma contagem normal. É assim fundamental um equilíbrio constante entre a trombocitopoiese e o consumo plaquetário, por senescência ou ativação plaquetária. (8) Quando este equilíbrio é perturbado, pode ocorrer um aumento ou uma diminuição do número de plaquetas circulantes.

2.1 Trombocitose

É o aumento do número de plaquetas circulantes, isto é, quando a contagem plaquetária ultrapassa $350 \times 10^9/L$. A trombocitose primária (hereditária ou adquirida) é causada por alterações ao nível das células hematopoiéticas, e a trombocitose secundária é o resultado de fatores externos, tais como inflamação crónica ou cancro. (1, 2)

2.2 Trombocitopenia

É a diminuição do número de plaquetas circulantes, isto é, quando a contagem plaquetária é inferior a $150 \times 10^9/L$. Pode ser causada pelo aumento do consumo de plaquetas à periferia (secundário, por exemplo, ao aumento da destruição das plaquetas por mecanismos imunes, ou ao aumento da retenção esplénica de plaquetas por esplenomegalia) ou pela diminuição da trombocitopoiese (secundária, por exemplo, à supressão medular por infeção, falência medular primária ou infiltração medular por neoplasias). (1, 2)

2.2.1 Trombocitopenia nos doentes hemato-oncológicos

As doenças do foro hemato-oncológico podem cursar com trombocitopenia devido, por exemplo, à falha da MO que, por sua vez pode ser causada pela doença em si e/ou pelo tratamento (radioterapia e quimioterapia). (9-11) De acordo com os aspetos clínicos, estes pacientes podem ser classificados em diferentes grupos:

2.2.1.1 Doentes com produção diminuída de plaquetas

Qualquer situação que conduza à aplasia medular ou a uma diminuição do número de megacariócitos na MO pode dar origem a uma trombocitopenia. A maioria dos doentes com leucemias agudas apresenta citopenias, incluindo trombocitopenia, em consequência da infiltração da medula por blastos. Nos linfomas e nas doenças linfoproliferativas crónicas, as citopenias podem resultar da infiltração medular pelos linfócitos neoplásicos. Nas anemias

megaloblásticas ocorrem defeitos na síntese do ADN que se manifestam por pancitopenia, com diminuição de todas as linhagens celulares, incluindo as plaquetas. Os agentes citotóxicos usados na quimioterapia, normalmente interferem com o ciclo celular, reduzindo por conseguinte o número de plaquetas. Nos doentes em quimioterapia citostática as plaquetas são cuidadosamente monitorizadas, e pode ser necessário administrar transfusões de plaquetas. A produção de plaquetas também pode ser afetada por processos infecciosos, víricos ou bacterianos, supondo-se que o mecanismo possa ser multifatorial, incluindo a supressão megacariocítica e a toxicidade direta sobre as plaquetas circulantes (1). Assim, alguns vírus, como o citomegalovírus (CMV), o vírus de Epstein-Barr (EBV), o vírus da varicela e o vírus da rubéola, assim como algumas bactérias, podem causar trombocitopenia.

2.2.1.2 Doentes com aumento da destruição periférica das plaquetas

Um baço normal contém um terço do número total de plaquetas. Em algumas situações hematológicas, o seu aumento faz parte do processo patológico, como por exemplo nas doenças mieloproliferativas, na hematopoiese extramedular e nas anemias hemolíticas. À medida que o baço aumenta, o sangue acumula-se neste órgão, retendo plaquetas da circulação periférica. Se o órgão for removido, um número elevado de plaquetas passa para a circulação, podendo condicionar um aumento da contagem plaquetária no sangue periférico e até causar complicações trombóticas. (1)

3. TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS

Desde 1960 que as transfusões de plaquetas (TP) têm desempenhado um papel muito importante no tratamento das trombocitopenias transitórias ou persistentes observadas em numerosas doenças, incluindo as hemato-oncológicas.(9-11) Assim, foram publicadas diretrizes europeias e americanas que recomendam que as TP devem ser usadas profilaticamente, no sentido de prevenir complicações hemorrágicas e manter o valor de plaquetas acima de 10.000/ml e de forma terapêutica, quando se pretende realizar uma manobra invasiva ou quando o paciente tem manifestações hemorrágicas.(12)

3.1 Preparação de concentrados de plaquetas

Os concentrados de plaquetas (CP) são produzidos usando diferentes materiais e processos centrifugação/leucorredução e armazenados à temperatura ambiente (20-24°C) em agitação contínua até 5 dias. Na preparação podem ser usados fundamentalmente 3 métodos: plasma rico em plaquetas (PRP), *buffy-coat* (BC) e aférese. (12, 13)

3.1.1 Método do plasma rico em plaquetas

Este método consiste na separação das plaquetas a partir do PRP. O primeiro passo é centrifugação do sangue total (ST) a baixa rotação, o que sedimenta os glóbulos vermelhos e os glóbulos brancos e concentra as plaquetas no plasma sobrenadante, designado PRP. No segundo passo, o PRP é centrifugado a rotações mais elevadas, o que faz sedimentar as plaquetas. O plasma sobrenadante, livre de plaquetas, é removido e as plaquetas são ressuspendidas em 50 a 70 mL de plasma. (14)

3.1.2 Método do “*buffy-coat*”

No método de separação das plaquetas a partir do BC, o ST colhido é centrifugado a altas rotações, o que permite a separação nas seguintes camadas: os glóbulos vermelhos, o “*buffy coat*” (90% das plaquetas e 70% dos leucócitos) e o plasma. Após centrifugação a baixas rotações do “*buffy coat*” são produzidos os CP unitários.(14)

3.1.3 Método de aférese

No método de aférese, o sangue é imediatamente combinado com o anticoagulante e separado em componentes, de acordo com as densidades. As plaquetas são transferidas para um saco enquanto os restantes componentes são re-infundidos no dador. O componente final tem um volume aproximado de 200 mL e é designado de componente unitário de plaquetas (CUP).(14)

4. FATORES CONDICIONANTES DA RESPOSTA À TRANSFUSÃO PLAQUETÁRIA

A resposta às TP é variável e depende de múltiplos fatores, relativos às plaquetas e ao doente, quer de natureza imune, quer de outra natureza.

4.1 Fatores intrínsecos às plaquetas

4.1.1 Número reduzido de plaquetas

O número de plaquetas por CP depende do número de plaquetas do dador e da perda de plaquetas durante o processamento, sobretudo durante a desleucocitação. As contagens plaquetárias são menores na desleucocitação pré-armazenamento (DPA), devido à perda de $10 \pm 3\%$ de plaquetas, sobretudo das plaquetas de maior tamanho.(15)

4.1.2 Contaminação com leucócitos

Estudos anteriores revelaram que a remoção de leucócitos dos componentes sanguíneos, processo designado de leucorredução, minimiza os riscos associados aos leucócitos contaminantes.

A leucorredução pode ser efetuada antes ou após o armazenamento das plaquetas, sendo que as vantagens da desleucocitação antes do armazenamento são as seguintes:

- Reduz a quantidade de citocinas inflamatórias libertadas pelos leucócitos durante o armazenamento, o que previne reações transfusionais febris não hemolíticas (RTFNH).
- Minimiza o risco de aloimunização contra antigénios (Ag) leucocitários humanos (HLA) através da remoção de leucócitos intactos, ao contrário da filtração pós-armazenamento, onde os fragmentos dos leucócitos passam através dos filtros e imunizam o recetor.
- Minimiza o risco de transmissão de vírus com tropismo para leucócitos, tais como o EBV e o CMV, pois após 72 horas de armazenamento, os leucócitos desintegram-se e libertam organismos intracelulares.
- Permite a monitorização do processo de leucorredução. (16)

4.1.3 Aumento do tempo de armazenamento

Mustard et al, mencionaram pela primeira vez em 1957, alterações que ocorrem nas plaquetas durante o armazenamento, mas só após quase 15 anos, é que *Murphy et al*, introduziu o conceito “lesão plaquetária” durante o armazenamento relacionada com a acumulação de lactato, alteração da morfologia de discoide para esférica e resposta reduzida

ao ADP; estes estudos revelaram ainda que algumas dessas alterações, parecem ser parcialmente reversíveis após a transfusão. (17)

A lesão das plaquetas durante o tempo de armazenamento, é definida por alguns autores, como o somatório das alterações na estrutura, morfologia e função das plaquetas, desde o momento da dádiva até à administração dos CP. (17, 18)

As lesões nas plaquetas são causadas por alterações bioquímicas no meio extracelular (pH, pCO₂ e concentração de lactato), implicando não só uma redução quantitativa das plaquetas mas também a diminuição ou perda de função plaquetária. (19) Assim, durante o período de armazenamento desenvolvem-se marcadores de ativação, secreção ou lise plaquetária nomeadamente, a libertação de moléculas de HLA solúveis, a expressão da selectina-P (CD62P), GpIb, GpIIb-IIIa, FvW, anexina V e a libertação de β -tromboglobulina. (15) A expressão de CD62P e de fosfatidilserina provoca o reconhecimento das plaquetas pelos macrófagos e subsequente remoção da circulação. Deste modo, tempos de armazenamento prolongados provocam alterações na superfície das plaquetas transfundidas e por sua vez, uma diminuição da semi-vida destas em circulação.(20)

Estudos concluem que, em doentes clinicamente estáveis, tanto as plaquetas armazenadas como as plaquetas com tempos de armazenamento inferiores a 3 dias, têm sobrevividas comparáveis e condicionam aumentos sobreponíveis das contagens plaquetárias; no entanto, em doentes clinicamente instáveis, CP com tempo de armazenamento até dois dias têm significativamente melhores resultados. Por outro lado, a administração de CP com um período de armazenamento superior a 3 dias está associada a um aumento da incidência de reações adversas não hemolíticas, devido à libertação de citocinas e à ativação do complemento.

As alterações provocadas pelo tempo de armazenamento prolongado são parcialmente contrariadas pela DPA.(15)

4.1.4 Viabilidade plaquetária diminuída

Alterações morfológicas e funcionais das plaquetas, nomeadamente por processamento tardio após a colheita ou armazenamento em condições de temperatura e de agitação inadequadas, podem comprometer a viabilidade plaquetária, que por sua vez pode ser responsável por um falso diagnóstico de refratariedade à transfusão de plaquetas (RTP) do ponto de vista clínico.

A viabilidade e a qualidade dos CP pode ser verificada com recurso às contagens plaquetárias, à determinação do pH, ao doseamento da desidrogenase láctica (DHL), à determinação dos níveis de glicocalicina, à avaliação da expressão de Gp plaquetárias (ex. CD42b) ou selectina-P (CD62P) na membrana das plaquetas, ao estudo microbiológico para

avaliar contaminação bacteriana e ao teste do turbilhão. O aumento da expressão de CD62P na membrana das plaquetas está associado a uma redução marcada da semi-vida plaquetária, seja por retenção esplénica e consequente *clearance* ou por consumo em microcirculação.

A morfologia das plaquetas configura-se na prática clínica como um indicador da capacidade das plaquetas armazenadas se manterem em circulação. O teste do turbilhão baseia-se no fenómeno de dispersão da luz pelas plaquetas de morfologia normal e confirma se estas ainda estão na forma discóide ou completamente convertidas na forma esférica. (15)

4.2 Fatores extrínsecos às plaquetas, de natureza não imune

São provavelmente os fatores mais frequentes (e desconhecidos), de prevenção e intervenção complicadas. Os únicos fatores não imunes que provocam contagens plaquetárias diminuídas à 1.^a hora são a febre e a esplenomegalia.(15)

4.2.1 Febre, infeção grave, sépsis

Alguns estudos demonstraram que a febre, infeção grave e sépsis levam à diminuição de 20-40% nos aumentos pós-transfusionais das contagens plaquetárias.(21)

A infeção é uma das causas mais comuns da trombocitopenia. Alguns exemplos são as infeções pelos vírus de imunodeficiência humana (VIH), da hepatite C (VHC), da rubéola e da varicela e ainda da malária, entre outras. (1)

4.2.2 Coagulação intravascular disseminada

A coagulação intravascular disseminada (CID) é definida como uma síndrome adquirida, caracterizada pela ativação generalizada da coagulação intravascular, pelo consumo de plaquetas e fatores da coagulação, que leva à formação e deposição de fibrina. O sistema fibrinolítico está, em geral, amplamente inativado durante a fase de maior ativação da coagulação, o que contribui na deposição de fibrina, na oclusão de vasos e consequentemente na falência de múltiplos órgãos. Porém, em algumas situações (por exemplo, na leucemia promielocítica aguda) a fibrinólise pode estar aumentada, contribuindo assim para quadros de hemorragia grave. (21)

4.2.3 Transplante com células progenitoras hematopoiéticas

O transplante com células progenitoras hematopoiéticas é uma modalidade terapêutica utilizada atualmente no tratamento de diversas doenças, incluindo as hemato-oncológicas. Dependendo do processo fisiopatológico, da resposta à quimioterapia e da disponibilidade de dadores, o paciente é selecionado para transplante com células de MO ou de sangue periférico, alogénico ou autólogo. Com o aparecimento de aplasia medular, em decorrência do

regime de quimioterapia e/ou radioterapia instituído, os pacientes submetidos ao transplante tornam-se susceptíveis a hemorragias (por trombocitopenia), e infeções (por neutropenia) e desenvolvem anemia, necessitando de transfusões de plaquetas e de eritrócitos. O suporte transfusional é, portanto, fundamental para o sucesso desta terapêutica. (21)

4.2.4 Esplenomegalia e hiperesplenismo

A maioria dos processos patológicos que envolvem o baço provoca o aumento deste órgão. O termo hiperesplenismo é utilizado para designar a retenção de células sanguíneas no baço a que normalmente a esplenomegalia conduz, provocando citopenias.

O hiperesplenismo é um dos fatores clínicos que mais afecta o incremento da contagem plaquetária (ICP) após transfusão, através do sequestro e da *clearance* esplénica. Normalmente 1/3 das plaquetas existentes em circulação são retidas no baço, o que significa que mesmo aumentos discretos do tamanho (esplenomegalia ligeira) e/ou da função esplénica, podem resultar em perda plaquetária não desprezível. A esplenomegalia maciça pode ocasionar uma perda de mais de 90% das plaquetas circulantes. Por outro lado, os doentes esplenectomizados apresentam ICP pós-transfusional significativamente superior aos doentes com *status* esplénico normal.(15)

4.2.5 Hemodiluição

A transfusão de componentes como concentrado de eritrócitos (CE), plasma e crioprecipitado, pode levar à diluição das plaquetas no volume de ST do doente e consequentemente, um falso diagnóstico de RTP do ponto de vista laboratorial.(15)

4.2.6 Causas farmacológicas

Alguns medicamentos quando administrados 24 horas antes e após a TP estão associados ao desenvolvimento de RTP, tais como, anticoagulantes (heparina), anti-epiléticos, anti-hipertensores, analgésicos, antibióticos, diuréticos e cardiotónicos.(15)

4.3 Fatores extrínsecos às plaquetas, de natureza imune

Os fatores de natureza imune podem envolver a presença de imunocomplexos circulantes, assim como anticorpos (Ac) anti-plaqueta (AcAp), com especificidades várias, incluindo Ag dos grupos sanguíneos, das plaquetas e dos leucócitos.

A púrpura pós-transfusional ocorre após a transfusão de componentes contendo plaquetas contra as quais o doente desenvolveu Ac. Estes Ac são dirigidos contra Ag plaquetários, desencadeando a remoção das plaquetas pelo baço.(1)

4.3.1 Complexos imunes circulantes

A presença de complexos imunes em circulação (CIC) correlaciona-se inversamente com o aumento pós-transfusional da contagem plaquetária. Os CIC ligam-se ao receptor tipo II para o fragmento Fc da IgG (Fc γ RII) das plaquetas, levando a que estas sejam removidas pelo sistema reticulo-endotelial.(21)

4.3.2 Aloimunização plaquetária

Os fatores imunes são responsáveis pelo desenvolvimento de Ac contra os aloantígenos plaquetários, com destruição das plaquetas transfundidas.

A aloimunização é definida, como o resultado da resposta imune (RI) do receptor contra as células transfundidas, não *self*, de um dador da mesma espécie, sendo confirmada pela identificação do Ac no receptor contra o/os Ag do dador. A RI depende dos Ag existentes no componente transfundido e do *status* imunitário do receptor, que pode estar comprometido pela patologia subjacente e/ou terapêutica instituída. O Ag dos componentes transfundidos não são apenas os plaquetários, mas também, Ag dos leucócitos circulantes que os acompanham, Ag das proteínas plasmáticas e dos medicamentos. A exposição ocorre através de transfusões e/ou gestações anteriores e também após o transplante de MO ou de órgão sólido.(15)

Existem três grandes grupos de aloantígenos plaquetários veiculados pela TP, contra os quais o sistema imunitário do receptor, produz AcAp: os Ag dos grupos sanguíneos (ABO, Lewis e P), os Ag específicos das plaquetas (*Human Platelet Antigen*, HPA) e por fim os Ag do sistema HLA.

4.3.2.1 Anticorpos anti-HLA

Os Ag HLA são glicoproteínas presentes na superfície da maioria das células nucleadas e estão frequentemente envolvidos em alo-imunizações, refratariedade às TP, RTFNH, lesão pulmonar aguda relacionada com a transfusão (TRALI) e a doença de enxerto contra hospedeiro (GVHD). Isto porque apesar da desleucocitação, a TP veicula leucócitos residuais que expressam Ag HLA classe II e células apresentadoras de Ag (APC, *Antigen Presenting Cells*): células dendríticas, macrófagos, monócitos e linfócitos B. A “desleucocitação universal”, ao diminuir o número de leucócitos residuais para valores inferiores a 1×10^6 /unidade de CP ou CE, número este que se pensa ser o limiar imunogénico, levou à prevenção do desenvolvimento de RI primárias, em indivíduos não previamente sensibilizados.(15)

4.3.2.2 Anticorpos anti-HPA

Os HPA (*Human Platelet Antigens*) são Ag expressos por porções polimórficas das Gp da membrana plaquetária, capazes de produzir uma RI em indivíduos susceptíveis que foram expostos por gravidez, transfusão sanguínea e por transplante.(15) Os AcAp resultantes da alo-imunização levam à destruição plaquetária e conseqüentemente a uma trombocitopenia. Esta trombocitopenia pode resultar em doenças hemorrágicas graves como Púrpura Trombocitopénica Aloimune Neonatal e na Refratariedade Plaquetária. Aproximadamente 10% dos pacientes politransfundidos desenvolvem AcAp, contudo desconhece-se qual a sua verdadeira contribuição na génese da RTP, sobretudo quando coexistem em doentes com aloimunização anti-HLA. Suspeita-se sempre de aloimunização HPA (clínicamente semelhante à aloimunização HLA), se as contagens plaquetárias são inadequadas uma hora após a TP, não são identificados Ac anti-HLA e o doente apresente um *crossmatch* incompatível com as plaquetas da maioria dos dadores.(15)

4.3.2.3 Anticorpos anti-ABO

As plaquetas transfundidas podem expressar Ag A e/ou B correspondentes ao grupo sanguíneo ABO e, uma vez em circulação, estão suspensas em plasma do dador, o qual tem naturalmente Ac contra o Ag A e/ou B, se ausentes no dador.(22) Existem dois tipos de incompatibilidade ABO nas TP: a incompatibilidade ABO *major* e a incompatibilidade ABO *minor*.

A **incompatibilidade ABO major** ocorre quando as plaquetas do dador têm Ag incompatíveis com os Ac presentes no recetor (transfundir CP do grupo A a receptores do grupo O). Contrariamente ao que se pensava, a expressão dos Ag ABH nas plaquetas pode afetar a sobrevivência das plaquetas transfundidas - ABH incompatíveis.(23) Desta forma após diversas transfusões ABO incompatíveis ocorre um aumento dos títulos anti-A e/ou anti-B no recetor e uma diminuição da sobrevivência das plaquetas incompatíveis. Brian Curtis *et al*, verificaram que existem alguns dadores que têm uma expressão anormalmente elevada de Ag A e B nas plaquetas. (23) No Japão, aproximadamente 7% da população expressa níveis significativamente elevados de Ag A ou B nas superfícies das plaquetas. Deste modo, os indivíduos podem ser classificados de "*low expressers*" (LE) ou "*high expressers*" (HE), de acordo com a quantidade de Ag A e B detetados nas suas plaquetas, fato que parece ser determinado geneticamente.(22) Os indivíduos de tipo HE apresentam níveis de glicosiltransferases A e B no soro significativamente mais elevados do que os indivíduos do grupo A1 e B com expressão normal e conseqüentemente baixos níveis do Ag H nos eritrócitos. (23)

A **incompatibilidade ABO *minor*** surge quando se transfundem CP que possuem Ac incompatíveis com os Ag ABO do recetor.(24) Os Ac adquiridos passivamente ligam-se às plaquetas e eritrócitos do receptor, o que podem originar uma hemólise clinicamente significativa - complicação rara e potencialmente severa (particularmente associado a dadores do grupo O). Estas reações são o resultado de títulos anormalmente elevados de Ac anti-A presentes no plasma de alguns dadores do grupo O que, quando administradas em receptores do grupo A e AB, podem causar uma hemólise significativa.(24)

Deste modo, sempre que possível a TP deve ser isogrupal para evitar ou atenuar estas reações transfusionais. No entanto, muitos bancos de sangue em todo o mundo transfundem plaquetas não isogrupais atendendo à limitada disponibilidade de dadores, bem como ao grande número de dadores do grupo O. (22)

5. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS TRANSFUSÕES DE PLAQUETAS

5.1 Recuperação da contagem plaquetária

O principal objetivo da TP é manter a contagem de plaquetas do doente acima de um limite definido, tanto tempo quanto possível no sentido de prevenir complicações hemorrágicas.

5.1.1 Incremento da contagem plaquetária

O ICP é determinado subtraindo a contagem de plaquetas pré-transfusional à contagem de plaquetas, 10 minutos, 1 hora e/ou 20-24 horas após a transfusão. No entanto, esse depende de vários fatores relacionados com a transfusão (nomeadamente da quantidade de plaquetas transfundidas) e com o recetor da transfusão (ex. superfície corporal, volume sanguíneo). Desta forma, para monitorizar a eficácia da TP têm sido utilizadas duas fórmulas, o incremento da contagem plaquetária corrigido (ICPC) e a percentagem de recuperação plaquetária, que têm em conta, respetivamente, a correção do aumento pós-transfusional do número de plaquetas, para a área de superfície corporal e para o volume sanguíneo do doente. (21, 25).

5.1.2 Incremento da contagem plaquetária corrigido

É calculado a partir da fórmula que se segue e é expresso como aumento pós transfusional da contagem de plaquetas $\times 10^9/L$. (21)

$$\text{ICPC} = \frac{\text{Incremento da contagem plaquetária (10}^9/l) \times \text{área de superfície corporal (m}^2)}{\text{Número de plaquetas transfundidas (x 10}^{11})}$$

5.1.3 Percentagem de recuperação plaquetária

É calculado a partir da fórmula que se segue e é expresso como percentagem de plaquetas recuperadas em circulação. (21)

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Incremento da contagem plaquetária (10}^9/L) \times 10^{-6} \times \text{volume sanguíneo (mL)}}{\text{Número de plaquetas transfundidas (x 10}^{11})}$$

A contagem de plaquetas, o ICPC e a percentagem de recuperação plaquetária pós-transfusionais são valores de referência para a determinação da eficácia da transfusão. No entanto, um maior número de plaquetas após a transfusão não indica necessariamente melhor função plaquetária ou uma hemostase primária restaurada. Deste modo a eficácia da transfusão correlaciona-se com maior precisão com a melhoria da função. (26)

5.2 Avaliação da função plaquetária

Na prática clínica, a eficácia das TP é baseada principalmente no aumento de plaquetas não sendo considerado o aspeto funcional das plaquetas transfundidas.(27) Alguns dos testes usados para avaliar a função das plaquetas são o seu estudo morfológico, o tempo de hemorragia (e outros testes funcionais semelhantes), as provas de agregação plaquetária, e outros processos que avaliam a função das plaquetas nomeadamente através de alterações bioquímicas e da composição da membrana, associadas à ativação plaquetária. (27)

5.3 Avaliação da forma plaquetária

A microscopia de campo escuro permite visualizar, as estruturas da superfície da plaqueta, e com a ajuda de um software possibilita a medição destas enquanto mudam de forma. A mudança de forma, pode ser quantificada e analisada através de uma base de dados de diâmetros que descrevem os diferentes estadios da ativação plaquetária.(28)

5.4 Avaliação do tempo de hemorragia

O PFA (*Platelet Function Assay*) tem sido utilizado para avaliar a função plaquetária, em substituição do “tempo de hemorragia” convencional. A metodologia do PFA consiste em medir o tempo necessário para a formação de um tampão plaquetário (tempo de oclusão) utilizando dois agonistas (colagénio/epinefrina e colagénio/ADP) e uma membrana sintética. No caso de TP, o PFA pode auxiliar na avaliação da atividade plaquetária dos doadores de plaquetas transfundidas garantindo assim, TP funcionais.(29)

5.5 Estudos de agregação plaquetária

Mede a agregação plaquetária em resposta a diferentes agonistas, como por exemplo, ADP, colagénio, epinefrina e trombina. No entanto, a agregometria correlaciona-se mal com outros testes de ativação e tem limitações na quantificação da ativação plaquetária *in vivo*.(4)

5.6 Doseamento de moléculas solúveis

O doseamento plasmático de proteínas plaquetárias específicas libertadas após ativação das plaquetas, como a β -tromboglobulina, o fator plaquetário 4 (PF4, *Platelet Factor 4*) e os metabolitos do tromboxano A2 (TxA2), também pode ser usado para avaliar, indiretamente, a ativação plaquetária (30)

5.7 Estudo das glicoproteínas da membrana plaquetária

A citometria de fluxo permite avaliar individualmente e de uma forma rápida e precisa as características físico-químicas de um grande número de partículas (incluindo células) e pode ser usada para caracterizar alterações das plaquetas, que podem ser resultado da sua ativação, da função hemostática ou do processo de maturação.(31) O estado de ativação das plaquetas, pode ser avaliado através da utilização de anticorpos monoclonais (AcMo) específicos para diversas Gp plaquetárias:

5.7.1 Complexo Gp IIb/IIIa (CD41/CD61)

Os AcMo anti-CD41 e anti-CD61, que reconhecem epítomos da Gp IIb/IIIa ligam-se à membrana das plaquetas em repouso e das plaquetas ativadas, sendo que a intensidade de expressão destas Gp aumenta com a ativação. Há também AcMo que reconhece a conformação da Gp IIb/IIIa ativada ou ligada à molécula de adesão (ex. PAC). (30)

5.7.2 Complexo Gp Ib/IX/V (CD42b/CD42a/CD42d)

Os AcMo anti-CD42b ligam-se à membrana das plaquetas em repouso e das plaquetas ativadas. Após a ativação plaquetária ocorre uma diminuição da expressão do complexo Gp Ib/IX/V na superfície das plaquetas (podem apresentar 60% a 80% de redução). O fenómeno pode ser reversível, não afeta a capacidade de adesão plaquetária em condições de fluxo e pode ser atribuído à translocação deste complexo para a membrana do SCA (internalização) e /ou à proteólise da GpV pela trombina. Desta forma, os AcMo anti-CD42 permitem o estudo de deficiências de glicoproteínas, reações metabólicas responsáveis por mudanças na superfície das plaquetas, adesão plaquetária e a identificação de plaquetas no sangue periférico e de megacariócitos.(30)

5.7.3 Selectina-P (CD62P)

Os AcMo anti-CD62P ligam-se às plaquetas ativadas e desgranuladas, mas não às plaquetas em repouso, uma vez que só após ativação a selectina-P passa a ser expressa na membrana externa das plaquetas.(31)

A quantificação da selectina-P é um indicador muito bom de ativação plaquetária: permite detetar plaquetas ativadas e desgranuladas; correlaciona-se bem com o tempo de armazenamento dos CP; a sua expressão na superfície das plaquetas leva a uma destruição rápida das mesmas e correlaciona-se inversamente com um aumento pós-transfusional de plaquetas.(30-32)

A reatividade destes AcMo pode ser expressa em percentagem de plaquetas positivas e/ou intensidade média de fluorescência (IMF), expressa em unidades arbitrárias de

fluorescência (u.a.f.). Por exemplo, a expressão das Gp do complexo Gp Ib/IX/V é geralmente avaliada pela IMF e não pela percentagem de células positivas porque a redução da expressão é normalmente insuficiente para levar à ausência completa de fluorescência.(30)

Embora a citometria tenha muitas potencialidades para o estudo das plaquetas, tem também algumas desvantagens. Em primeiro lugar, os citómetros são equipamentos caros para adquirir e manter; em segundo lugar, a preparação das amostras é difícil e, em terceiro lugar, para evitar a ativação das plaquetas *ex vivo*, as amostras de sangue têm de ser processadas rapidamente após a colheita.(21, 22) Alguns destes aspetos são comuns aos outros métodos de avaliação da ativação das plaquetas.

6. REFRATARIEDADE ÀS TRANSFUSÕES DE PLAQUETAS

6.1 Definição

A Refratariedade à Transfusão de Plaquetas (RTP) é definida empiricamente como baixo rendimento transfusional, após duas ou mais TP contendo um adequado número de plaquetas, ABO compatíveis, no decurso de duas semanas. Atinge sobretudo a população de doentes hemato-oncológicos politransfundidos, está associada a uma elevada taxa de mortalidade e obriga a uma abordagem transfusional especializada. (15). Trata-se de uma síndrome hemorrágica cutâneo-mucosa, devida à diminuição da sobrevivência plaquetária, do próprio e/ou das plaquetas alogénicas transfundidas, de causa frequentemente multifatorial. Em aproximadamente 66% dos casos a etiologia da RTP é não imunológica e em 33% dos casos é a aloimunização. (15)

6.2 Critérios de diagnóstico

Bishop et al. determinaram quais os valores que melhor correspondiam com um aumento pós-transfusional do número de plaquetas de pelo menos $20 \times 10^9/L$ e com a manutenção desse número até 20 horas após a transfusão. Deste modo, os valores de referência usados para identificar a refratariedade são um ICPC <7.5 plaquetas $\times 10^9/L$ após 1 hora, um ICPC <4.5 plaquetas $\times 10^9/L$ após 20 horas ou ainda, uma percentagem de recuperação plaquetária $<20\%$ após 1 hora.(21)

Capítulo 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu em avaliar se existia alguma relação do perfil demográfico e clínico dos doentes transfundidos com CP, das características dos “pools” de CP administrados e da ativação das plaquetas com o rendimento da transfusão plaquetária, avaliado pelo ICPC.

Os objetivos específicos foram avaliar se existia alguma relação entre:

- Variáveis demográficas (idade, sexo) e clínicas dos doentes (diagnóstico, febre, infeção e esplenomegalia) e ICPC.
- Características dos “pools” de CP transfundidos (grupo sanguíneo, tempo de armazenamento, ativação plaquetária basal e após adição de trombina) e ICPC.
- Ativação das plaquetas (basal e após adição de trombina) presentes no sangue venoso colhido uma hora após a transfusão de plaquetas, grau de ativação das plaquetas transfundidas e ICPC.

Capítulo 3. MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

Foram estudados 30 doentes com trombocitopenia submetidos a TP na Unidade de Hemato-Oncologia (UHO) e na Unidade de Doentes Neutropénicos (UDN) do Hospital de São João (HSJ), Porto, entre Abril de 2011 e Janeiro de 2012.

Foram incluídos todos os doentes com trombocitopenia da UHO e UDN sujeitos a TP durante esse período de tempo, nos dias em que havia disponibilidade para executar o estudo laboratorial. Foram excluídos os doentes que se recusaram a participar no estudo, assim como os doentes transfundidos com CUP ou com “pools” de CP provenientes do exterior.

2. Metodologia

2.1 Procedimentos

Antes do início deste trabalho, foram pedidas autorizações aos Diretores da UDN, da UHO e do Serviço de Imunohemoterapia (SIH). O estudo foi submetido à aprovação da Comissão de Ética do HSJ e solicitado consentimento informado aos doentes para participar no estudo.

2.1.1 Preparação do pool de plaquetas para transfusão

Foram transfundidos CP obtidos por centrifugação de plasma rico em plaquetas (PRP) sendo que a compatibilidade ABO foi respeitada sempre que possível. Antes do seu envio para transfusão foi retirado, por expressão da tubuladura, 1 ml a cada CP e composto um “pool” de CP.

2.1.2 Colheitas de sangue

As amostras de sangue foram colhidas, por punção venosa sem uso de garrote ou por cateter central, em tubos com dois tipos de anticoagulante: sal tripotássico de ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA-K3) e citrato de sódio.

Avaliação pré-transfusional: Antes da TP foi colhida uma amostra de sangue em tubo com EDTA-K3, destinada à contagem plaquetária.

Avaliação pós-transfusional: Uma hora após a conclusão da transfusão de plaquetas, foram colhidas duas amostras de sangue: uma amostra em tubo com EDTA-K3 e outra em tubo com citrato de sódio, destinadas à contagem plaquetária e ao estudo de ativação plaquetária, respetivamente.

2.1.3 Recolha de dados dos doentes

Foram recolhidos alguns dados dos doentes, considerados relevantes para a interpretação dos resultados do estudo, nomeadamente: o diagnóstico, a presença ou ausência de febre, infeção e esplenomegalia, a medicação em curso, se o doente já tinha feito transfusões de plaquetas anteriormente, se os CP transfundidos eram isogrupais para os Ag do sistema ABO e Rh (D) e, no caso de não serem isogrupais, se havia incompatibilidade entre dadores e recetores. Para a recolha desses dados foi solicitada a colaboração dos médicos da UHO e da UDN. O formulário de recolha de dados é apresentado em anexo (anexo1).

2.1.4 Estudos laboratoriais

O trabalho laboratorial foi realizado no SIH do HSJ, Porto.

2.1.4.1 Contagem de plaquetas

A quantificação das plaquetas (n° de plaquetas $\times 10^9/L$) foi feita nos pools de CP a transfundir e nas amostras de sangue do doente, colhidas antes da transfusão e uma hora após a mesma (cálculo do ICPC), no contador hematológico Sysmex XE 5000TM.

2.1.4.2 Imunofenotipagem plaquetária

O estudo imunofenotípico das plaquetas foi efetuado através de imunomarcção, seguida de aquisição em citómetro de fluxo FACSTM (Becton Dickinson) e análise dos resultados.

Para a imunomarcção foi usada uma técnica de imunofluorescência direta, usando os AcMo conjugados com diferentes fluorocromos, com especificidade para Ag considerados relevantes para a identificação das plaquetas (CD41a, CD42b, CD61) e para a avaliação da ativação plaquetária (CD41a, CD42b, CD62P) (anexo 2).

Procedeu-se à caracterização do estado basal de ativação plaquetária e da resposta das plaquetas a estímulos, no *pool* a transfundir, avaliados pela intensidade de expressão das Gp IIb (CD41), IIIa (CD61) e Ib (CD42b), assim como pela % de plaquetas CD62P positivas e pela expressão de CD62P, medida pela IMF, antes e após adição de trombina, respetivamente.

Procedeu-se também à caracterização do estado de ativação plaquetária e da resposta das plaquetas a estímulos na amostra de sangue colhida ao doente uma hora pós-transfusão, avaliada pela percentagem de plaquetas CD62P positivas e pela intensidade de expressão de CD62P, avaliada pela IMF, antes e após adição da trombina.

2.1.4.3. Pesquisa de anticorpos anti-plaqueta

Foram congeladas amostras de plasma de todos dos doentes para pesquisa de AcAp, pelo método *Solide Phase Red Cell Adherence* (Capture P Solide Phase System da Immucor), no caso de suspeita de refratariedade à TP por aloimunização.

3. Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizado o *Software* SPSS Statistics 18.0. Foi assumido o nível de significância de 0.05.

3.1 Variáveis quantitativas contínuas

No caso das variáveis quantitativas contínuas (idade, ICP, ICPC, etc.) foram calculados a mediana, o mínimo, o máximo; para avaliar as diferenças entre grupos foram usados o teste U de Mann Whitney (amostras não emparelhadas) e o teste de Wilcoxon (amostras emparelhadas) e para avaliar a correlação entre as variáveis foi feito o estudo de regressão linear usando o teste de correlação de Spearman.

3.2 Variáveis qualitativas

No caso das variáveis qualitativas (sexo, presença ou ausência de febre, infeções, esplenomegalia, etc.) foram calculadas as frequências absolutas e relativas; para avaliar as diferenças entre grupos foi usado o teste de Qui-quadrado.

Capítulo 4. RESULTADOS

1. Características da população estudada

Neste estudo participaram 30 doentes, 19 do sexo feminino (63.3%) e 11 do sexo masculino (36.7%), com idades compreendidas entre 20 e 76 anos (mediana de 55.5 anos) (Tabela 1), sendo que 66.7% tinham leucemias agudas (Tabela 2).

Tabela 1. Características demográficas dos doentes incluídos neste estudo.

| Características demográficas | | Grupo | N (%) |
|------------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------|
| Sexo | Relação M/F: 0.58 | Feminino | 19 (63.3) |
| | | Masculino | 11 (36.7) |
| Idade (anos) | 55.5 (20 – 76) | Inferior a 60 anos | 16 (53.3) |
| | | Igual ou superior a 60 anos | 14 (46.7) |

Abreviaturas: N (%), frequência absoluta (frequência relativa); M, masculino; F, feminino.

Tabela 2. Diagnóstico dos doentes incluídos neste estudo.

| Grupo de diagnóstico | Diagnóstico | N (%) | |
|--|-------------------------------------|-----------|-----------|
| Leucemias agudas | Leucemia Linfoblástica Aguda | 4 (13.3) | 20 (66.7) |
| | Leucemia Mieloblástica Aguda | 16 (53.3) | |
| Linfomas e doenças linfoproliferativas | Linfoma de Burkitt | 1 (3.3) | 5 (16.7) |
| | Linfoma B difuso de grandes células | 1 (3.3) | |
| | Linfoma não Hodgkin | 2 (6.7) | |
| | Leucemia Linfocítica Crónica | 1 (3.3) | |
| Outras doenças hemato-oncológicas | Aplasia medular | 3 (10.0) | 5 (16.7) |
| | Síndromes Mielodisplásicas | 1 (3.3) | |
| | Mieloma múltiplo | 1 (3.3) | |

Abreviaturas: N (%), frequência absoluta (frequência relativa)

As amostras foram colhidas por cateter em todos os casos.

A mediana da contagem plaquetária no sangue periférico antes da transfusão era de $10 \times 10^9/L$, variando entre 10 e $27 \times 10^9/L$.

Todos os doentes faziam medicação e todos tinham sido previamente transfundidos.

No que respeita às restantes variáveis analisadas como febre, infeção e esplenomegalia, a população estudada era bastante heterogénea (Tabela 3).

A maioria dos doentes (73.3%) tinha infeção documentada, mas apenas 30.0% apresentava febre na altura da TP; em 2 destes casos, a hipertermia foi revertida com anti-piréticos antes de iniciar a transfusão, pelo que só 23.3% dos doentes foram transfundidos com hipertermia. Dez por cento dos doentes apresentava esplenomegalia e 1 doente tinha sido previamente esplenectomizado. Apenas um doente tinha evidência de hemorragia ativa.

Tabela 3. Descrição dos aspetos clínicos dos doentes incluídos neste estudo.

| Aspetos clínicos | N (%) |
|-------------------------|--------------|
| Febre | 9 (30.0) |
| Infeção | 22 (73.3) |
| Esplenomegalia | 3 (10.0) |
| Esplenectomia | 1 (3.3) |
| Medicação | 30 (100.0) |
| Transfusões Anteriores | 30 (100.0) |
| Hemorragia ativa | 1 (3.3) |

Abreviaturas: N (%), frequência absoluta (frequência relativa)

2. Características das plaquetas transfundidas

2.1 Compatibilidade ABO e Rh

Em 40% dos doentes a TP foi isogrupal para os Ag do sistema ABO e Rh (D); os restantes 60% foram transfundidos com CP não isogrupais para estes Ag. No entanto, só havia incompatibilidade ABO e/ou Rh (D) entre dador e recetor em 30% dos casos (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização das transfusões plaquetárias quanto à identidade e compatibilidade dos grupos sanguíneos ABO e Rh (D) de dadores e recetores.

| Discrepância ou incompatibilidade de grupo sanguíneo entre dador e recetor | | N | % Total de casos | % Casos com transfusão não isogrupal |
|--|-------------------------------|----|------------------|--------------------------------------|
| Plaquetas não isogrupais | Para o sistemas ABO e/ou Rh | 18 | 60.0 | 100.0 |
| | Apenas para o sistema ABO | 7 | 23.3 | 38.9 |
| | Apenas para o sistema Rh (D) | 4 | 13.3 | 22.2 |
| | Para os sistemas ABO e Rh (D) | 7 | 23.3 | 38.9 |
| Plaquetas incompatíveis | Para o sistemas ABO e/ou Rh | 9 | 30.0 | 50.0 |
| | Apenas para o sistema ABO | 7 | 23.3 | 38.9 |
| | Apenas para o sistema Rh (D) | 2 | 6.7 | 11.1 |
| | Para os sistemas ABO e Rh (D) | 0 | 0.0 | 0.0 |

2.2 Quantidade de plaquetas

A mediana do número de plaquetas transfundidas por doente (quantidade de plaquetas presentes nos “pools” de CP) foi de 3.1×10^{11} , variando entre 1.3 e 5.0×10^{11} . O estudo por citometria de fluxo confirmou que praticamente todas células presentes nos “pools” de CP eram plaquetas, de acordo com a positividade para CD41a (mediana 98.3%) e CD42b (mediana 97.4%) (Tabela 5).

Tabela 5. Caracterização dos “pools” de concentrados de plaquetas quanto à quantidade de plaquetas, à percentagem de células CD41a+ e CD42b+ e à intensidade de expressão destas moléculas nas plaquetas.

| Parâmetro avaliado | Mediana | Mínimo | Máximo |
|---|---------|--------|--------|
| Número de CP / “pool” * | 6 | 5 | 8 |
| Plaquetas x 10 ¹¹ / “pool” * | 3.1 | 1.3 | 5.0 |
| % Células CD41a+ | 98.3 | 74.2 | 99.8 |
| Intensidade de expressão de CD41a (IMF) | 630.3 | 227.6 | 1684.0 |
| % Células CD42b+ | 97.4 | 89.6 | 99.5 |
| Intensidade de expressão de CD42b (IMF) | 326.1 | 198.7 | 1303.0 |

Abreviaturas: CP, concentrado de plaquetas; IMF, Intensidade média de fluorescência expressa em unidades arbitrárias de fluorescência.

* Contagem em contador hematológico.

2.3 Tempo de armazenamento

A mediana do tempo de armazenamento dos “pools” de plaquetas foi de 3.9 dias, variando entre 3 a 5 dias (Tabela 6).

Tabela 6. Caracterização dos “pools” de concentrados de plaquetas quanto ao tempo de armazenamento.

| Tempo de armazenamento | N (%) | Mediana (mínimo – máximo) |
|----------------------------|----------|---------------------------|
| Igual ou inferior a 2 dias | 0 (0.0%) | 3.9 (2.5 – 5.0) dias |
| Igual ou inferior a 4 dias | 17 (57%) | |
| Superior a 4 dias | 13 (43%) | |

Abreviaturas: N (%), frequência absoluta (frequência relativa)

2.4 Ativação plaquetária

Relativamente ao estado de ativação das plaquetas, verificamos que a mediana das percentagens de plaquetas CD62P+ presentes nos “pools” de CP transfundidos era de 74.8%; após adição de trombina (agonista forte) este valor aumentou para 97.3% (p<0.001) (Tabela 7),

da mesma forma que aumentou a intensidade de expressão de CD62P à superfície das plaquetas ($p < 0.001$) (Tabela 7).

Tabela 7. Caracterização dos “pools” de concentrados de plaquetas quanto à percentagem de plaquetas ativadas (CD62P+) e à intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas, antes e após adição de trombina.

| Condições | Plaquetas CD62P+ (%) * | P ** | Intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas (IMF) * | P ** |
|-------------------------------------|------------------------|--------|---|--------|
| Antes da adição de trombina (basal) | 74.8 (11.0 – 98.0) | <0.001 | 192.8 (21.4 – 468.1) | <0.001 |
| Após adição de trombina | 97.3 (88.0 – 100.0) | | 456.0 (241.1 – 759.5) | |
| Variação | 21.1 (0.9 – 82.8) | NA | 272.3 (15.6 – 478.7) | NA |

Abreviaturas: NA, não aplicável; IMF, Intensidade média de fluorescência expressa em unidades arbitrárias de fluorescência;

* Mediana (mínimo – máximo)

** Teste de Wilcoxon; nível de significância: $p < 0.05$.

2.5 Relação entre a ativação plaquetária e tempo de armazenamento

2.5.1. Ativação plaquetária basal e tempo de armazenamento

Não foi encontrada correlação entre ativação plaquetária e o tempo de armazenamento das plaquetas, nem no que respeita à percentagem de plaquetas CD62P+ (teste de Spearman; $p = 0.314$; $r = 0.190$), nem no que respeita à intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas (teste de Spearman; $p = 0.567$; $r = -0.109$). Também não foi encontrada correlação entre ativação plaquetária e tempo de armazenamento, quando analisada a intensidade de expressão de CD41a (teste de Spearman; $p = 0.751$; $r = -0.016$) e de CD42b (teste de Spearman; $p = 0.052$; $r = -0.358$). A mediana da percentagem de plaquetas ativadas (CD62P+) observada nos “pools” de CP com tempo de armazenamento superior a quatro dias (77.0%) ligeiramente superior à observada naqueles com tempo de armazenamento igual ou inferior (72.5%), mas a diferença não foi estatisticamente significativa, assim como não foram estatisticamente significativas as diferenças observadas na intensidade de expressão de CD62P, CD41a e CD42b (Tabela 8).

Tabela 8. Ativação basal das plaquetas em função do tempo de armazenamento.

| Variável analisada nas plaquetas transfundidas, sem adição de trombina | Tempo de armazenamento das plaquetas | | P ** |
|--|--------------------------------------|--------------------------|------------|
| | Igual ou inferior a 4 dias (N=17) | Superior a 4 dias (N=13) | |
| Plaquetas CD62P+ (%) * | 72.5 (49.4 – 98.5) | 77.0 (10.6 – 94.1) | 0.572 (NS) |
| Intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas (IMF) * | 198.4 (103.9 – 377.2) | 178.4 (21.4 – 468.1) | 0.414 (NS) |
| Expressão de CD41a nas plaquetas (IMF) * | 656.3 (277.6 – 1508.0) | 612.3 (445.3 – 1684.0) | 0.884 (NS) |
| Intensidade de expressão de CD42b nas plaquetas (IMF) * | 316.1 (198.7 – 700.5) | 344.7 (246.5 – 1303.0) | 0.149 (NS) |

Abreviaturas: NS, não significativo; IMF, Intensidade média de fluorescência expressa em unidades arbitrárias de fluorescência

* Mediana (mínimo – máximo)

** Teste U de Mann Whitney; nível de significância: $p < 0.05$.

2.5.2 Ativação plaquetária induzida pela trombina e tempo de armazenamento

Não foi encontrada correlação entre a ativação plaquetária induzida pela trombina e o tempo de armazenamento das plaquetas, no que respeita à percentagem de plaquetas CD62P+ após adição de trombina (teste de Spearman; $p=0.399$; $r=-0.16$). No entanto, a variação da percentagem de plaquetas CD62P+ antes e após adição de trombina correlacionava-se negativamente com o tempo de armazenamento, sugerindo que as plaquetas armazenadas durante mais tempo são menos reativas (teste de Spearman; $p=0.047$; $r=-0.365$).

Apesar disso, não foram observadas diferenças entre as plaquetas com tempo de armazenamento superior a quatro dias e aquelas com tempo de armazenamento igual ou inferior, no que respeita quer à percentagem de plaquetas CD62P quer à intensidade de expressão de CD62P após adição de trombina, assim como nas variações destes parâmetros em relação aos observados antes da adição deste agonista (Tabela 9).

Tabela 9. Ativação das plaquetas induzida pela trombina em função do tempo de armazenamento.

| Variável analisada nas plaquetas transfundidas, após adição de trombina | Tempo de armazenamento das plaquetas | | P ** |
|---|--------------------------------------|--------------------------|------------|
| | Igual ou inferior a 4 dias (N=17) | Superior a 4 dias (N=13) | |
| Plaquetas CD62P+ (%) * | 97.4 (96.4 – 99.8) | 97.1 (87.9 – 99.1) | 0.267 (NS) |
| Varição (em relação ao valor obtido sem adição de trombina) * | 23.9 (0.9 – 47.9) | 19.6 (4.4 – 82.8) | 0.439 (NS) |
| Intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas (IMF) * | 559.1 (286.4 – 759.5) | 417.0 (241.1 – 608.8) | 0.149 (NS) |
| Varição (em relação ao valor obtido sem adição de trombina) * | 317.8 (15.6 – 478.7) | 231.1 (54.2 – 358.5) | 0.107 (NS) |

Abreviaturas: NS, não significativo; IMF, Intensidade média de fluorescência expressa em unidades arbitrárias de fluorescência.

* Mediana (mínimo – máximo)

** Teste U de Mann Whitney; nível de significância: $p < 0.05$.

3. Resposta à transfusão de plaquetas

3.1 Incremento da contagem de plaquetas

A mediana das contagens de plaquetas 1 hora após transfusão foi de $39 \times 10^9/L$ e os valores das contagens pós-transfusionais de plaquetas diferiam significativamente dos pré-transfusionais (teste de Wilcoxon; $p < 0.001$).

As medianas do ICP e do ICPC determinados 1 hora após transfusão foram de 28.0×10^9 plaquetas/L e de 15.7×10^9 plaquetas/L, respetivamente, havendo uma grande variação de doente para doente (Tabela 10).

Tabela 10. Resposta à transfusão de plaquetas avaliada pelo incremento da contagem plaquetária e pelo incremento da contagem plaquetária corrigido.

| Parâmetro avaliado | Plaquetas x $10^9/L$ * | P ** |
|--|------------------------|--------|
| Contagem pré-transfusional de plaquetas | 10 (10 – 27) | <0.001 |
| Contagem de plaquetas uma hora após transfusão | 39 (18 – 65) | |
| ICP | 28.0 (3.0 – 53.0) | NA |
| ICPC | 15.7 (2.1 – 42.2) | NA |

Abreviaturas: NA, não aplicável; ICP, incremento da contagem de plaquetas; ICPC, incremento da contagem de plaquetas corrigido

* Mediana (mínimo – máximo).

** Teste de Wilcoxon; $p < 0.05$.

3.2 Refratariedade à transfusão de plaquetas

Vinte por cento dos doentes transfundidos cumpriam critérios de refratariedade à TP, definidos por um ICPC inferior a $7,5 \times 10^9$ plaquetas/L, determinado 1 hora após a transfusão (Figura 2).

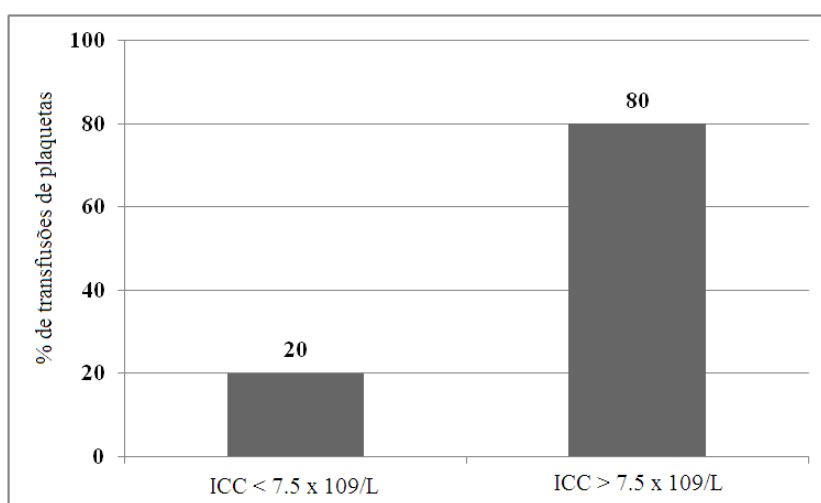


Figura 1. Percentagem de casos com (ICPC <7.5 x 10⁹ plaquetas/L) e sem (ICPC >7.5 x 10⁹ plaquetas/L) refratariedade à transfusão.

A mediana do ICPC nos doentes não refratários à TP foi de 16.8 x10⁹ plaquetas/L, em comparação com o valor de 6.8 observado nos doentes refratários (p<0.001) (Tabela 11).

Tabela 11. Incremento da contagem plaquetária corrigido em doentes refratários e não refratários à transfusão de plaquetas.

| Variável | Grupo | ICPC (plaquetas x 10 ⁹ /L) * | P ** |
|---|-------|---|--------|
| Refratariedade à transfusão de plaquetas*** | Sim | 6.8 (2.1 – 7.4) | <0.001 |
| | Não | 16.8 (8.4 – 42.2) | |

Abreviaturas: ICPC, Incremento da contagem plaquetária corrigido;

* Mediana (mínimo – máximo)

** Teste U de Mann Whitney; nível de significância: p<0.05.

*** Para definir o estado de refratariedade à TP foi considerado um ICPC <7.5 x 10⁹/L, determinado 1 hora após transfusão.

De notar que a pesquisa de AcAp foi negativa nos 6 casos em que houve refratariedade às TP e que todos os casos ocorreram em doentes com diagnóstico de LMA.

3.3 Ativação das plaquetas após transfusão

Foi avaliada a ativação plaquetária no sangue venoso dos doentes, 1 hora após transfusão de plaquetas. A mediana da percentagem de plaquetas ativadas (CD62P+) foi de 21.4%, aumentando para 88.2% após adição de trombina (p<0.001) (Tabela 12), da mesma forma que aumentou a intensidade de expressão de CD62P à superfície das plaquetas (p<0.001) (Tabela 12).

Tabela 12. Percentagem de plaquetas ativadas (CD62P+) e intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas, antes e após adição de trombina, no sangue venoso dos doentes colhido uma hora após transfusão.

| Condições | Plaquetas CD62P+ (%) * | P ** | Intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas (IMF) * | P ** |
|-------------------------------------|------------------------|--------|---|--------|
| Antes da adição de trombina (basal) | 21.4 (8.4 - 68.4) | <0.001 | 109.7 (61.3 - 269.4) | <0.001 |
| Após adição de trombina | 88.2 (56.3 - 97.3) | | 364.7 (123.8 - 607.8) | |
| Variação | 57.7 (12.7 - 84.7) | NA | 196.8 (63.6 - 452.2) | NA |

Abreviaturas: NA, não aplicável; IMF, intensidade média de fluorescência expressa em unidades arbitrárias de fluorescência.

* Mediana (mínimo – máximo)

** Teste de Wilcoxon; nível de significância: p<0.05.

A percentagem de plaquetas ativadas no sangue venoso colhido 1 hora após a transfusão era significativamente inferior à percentagem de plaquetas ativadas nos “pools” de plaquetas transfundidos, o mesmo acontecendo com a intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas (Tabela 13).

Tabela 13. Ativação basal das plaquetas no sangue venoso colhido uma hora após transfusão e a ativação basal das plaquetas transfundidas.

| Variáveis analisadas | Plaquetas transfundidas | Plaquetas no sangue venoso colhido 1 hora após transfusão | P ** |
|---|-------------------------|---|---------------|
| Plaquetas CD62P+ (%) * | 74.8 (10.6 – 98.5) | 21.4 (8.4 – 68.4) | <0.001 (S) |
| Intensidade de expressão de CD62P (IMF) * | 195.2 (21.4 – 468.1) | 109.7 (61.3 – 269.4) | 0.002 (S) |

Abreviaturas: NS, não significativo; S, significativo; IMF, intensidade média de fluorescência expressa em unidades arbitrárias de fluorescência

* Mediana (mínimo – máximo).

** Teste de Wilcoxon; nível de significância: p<0.05

A ativação basal das plaquetas do sangue venoso colhido 1 hora após transfusão correlacionava-se positivamente (teste de Spearman; r=0.57) com a ativação basal das plaquetas transfundidas, quando avaliada pela percentagem de plaquetas CD62P+, sendo essa correlação estatisticamente significativa (p=0.001); no entanto, não havia correlação estatisticamente significativa entre a intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas do sangue venoso dos doentes colhido 1 hora após a transfusão e esse mesmo parâmetro nas

plaquetas transfundidas (teste de Spearman; $p=0.295$; $r=-0.201$) (Tabela 14). Também foram encontradas correlações positivas estatisticamente significativas entre os parâmetros relacionados com a ativação plaquetária induzida pela trombina nas plaquetas transfundidas e esses mesmos parâmetros nas plaquetas do sangue venoso pós-transfusional (Tabela 14).

Tabela 14. Correlação entre a ativação das plaquetas transfundidas e a ativação das plaquetas do sangue venoso colhido 1 hora após a transfusão.

| Grupos comparados | Variáveis analisadas | | Análise de correlação linear simples * | |
|---|---|---|--|--------|
| | | | P ** | r |
| Plaquetas transfundidas <i>versus</i> Plaquetas do sangue venoso colhido 1h após transfusão | Plaquetas CD62P+ (%) | Ativação plaquetária basal | 0.001 (S) | +0.570 |
| | | Ativação plaquetária induzida pela trombina | 0.021 (S) | +0.419 |
| | | Variação | 0.029 (NS) | +0.398 |
| | Intensidade de expressão de CD62P (IMF) | Ativação plaquetária basal | 0.295 (NS) | -0.201 |
| | | Ativação plaquetária induzida pela trombina | 0.018 (S) | +0.436 |
| | | Variação | 0.084 (S) | +0.326 |

Abreviaturas: NS, não significativo; S, significativo; IMF, intensidade média de fluorescência expressa em unidades arbitrárias de fluorescência.

*Teste de correlação de Spearman; ** nível de significância: $p<0.05$.

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre doentes transfundidos com plaquetas com tempo de armazenamento igual ou inferior a quatro dias e aqueles que foram transfundidos com plaquetas com tempo de armazenamento superior, no que respeita à ativação basal das plaquetas do sangue venoso colhido uma hora após a transfusão, quer no que respeita à percentagem de plaquetas CD62P+, quer no que respeita à intensidade de expressão de CD62P (Tabela 15).

Tabela 15. Ativação basal das plaquetas no sangue venoso dos doentes colhido uma hora após a transfusão em função do tempo de armazenamento das plaquetas transfundidas.

| Variável analisada nas plaquetas do sangue venoso colhido uma hora após transfusão | Tempo de armazenamento das plaquetas | | P ** |
|--|--------------------------------------|--------------------------|------------|
| | Igual ou inferior a 4 dias (N=17) | Superior a 4 dias (N=13) | |
| Plaquetas CD62P+ (%) * | 16.6 (8.4 – 61.2) | 31.4 (11.9 – 68.4) | 0.174 (NS) |
| Expressão de CD62P nas plaquetas (IMF) * | 143.2 (64.2 – 251.3) | 95.5 (61.3 – 269.4) | 0.072 (NS) |

Abreviaturas: NS, não significativo; IMF, intensidade média de fluorescência expressa em unidades arbitrarias de fluorescência.

* Mediana (mínimo – máximo).

** Teste U de Mann Whitney; nível de significância: $p < 0.05$.

Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nesses mesmos parâmetros de ativação plaquetária, após adição de trombina (Tabela 16).

Tabela 16. Ativação induzida pela trombina das plaquetas no sangue venoso dos doentes colhido uma hora após a transfusão em função do tempo de armazenamento das plaquetas transfundidas.

| Variável analisada nas plaquetas do sangue venoso colhido uma hora após transfusão | Tempo de armazenamento das plaquetas | | p* |
|--|--------------------------------------|--------------------------|------------|
| | Igual ou inferior a 4 dias (N=17) | Superior a 4 dias (N=13) | |
| Plaquetas CD62P+ (%) * | 86.9 (60.9 – 95.6) | 90.0 (56.3 – 97.3) | 0.368 (NS) |
| Expressão de CD62P nas plaquetas (IMF) * | 347.4 (236.6 – 607.8) | 437.3 (124.8 – 520.5) | 0.861 (NS) |

Abreviaturas: NS, não significativo; IMF, intensidade média de fluorescência expressa em unidades arbitrarias de fluorescência.

* Mediana (mínimo – máximo).

** Teste U de Mann Whitney, nível de significância $p < 0.05$.

4. Fatores condicionantes da resposta à transfusão

4.1. Relação com as características demográficas e clínicas dos doentes

O ICPC foi ligeiramente superior nos doentes do sexo masculino, nos doentes sem febre, nos doentes sem infeção e nos doentes sem esplenomegalia; no entanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas. (Tabela 17)

Tabela 17. Incremento da contagem de plaquetas corrigido em função das variáveis demográficas e clínicas.

| Variável | Grupo | ICPC (Plaquetas x 10 ⁹ /L) * | P ** |
|----------------|------------------------------------|--|---------------|
| Sexo | Feminino (N=19) | 15.1 (2.1 – 42.2) | 0.236 (NS) |
| | Masculino (N=11) | 16.4 (6.6 – 31.1) | |
| Idade | Inferior a 60 anos (N=16) | 15.7 (6.6 – 31.1) | 0.934 (NS) |
| | Igual ou superior a 60 anos (N=14) | 15.7 (2.1 – 42.2) | |
| Febre | Sim (N=9) | 13.7 (6.6 – 23.9) | 0.402 (NS) |
| | Não (N=21) | 16.4 (2.1 – 42.2) | |
| Infeção | Sim (N=22) | 14.4 (2.1 – 42.2) | 0.159 (NS) |
| | Não (N=8) | 21.7 (7.4 – 24.5) | |
| Esplenomegalia | Sim (N=3) | 8.3 (4.3 – 15.7) | 0.137 (NS) |
| | Não (N=27) | 16.3(2.1 – 42.2) | |

Abreviaturas: NS, não significativo; ICPC, Incremento da contagem de plaquetas corrigido.

* Mediana (mínimo – máximo).

** Teste U de Mann Whitney, nível de significância p<0.05.

4.2. Relação com as características das plaquetas transfundidas

4.2.1 Grupos sanguíneos

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas no ICPC entre as transfusões com plaquetas isogrupais ou não isogrupais e, dentro destas últimas, também não

houve diferenças significativas no ICPC entre transfusões compatíveis e incompatíveis, quer no que respeita aos Ag do sistema ABO, quer no que respeita aos antígenos do sistema Rh (D). (Tabela 18)

Tabela 18. Incremento da contagem de plaquetas corrigido em função da semelhança e compatibilidade entre grupos sanguíneos ABO e Rh de dadores e recetores.

| Variáveis analisadas | | Grupos de comparação | ICPC (plaquetas x 10 ⁹ /L) * | P ** | |
|--|--|----------------------|---|-------------------|------------|
| Diferença de grupos sanguíneos entre dadores e recetores (Não isogrupal) | ABO e/ou Rh (D) | Sim (N=18) | 14.4 (2.1 – 42.2) | 0.271 (NS) | |
| | | Não (N=12) | 18.4 (6.8 – 39.6) | | |
| | Apenas ABO | Sim (N=16) | 16.0 (4.3 – 39.6) | 0.934 (NS) | |
| | | Não (N=14) | 15.4 (2.1 – 42.2) | | |
| | Apenas Rh (D) | Sim (N=19) | 16.4 (2.1 – 42.2) | 0.237 (NS) | |
| | | Não (N=11) | 15.1 (4.3 – 22.2) | | |
| | ABO e Rh (D) | Sim (N=7) | 15.7 (11.7 – 22.0) | 0.980 (NS) | |
| | | Não (N=23) | 15.7 (2.1 – 42.2) | | |
| | Incompatibilidade de grupos sanguíneos ABO e/ou Rh (D) entre dadores e recetores | ABO e/ou Rh (D) | Sim (N=9) | 15.7 (2.1 – 31.1) | 0.734 (NS) |
| | | | Não (N=21) | 15.7 (5.9 – 42.2) | |
| Apenas ABO | | Sim (N=7) | 15.7 (2.1 – 31.1) | 0.902 (NS) | |
| | | Não (N=23) | 15.7 (5.9 – 42.2) | | |
| Apenas Rh (D) | | Sim (N=2) | 10.5 (4.3 – 16.8) | 0.406 (NS) | |
| | | Não (N=28) | 15.9 (2.1 – 42.2) | | |
| ABO e Rh (D) | | Sim (N=0) | NA | NA | |
| | | Não (N=30) | 15.7 (2.1 – 42.2) | | |

Abreviaturas: NA, não aplicável; NS, não significativo; ICPC, Incremento da contagem de plaquetas corrigido.

* Mediana (mínimo – máximo).

** Teste U de Mann Whitney; nível de significância: p<0.05.

4.2.2 Tempo de armazenamento dos concentrados de plaquetas

Não foi encontrada correlação entre o tempo de armazenamento das plaquetas e o ICPC (teste de Spearman; $p=0.980$; $r=0.005$). A mediana dos ICPC observados nas TP com tempo de armazenamento superior a quatro dias (13.8 plaquetas $\times 10^9/L$) foi ligeiramente inferior à observada naquelas em que foram usadas plaquetas com tempo de armazenamento igual ou inferior (16.4 plaquetas $\times 10^9/L$), mas a diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 19).

Tabela 19. Incremento da contagem de plaquetas corrigido em função do tempo de armazenamento das plaquetas transfundidas.

| Variável analisada | Grupos de comparação | ICPC (plaquetas $\times 10^9/L$) * | P ** |
|--|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| Tempo de armazenamento das plaquetas transfundidas | Igual ou inferior a 4 dias (N=17) | 16.4 (4.3 – 42.2) | 0.544 (NS) |
| | Superior a 4 dias (N=13) | 13.8 (2.1 – 39.6) | |

Abreviaturas: NS, não significativo; ICPC, Incremento da contagem de plaquetas corrigido.

* Mediana (mínimo – máximo).

** Teste U de Mann Whitney; nível de significância: $p<0.05$.

4.2.3 Ativação plaquetária

Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre a ativação basal das plaquetas transfundidas e o ICPC, nem entre ativação das plaquetas transfundidas induzida pela trombina e o ICPC, quando avaliadas pela percentagem de plaquetas CD62P+, nem quando avaliadas pela intensidade de expressão de CD62P (Tabela 20). No entanto, a intensidade basal de expressão de CD41a e de CD42b nas plaquetas transfundidas correlacionava-se positivamente com o ICPC (teste de Spearman; $r=0.456$ e $r=0.430$, respetivamente), sendo essa correlação estatisticamente significativa em ambos os casos ($p=0.011$ e $p=0.018$, respetivamente) Tabela 20).

Tabela 20. Correlação entre a ativação das plaquetas transfundidas e o incremento da contagem de plaquetas corrigido.

| Variável analisada nas plaquetas transfundidas | | Variável de comparação | Análise de correlação linear simples* | |
|---|---|---|---------------------------------------|--------|
| | | | P* | r |
| Plaquetas CD62P+ (%) | Ativação plaquetária basal | ICPC (plaquetas x 10 ⁹ /L) | 0.926 (NS) | -0.018 |
| | Ativação plaquetária induzida pela trombina | | 0.234 (NS) | -0.224 |
| | Variação | | 0.752 (NS) | -0.06 |
| Intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas (IMF) | Ativação plaquetária basal | | 0.729 (NS) | -0.066 |
| | Ativação plaquetária induzida pela trombina | | 0.077 (NS) | -0.328 |
| | Variação | | 0.195 (NS) | -0.243 |
| Intensidade de expressão de CD41a nas plaquetas (IMF) | Ativação plaquetária basal | 0.011 (S) | +0.456 | |
| Expressão de CD42b nas plaquetas (IMF) | Ativação plaquetária basal | 0.018 (S) | +0.430 | |

Abreviaturas: NS, não significativo; S, significativo; IMF, intensidade média de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias de fluorescência; ICPC, incremento da contagem de plaquetas corrigido.

*Teste de correlação de Spearman; nível de significância: $p < 0.05$.

Em relação à ativação basal das plaquetas do sangue venoso dos doentes colhido 1 hora após a transfusão verificamos que também não havia correlação dos diversos parâmetros analisados com o ICPC (Tabela 21). O mesmo aconteceu com a ativação destas plaquetas induzida pela trombina, exceto no que respeita a uma correlação negativa ($r = -0.418$) entre a intensidade de expressão de CD62P e o ICPC ($p = 0.024$) (Tabela 21).

Tabela 21. Correlação entre a ativação das plaquetas do sangue venoso colhido uma hora após transfusão e o incremento da contagem de plaquetas corrigido.

| Variável analisada nas plaquetas do sangue venoso colhido 1 hora após a transfusão | | Variável de comparação | Análise de correlação linear simples | |
|--|---|---|--------------------------------------|--------|
| | | | P* | r |
| Plaquetas CD62P+ (%) | Ativação plaquetária basal | ICPC (plaquetas x 10 ⁹ /L) | 0.964 (NS) | -0.009 |
| | Ativação plaquetária induzida pela trombina | | 0.136 (NS) | -0.279 |
| | Variação | | 0.603 (NS) | -0.099 |
| Intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas (IMF) | Ativação plaquetária basal | | 0.432 (NS) | -0.152 |
| | Ativação plaquetária induzida pela trombina | | 0.024 (S) | -0.418 |
| | Variação | | 0.054 (S) | -0.362 |

Abreviaturas: NS, não significativo; S, significativo; IMF, intensidade média de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias de fluorescência; ICPC, incremento da contagem de plaquetas corrigido.

*Teste de correlação de Spearman; nível de significância: p<0.05.

5. Fatores condicionantes da refratariedade à transfusão

5.1. Relação com as características demográficas e clínicas dos doentes

A percentagem de doentes com refratariedade à transfusão foi ligeiramente superior nos doentes do sexo feminino, nos doentes com mais de 60 anos e naqueles com febre, infeção ou com esplenomegalia; no entanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas em nenhum dos casos em relação aos doentes que não tinham estas características (Tabela 22).

Tabela 22. Refratariedade à transfusão de plaquetas e características demográficas e clínicas.

| Variável analisada | Grupos de comparação | Não refratários N (%) | Refratários N (%) | P * |
|--------------------|------------------------------------|--------------------------|----------------------|---------------|
| Sexo | Feminino (N=19) | 15 (78.9) | 4 (21.1) | 0.850 (NS) |
| | Masculino (N=11) | 9 (81.8) | 2 (18.2) | |
| Idade | Inferior a 60 anos (N=16) | 13 (81.2) | 3 (18.2) | 0.850 (NS) |
| | Igual ou superior a 60 anos (N=14) | 11 (78.6) | 4 (21.4) | |
| Febre | Não (N=21) | 17 (81.0) | 4 (19.0) | 0.842 (NS) |
| | Sim (N=9) | 7 (77.8) | 2 (22.2) | |
| Infeção | Não (N=8) | 7 (87.5) | 1 (12.5) | 0.536 (NS) |
| | Sim (N=22) | 17 (77.3) | 5 (22.7) | |
| Esplenomegalia | Não (N=27) | 22 (81.5) | 5 (18.5) | 0.543 (NS) |
| | Sim (N=3) | 2 (66.7) | 1 (33.3) | |

Abreviaturas: N(%), frequência absoluta (frequência relativa); NS, não significativo.

* Teste Qui quadrado, nível de significância $p < 0.05$.

5.2. Relação com as características das plaquetas transfundidas

5.2.1 Grupos sanguíneos

A percentagem de doentes com refratariedade à transfusão foi ligeiramente superior nos doentes que fizeram transfusão não isogrupal e nos doentes que fizeram transfusão com

plaquetas incompatíveis para os grupos ABO e/ou Rh (D), em relação à observada nos doentes em que a transfusão respeitou a identidade e compatibilidade dos grupos sanguíneos entre dadores e recetores, mas as diferenças não atingiram significado estatístico (Tabela 23).

Tabela 23. Refratariedade à transfusão de plaquetas e identidade e compatibilidade de grupos sanguíneos entre dadores e recetores.

| Variável analisada | Grupos de comparação | Não refratários N (%) | Refratários N (%) | P * |
|---|----------------------|--------------------------|----------------------|---------------|
| Transfusão isogrupal para os grupos ABO e Rh (D) | Sim (N=12) | 10 (83.3) | 2 (16.7) | 0.709 (NS) |
| | Não (N=18) | 14 (77.8) | 4 (22.2) | |
| Transfusão incompatível para os antigénios dos grupos ABO e/ou Rh (D) | Não (N=21) | 17 (78.6) | 4 (21.4) | 0.842 (NS) |
| | Sim (N=9) | 7 (77.8) | 2 (22.2) | |

Abreviaturas: N (%), frequência absoluta (frequência relativa); NS, não significativo.

*Teste Qui quadrado, nível de significância $p < 0.05$.

5.2.2 Tempo de armazenamento dos concentrados de plaquetas

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o tempo de armazenamento das plaquetas administradas aos doentes refratários à transfusão de plaquetas (mediana 3.5 dias) e aquelas que foram administradas aos doentes não refratários (mediana 4.0 dias) (Tabela 24).

Tabela 24. Refratariedade à transfusão de plaquetas e tempo de armazenamento das plaquetas.

| Grupos de comparação | Tempo de armazenamento das plaquetas (dias) * | P ** |
|--------------------------------|---|-------|
| Doentes não refratários (N=24) | 4.0 (2.5 – 5.0) | 0.483 |
| Doentes refratários (N=6) | 3.5 (3.0 – 5.0) | (NS) |

Abreviaturas: NS, não significativo.

* Mediana (mínimo – máximo)

** Teste U de Mann Whitney; nível de significância: $p < 0.05$.

5.2.3 Ativação plaquetária

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre doentes refratários e não refratários à transfusão de plaquetas no que respeita à ativação basal das plaquetas transfundidas, assim como no que respeita à ativação destas plaquetas induzida pela trombina (Tabela 25).

Em relação à ativação basal das plaquetas do sangue venoso dos doentes colhido 1 hora após a transfusão verificamos que também não havia diferenças estatisticamente significativas entre doentes refratários e doentes não refratários à TP, o mesmo acontecendo com a ativação das plaquetas do sangue venoso colhido 1 hora após transfusão, induzida pela trombina (Tabela 26).

Tabela 25. Refratariedade à transfusão de plaquetas e ativação das plaquetas transfundidas.

| Variável analisada nas plaquetas transfundidas | | Não refractários (N=24) | Refractários (N=6) | P ** |
|---|---|----------------------------|--------------------------|---------------------|
| Plaquetas CD62P+ (%) * | Ativação plaquetária basal | 74.9 (10.6 – 95.6) | 72.4 (49.9 – 98.5) | 0.836 (NS) |
| | Ativação plaquetária induzida pela trombina | 96.8 (87.9 – 99.8) | 97.9 (96.6 – 99.4) | 0.147 (NS) |
| | Variação | 21.1 (4.1 – 82.8) | 25.0 (0.9 – 47.7) | 0.534 (NS) |
| Intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas (IMF) * | Ativação plaquetária basal | 184.1 (21.4 – 468.1) | 204.4 (163.6 – 291.0) | 0.378 (NS) |
| | Ativação plaquetária induzida pela trombina | 413.3 (241.1 – 759.5) | 589.4 (508.9 – 649.4) | 0.01 (S) |
| | Variação | 226.4 (15.6 – 478.8) | 358.5 (344.4 – 448.3) | 0.008 (S) |
| Intensidade de expressão de CD41a nas plaquetas (IMF) * | Ativação plaquetária basal | 656.1 (506.1 – 1684.9) | 437.5 (227.7 – 764.0) | 0.02 (S) |
| Intensidade de expressão de CD42b nas plaquetas (IMF) * | Ativação plaquetária basal | 342.8 (240.9 – 1303.0) | 271.3 (198.7 – 352.0) | 0.017 (S) |

Abreviaturas: NS, não significativo; S, significativo; IMF, intensidade média de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias de fluorescência.

* Mediana (mínimo – máximo).

** Teste U de Mann Whitney; nível de significância: p<0.05.

Tabela 26. Refratariedade à transfusão de plaquetas e ativação das plaquetas do sangue venoso colhido uma hora após a transfusão.

| Variável analisada nas plaquetas do sangue venoso colhido uma hora após a transfusão | | Não refratários (N=24) | Refratários (N=6) | P * |
|--|---|---------------------------|--------------------------|---------------------|
| Plaquetas CD62P+ (%) * | Ativação plaquetária basal | 23.4 (8.8 – 68.4) | 20.2 (8.4 – 48.0) | 0.568 (NS) |
| | Ativação plaquetária induzida pela trombina | 87.5 (56.3 – 97.3) | 91.7 (78.5 – 95.3) | 0.378 (NS) |
| | Variação | 54.8 (12.7 – 84.7) | 65.4 (42.6 – 84.2) | 0.276 (NS) |
| Intensidade de expressão de CD62P nas plaquetas (IMF) * | Ativação plaquetária basal | 106.5 (61.3 – 269.4) | 139.5 (105.5 – 251.3) | 0.216 (NS) |
| | Ativação plaquetária induzida pela trombina | 360.3 (124.8 – 598.4) | 470.7 (305.1 – 607.8) | 0.076 (S) |
| | Variação | 176.0 (63.6 – 452.2) | 341.8 (196.8 – 370.7) | 0.106 (NS) |

Abreviaturas: NS, não significativo; S, significativo; IMF, intensidade média de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias de fluorescência.

* Mediana (mínimo – máximo).

** Teste U de Mann Whitney; nível de significância: p<0.05.

Capítulo 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A necessidade de TP para o tratamento e a prevenção de trombocitopenias em doentes hemato-oncológicos tem vindo a aumentar. No entanto estas plaquetas sofrem lesões durante a colheita, preparação e armazenamento, que podem condicionar a sua função e a clínica das transfusões.

Segundo *Meltcalfe et al*, apesar de se verificar um aumento da expressão dos níveis da CD62P durante o armazenamento, o maior incremento de ativação ocorre durante o processamento, sendo maior na metodologia de PRP do que na de BC.(33) O armazenamento tem assim um impacto pequeno na expressão da selectina-P nos CP preparados pelo método de PRP, os quais apresentam ao 5.º dia cerca de 50%, enquanto os CP preparados pelos métodos de BC e de aférese têm respetivamente, 20% e 35%.(33) Também *Holme et al* evidenciou que os CP preparados pelo método PRP apresentavam uma expressão de CD62P no 1.º dia de 30 ± 13 aumentando no 5.º dia para 51 ± 17 ; e *Wang et al* verificou que não é estatisticamente significativo o pequeno aumento da expressão do CD62P com o tempo de armazenamento. (34, 35) No presente estudo, os “pools” de CP apresentavam uma ativação plaquetária basal mais elevada do que a referida na literatura, o que parece ter por base o método de processamento, pois não foi demonstrada nenhuma correlação entre a ativação plaquetária e o tempo de armazenamento ($r=0,190$). De salientar o facto de os “pools” serem compostos por CP com diferentes datas de colheita e conseqüentemente diferentes tempos de armazenamento.

Wang et al demonstrou ainda um aumento na proporção de plaquetas que expressam o CD62P após a exposição à trombina, sendo a capacidade de responder a esta progressivamente reduzida com um aumento do tempo de armazenamento.(35) Neste trabalho observa-se também um aumento na proporção de plaquetas ativadas após a adição de trombina e uma variação na percentagem de plaquetas CD62P positivas (após a adição de trombina), que se correlaciona negativamente com o tempo de armazenamento, sugerindo que, tal como no estudo referido anteriormente, quanto maior o tempo de armazenamento menor a capacidade de resposta à trombina.

A frequência de refratariedade à TP encontrada no presente estudo foi de 20%, próxima da que está descrita na literatura, a qual se encontra entre 30 a 70% dos casos. Exemplo disso é o estudo realizado por *Fabris et al* que avaliou 25 doentes, entre os quais 6 (24%) foram refratários.(36) Assim como o estudo realizado por *Ferreira et al*, que em 16 doentes estudados, encontrou uma refratariedade de 19%, sendo que a frequência de alo-imunização nestes doentes foi de 67%, enquanto a literatura apresenta valores de 25 a 43%.(10) Neste estudo, nenhum doente refratário apresentou alo-imunização pela presença de AcAp, não tendo sido avaliada a presença de ac anti-HLA.

Michelson et al, demonstrou que plaquetas desgranuladas rapidamente perdem a expressão de CD62P da sua membrana para o plasma, mas continuam em circulação, mantendo a sua função *in vivo*.(37) Por outro lado, *Holme et al* descreve que a maioria da perda de selectina-P é resultado da sua internalização e não da sua perda da superfície.(34)

No presente estudo, os dados obtidos parecem apoiar os trabalhos supracitados, uma vez que se verifica uma diminuição de plaquetas CD62P positivas no sangue venoso (sem trombina) quando comparada com as plaquetas transfundidas (apesar de apenas a percentagem de CD62P apresentar uma correlação positiva estatisticamente significativa). Também existe uma correlação positiva entre a capacidade de resposta à trombina das plaquetas transfundidas e a capacidade de resposta à trombina das plaquetas no sangue venoso, indicando a importância de transfundir componentes cujas plaquetas sejam mais reativas. Os dados deste estudo revelam ainda que o tempo de armazenamento das plaquetas transfundidas não está relacionado com as plaquetas CD62P positivas, com e sem a adição de trombina, no sangue venoso uma hora após a TP.

Os doentes hemato-oncológicos apresentam frequentemente fatores clínicos e tomam medicação que interfere com a resposta à TP. Estudos anteriores evidenciaram que alguns fatores, como ser do sexo masculino, ter esplenomegalia, hemorragia, febre ou infeção se associam a reduções significativas do ICPC, 1 hora após a TP.(9) Contrariamente ao esperado não foi verificada uma associação estatisticamente significativa entre o ICPC 1 hora após a TP e os fatores demográficos e clínicos acima referidos; contudo este foi ligeiramente superior nos doentes sem febre, sem infeção, sem esplenomegalia e, embora a literatura apresente dados discordantes, no sexo masculino. Por outro lado, estudos anteriores mostraram que plaquetas ABO compatíveis e plaquetas armazenadas por um período de tempo inferior a 48 horas estão associadas a um aumento do ICPC 1 hora após a TP.(9) No entanto, neste estudo, em que apenas foram usadas plaquetas armazenadas por mais de 48 horas, não foi verificada nenhuma relação entre a compatibilidade ABO e o ICPC uma hora após a TP.

Este estudo evidenciou correlações positivas entre o ICPC e a intensidade de expressão do CD41a, do CD42b e do CD62P (ativação plaquetária induzida pela trombina) das plaquetas transfundidas, no entanto não existem estudos que permitam perceber e comparar estes resultados. Paralelamente os doentes não refratários revelam intensidades de expressão do CD41a, do CD42b superiores aos doentes refratários, indicando a importância das glicoproteínas IIb/IIIa e Ib/IX/V.

Estudos evidenciaram que a expressão de selectina-P correlaciona-se de forma inversa com a percentagem de recuperação, porém nos resultados observados não foi encontrada nenhuma correlação entre a expressão de CD62P nas plaquetas transfundidas e o ICPC 1 hora após a TP.

Estes trabalho apresenta algumas limitações nomeadamente: os pool serem compostos por CP com diferentes tempos de armazenamento, a amostra ser pequena, os CP terem tempos de armazenamentos superiores a 48 horas, as plaquetas transfundidas serem tanto isogrupais como não isogrupais e o fato de ter sido utilizado um agonista forte (trombina) para avaliar a resposta das plaquetas a estímulos.

Seria importante realizar outros estudos no sentido de:

- Avaliar a contagem e a ativação das plaquetas 10 minutos, 1 hora e 20-24 horas após a transfusão, para verificar, por um lado, se a expressão do CD62P na superfície das plaquetas, leva uma redução da sua semi-vida e por outro lado avaliar a resposta destas plaquetas ao longo do tempo na circulação.
- Usar agonistas fracos como o ADP ou a epinefrina para melhor avaliar a capacidade de resposta das plaquetas a estímulos.
- Estabelecer uma relação entre a resposta das plaquetas a diferentes estímulos e a resposta clínica do doente.

Em conclusão:

As TP desempenham um papel importante na prevenção e tratamento da hemorragia em doentes hemato-oncológicos. Os avanços que gradualmente se têm vindo a implementar ao nível do fracionamento e armazenamento das plaquetas contribuíram para uma maior disponibilidade deste componentes, sendo imprescindível realizar estudos para avaliar a qualidade destes componentes e analisar se proporcionam a resposta desejada. Neste estudo, realizado em doentes hemato-oncológicos, verificamos que 20% dos doentes eram refratários às TP e não encontramos associações estatisticamente significativas entre o ICPC uma hora após transfusão e os fatores demográficos e clínicos analisados. Observamos que as plaquetas transfundidas apresentavam uma ativação mais elevada do que seria de esperar, provavelmente resultante do método de processamento, e que a capacidade de resposta à trombina diminuía com o tempo de armazenamento. Deste modo, a melhoria contínua da qualidade dos componentes plaquetários através do aperfeiçoamento dos métodos de produção e armazenamento, assim como uma avaliação mais rigorosa da eficácia da transfusão são um desafio que se coloca a todos os especialistas desta área.

Referências Bibliográficas

1. Ciesla. Hematology in Practice. 2010 ed. Philadelphia 2007.
2. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. Blood Reviews 2009 Jul;23(4):177-89.
3. Jandrot-Perrus. Des fonctions plaquettaires aux implications thérapeutiques. La Revue de médecine interne 2010;31S:S319–S23.
4. Kamath S, Blann AD, Lip GY. Platelet activation: assessment and quantification. European Heart Journal 2001 Sep;22(17):1561-71.
5. Nigel Key MM. Practical Hemostasis and Thrombosis. 2010(2.^a).
6. Angiolillo DJ, Ueno M, Goto S. Basic principles of platelet biology and clinical implications. Circulation Journal Mar 25;74(4):597-607.
7. Brass L. Understanding and evaluating platelet function. Hematology American Society Hematology Education Program 2010:387-96.
8. Daly ME. Determinants of platelet count in humans. Haematologica Jan;96(1):10-3.
9. Slichter SJ, Davis K, Enright H, Braine H, Gernsheimer T, Kao KJ, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. Blood 2005 May 15;105(10):4106-14.
10. Ferreira AA, Zulli R, Soares S, Castro V, Moraes-Souza H. Identification of platelet refractoriness in oncohematologic patients. Clinics 66(1):35-40.
11. Mohanty D. Current concepts in platelet transfusion. Asian Journal of Transfusion Science 2009 Jan;3(1):18-21.
12. Blajchman MA, Slichter SJ, Heddle NM, Murphy MF. New strategies for the optimal use of platelet transfusions. Hematology American Society Hematology Education Program 2008:198-204.
13. Stroncek DF, Rebullá P. Platelet transfusions. Lancet 2007 Aug 4;370(9585):427-38.
14. Pietersz RN. Pooled platelet concentrates: an alternative to single donor apheresis platelets? Transfusion and Apheresis Science 2009 Oct;41(2):115-9.
15. Guerreiro T. Refratariedade Plaquetária. ABO 2007 Abril/Junho 30:7-30.
16. Sharma RR, Marwaha N. Leukoreduced blood components: Advantages and strategies for its implementation in developing countries. Asian Journal of Transfusion Science Jan;4(1):3-8.

17. Schubert P, Devine DV. Towards targeting platelet storage lesion-related signaling pathways. *Blood Transfusion* 2010 Jun;8 Suppl 3:s69-72.
18. Delobel J, Rubin O, Prudent M, Crettaz D, Tissot JD, Lion N. Biomarker analysis of stored blood products: emphasis on pre-analytical issues. *International Journal of Molecular Science*;11(11):4601-17.
19. Neiva T. Evaluation of platelet aggregation in platelet concentrates: storage implications. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia* 2003;25:207-12.
20. Cauwenberghs S, van Pampus E, Curvers J, Akkerman JW, Heemskerk JW. Hemostatic and signaling functions of transfused platelets. *Transfusion Medicine Review* 2007 Oct;21(4):287-94.
21. Novotny VM. Prevention and management of platelet transfusion refractoriness. *Vox Sanguinis* 1999;76(1):1-13.
22. Sant'Anna Gomes BM, Estalote AC, Palatnik M, Pimenta G, Pereira Bde B, Do Nascimento EM. Prevalence, serologic and genetic studies of high expressers of the blood group A antigen on platelets*. *Transfusion Medicine* Oct;20(5):303-14.
23. Curtis BR, Edwards JT, Hessner MJ, Klein JP, Aster RH. Blood group A and B antigens are strongly expressed on platelets of some individuals. *Blood* 2000 Aug 15;96(4):1574-81.
24. Josephson CD, Castillejo MI, Grima K, Hillyer CD. ABO-mismatched platelet transfusions: strategies to mitigate patient exposure to naturally occurring hemolytic antibodies. *Transfusion and Apheresis Science* Feb;42(1):83-8.
25. Davis KB, Slichter SJ, Corash L. Corrected count increment and percent platelet recovery as measures of posttransfusion platelet response: problems and a solution. *Transfusion* 1999 Jun;39(6):586-92.
26. Salama ME, Raman S, Drew MJ, Abdel-Raheem M, Mahmood MN. Platelet function testing to assess effectiveness of platelet transfusion therapy. *Transfusion and Apheresis Science* 2004 Apr;30(2):93-100.
27. Monteiro M. La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas. II. Aplicaciones clínicas. *Revista de Diagnóstico Biológico* 2002 jul-set;5.
28. Kraus MJ, Strasser EF, Eckstein R. A New Method for Measuring the Dynamic Shape Change of Platelets. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*;37(5):306-10.
29. Favaloro EJ, Lippi G, Franchini M. Contemporary platelet function testing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* May;48(5):579-98.

- 30.Landin E. Flow cytometric characterization of platelet activation in platelet concentrates. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia* 2003;25:39-46.
- 31.Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996 Jun 15;87(12):4925-36.
- 32.Ahmed AS, Leheta O, Younes S. In vitro assessment of platelet storage lesion in leucoreduced random donor platelet concentrates. *Blood Transfusion* Jan;8(1):28-35.
33. Metcalfe P, Reutelingsperger C. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: a comparative flow cytometric study of different production methods. *British Journal of Haematology* 1997;98:86-95.
- 34.Holme S. The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelets concentrates: relationship to loss of in vivo viability. *Transfusion* 1997;37:12-7.
- 35.Wang C, Herst R. Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates. *Transfusion Science*1999;20:129-39.
- 36.Fabris F, Sartori R. Clinical and laboratory factors that affect the post-transfusion platelet increment. *Transfusion Science* 2000;23:63-8.
- 37.Michelson AD. In vivo tracking of platelets: Circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Medical Sciences*1996;93:11877-82.

Anexos

Anexo 1: Formulário de recolha de dados

A recolha destes dados destina-se ao trabalho de mestrado:

| |
|---|
| EFICÁCIA DAS TRANSFUSÕES DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS E ACTIVAÇÃO PLAQUETÁRIA. |
|---|

DADOS DO DOENTE

Nome do doente _____

N.º Interno _____ N.º do doente _____

Idade _____ Sexo: Feminino Masculino

UNIDADE DE HEMATO-ONCOLOGIA

Diagnóstico _____

Colheita: Cateter Punção venosa Peso _____ Altura _____

1. O paciente tem febre? Sim Não
2. O paciente tem infecção? Sim Não
3. O paciente tem esplenomegalia? Sim Não
4. O paciente toma medicação? Sim Não Qual? _____

Data ___/___/___ Assinatura _____

SERVIÇO DE SANGUE

1. A transfusão de concentrados de plaquetas enviada é isogrupal?

Sim Não

2. O paciente já fez, anteriormente, transfusão de concentrados de plaquetas?

Sim Não

Data ___/___/___

Anexo 2: Imunomarcação das plaquetas

Anticorpos monoclonais

No presente estudo foram usados os anticorpos monoclonais indicados no Quadro 1.

Quadro 1. Características dos anticorpos monoclonais utilizados neste estudo.

| Especificidade | Clone | Fluorocromo (a) | Fabricante (b) |
|-----------------------|--------------|------------------------|-----------------------|
| CD41a | RVV-VL7F1 | FITC | BD |
| CD42b | HIP 1 | FITC | BD |
| CD61 | HIP 8 | PerCP | BD |
| CD62P | AK-4 | PE | BD |

(a) PE, Phycoerythrin; PerCP, *Peridinin Chlorophyll protein*; (b) BD, Becton Dickinson Bioscience.

Procedimentos técnicos

Para determinar a expressão do CD62P no “pool” de plaquetas e no doente 1 hora após a TP, procedeu-se à imunomarcação da seguinte forma:

- a) Diluição amostra a estudar (50 µl de amostra /450 µl de tampão).
- b) Identificação de 3 tubos: tubo1 – controlo negativo, tubo 2 – ativação basal, tubo 3 – reatividade plaquetária à trombina.
- c) Preparação das amostras segundo o esquema:
 - Tubo 1: 25 µl de amostra + 5 µl anti-CD61
 - Tubo 2: 25 µl de amostra + 5 µl anti-CD61+ 5 µl anti-CD62P
 - Tubo 3: 25 µl de amostra + 5 µl GPRP + 5 µl anti-CD61 + 5 µl anti-CD62P + 5 µl Trombina (BC Thrombin Reagent, Siemens)
- d) Incubação das amostras marcadas durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente (18-25°C).
- e) No final do período de incubação, adicionou-se 1 ml de solução tampão de fosfatos em meio salino (BD FACSSFlow™), ficando as amostras preparadas para a leitura no citómetro de fluxo.

Para caracterizar as amostras para o CD41a e o CD42a, procedeu-se à imunomarcação da seguinte forma:

- a) Diluição do pool de plaquetas (50 µl de amostra + 450 µl de tampão).
- b) Preparação das amostras segundo o esquema:

Tubo 1: 10 µl anti-CD61 + 10 µl anti-CD41a + 10 µl da amostra diluída

Tubo 2: 10 µl anti-CD61+ 10 µl CD42b + 10 µl da amostra diluída

- c) Agitação suave.
- d) Incubação durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente (18-25°C).
- e) No final do período de incubação, adicionou-se 1 ml de soro fisiológico, ficando as amostras preparadas para a leitura no citómetro de fluxo.

As amostras foram lidas no citómetro de fluxo FACSTM da Becton Dickinson com as características mencionadas no Quadro 2.

Quadro 2. Características do citómetro de fluxo usado neste estudo.

| Laser | Comprimento de onda de emissão do laser (nm) | Canal | Exemplos de fluorocromos | Comprimento de onda de emissão máxima dos fluorocromos (nm) |
|----------|--|-------|--------------------------|---|
| Azul | 488 | FS | - | - |
| | | SS | - | - |
| | | FL1 | FITC | 541 |
| | | FL2 | PE | 575 |
| | | FL3 | PerCP | 695 |
| Vermelho | 638 | FL4 | APC | 660 |

Para a leitura, foi usado o *Software* CellQuest versão 4.1. Em cada amostra foram adquiridos 10000 eventos.

A análise da expressão do CD41a e do CD42b consistiu fundamentalmente nas seguintes etapas:

- a) Seleção das plaquetas com base na expressão de CD61 e no SSC;
- b) Quantificação da % de células CD41a+ e de células CD42b+
- c) Avaliação da IMF de expressão de CD41a e CD42b nas células CD41a+ e de células CD42b+

Por outro lado, a análise da expressão do CD62P consistiu nas seguintes etapas:

- a) Seleção das plaquetas com base na expressão de CD61 e no SSC;
- b) Cálculo da % de plaquetas ativadas, considerando um valor de cut-off de 0,5% para o controlo negativo.
- c) Determinação das % de plaquetas CD62P+ na amostra sem trombina (tubo 2) e com trombina (tubo 3).
- d) Avaliação da IMF de expressão de CD62P nas plaquetas CD62P+.