



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO

↳ Instituto de Ciências da Saúde

Eficácia da inativação dos linfócitos nos *pools* de plaquetas após tratamento com Mirasol em comparação com a gama irradiação.

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 de Hematologia e ImunoHemoterapia

Por:

Pedro Miguel Oliveira Ramoa

Porto, Dezembro de 2012



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO

↳ Instituto de Ciências da Saúde

Eficácia da inativação dos linfócitos nos *pools* de plaquetas após tratamento com Mirasol em comparação com a gama irradiação.

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 de Hematologia

Por:

Pedro Miguel Oliveira Ramoa

Sob orientação de:

Dra. Salomé Maia (Orientadora)

Professor Doutor Elísio Costa (Co-orientador)

Porto, Dezembro de 2012

Resumo:

A transfusão de componentes de sangue é hoje uma terapêutica de suporte essencial para o tratamento e apoio em muitas situações clínicas e cirúrgicas. No entanto, a transferência de leucócitos na transfusão de sangue homólogo pode estar associada ao risco de vários efeitos adversos, tais como a doença do enxerto contra o hospedeiro associada à transfusão (TA-GVHD), a aloimunização e as reacções transfusionais febris não-hemolíticas (FNHTRs).

Para a prevenção da TA-GVHD o método da gama irradiação é recomendado pela *food and drug administration, american association of blood bank* e pelo conselho da europa, mas esta tecnologia não previne a aloimunização nem a FNHTRs. Neste contexto, tem-se desenvolvido novas tecnologias para o tratamento de redução de patogénios (PRT), tais como o uso de riboflavina (vitamina B₂) que quando exposto à luz ultravioleta modifica os ácidos nucleicos, inibindo a replicação de patogénios e dos leucócitos nos produtos de sangue.

Objectivo: Este estudo pretende comparar o efeito da gama irradiação e da inactivação pelo método PRT numa *pool* de leucócitos que represente a produção das *pools* de plaquetas no centro regional de sangue do porto.

Material e Método: Os linfócitos T foram isolados de quatro concentrados leucocitais obtidos do sistema automatizado Atreus® 3C (CaridianBCT, Bélgica), pelo método do ficoll-histopaque. Com os concentrados residuais constituiu-se uma hiper*pool* e subdividiu-se em três *pools*; uma *pool* irradiada com uma dose de 33Gy (Gammacell® 3000 Elite, MDS Nordion), outra *pool* para inactivar pelo método Mirasol® PRT *system* e outra *pool* para controlo (sem tratamento). De cada uma das *pools* foram retiradas amostras representativas e preparados três ensaios. Cada ensaio foi composto pelo controlo negativo, controlo positivo, amostra irradiada e inactivada. Cada ensaio foi submetido à estimulação com o *phorbol myristate acetate*, PMA (com excepção do controlo negativo) para posteriormente analisar a expressão do CD69 nos linfócitos T, por citometria de fluxo.

Resultados: A média de expressão do CD69 nos linfócitos T, CD3 positivos, nas amostras irradiadas foi de 6,72% e nas amostras inactivadas pelo método PRT foi de 0,29%. No controlo negativo, a média de expressão do CD69 foi de 1,12%, enquanto no controlo positivo foi de 96,54%.

Conclusão: Deste estudo podemos concluir que tanto as amostras gama irradiadas como as amostras inactivadas pelo método PRT diminuem muito significativamente a expressão do CD69.

Abstrat

The transfusion of blood components is now an essential supportive therapy for the treatment and support in many medical and surgical situations. However, the transfer of leukocytes in transfusion of homologous blood may be associated with several risk of adverse effects such as transfusion associated - graft versus host disease (TA-GVHD), alloimmunization and febrile non-hemolytic transfusion reactions (FNHTR).

For the prevention of TA-GVHD, gamma irradiation method is recommended by the food and drug administration, american association of blood bank and the council of europe, but this technology does not prevent alloimmunization nor FNHTR. In this context, new technologies has been developed to reduce pathogens treatment (PRT), such as the use of riboflavin (vitamin B2) that when exposed to ultraviolet light modifies the nucleic acids by inhibiting the replication of pathogens and leukocytes in blood products.

Aims: This study compares the gamma irradiation with the inactivation method PRT in the inactivation of leukocytes in a pool, prepared in regional blood center in porto (Portugal) from automated atreus 3C.

Materials and Methods: The T cells were obtained from concentrates leucosiduais Atreus® 3C automated system (CaridianBCT, Belgium) and isolated by ficoll-histopaque method. One hiperpool was created with the four leucosiduais concentrated and divided into three pools , the first got irradiated with 33Gy dose (Gammacell® 3000 Elite ®, MDS Nordion), the second with the method for inactivating Mirasol® PRT System and the third to control the process (no treatment). The samples were subjected to stimulation with phorbol myristate acetate, PMA (except the negative control), and measured the CD69 expression on T lymphocytes.

Results: The average of CD69 on T-lymphocytes (não sei como se escreve) and CD3-positive of the irradiated sample was 6,72% whereas the inactivated samples by the PRT method was 0,29%. In negative control the average CD69 was 1,12% while the positive control was 96,54%.

This study has shown that both the samples gamma irradiated and inactivated by PRT drastically decrease the CD69 expression.

Conclusion: This study has shown that both the samples gamma irradiated and inactivated by PRT drastically decrease the CD69 expression.

Agradecimentos

À Doutora. Salomé Maia, orientadora desta dissertação, agradeço todo empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, pela oportunidade de crescimento, aprendizagem, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

Ao Doutor Elísio Costa, co-orientador desta dissertação, por sua ajuda e interesse, na revolução dos contratempos que foram surgindo ao longo deste projecto.

Aos meus colegas de Serviço, pela colaboração, participação e dedicação demonstrado ao longo do projecto.

Aos meus familiares e amigos que sempre estiveram presentes, que me aconselharam, apoiaram e incentivaram na minha realização pessoal, profissional e académica.

Em especial à minha mãe, que desde sempre me vem apoiando, acarinhando ao longo da vida, tanto nos bons como nos maus momentos, e sempre com uma palavra amiga, de esperança e força.

À minha namorada, a paciência e compreensão nos momentos de maior ausência, assim como o amor demonstrado, que me permitiram superar os momentos menos bons.

**“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não
sou o que era antes “
(Marthin Luther King)**

Lista de Abreviaturas

AABB – American Association of Blood Bank

Ac – Anticorpos

Ag - Antigénios

CMV – Citomegalovírus

CRSP - Centro Regional do Sangue do Porto

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

FB – Fresh Blood

FDA – Food And Drugs Administration

FNHTR – Febrile Non-Hemolytic Transfusion Reactions (Reacções Transfusionais Não Hemolíticas Febris)

GVHD – Graft vs Host Diseases (Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro)

HLA - Antígeno Leucocitário Humano

HBV – Vírus da Hepatite B

HBC – Núcleo Hepatite B

HBS – Superfície Hepatite B

HCV – Vírus Hepatite C

HTLV – Human T Lymphotropic Virus

HIV – Vírus de Imunodeficiência Humana

IPS,IP – Instituto Português do Sangue, Instituto Público

ON – Over Night

PFC - Plasma Fresco Congelado

PYI – Platelet Yield Index

PRT – Pathogen Reduction Technology (Tecnologia de Redução Patogénios)

PSL – Produtos Sanguíneos Labeis

PMA – Phorbol Myristate Acetate

PCR – Polimerase Chain Reaction

PVC – Polivinilcloreto

RNA - ácido ribonucleico

ST – Sangue Total

SGQ – Sistema Gestão Qualidade

TA-GVHD – Transfusion Associated – Graft vs Host Diseases (Doença do Enxerto
Contra o Hospedeiro – Associado à Transfusão)

TRALI - Transfusão lesão pulmonar aguda relacionada

UV – Ultra Violeta

Índice

1.	Introdução.....	i
1.1	Qualidade e segurança transfusional.....	1
1.2	Hemovigilância.....	5
1.3	Risco transfusional.....	5
2	Efeitos adversos mediados pelos leucócitos.....	9
2.1	Doença do enxerto contra o hospedeiro associado à transfusão (TA-GVHD).....	9
2.2	Reacção transfusional febril não-hemolítica (FNHTR).....	10
3	Separação das unidades de sangue total.....	13
3.1	Atreus® 3C.....	15
4	Métodos de Inactivação dos Componentes Sanguíneos do CRSP.....	17
4.1	Gama Irradiação, GammaCell®.....	17
4.2	Inactivação PRT.....	19
5	Enquadramento Conceptual.....	21
6	Objectivos.....	23
6.1	Objectivos gerais.....	23
6.2	Objectivos específicos.....	23
7	Material e Método.....	25
7.1	Obtenção da Amostra.....	26
7.2	Isolamento dos Linfócitos.....	27
7.3	Preparação das pools de leucócitos.....	28
7.4	Tratamento das pools.....	29
7.5	Recolha das amostras nas pools tratadas e controlo.....	29
7.6	Activação dos linfócitos.....	30
7.7	Tratamento estatístico de dados.....	30
8	Resultados.....	31

9	Discussão e Conclusão.....	37
10	Referencias Bibliográficas	41
	Anexo A - Protocolo	44

Índice Tabelas

Tabela 1 - <i>Determinação do peso, volume, contagem de leucócitos, Linfócitos e Plaquetas em cada um dos concentrados leucos residuais</i>	31
Tabela 2 - <i>HiperPool avaliado o volume e feita contagem hematológica</i>	31
Tabela 3 - <i>Amostras diluídas, após tratamento (com excepção controlo), e ressuspensas em PFC recuperado.</i>	32

Índice Figuras

Figura 1 - <i>Atreus® 3C da Caridian BCT. Sistema Automático de Separação de Unidades de Sangue Total</i>	14
Figura 2 - <i>Display do Atreus® 3C no final de cada processamento, disponibilizando os volumes do sangue total e dos diferentes componentes, assim como o valor de PYI</i>	16
Figura 3 - <i>Mapa de irradiação, GammaCell® 3000 Elan, com doses de irradiação de 33Gy no centro do copo e um mínimo de 25Gy</i>	17
Figura 4 - <i>Indicadores de irradiação de 25Gy Radsure™. Antes da irradiação visualiza-se o “NOT”. Existe um campo para identificar o operador e a data de irradiação. Retirado de:</i>	18
Figura 5 - <i>Depois da irradiação dos componentes, o “NOT” desaparece e é indicativo que foi aplicada uma dose mínima de 25Gy. Retirado de: http://www.vingmed.se/isp-radsure-radsure-.aspx</i>	18
Figura 6 - <i>Kit preparação de plasma e plaquetas. Sacos de conexão e 35ml de riboflavina (50µmol/L)</i>	20
Figura 7 - <i>Concentrados leucos residuais, obtidos a partir do sistema automático Atreus 3C®</i>	27
Figura 8 - <i>Remoção do anel dos linfócitos</i>	28
Figura 9 - <i>Uma das três pools, obtidas a partir da divisão da Hiperpool</i>	28
Figura 10 – <i>Legenda das cores das populações e subpopulações dos linfócitos T que sejam CD69 positivo ou negativo e marcados com os seguintes fluorocromos: CD3-PC5, CD8-FITC e CD69-PE</i>	32
Figura 11 – <i>Amostra gama irradiada. Determinada a percentagem de linfócitos T, CD3 que ainda tem capacidade para expressar o CD69</i>	33
Figura 12 – <i>Amostra inactivada com riboflavina pelo método PRT. Determinada a percentagem de linfócitos T, CD3 que ainda tem capacidade para expressar o CD69</i>	33
Figura 13 – <i>Controlo negativo. Amostras não tratadas e não estimuladas com o PMA e determinada a percentagem de linfócitos T (CD3) que não respondem à activação primária (CD69)</i>	34
Figura 14 – <i>Controlo positivo. Amostras sem tratamento mas estimuladas com PMA e determinada a percentagem de linfócitos T (CD3) que respondem à activação primária (CD69)</i>	35
Figura 15 – <i>Gráfico com a média e o desvio padrão dos três ensaios, para cada uma das amostras tratadas e não tratadas</i>	35

1 Introdução

1.1 *Qualidade e segurança transfusional*

A transfusão de componentes de sangue é hoje uma terapêutica de suporte essencial para o tratamento e apoio em muitas situações clínicas e cirúrgicas, assistindo-se a um constante aumento da sua necessidade. A disponibilidade em componentes de sangue permitiu a aplicação de terapêuticas cada vez mais agressivas na área da oncologia, e como tal mais eficazes, assim como possibilitou o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas de complexidade crescente que contribuem para a resolução de múltiplas situações clínicas e traumatológicas¹.

Neste contexto, a qualidade e segurança na cadeia transfusional é essencial ao desenvolvimento da medicina moderna que exige componentes seguros, eficazes e disponíveis em tempo útil. O conceito de qualidade como um instrumento de gestão não é universal, mas ao longo dos últimos anos os serviços de sangue e medicina transfusional têm procurado acompanhar o aumento das necessidades de sangue e componentes, avaliar e controlar a metodologia de obtenção e produção de componentes sanguíneos padronizados, disponibilidade de *stocks* adequados em quantidade e diversidade, assim como a harmonização nos critérios de decisão terapêutica.

Para esta evolução na qualidade e segurança transfusional, o conselho da europa aprovou um conjunto de directivas, entre as quais, a directiva 2002/98/CE que estabelece as normas de qualidade e segurança aplicadas à colheita e à análise de sangue humano, assim como propõe a inspecção dos serviços de sangue e medicina transfusional. Esta directiva também veio tentar uniformizar a qualidade e segurança transfusional na Europa. Em Portugal esta directiva foi transposta para a ordem jurídica nacional e publicada em Julho de 2007 a decreto-lei nº 267/2007. Esta legislação é aplicada a dois tipos de serviços: os serviços de sangue que colhem, analisam, processam, armazenam e distribuem o sangue e os componentes, e os Serviços de medicina transfusional que aplicam os componentes de sangue e seus derivados. Para dar cumprimento a este decreto-lei foi criada a autoridade para os serviços de sangue e transplantação (ASST), com competências para fiscalizar o cumprimento da legislação por parte dos serviços de sangue e de medicina transfusional juntamente com o então instituto português do sangue (IPS), IP² (decreto-lei nº267/2007) e actual instituto

português do sangue e da transplantação, IP. Mais tarde, esta directiva deu origem a outras duas directivas, a directiva de 2004/23/CE que estabeleceu as normas de qualidade e segurança em relação à dádiva, colheita, análise, processamento preservação, armazenamento e distribuição de tecidos e células de origem humana e a directiva de 2004/33/CE que determina as exigências técnicas relativas ao sangue e aos componentes sanguíneos.

A garantia da qualidade e segurança do acto transfusional integra um conjunto complexo de procedimentos encadeados, que vão desde a planificação da actividade da colheita, correcta selecção do dador benévolo até à vigilância activa do doente transfundido.

Contudo, e apesar de todos os cuidados de qualidade e segurança introduzidos ao longo de toda a cadeia transfusional, a transfusão de sangue homólogo não é isenta de riscos, e apresenta efeitos adversos indesejáveis dos quais se destacam dois dos grandes grupos, a transmissão de agentes patogénicos conhecidos ou não, e a indução de respostas imunes, sendo uma das mais importantes induzidas pela transferência de leucócitos.³

Para minimizar os riscos e proporcionar reservas de sangue e derivados seguros, a primeira medida passa pela selecção de dadores saudáveis, voluntários e não remunerados que num gesto altruísta se predispõem a doar sangue^{4,5,6}. Nas últimas décadas, vários estudos demonstraram que os dadores de sangue remunerados e por isso não voluntários, influenciavam directamente a segurança e qualidade do sangue, pois apresentavam um maior risco para as transfusões de sangue^{5,6}. Outra questão discutível são os incentivos governamentais, tal como a isenção das taxas moderadoras, que pode ser entendido como uma forma de pagamento e por isso influenciar a qualidade e segurança do sangue. Assim, e sempre com a preocupação de se obterem dadores para disponibilizar componentes de sangue suficientes, a organização da promoção da dádiva voluntária e não remunerada a nível nacional sempre considera a inclusão de toda a informação e acções dirigidas para a divulgação da dádiva de sangue no sentido de mobilizar a população saudável de forma consciente e responsável.

Traçado o perfil do dador de sangue desejável, o processo da sua elegibilidade antes de cada dádiva e em conformidade com a directiva 2004/33/CE englobam o cumprimento dos critérios de selecção do dador. Estes critérios passam pelo preenchimento por parte

do dador, do consentimento esclarecido, individual e confidencial posteriormente analisado pelo médico, constituem outra melhoria na qualidade e segurança do sangue. A triagem clinico-epidemiológica rigorosa, que consiste numa entrevista médica, que integra o exame clínico e físico do dador, a sua história clínica, a identificação de factores de risco ou outros que possam comprometer a qualidade do sangue e a segurança do dador e/ou do receptor⁷ (directiva 2004/33/CE). Neste contexto, também foram criados critérios de suspensão e de eliminação que permite garantir a qualidade e segurança da dádiva, assim como salvaguardar o próprio dador. Mais recentemente foi implementado o voto de auto-exclusão, em que o dador pode excluir a sua dádiva da cadeia transfusional, no caso de omissão de alguma situação de risco aquando da dádiva que possam comprometer a segurança transfusional⁸ (directiva 2004/33/CE).

Outro avanço na qualidade e segurança transfusional, verificou-se na aplicação de procedimentos bem definidos relativos aos cuidados da desinfeção no local da punção, assim como, a melhoria na concepção dos sacos de colheita de sangue, que incluiu um pequeno saco satélite para a derivação dos primeiros mililitros de sangue reduzindo o risco de infecção por contaminação bacteriana devido a bactérias presentes na pele. O conteúdo deste pequeno saco satélite é utilizado como amostra, para efectuar os testes laboratoriais de pesquisa de agentes transmissíveis e fenotipagem imunohematológica.

É indiscutível que na evolução da segurança transfusional, a introdução dos testes de rastreio nas unidades de sangue e componentes reduziram drasticamente do risco de transmissão de agentes patogénicos. Nos últimos 30 anos, os testes serológicos têm evoluído e aumentado a sua sensibilidade e especificidade, reduzindo o período de janela para os diferentes tipos de vírus. Actualmente o método de ELISA é amplamente utilizado para o despiste do HBV (Ac anti-HBc, Ac anti-HBs, Ag HBs e Ag HBe), HCV, HIV, Sífilis e o HTLV (às primeiras dádivas). No entanto, também foram introduzidos os testes de “*polymerase chain reaction*” (PCR), testes de amplificação e detecção dos ácidos nucleicos que tem maior sensibilidade do que os testes serológicos e permitem o esclarecimento de reacções indeterminadas nos testes serológicos e/ou diminuir ainda mais o período de janela⁹. Os testes de fenotipagem imunohematológica também contribuíram para aumentar a segurança transfusional, com técnicas de fenotipagem dos sistemas ABO, Rh e outros fenótipos, pesquisa de anticorpos e testes

de compatibilidade, entre outros, de muito maior sensibilidade e especificidade e de interpretação objectiva⁹.

Nos últimos 20 anos, devido à introdução de sacos de colheita de sangue em polivinilcloreto (PVC) com sacos satélite acoplados em sistema fechado também se verificou o desenvolvimento na separação das unidades de sangue total em componentes sanguíneos e seus derivados. Por um lado, verificou-se um aumento generalizado no consumo de componentes de sangue e seus derivados nas múltiplas situações clínicas, traumatológicas e neoplásicas, por outro lado, a escassez de sangue e os constrangimentos com a sustentabilidade de sangue devido às restrições na elegibilidade do dador, passando pela dificuldade em sensibilizar e captar novos dadores fidelizando-os de forma a efectuarem as suas dadas regularmente, tem obrigado os bancos de sangue a adoptar novas medidas, métodos e tecnologias para aumentar a eficiência na separação e obtenção de produtos e derivados, de modo a satisfazer todas as necessidades transfusionais.

Visto que o sangue é um produto biológico com prazo de validade limitado e que pode causar efeitos adversos, o seu uso deve ser ponderado e avaliado. Não obstante aos progressos na medicina transfusional, o sangue ainda é um vector de risco, e por isso são propostas e revistas regularmente as normas e algoritmos de recomendações que ajudam os clínicos a avaliarem e a desenvolverem estratégias para o uso adequado e apropriado do sangue, de modo a racionalizar as reservas do sangue e dos componentes do sangue, não esquecendo as alternativas à transfusão.

A transfusão de sangue é uma terapêutica insubstituível, com recurso finito e com efeitos indesejáveis, onde o esforço e o investimento para a obtenção de componentes de sangue é cada vez maior e a quantidade de dadores disponíveis é cada vez menor. Há uma disparidade entre o investimento e o resultado, para o mesmo esforço obtém-se cada vez menos, não só porque as exigências colocadas nos critérios de selecção de dadores está sempre a aumentar, como a introdução de cada vez mais testes de despiste e sobre mais agentes e simultaneamente assiste-se a um constante aumento do consumo.

1.2 Hemovigilância

A hemovigilância contribui para a melhoria da qualidade e segurança transfusional, surge em resposta à directiva 2002/98/CE, e é um sistema de vigilância e alerta. A hemovigilância foi inicialmente implementada em França, em 1990¹⁰. Em Portugal, este sistema foi formalmente implementado em 2008 e tem como objectivo recolher e avaliar informações sobre os efeitos indesejáveis e/ou inesperados da utilização de componentes sanguíneos a fim de prevenir o seu aparecimento ou recorrência. Ainda permite avaliar, monitorizar e alertar os intervenientes na cadeia transfusional e gerar acções correctivas de eventuais não conformidades¹⁰.

A hemovigilância é um conjunto de procedimentos de vigilância que abrange toda a cadeia de transfusão (a partir da doação de sangue e seus componentes, até ao acompanhamento dos receptores de transfusões), destinado a recolher e avaliar informações sobre o uso terapêutico de produtos lábeis do sangue, efeitos adversos ou inesperados e divulgação de alertas em tempo útil para evitar a ocorrência ou recorrência de tais incidentes.

1.3 Risco transfusional

Entre as décadas de 70 e 90, foram descobertos alguns dos agentes transmissíveis pelo sangue e que actualmente fazem parte dos testes de rastreio às unidades de sangue, tais como a Sífilis, HIV, HBV e HCV. Ao mesmo tempo, foram desenvolvidas novas tecnologias para a detecção desses agentes e redefinido os critérios de elegibilidade dos dadores. Estas medidas também contribuíram para a redução do risco associado à transfusão de sangue, mas não erradicaram o risco de transmissão desses patogénicos, assim como não preveniram a transmissão de agentes emergentes e ou re-emergentes.

As alterações climáticas, a globalização e a mobilidade global, tem levantado alguns problemas para os países europeus, que se vêem confrontados com a possibilidade e surgimento de patogénios emergentes e re-emergentes, tais como a doença de chagas, provenientes de outros países ou continentes e que afectam directamente a sustentabilidade do sangue. Outro factor importante é o aparecimento de surtos pandémicos que levam os bancos de sangue a adoptar critérios de elegibilidade do dador mais restritivo, assim como a implementação de testes serológicos específicos se

disponíveis. Em relação aos agentes emergentes e aos re-emergentes os testes actuais não são adequados, esta preocupação foi agudizada pelo aparecimento de agentes em regiões geograficamente diferentes da distribuição habitualmente esperada².

Actualmente, a transmissão de agentes patogénicos não são as únicas preocupações na medicina transfusional. Nestas últimas décadas, as preocupações do risco transfusional tem-se voltado para a redução e eliminação dos leucócitos nos componentes sanguíneos. Esta preocupação resulta da descoberta de que os leucócitos, por um lado são vectores na transmissão de vários agentes patogénicos e por outro lado são responsáveis por vários efeitos adversos associados à transfusão de sangue.

Assim, a transferência de leucócitos nos componentes de sangue além de desencadear uma resposta imune do receptor como aloimunização e reacção transfusional febril não-hemolítica (FNHTRs) podem estes mesmos leucócitos presentes no componente com origem no dador causar uma reacção imune anti-recetor, habitualmente conhecida como doença do enxerto contra o hospedeiro associado à transfusão (TA-GVHD)^{12,13,14}.

Vemos então que a transferência de leucócitos nos componentes de sangue está associada a vários efeitos adversos, sendo eles próprios transportadores de agentes patogénicos (intracelulares) sendo ainda desencadeadores de libertação de citocinas^{7,9} responsáveis por FNHTRs. Mais recentemente, parece desempenhar também um papel na lesão pulmonar associada à transfusão (TRALI). Paralelamente a epidemia da nova variante da doença de *creutzfeldt jakob* causada pela transmissão de priões¹⁵ adquiridos através do consumo de carne e vísceras bovinas provenientes de animais afectados pela encefalopatia espongiiforme bovina, vulgarmente conhecida como *doença das vacas loucas*, veio precipitar a decisão de serem tomadas medidas para reduzir o número de leucócitos nos componentes de sangue a níveis residuais. Foi demonstrado que os leucócitos são locais preferenciais de alojamento dos priões, tendo sido Portugal, através do então instituto português do sangue, IP, o primeiro país a introduzir como medida cautelar a leucoredução universal pré armazenamento logo seguido pelos restantes países da Europa^{1,7,13}.

Após a introdução destas medidas verificou-se uma redução, mas não a erradicação das reacções imputáveis aos leucócitos sobretudo nas FNHTRs e embora se tenha demonstrado que a TA-GVHD é dependente do número de linfócitos viáveis no

componente transfundido, este efeito adverso não evidenciou qualquer alteração após a introdução desta medida. No que diz respeito à prevenção da TA-GVHD, a leucoredução não é portanto suficiente e por isso, a *food and drug administration* (FDA), *american association of blood bank* (AABB) ¹⁰ assim como o conselho da europa recomendam a aplicação da gama irradiação a cada componente a transfundir especialmente a determinados grupos de doentes e de patologias¹⁶.

2 Efeitos adversos mediados pelos leucócitos

2.1 *Doença do enxerto contra o hospedeiro associado à transfusão (TA-GVHD)*

A TA-GVHD foi observada pela primeira vez por *Murphy* em 1916, em embriões de galinha¹⁷, mas só em 1965 é que foi publicado o primeiro caso de TA-GVHD em humanos e associado a doentes politransfundidos que apresentavam hepatomegalia e anemia aplásica fatal¹⁸. Nestes doentes foram observadas células imunocompetentes do dador, com diferenças antigénicas entre as células do dador e do receptor, em que as células do hospedeiro não tinham capacidade de rejeitar as células do dador. Mais tarde, também se verificaram casos de doentes com células imunocompetentes e que desenvolveram a TA-GVHD, estes doentes apresentavam grande similaridade nos antígenos HLA, “*human leucocyte antigens*”, entre as células do dador e receptor, e o receptor não tinha capacidade de reconhecer e rejeitar as células como estranhas^{16,17,18}.

A TA-GHVD é uma complicação rara mas fatal em mais de 90% dos casos clínicos e desenvolve-se entre a 1ª e a 3ª semana após a transfusão em doentes submetidos a transplante de medula, doentes imunocomprometidos ou com alta similaridade com o dador dos antígenos do sistema HLA^{16,17,18}.

Qualquer componente de sangue que contenha linfócitos viáveis tem o potencial de causar este tipo de reacção. Assim sendo, esta doença resulta na inabilidade que o sistema imunológico do doente imunocomprometido apresenta em reconhecer os linfócitos T do dador imunocompetente como não próprias e de as neutralizar e eliminar, podendo mediar reacções intensas contra tecidos e/ou órgãos do doente e provocar lesão e a morte^{16,17,18}.

Neste contexto, esta doença poder ser prevenida pela identificação de determinados grupos de doentes, tais como, os que são submetidos a transplante de medula óssea, todos os imunocomprometidos, não esquecendo os recém-nascidos prematuros de baixo peso e de muito baixo peso que recebem linfócitos T imunocompetentes. Nestes o sistema imunológico do doente não tem capacidade para neutralizar nem eliminar os linfócitos do dador. Mas também nas situações em que existe uma alta similaridade entre os haplotipos do antígeno HLA entre o dador e o receptor, nestes casos o sistema

imune do doente falha no reconhecimento dos linfócitos não próprios que atacam o tecido do próprio doente^{16,17,18}.

2.2 Reacção transfusional febril não-hemolítica (FNHTR)

As FNHTRs são efeitos indesejáveis, que ocorrem durante ou após a transfusão de componentes de sangue homólogo e são causadas pela transferência de leucócitos viáveis do dador para o receptor^{12,15,19,20}.

A FNHTRs é uma reacção imediata em que o doente geralmente apresenta febre como o primeiro sinal juntamente com sintomatologia inflamatória. Algumas publicações referem que a incidência nos concentrados eritrócitos é de 0,12 a 0,5% e nos concentrados de plaquetas de 1,7 a 31%, ambos os componentes não leucoreduzidos^{21,22}. Pode contudo verificar-se que as publicações encontram resultados similares no que respeita à associação entre este tipo de reacção e o tipo de componente administrado, com incidência significativamente mais elevada após transfusão de concentrados de plaquetas.

Durante vários anos estas reacções não eram identificadas e muitas vezes passavam despercebidas, no entanto ao longo dos últimos anos, vários esforços foram feitos para identificar as reacções que passaram a ser de registo obrigatório nos sistemas de hemovigilância dos vários países da Europa, Estados Unidos, Canadá e Austrália.

As FNHTRs foram relacionadas com a presença de anticorpos contra os leucócitos ou plaquetas mas mais recentemente vários estudos apontam para a presença de citocinas como factor principal^{15,19,20}. Assim, verificou-se que nos componentes de sangue transfundidos que continham leucócitos viáveis, estes eram os responsáveis pela secreção das citocinas e conseqüentemente pela FNHTRs²³.

Durante o armazenamento dos concentrados de plaquetas aumenta a concentração de citocinas inflamatórias libertadas pelos leucócitos, que por sua vez constituem eles próprios os alvos para a síntese de anticorpos por parte do receptor. Por sua vez, estes complexos imunológicos podem eles próprios estimular a produção e a libertação de citocinas responsáveis por um conjunto de alterações clínicas que podem evoluir até alterações respiratórias de várias ordens de gravidade^{15,19,20}.

A leucoredução pré armazenamento como medida cautelar implementada nos bancos de sangue veio contribuir de forma significativa para a redução deste tipo de reacção adversa da transfusão de componentes de sangue, contribuindo não só para redução das citocinas libertadas pelos leucócitos durante o armazenamento dos componentes como reduzir os antígenos dos leucócitos presentes nos componentes responsáveis pelo desencadeamento da síntese de anticorpos específicos e da formação de imunocomplexos com todos os inconvenientes e efeitos negativos para o receptor¹².

3 Separação das unidades de sangue total

Sendo o sangue um produto biológico, constituído essencialmente por eritrócitos, leucócitos, plaquetas e factores plasmáticos suspensos em plasma, que conferem características únicas e que diferem entre dadores, a separação das unidades de sangue total requer um conjunto de meios técnicos e tecnológicos que permitam garantir a qualidade e a segurança transfusional.

Embora no mercado existam algumas variedades de sistemas semi-automáticos especificamente concebidos para a separação de unidade de sangue total que combinam a centrifugação diferencial com a posterior extracção dos componentes, pela interacção de um conjunto de sistemas de “*clamps*” e células fotoeléctricas que forçam os componentes a migrar para os sacos satélites. Este sistema, que vigora na maioria dos bancos de sangue, permitia uma maior padronização dos diferentes componentes sanguíneos, assim como produtos com melhor qualidade, eficiência e reprodutibilidade. Mesmo assim, este sistema, devido à sua grande exigência técnica é muito susceptível a variações analíticas, que aumenta o desperdício dos componentes. Para responder a todas estas exigências, e para cumprir as directivas interpostas pelo conselho da europa, a existência de um controlo de qualidade para controlar todos os pontos críticos nas etapas do processamento do sangue total e para aplicar as acções correctivas para responder às alterações ocorridas.

Não obstante a todas estas situações, a Caridian® BCT, desenvolveu inicialmente um sistema automático para a separação de unidade de sangue total, Atreus® 2C, que num único equipamento separa a unidade de sangue total em concentrado de eritrócitos, concentrado de *buffy coat* e plasma fresco desleucocitado. Este sistema mostrou maior robustez, qualidade e fiabilidade na obtenção dos componentes e com menor intervenção técnica. No entanto, este sistema era complementado com outro equipamento para a produção de *pools* de plaquetas, o mesmo equipamento utilizado no sistema semiautomático, para a lavagem e adição da solução aditiva que permitia a conservação das plaquetas.

Mais tarde, este sistema automatizado sofreu várias actualizações, o que lhe permitiu migrar para outro sistema automatizado, Atreus® 3C (fig. 1).



Figura 1 - Atreus[®] 3C da Caridian BCT. Sistema Automático de Separação de Unidades de Sangue Total

Este novo equipamento, tal como o seu anterior, separa as unidades de sangue total de forma totalmente automática, mas de onde se obtêm um concentrado de eritrócitos, um concentrado unitário de plaquetas, um concentrado leucorresidual e um plasma fresco desleucocitado. Desta forma, para a produção de *pools* de plaquetas não é necessário outro equipamento, como acontecia com o sistema anterior ou mesmo com o semi-automático.

Este sistema ainda veio dinamizar o processamento e armazenamento dos componentes do sangue, com programas que permitem a separação de unidade de sangue total a partir de 2h até às 24h após a colheita, ao invés das tradicionais 8-12h de repouso necessárias antes do processamento das unidades de sangue total.

Esta mais-valia obtida com o Atreus[®] 3C, introduziu maior flexibilidade de tempo para iniciar a preparação dos componentes, assim como uma gestão mais eficiente dos recursos e de “*stocks*” de componentes, com um aumento na capacidade de resposta e principalmente uma gestão eficiente no que se refere à produção de unidade com prazos de validade curtos, tais como a produção de *pools* plaquetas, que podem ser produzidas “*in deman*” com vista a reduzir o desperdício e de fornecer um produtos com a maior eficácia terapêutica possível.

Como já vimos, com esta tecnologia totalmente inovadora e única no mercado para a separação e obtenção dos componentes sanguíneos, permitiu simplificar o processo de produção, tornando-o num sistema de maior robustez, fiabilidade e reduzindo muito significativamente as variáveis técnicas que se verificavam de forma mais acentuada nos sistemas manuais e de forma menos acentuada nos sistemas semi-automáticos. Este sistema também tem um programa associado que identifica todas as etapas do processo, ou seja, a identificação do operador, do equipamento, do programa utilizado, assim como dos volumes obtidos para cada componente, entre outros dados. Mas mais relevante e inovador foi a obtenção do valor da hemoglobina que o próprio equipamento dá para cada componente eritrocitário, assim como o índice plaquetário, que está relacionado com o número de plaquetas em cada concentrado unitário de plaquetas. Deste modo, este equipamento reduz os pontos críticos, verificados nos sistemas semiautomáticos assim como reduz a necessidade de controlo de qualidade do processo.

3.1 Atreus® 3C

Como referido anteriormente, o Atreus® 3C, é um sistema totalmente automatizado na separação e obtenção de componentes sanguíneos²⁴. Este sistema permite seleccionar um protocolo de separação de acordo com os componentes que são pretendidos no momento.

Assim, foram desenvolvidos seis programas para separação das unidades de sangue total. Dos seis programas pode-se subdividir em dois grupos. Um para obter componentes de sangue separados entre as 2h e as 8h após a colheita, designado por “*fresh blood - FB*” e outro para separar entre as 8h e as 24h após a colheita, designados por “*over night - ON*”. Para cada um dos dois grupos existem três programas, um dos programas permite obter todos os concentrados unitários de plaquetas, um programa que permite seleccionar a obtenção dos melhores concentrados de plaquetas e um último para não obter o concentrado de plaquetas. Para obter o melhor concentrado de plaquetas existe uma aplicação, “*autoswitch*”, que mede a espessura da camada leucoplaquetaria e determina quais as unidades que possibilitam a obtenção de plaquetas com alta concentração celular nas unidades²⁴. Todos estes programas permitem ajustar a produção às necessidades existentes e em tempo útil.

Assim para iniciar a obtenção de componentes, é necessário seleccionar o programa de separação pretendido. Seguidamente é obrigatório uma série de identificações do operador, do número da colheita, da referência do saco colheita, do lote e do grupo sanguíneo. As unidades são colocadas numa posição única, posição de carga, e colocadas as tubuladuras nas respectivas cabeças. O ciclo de processamento varia consoante o programa escolhido e as características de cada unidade, entre um período de 8 e os 12 minutos. No final do ciclo os produtos estão prontos e selados, apenas os glóbulos rubros necessitam de filtração por gravidade. O equipamento também tem um *display* que evidencia as características mais relevantes de cada um dos componentes processados, tais como o programa a uso, a identificação da unidade, o volume de cada componente e o “*platelet yield index*”, PYI²⁵ (fig. 2).



Figura 2 - *Display do Atreus® 3C no final de cada processamento, disponibilizando os volumes do sangue total e dos diferentes componentes, assim como o valor de PYI.*

Este PYI é uma indicação da concentração plaquetária e sempre que se encontra acima de 40, indica que o concentrado de plaquetas tem uma quantidade celular acima das 60×10^9 plaquetas na unidade, valor definido para produzir *pool* plaquetas com óptimo rendimento. Todos os dados relativos às unidades são armazenadas no servidor e numa base de dados desenvolvida para permitir a total rastreabilidade de cada componente, equipamento e/ou operador, assim como as características de cada unidade e dos componentes a que deu origem, passando também pela taxa de ocupação do equipamento e controlo e monitorização de erros.

4 Métodos de Inativação dos Componentes Sanguíneos do CRSP

Como já referimos, o Atreus® 3C acrescentou uma melhoria significativa na qualidade e segurança nos componentes de sangue, no entanto a transmissão de leucócitos estão associados a um conjunto de efeitos adversos e à transmissão de agentes patogénicos. Como já vimos anteriormente, para responder à eliminação dos leucócitos a gama irradiação é amplamente aceite e utilizado para a prevenção de TA-GVHD, mas uma tecnologia mais recente, que permite a inativação de vários vírus, bactérias e parasitas, Mirasol® PRT System tem demonstrado eficácia na inativação dos leucócitos.

4.1 Gama Irradiação, GammaCell®

A gama irradiação é presentemente o método recomendado para a prevenção do TA-GVHD. O gama irradiador, *GammaCell*® 3000 com dose de irradiação de 33Gy no centro e de 24 nas extremidades (fig. 3).

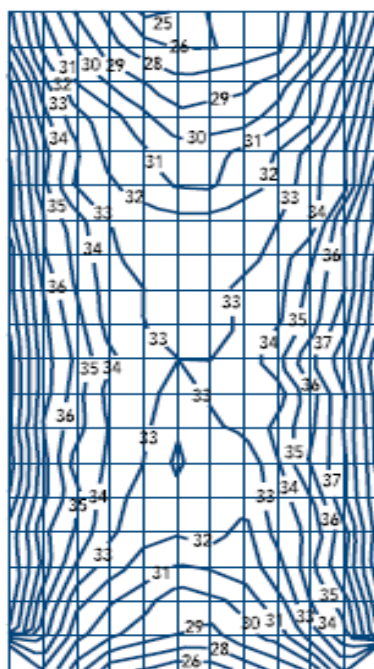
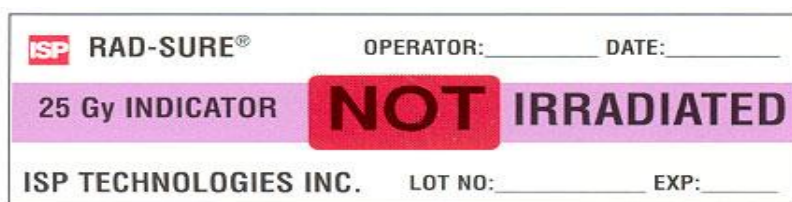


Figura 3 - Mapa de irradiação, *GammaCell*® 3000 Elan, com doses de irradiação de 33Gy no centro do copo e um mínimo de 25Gy.

Este equipamento utiliza uma radiação ionizante emitida pelo decaimento de átomos instáveis de Césio 137 que são beta e gama radiação. O encapsulamento do Césio 137 num equipamento, *Gammacell*® 3000 Elan, impede que a radiação beta atinja a amostra,

mas por outro lado a radiação gama é composta por ondas electromagnéticas que atinge as amostras em níveis reduzidos de radiação aceitáveis.

Esta radiação ionizante promove a remoção dos electrões, fazendo com que os átomos se tornem electricamente carregados ou ionizados e nestas circunstâncias, a presença dos iões perturba o processo biológico normal, danificando o núcleo do DNA, impedindo deste modo a activação e proliferação das células nucleadas e neste caso os leucócitos¹⁶.



BEFORE IRRADIATION

Figura 4 - Indicadores de irradiação de 25Gy Radsure™. Antes da irradiação visualiza-se o “NOT”. Existe um campo para identificar o operador e a data de irradiação. Retirado de:

http://www.rch.org.au/bloodtrans/about_blood_products/Irradiation_of_blood_products/

Para controlar este processo, é colocado um indicador de irradiação no(s) componente(s) a irradiar, o sistema Radsure™, para verificar se a dose de irradiação foi correctamente aplicada nos componentes. Assim sendo, na etiqueta inicial, antes de ser submetida ao ciclo de irradiação, surge com a palavra “NOT” visível (fig. 4). Quando o ciclo de irradiação terminar com sucesso e se dose for superior a 25Gy a palavra “NOT” desaparece (fig. 5), indicando que o componente foi irradiado.

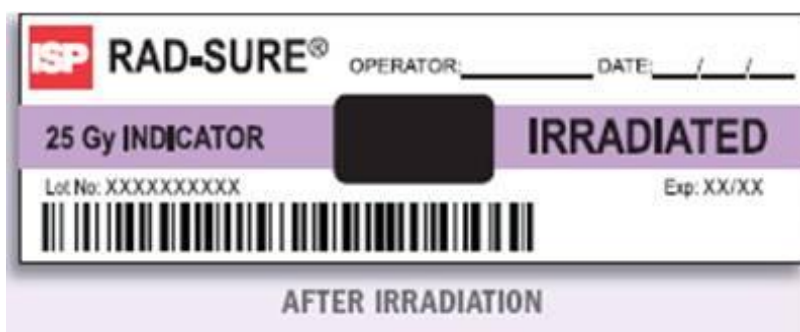


Figura 5 - Depois da irradiação dos componentes, o “NOT” desaparece e é indicativo que foi aplicada uma dose mínima de 25Gy. Retirado de: <http://www.vingmed.se/isp-radsure-rad-sure-.aspx>

Esta etiqueta permite controlar a dose de irradiação no entanto, no final de cada ciclo é emitido um relatório com a identificação do operador, número de colheita dos componentes a irradiar, assim como a duração do ciclo e a dose aplicada.

4.2 Inactivação PRT

A riboflavina, ou vitamina B₂, é um composto heterocíclico foto reactivo que catalisa a clivagem, por transferência de electrões e oxidação, dos resíduos de guanina e fragmentação da dupla hélice. A riboflavina é activada num intervalo maior de comprimentos de onda, em luz ultra violeta.

O único sistema comercial aprovado para inactivação patogénica de componentes sanguíneos com riboflavina é o Mirasol® PRT; CaridianBCT, Lakewood, CO.

A riboflavina tem acção inespecífica através de radicais de oxigénio, nos componentes proteicos e lipídicos do agente patogénico e demonstra eficácia tanto em vírus com invólucro lipídico como em vírus sem invólucro^{18,26,27}. Provou também ser eficaz na redução bacteriana. O facto deste composto ser natural e ubíquo na natureza, faz com que seja considerado seguro, não sendo necessária a remoção do mesmo.

O sistema Mirasol® PRT consiste num iluminador e um *kit* que consiste num conjunto de sacos para armazenar o componente a tratar e um saco com 35ml de solução de riboflavina de 50 µmol/L estéril²⁷ (fig. 6).

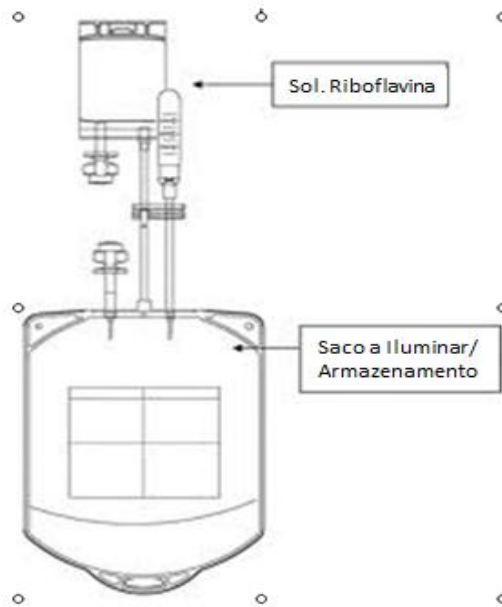


Figura 6 - Kit preparação de plasma e plaquetas. Sacos de conexão e 35ml de riboflavina (50 µmol/L)

O processo Mirasol® PRT requer que a riboflavina esteja misturada com a componente a tratar, que é então exposto a uma luz UV (265-370nm)^{18,27} durante um curto período de tempo (menos de 10 min). Esta iluminação causa uma reacção química que previne a replicação do DNA e RNA. Portanto, muitos dos vírus, bactérias e outras células nucleadas (como por exemplo os leucócitos) podem ter a sua replicação comprometida, ou seja inactivados. Contudo, os eritrócitos, plaquetas e plasma, que não tem ácidos nucleicos, não ficam comprometidos.

5 Enquadramento Conceptual

Sendo os leucócitos os principais responsáveis pela FNHTR a redução do número de leucócitos nos componentes de sangue, no mínimo, para valores residuais inferiores a 5×10^6 por componente seria desejável para diminuir este efeito adverso de forma significativa, não só quantitativamente como qualitativamente, tanto em adultos como em crianças²⁴.

Para a leucoredução universal os bancos de sangue dispõem de uma tecnologia para filtração utilizando filtros de 3ª geração que permitem atingir uma redução de 3 log por componente, sem afectar a funcionalidade ou antigenicidade das plaquetas ou dos eritrócitos.

Esta ordem de grandeza da capacidade de leucoredução permite a obtenção de componentes de sangue com níveis de leucócitos inferiores a 1×10^6 por componente sendo este o *standard* recomendado no guia do conselho da europa considerando que no mínimo 90% dos componentes cumprem este requisito²⁸.

Embora tecnologicamente os filtros disponíveis no mercado respondam de forma satisfatória a estes requisitos não são contudo a solução ideal. Essa seria uma tecnologia que garantisse um teor de leucócitos residuais equivalente a zero e dentro do “*timing*” ideal para que se consiga o equilíbrio entre a actividade fagocítica sem contudo se dar início às alterações metabólicas que através da normal actividade enzimática ou até da degradação celular, à libertação de citocinas ou outros mediadores com efeitos prejudiciais à segurança do componente.

Paralelamente, existem tecnologias de obtenção de componentes que permitem uma leucoredução mais eficaz de forma automatizada, são elas a elutrição utilizada nas metodologias de colheita de componentes por aférese e mais recentemente, na obtenção de componentes a partir de sangue total, através da utilização da tecnologia Atreus® 3C, desenvolvida em parceria com a empresa Caridian® BCT, pelo laboratório de separação de componentes do centro regional de sangue do porto do instituto português do sangue, IP.

Como já referido a TA-GVHD sendo uma complicação de grande gravidade com uma elevadíssima taxa de mortalidade não tem actualmente tratamento específico estando

apenas disponível a possibilidade de prevenção através da utilização da gama irradiação¹⁶.

Neste contexto, a gama irradiação, utilizando como fonte o cobalto 60 e o Césio 137 é amplamente utilizado como método de referência para a profilaxia da TA-GVHD¹⁶. Apesar disso, a dose de irradiação a aplicar nos componentes de sangue ainda não é totalmente consensual. Para o AABB e para o FDA recomendam doses de irradiação de 25Gy na zona central do componente e de 15Gy no mínimo nas extremidades ou em qualquer parte do componente. As recomendações do conselho da europa referem que nenhuma parte do componente deve receber uma dose de irradiação mínima de 25Gy ou máxima de 50Gy^{16,29}.

No mercado, existem vários equipamentos para a irradiação de componentes, com diferentes fontes (cobalto 60 e o Césio 137) e doses de irradiação (15Gy e os 50Gy), sendo que as doses de irradiação entre 25-30Gy apresentam maior consenso na relação entre inactivação dos leucócitos e os efeitos que a irradiação pode provocar nos componentes. Para reduzir esses efeitos, nomeadamente a redução dos níveis de potássio¹⁶, o conselho da europa recomenda a utilização dos componentes irradiados nas primeiras 48h, assim com a alteração do prazo de validade para 14 dias, após irradiação, não excedendo os 28 dias desde a colheita do componente^{16,29} assim como recomenda a administração destes componentes irradiados a doentes susceptíveis de desenvolver esta doença ou a doentes imunocomprometidos.

Considerando que a prevenção da TA-GVHD exige a exposição dos componentes à gama irradiação e consequentes efeitos, mas que não previne a inactivação da grande maioria dos vírus, bactérias e parasitas, obrigando deste modo a que os componentes sejam submetidos a novo tratamento¹⁸. Neste contexto, o método de PRT tem demonstrado a sua eficácia tanto ao nível da inactivação de vários vírus, bactérias e parasitas como na inactivação dos leucócitos e na libertação de citocinas mediadas pelos leucócitos²⁸. Assim para *Fast et al*¹⁴ refere no seu estudo que existem diferenças significativas na expressão do CD69, assim como na secreção de citocinas mediadas pelos leucócitos entre os produtos tratados com irradiação gama e com Mirasol PRT. No entanto, para *Luban et al*²⁹, refere que as diferenças entre as amostras tratadas apresentam diferenças mais significativas a partir do sétimo dia após tratamento relativamente ao nível das citocinas IL11 e IL 12.

6 Objectivos

6.1 Objectivos gerais

Comparar o efeito da gama irradiação e da inactivação pelo método PRT numa *pool* de leucócitos que represente a produção das *pools* de plaquetas no centro regional de sangue do porto.

6.2 Objectivos específicos

Avaliar o impacto de ambos os tratamentos na qualidade destes componentes.

7 Material e Método

Este estudo que se desenvolveu no centro regional de sangue do porto (CRSP), no serviço de separação de produtos sanguíneos lábeis (PSL), em cooperação com os laboratórios de controlo de qualidade e com a empresa Gambro® BCT.

Para desenvolver este estudo foram seleccionadas amostras de concentrados leucos residuais, utilizando a tecnologia de separação automática de componentes sanguíneos (Atreus® 3C), a partir de unidade de sangue total. Da unidade de sangue total é separada em um concentrado eritrocitário, um concentrado unitário de plaquetas, um plasma fresco leucoreduzido e um concentrado leucoresidual.

Para verificar a capacidade de inactivação dos leucócitos, principalmente os linfócitos T em *pools* de plaquetas após irradiação e inactivação por PRT, utilizaram-se os concentrados leucos residuais. Estes concentrados permitem reduzir as interferências das plaquetas que também expressão o CD69, uma vez que são constituídos essencialmente por leucócitos (na sua maioria linfócitos), uma quantidade residual de plaquetas e de eritrócitos e ressuspensão em plasma recuperado. Para a selecção dos concentrados leucos residuais, foram escolhidas unidades de sangue total e separadas no sistema Atreus® 3C até um período máximo de 6 horas após a colheita, de modo a manter a integridade dos leucócitos.

Os linfócitos foram isolados a partir do concentrado leucoresidual e os linfócitos isoladas a partir do método de referência, *ficoll-histopaque*®-1077 da Sigma-Aldrich® (sterile-filtered, density: 1.077 g/mL), que permite separar os linfócitos a partir do sangue total. Este método devido ao seu gradiente e pela aplicação de uma força gravitacional faz com que as células migrem de modo a que o *ficoll* actue como camada intermédia e separe os eritrócitos e os leucócitos granulares na mesma camada inferior e os linfócitos e plaquetas na camada acima do *ficoll* seguido do sobrenadante. A maioria das plaquetas foram removidas dos linfócitos por processos de lavagem repetidos, em que as plaquetas ficam suspensas no sobrenadante que é rejeitado.

Foram utilizadas três *pools*, cada uma delas obtida a partir de uma *hiperpool* constituída com os quatro concentrados leucos residuais. A *hiperpool* foi ressuspensa em 100% de plasma fresco congelado recuperado, com volume aproximado de 600ml, para que cada

pool apresente um volume final de 200ml e uma concentração de leucócitos entre $3-5 \times 10^9/L$. Deste modo, procurou-se também reproduzir a produção *pools* plaquetas no CRSP e introduzir a mesma heterogeneidade do produto terapêutico.

Este produto único foi dividido em três alíquotas para posterior manipulação; uma *pool* não foi submetida a qualquer tipo de tratamento (controlo); a segunda *pool* foi tratada com PRT, Mirasol® PRT, 35ml de riboflavina (50µml/L) e iluminada com o sistema Mirasol da Caridian BCT; a terceira *pool* foi submetida a tratamento com Césio 137, 33Gy de gama irradiação.

Após o tratamento, os linfócitos foram isolados dos três produtos por centrifugação diferencial e estimulados com PMA (“*phorbol myristate acetate*”) e analisados por citometria de fluxo nas 24horas seguintes.

De notar que o produto controlo foi dividido, sendo uma das fracções submetida a estimulação com PMA (controlo positivo), enquanto a outra fracção não foi submetida a qualquer tipo de estimulação (controlo negativo) e que os produtos foram mantidos nas condições normais de armazenamento, similares às condições de armazenamento das *pools* plaquetas.

Para a citometria de fluxo foram utilizados os marcadores CD3 para definir a população dos linfócitos T, os CD8 para distinguir a subpopulação de linfócitos T citotóxicos e o CD69 que é o marcador primário de activação dos leucócitos, principalmente dos linfócitos, mas também pode ser observado noutras células, tais como as plaquetas. Com estes marcadores podemos isolar a população de linfócitos e verificar que são ou não activados, reduzindo a possibilidade de falsos resultados.

7.1 Obtenção da Amostra

Para realizar este estudo as amostras de concentrados leucore residuais foram obtidos no serviço do centro regional de sangue do porto. As colheitas de sangue total, efectuadas a dadores de sangue benévolos e voluntários, cumpriram todos os requisitos estabelecidos nos manuais de boas práticas de colheitas e utilizado um “*kit*” de sacos de colheita, específicos para a separação no sistema automático (Atreus 3C®, Caridian BCT). Para a separação dos componentes, também foram cumpridos todos os requisitos de boas práticas laboratoriais. As unidades de sangue total foram separadas num máximo de 6

horas após a colheita, num programa utilizado na rotina laboratorial para obtenção de concentrados unitários de plaquetas óptimos. Das unidades separadas foram seleccionados quatro concentrados leucos residuais (fig. 7) e efectuado o respectivo hemograma no Cell-Dyn®.



Figura 7 - Concentrados leucos residuais, obtidos a partir do sistema automático Atreus 3C®

7.2 Isolamento dos Linfócitos

Os linfócitos foram isolados pelo método do *ficoll-histopaque*®-1077 da Sigma-Aldrich® (sterile-filtered, density: 1.077 g/mL), pelo diferencial de migração das células durante o processo de centrifugação. Deste procedimento resultou a sedimentação celular, onde os linfócitos e a maioria das plaquetas ficaram isolados na camada acima do *ficoll* formando um anel branco, designado por “*pellet*”.

Com o auxílio da pipeta de *pasteur*, foi removido a maioria do anel de cada uma das quatro amostras e adicionado num único tubo *falcon* de 50ml (fig. 8). Para remover a maioria das plaquetas das amostras concentradas no tubo *falcon*, procedeu-se a três lavagens com PFC e rejeitado o sobrenadante, por centrifugação (ver protocolo no

anexo A, capítulo “Isolamento de linfócitos, a partir dos concentrados de leucos residuais”).



Figura 8 - Remoção do anel dos linfócitos

7.3 Preparação das pools de leucócitos

Para a preparação da *pool* (ver protocolo no anexo A, capítulo “preparação das da *pool* de leucócitos”), inicialmente constituiu-se uma *hiperpool* com os linfócitos isolados das 4 unidades de concentrados leucos residuais (acima descrito) e 2 plasmas frescos congelados desleucocitado. Assim sendo, a *hiperpool* apresenta um volume de 600ml e uma concentração entre 3×10^6 /ml. Deste modo, permite subdividir a *hiperpool* em três *pools* com as seguintes características: a *pool* para irradiar com volume de 210ml. A *pool* para tratar com Mirasol® PRT com volume de 200 ml e concentração de $3,1 \times 10^6$ /ml e a *pool* a não tratada com volume de 198ml e concentração $3,2 \times 10^6$ /ml (fig. 9).



Figura 9 - Uma das três pools, obtidas a partir da divisão da Hiperpool.

7.4 Tratamento das pools

Das três *pools* constituídas (como descrito acima), procedeu-se à preparação das duas *pools* para tratar (ver protocolo no anexo A, capítulo “Tratamento das *pools* com linfócitos”). Na primeira *pool* submetida a inactivação no Mirasol® PRT, adicionou-se 35ml de riboflavina (50 µmol/L), retirado o ar do saco e colocado no equipamento submetido a uma luz UV. No fim do processo é imitado um relatório com o tempo do ciclo, a intensidade da UV aplicada e o estado de conclusão do ciclo. À segunda *pool* adicionou-se 35 ml de soro fisiológico, volume igual ao adicionado na primeira *pool*, e deste modo submeteu-se as *pools* às mesmas condições. A *pool* foi submetida a irradiação gama 33Gy, no *GammaCell®3000 Elan*, e colocada uma etiqueta de identificação, sistema *Radsure™*, que permite controlar o ciclo de irradiação. Para a terceira *Pool*, controlo, adicionou-se 35 ml de soro fisiológico e não foi submetida a nenhum tratamento.

7.5 Recolha das amostras nas pools tratadas e controlo

De cada uma das *pools*, retiraram-se 50ml de amostra e por centrifugação removeu-se o sobrenadante, adicionando cerca de 10ml de PFC (ver protocolo no anexo A, capítulo “Activação dos linfócitos com o CD69”). Efectuou-se contagem de leucócitos e dilui-se as amostras com PFC recuperado para obter uma concentração de 1×10^6 /ml.

Para a activação dos linfócitos foi utilizado o PMA a 1mg da Sigma Aldrich® ($\geq 99\%$ (TLC), film or powder) dissolvido em DMSO (*dimethyl sulfoxide*, Sigma Aldrich®), a uma concentração de 1000ng/ml. Seguidamente, procedeu-se à preparação das amostras para promover a activação com o PMA. Para isso, foram preparadas 12 alíquotas das quais:

- Da amostra irradiada e diluída – preparou-se 3 alíquotas e adicionado o PMA;
- Da amostra inactivada por PRT e diluída - preparou-se 3 alíquotas e adicionado o PMA;
- Da amostra não tratada (Controlo) – prepararam-se 3 alíquotas com PMA (controlo positivo) e mais 3 alíquotas sem PMA (controlo negativo).

As 12 alíquotas foram submetidas a incubação a 37°C durante 4 horas em banho-maria e com agitação.

7.6 Activação dos linfócitos

A activação dos linfócitos foi medida pela expressão de CD69- PE, conjugados com os marcadores CD3-PC5, CD8-FITC e CD45-PC7 e incubados à temperatura ambiente em zona escurecida e durante 20 minutos (ver protocolo no anexo A, capítulo “Activação dos linfócitos com o CD69”). A expressão dos marcadores foi medida e analisada por citometria de fluxo (Beckman Coulter®/ FC500MPL).

7.7 Tratamento estatístico de dados

Para o tratamento de dados, obtidos da citometria de fluxo, recorreu-se à estatística descritiva, para calcular as médias e desvios padrões. Para comparar as médias foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

8 Resultados

Os resultados obtidos foram analisados com base na comparação de dois grupos, o grupo com amostras gama irradiadas e o grupo com as amostras inativadas com PRT, tendo como controlo do processo o controlo positivo e negativo.

Na tabela 1 estão representados os resultados obtidos dos quatros concentrados leucos residuais referentes ao peso (tara incluída), volume e o concentrado dos leucócitos, linfócitos e plaquetas.

Tabela 1 - Determinação do peso, volume, contagem de leucócitos, linfócitos e plaquetas em cada um dos concentrados leucos residuais

Nº Amostra	Peso (gr)	Volume (ml)	Leucócitos $10^3/\mu\text{l}$	Linfócitos $10^3/\mu\text{l}$	Plaquetas $10^3/\mu\text{l}$
1	49,0	10,0	111,0	61,0	602,0
2	50,0	12,5	115,0	66,1	782,0
3	50,0	12,5	114,0	77,1	1046,0
4	48,0	10,0	121,0	72,0	766,0

Dos concentrados leucos residuais foram isolados os linfócitos a uma concentração total de 50×10^3 leucócitos/ μl . Esta concentração foi diluída em PFC recuperado para constituir a *hiperpool*.

Na tabela 2 estão representados os resultados da constituição da *hiperpool*. Esta foi subdividida em três *pools* com um volume aproximado de 200ml e concentração de aproximadamente $4,7 \times 10^3$ leucócitos/ μl . Das *pools* tratadas e não tratadas foram retirados 50 ml de amostra e diluídas para obter uma concentração final de aproximadamente 1×10^3 leucócitos/ μl (tabela 3) para posteriormente submeter a estimulação com o PMA e marcação.

Tabela 2 - *Hiperpool* avaliado o volume e feita contagem hematológica

	Volume (ml)	Leucócitos $10^3/\mu\text{l}$	Linfócitos $10^3/\mu\text{l}$	Plaquetas $10^3/\mu\text{l}$
<i>Hiperpool</i>	≈ 610	≈ 4,7	3,7	18

Tabela 3 - Amostras diluídas, após tratamento (com exceção controlo), e ressuspensas em PFC recuperado.

Amostras diluídas	Leucócitos 10³/μl	Linfócitos 10³/μl
Inactivada	1,4	1,1
Irradiada	1,1	0,9
Controlo	1,4	1,1

Das amostras ressuspensas, o controlo foi dividido em dois, um para ser submetido a estimulação com PMA e outro não (controlo positivo e negativo respectivamente), assim como as restantes amostras foram submetidas à estimulação por PMA. As amostras foram incubadas com os marcadores CD3-PC5, CD8-FITC e o CD69-PE.

A figura 10 representa a legenda das cores das populações e subpopulações dos linfócitos T CD69 positivos ou negativos e marcados com os fluorocromos CD3-PC5, CD8-FITC e o CD69-PE. Este esquema permite distinguir as diferentes populações/subpopulações distribuídas nas figuras abaixo mencionadas.

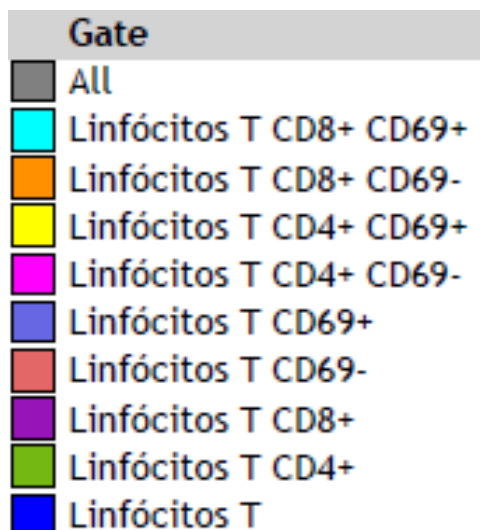


Figura 10 – Legenda das cores das populações e subpopulações dos linfócitos T que sejam CD69 positivo ou negativo e marcados com os seguintes fluorocromos: CD3-PC5, CD8-FITC e CD69-PE.

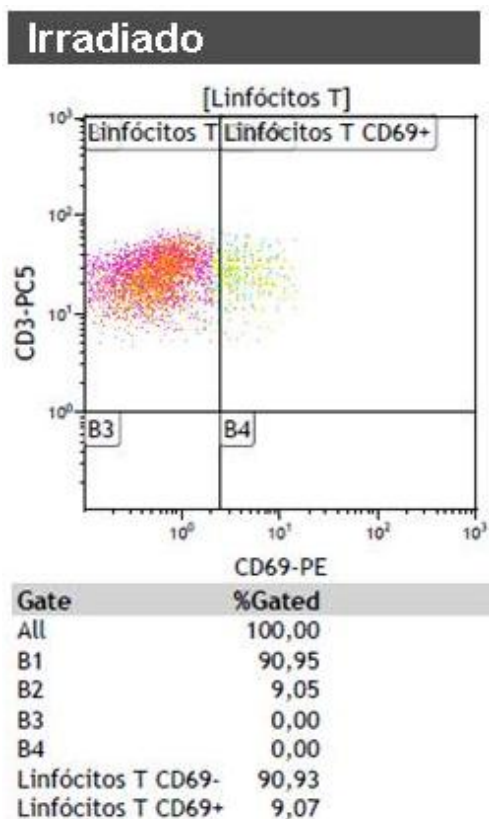


Figura 11 – Amostra gama irradiada. Determinada a percentagem de linfócitos T, CD3 que ainda tem capacidade para expressar o CD69.

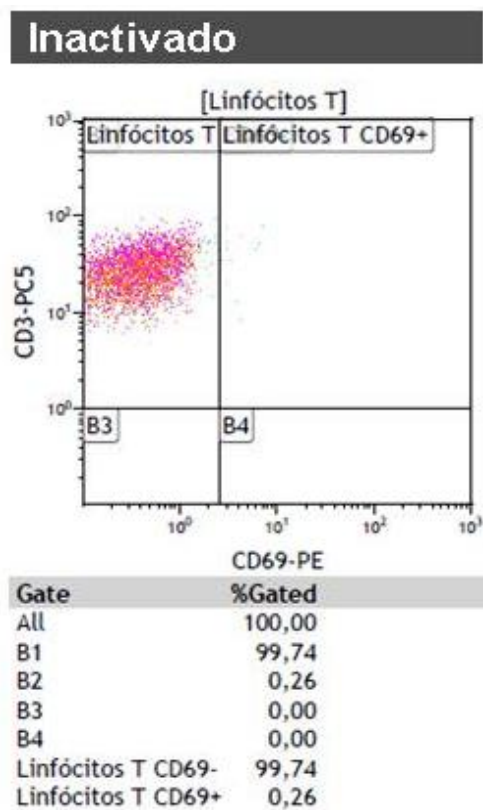


Figura 12 – Amostra inactivada com riboflavina pelo método PRT. Determinada a percentagem de linfócitos T, CD3 que ainda tem capacidade para expressar o CD69.

A figura 11 e 12 representam as amostras gama irradiadas e inactivadas pelo PRT. A população de linfócitos T (CD3) gama irradiado e inactivado, depois de estimuladas com o PMA, a expressão do CD69 (marcador primário na activação linfócitos T) foi de 9,07% e 0,26% respectivamente. Dos linfócitos T irradiados 2,31% são CD8 e dos inactivados são 0,53%.

A figura 13 representa o controlo negativo. Nesta população dos linfócitos T, CD3, que não foi sujeita a estimulação com o PMA, na sua grande maioria não expressa o CD69 (98,67%) e uma expressão de CD69 de 1,33% que pode ser justificada com a manipulação das amostras. Dos linfócitos T que expressão o CD69, 1,22% são da subpopulação CD8. O controlo negativo permite verificar se a manipulação dos linfócitos T ao longo do processo interfere na sua activação, o que não se verificou.

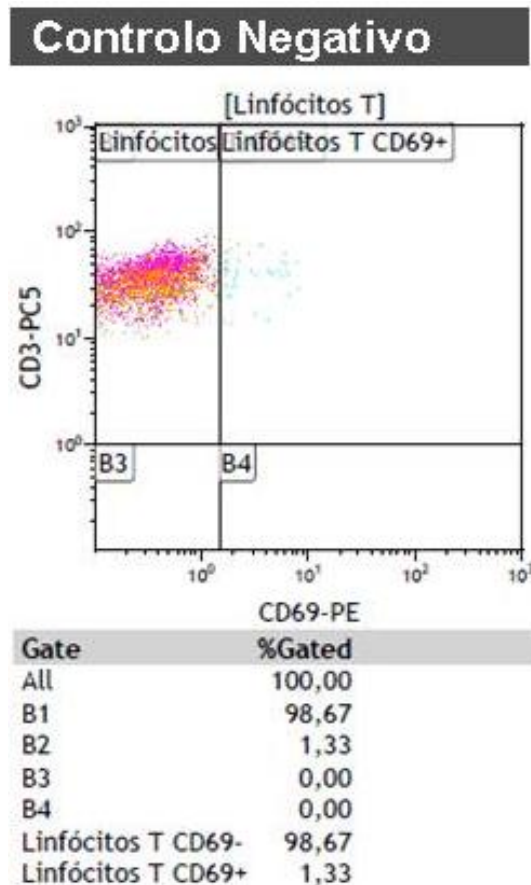


Figura 13 – Controlo negativo. Amostras não tratadas e não estimuladas com o PMA e determinada a percentagem de linfócitos T (CD3) que não respondem à activação primária (CD69).

A figura 14 representa o controlo positivo. Nesta população dos linfócitos T, CD3, foi sujeita a estimulação com o PMA na sua grande maioria expressa o CD69 (97,16%) enquanto 2,75% não expressa o CD69. A não expressão do CD69 no controlo positivo, que não foi tratado mas sim estimulado, pode dever-se à morte celular resultante da manipulação ao longo do processo. Dos linfócitos T que expressam o CD69, 36,46% é da subpopulação CD8. Este controlo permite determinar se os linfócitos T respondem à estimulação com o PMA.

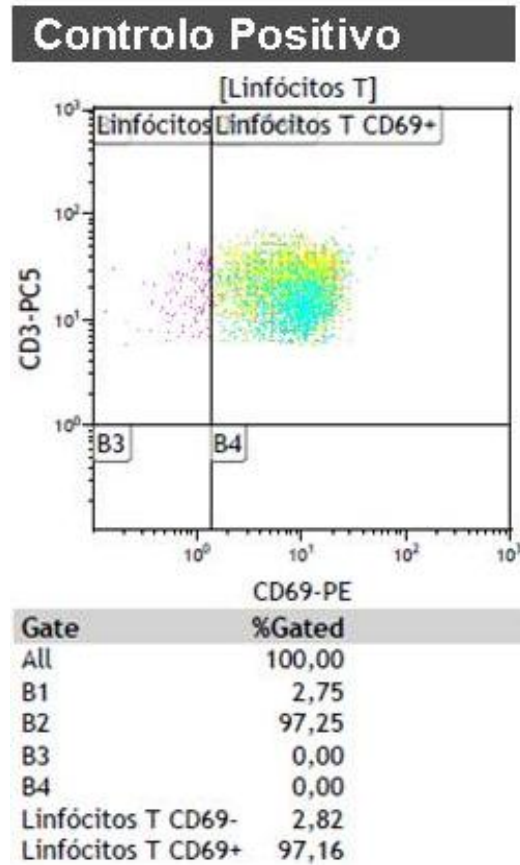


Figura 14 – Controlo positivo. Amostras sem tratamento mas estimuladas com PMA e determinada a percentagem de linfócitos T (CD3) que respondem à activação primária (CD69).

As médias dos três ensaios também foram calculadas para os linfócitos T, CD3 das quatro amostras em função da expressão do CD69. Estes resultados estão representados na figura 15.

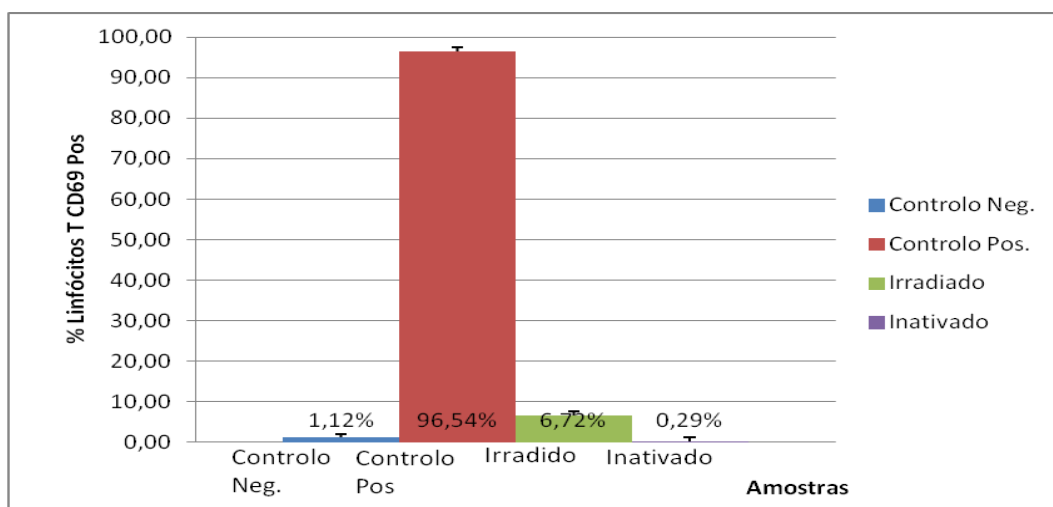


Figura 15 – Gráfico com a média e o desvio padrão dos três ensaios, para cada uma das amostras tratadas e não tratadas.

9 Discussão e Conclusão

O suporte transfusional com componentes de sangue homólogo é actualmente essencial ao tratamento de muitas situações clínicas que sem este contributo não teriam capacidade de evoluir, tratar e até curar um grande número de patologias. Dentro deste quadro integram-se as situações clínicas de neoplasias, onde o transplante de tecidos e órgãos toma um lugar central, assim como a traumatologia e até a actividade cirúrgica corrente.

Apesar de todo o cuidado colocado nas diferentes etapas da cadeia transfusional no sentido de se obterem componentes em número suficiente, mas simultaneamente seguros, é uma terapêutica que apresenta ainda efeitos adversos. No sentido de serem prevenidas situações que possam representar maior risco de efeitos adversos vão sendo introduzidas metodologias e tecnologias, além de testes laboratoriais e manipulações dos componentes que vão acrescentando custos, muitas vezes sem que daí se extraíam os benefícios esperados. Paralelamente existe a pressão exercida pelos media e pela sociedade do tão desejado o “risco zero”.

Do risco associado à transfusão destaca-se a transmissão de agentes patogénicos e a resposta imune induzida pela transferência de leucócitos^{8,16,17}. A introdução da leucoredução universal apresentou custos significativos no processo transfusional, mas com esta medida pode-se responder a várias situações indesejáveis relacionadas com a transfusão de componentes de sangue¹². Na leucoredução ao retirar a maioria dos leucócitos presentes nos componentes, além de acautelar a possível transmissão de priões, principal motivo que impulsionou a introdução desta medida, induz benefícios adicionais como a redução significativa da FNHTRs, redução da transmissão de agentes intracelulares como o CMV, diminuição do efeito imunomodulador e a aloimunização plaquetária¹⁵.

No entanto, a leucoredução não eliminou o risco associado à transmissão de leucócitos e causadores de efeitos adversos. Nesse sentido a recomendação para a inactivação dos leucócitos recai sobre a gama irradiação. Num estudo “in vitro” desenvolvido por *Luban et al*²⁹ refere que os linfócitos T irradiados com doses de 25Gy têm uma redução superior a 69% enquanto para doses de irradiação de 15Gy a redução é de 60%.

*Pelszynki et al*³¹ utilizou doses de irradiação gama entre 25Gy e os 30Gy e obteve uma redução superior a 70%. Também demonstrou em laboratório que linfócitos T CD4 e CD8 positivo tinham capacidade de causar a GVHD.

Do nosso estudo podemos verificar que tanto a gama irradiação como a inactivação por Mirasol® PRT reduzem a expressão do CD69 nos linfócitos T, ou seja, estas duas metodologias inactivam a grande maioria dos linfócitos T mesmo quando submetidos a estimulação com o PMA. No entanto, na figura 11 e 12 podemos verificar que existe uma percentagem de linfócitos T CD3 positivos que expressa maior quantidade de CD69 nas amostras irradiados (9,07%) do que nas amostras inactivadas com Mirasol® PRT (0,26%), ou seja, o método de Mirasol® PRT parece inactivar uma maior percentagem de linfócitos do que a gama irradiação, embora quando comparados os ensaios de ambas as amostras não se verifiquem diferenças estatisticamente significativas.

Neste contexto, o estudo desenvolvido por *Fast et al*¹⁴ também compara amostras gama irradiadas com amostras inactivadas pelo Mirasol® PRT. Nesse estudo tanto as amostras gama irradiadas como tratadas com Mirasol® PRT inactivam os linfócitos T no entanto, encontram evidências estatisticamente diferentes entre amostras, $p < 0,01$ no teste T para amostras emparelhadas¹⁴. Também existe tendência para que as amostras inactivadas com Mirasol® PRT apresentem uma percentagem quase residual de linfócitos T que expressão o CD69, em contraste com as amostras gama irradiadas que apresentam uma expressão de CD69 de aproximadamente 36%. Estas diferenças verificadas entre os estudos podem ser justificadas por um lado pelo reduzido número de amostras do nosso projecto ($n=3$) em comparação com as de *Fast et al*¹⁴ ($n=11$). Por outro lado, as doses de gama irradiação utilizadas, no nosso estudo foram de 33Gy enquanto no estudo de *Fast et al*¹⁴ foram de 25Gy. Este facto pode justificar os 9.07% de linfócitos T inactivados por gama irradiação comparativamente aos 36% apresentados no estudo de *Fast et al*¹⁴. Outra diferença encontrada entre estes estudos é o facto do nosso controlo positivo, que não sofreu qualquer tratamento, mas foi submetido a estimulação com PMA, apresentar maior percentagem de linfócitos T viáveis (97,16%) comparativamente com os aproximadamente 68% no estudo de *Fast et al*¹⁴. No nosso estudo foram utilizadas unidades de sangue total separadas no sistema automático Atreus 3C, enquanto no estudo de *Fast et al*¹⁴ foram utilizados concentrados

leucos residuais obtidos dos filtros leucoredutores nos componentes colhidos por aférese. Este facto também pode justificar as diferenças nos resultados entre o nosso estudo e o de *Fast et al*¹⁴ uma vez que as nossas amostras necessitam de menor manipulação.

Perante os resultados obtidos tanto no nosso estudo como no de *Fast et al*¹⁴, a implementação do Mirasol® PRT parece constituir uma mais-valia na rotina transfusional¹⁴. Este método permite inactivar um conjunto de vírus, bactérias e parasitas emergente ou re-emergentes assim como os mais recentes estudos parecem suportar que inactivam os linfócitos T, mas também parece reduzir a secreção de citocinas mediadas pelos leucócitos^{29,30}. Outra vantagem que esta metodologia apresenta é o facto de não provocar alterações analíticas nos componentes tratados e deste modo não alterar o prazo de validade. A solução de riboflavina utilizada nas amostras a inactivar não parece apresentar factor de risco, ou seja, não é carcinogénica ou tóxica para o doente e por isso pode ser administrada juntamente com os componentes. Este facto não é observado em todos os métodos de inactivação por PRT o que obriga à remoção da substância utilizada para inactivar, como é o caso do amotosaleno²⁶. O mesmo não acontece com a gama irradiação, que provoca alterações analíticas nos componentes gama irradiados, com aumento da lise celular e consequente aumento dos níveis de potássio extracelular, obrigando a que o prazo de validade seja alterado para 14 dias e com recomendação para ser administrado nas primeiras 48h¹⁶.

Outra questão a considerar é o facto da portabilidade dos equipamentos. Enquanto o irradiador, devido a ser constituído por um núcleo de Césio 139 encapsulado, necessita de um complexo conjunto de procedimentos para ser transportados assim como de estruturas físicas adequadas para ser implementado, com restrições de acesso e manuseamento e um serviço de manutenção que obriga a cuidados especiais e dispendiosos^{18,30}. Também existem algumas dúvidas relativamente à exposição dos operadores durante os ciclos de irradiação. Actualmente este tipo de equipamento apresenta algum perigo público, no sentido em que o núcleo de césio é um alvo para grupos terroristas³⁰.

Relativamente ao Mirasol® PRT não apresenta tantos condicionalismos, uma vez que o equipamento não tem na sua constituição substâncias radioactivas, é um equipamento de bancada de fácil portabilidade e cujo acesso operativo não é tão restritivo como o irradiador. As manutenções são simples, menos dispendiosas do que as do irradiador.

Em conclusão, embora sejam necessários mais estudos para suportar estas evidências, o método do Mirasol® PRT parece apresentar resultados promissores relativamente à inactivação dos leucócitos, nomeadamente dos linfócitos T além da já conhecida capacidade de inactivação de um conjunto de agentes patogénicos emergentes ou re-emergentes. No entanto, cabe a cada instituição verificar o custo benefício associado a esta metodologia comparativamente ao irradiador.

Num futuro seria desejável que com um único passo fosse possível a inactivação dos agentes patogénicos e leucócitos no produto primário, isto é, no sangue total, pois os benefícios estender-se-iam a todos os componentes daí obtidos sem acréscimo de custos.

10 Referências Bibliográficas

1. **Santos LL (2010)**. Indicadores de Qualidade para Serviços de Sangue e de Medicina Transfusional. *Revista Medicina Transfusional ABO* 42:30-32.
2. **Silva AMP (2010)**. Qualidade e Segurança da Dádiva, Colheita, Análise, Processamento, Preservação, Armazenamento, Distribuição e Aplicação de Tecidos e Células de Origem Humana. *Revista Medicina Transfusional ABO* 42:7-8.
3. **Klein GH (2006)**. Poderão os riscos Infeciosos da Transfusão de Sangue Ser Eliminado? *Medicina Transfusional ABO* 27:33-36.
4. **OMS, Recomendação Organização Mundial Saúde (2010)**. Rastreo de dádivas de sangue para Detecção de Infecções Transmissíveis por Transfusão NLM:WB 356.
5. **Holland PV (2008)**. Selling Blood Vs Donating blood. *Vox Sanguinis* 94:171
6. **Poel CL(2008)**. Remuneration Of Blood Donnor: New Proof of the pudding? *Vox Sanguinis* 94:169-170.
7. **Boning H, Schmidt M, et al. (2012)**. Sufficient Bold, Safe Blood: can we have both? *BMC Medicine*. 23:10-29
8. **Instituto Português do Sangue, IP (2005)**. Modos Operatórios do Centro Regional de Sangue Do Porto.
9. **Carrazzone CFV, Brito AM, Gomes YM (2004)**. Importancia da avaliação sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. *Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia* 26:93-98.
10. **Strong BM, AuBuchon J, Whitaker B, Kuehnert MJ (2008)**. Biovigilance initiatives. *ISBT Science Series* 3:77-84.
11. **Harvey J Alter. Pathogen Redution (2008): A Preocutionary Principle Paradigm**. *Transfusion Medicine Reviews* 22:97-102.
12. **Yazer MH, Podlosky L, Clarke G, Nahirniak SM (2004)**. The effect of prestorage WBC reduction on the rates of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelet concentrates and RBC. *Transfusion*. 44:10-5.
13. **Marschner S, Fast LD, Baldwin WM 3rd, Slichter SJ, Goodrich RP (2010)** . White blood cell inactivation after treatment with riboflavin and ultraviolet light. *Transfusion* 50:2489-98.
14. **Fast LD, Dileone G, Marschner S (2010)**. Inactivation of human white blood cells in platelet products after pathogen reduction technology treatment in comparison to gamma irradiation. *Transfusion* 51:1397-404.
15. **Chu RW (1990)**. Leukocytes in blood transfusion: Adverse effects and their prevention. *HKMJ* 5:280-284.

16. **Gorlin BJ, Mintz DP (2011)**. Transfusion-Associated Graft-vs-Host Disease. Transfusion Therapy: Clinical Principles 643-663.
17. **Dwyre DM, Holland PV (2008)**. Transfusin-Associated Graft-Versus-Host Didease. Vox Sanguinis 95: 85-93.
18. **Mintz PD, Wehrli G (2009)**. Irradiation and eradication and Pathogen Reduction. Ceasing Cesium Irradiation of Blood Products. Bone Marrow Transplantation 44: 205-211.
19. **Mueller MM, Henschler R, Seifried E(2008)**. Clinical Impact of Leucocyte Depletion – What is the Evidence? ISBT Science Series 3: 85-90.
20. **Heddle NM (2004)**. Universal leukoreduction and acute transfusion reactions: putting the puzzle together. Transfusion 44:1-4.
21. **Uhlmann EJ, Isgriggs E, Wallhermfecht M, Goodnough LT (2001)**. Prestorage Universal WBC reduction of BBC units does not affect incidence of transfusion reactions. Transfusion 41:997-1000.
22. **Goodnough LT, Ridell J, Lazarus H et al (1993)**. Prevalence of platelet transfusion reactions before and after implementation of leukocyte-depleted platelet concentrates by filtration. Vox Sang 65:103-7
23. **Apelseth TO, Hervig TA, Wentzel-Larsen T, Bruserud O (2006)**. Cytokine accumulation in photochemically treated and gamma-irradiated platelet concentrates during storage. Transfusion 46:800-10.
24. **Couban S, Carruthers J, Andreou P, et al (2002)**. Platelet transfusion in children: results of a randomized propective , cross-over trial of plasma removal and a prospective audit of WBC reduction. Transfusion 42:753-8.
25. **Caridian BCT (2008)**. Guia de Protocolo: Processamento integrado de 3 Componentes de Atreus. Atreus whole blood processing system. Catalogo nº 986302-042
26. **McCullough JD (2007)**. A new paradigm for preventing transfusion transmitted infections. American Society for Clinical Pathology 128:945-955.
27. **Mirasol Pathogen Reduction Technology (2008)**. A Novel Approach to Blood Safety: the Mirasol PRT System. Gambro BCT Europe PN 306690-062.
28. **Council of Europe (2011)**. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood Components - Recommendation N°.R (95) 15, 16th edition ISBN 978-92-871-7022-4.
29. **Luban NLC, Drothler D, Moroff G, Quinones R (2000)**. Irradiation of platelet components: inhibition of lymphocyte proliferation assessed by limiting-dilution analysis. Transfusion 40:348-352.
30. **Mintz PD, et al (2011)**. Editorial. Cesium Cessation? An advantage of pathogen reduction treatments. Transfusion 51:1369-1376.

31. **Pelszynski MM, Moroff G, Luban NL, Taylor BJ, Quinones RR (1994).** Effect of gamma irradiation of red blood cell units on T-cell inactivation as assessed by limiting dilution analysis: implications for preventing transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood* 83:1683-9.
32. **Heddle NM, Klama L, Meyer R, et al (1999).** A randomized controlled trial comparing plasma removal with white cell reduction to prevent reactions to platelets. *Transfusion* 39:231-8.
33. **Custer B, Agapova M, Martinez RH (2010).** The cost-effectiveness of pathogen reduction technology as assessed using a multiple risk reduction model. *Transfusion* 50:2461-73.
34. **Seghatchian J, de Sousa G (2006).** Pathogen-reduction systems for blood components: the current position and future trends. *Transfus Apher Sci* 35:189-96.

Anexo A - Protocolo

Material:

- Seringas
- Tubos *Falcon* 50ml
- Suporte
- Tubos 12x75 mL
- Pipetas Pasteur
- Kit preparação *Pools*
- Sacos Amostra
- Centrifuga
- Banho-Maria
- Auto Analisador *Cell Dyn*
- Citometro Fluxo (*Falcon*® 500)
- *Mirasol*® PRT, *Caridian BCT*
- *GammaCell*® 3000 *Elan*
- Câmara de Fluxo Laminar
- *Atreus*® 3C, *Caridian BCT*

Reagentes

- PMA (*Sigma Aldrich*®)
- Marcadores CD69, CD45, CD3 e CD8
- Soro Fisiológico
- Plasma Fresco Congelado Recuperado
- DMSO (*Dimethyl sulfoxide*)
- Amostras Concentrados Leucos residuais

Isolamento dos linfócitos, a partir dos concentrados leucos residuais

Para o isolamento dos linfócitos foram utilizados 4 concentrados leucos residuais obtidos através do processamento automatizado do sistema *Atreus*® 3C, no CRSPorto. Para cada concentrado leucos residual procedeu-se da seguinte forma:

1. Registou-se o nº da colheita, data da colheita e peso;
2. Identificou-se um tubo 7,5ml e dois tubos *falcon* 50ml com o nº de colheita e colocou-se em suportes;
3. Em câmara de fluxo laminar, homogeneizou-se o concentrado leucos residual, cortar a tubuladura e verteu-se o conteúdo cuidadosamente para o tubo de *falcon* 50ml e registou-se o volume;
4. Com pipeta de *pasteur*, retirou-se cerca de 500µl para o tubo de 7,5ml e fechou-se;
 - 4.1 Homogeneizou-se convenientemente o tubo (ex. no vortex) e efectuou-se a determinação do hemograma;
5. Com uma seringa de 20ml, adicionou-se cerca de 10ml de soro fisiológico no saco do Concentrado Leucos residual, homogeneizou-se e verteu-se o conteúdo para o mesmo tubo *falcon*;
6. No tubo *falcon* 50ml, fez-se um volume total de 25ml, com soro fisiológico;
7. Método para juntar o *ficoll histopaque* e a amostra de concentrado leucos residual obtida no ponto 1.6:
 - 7.1 No segundo tubo *falcon* 50ml, adicionou-se 12,5ml de *ficoll histopaque*;

- 7.2 Inclinou-se o tubo *falcon* com o *ficoll histopaque*, de forma a fazer-se um ângulo de 45°;
- 7.3 Com auxílio de uma seringa de 20ml, verteu-se os 25ml de concentrado leucosidual, num fluxo muito lento e contínuo, sobre o *ficoll histopaque*;
- 7.4 Reposicionou-se o tubo e de forma cuidadosa, centrifugou-se a amostra;
- 7.5 Para centrifugar a amostra, utilizou-se um programa com 800g, durante 30 minutos e sem travão tanto na aceleração como na travagem, para não desfazer o gradiente;
8. Identificou-se outro tubo de *falcon* 50ml, com o n° *pool* (ex. *pool1*)
 - 8.1 Com o auxílio de uma micropipeta (1000µl), removeu-se o anel de linfócitos, por aspiração suave, lenta e contínua.
 - 8.2 Adicionou-se os linfócitos no tubo *falcon*
 - 8.3 No final da aspiração dos 4 anéis de linfócitos, efectuou-se a determinação do hemograma, de forma a verificar se os linfócitos foram convenientemente aspirados;
9. Centrifugou-se o tubo *falcon* com os linfócitos a 300g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente e com aceleração e travão elevado;
 - 9.1 Removeu-se e descartou-se o sobrenadante;
 - 9.2 Adicionou-se o plasma (PFC) até perfazer os 50ml e voltar a centrifugar;
 - 9.3 Voltou-se a remover e a descartar o sobrenadante;
10. Adicionou-se 1ml de PFC e colocar num agitador até que as células fiquem ressuspensas e efectuou-se o hemograma
11. Caso seja conveniente, repetir o ponto 1.10;

Preparação das da *pool* de leucócitos

1. Descongelou-se 2 plasmas AB e identificou-se as unidades e o peso;
2. Em câmara de fluxo laminar, transferiu-se aproximadamente 600ml de plasma para o saco de armazenamento;
3. Com o auxílio de uma seringa de 20ml, transferiu-se o volume do(s) tubo(s) com os linfócitos para o saco de armazenamento com o plasma;
4. Selou-se a tubuladura e deixou-se homogeneizar durante 15 minutos à temperatura ambiente.

5. Efectuou-se a contagem e procedeu-se à correcção dos linfócitos, caso haja necessidade.
6. Dividiu-se o conteúdo do saco de armazenamento, em três alíquotas de aproximadamente 200ml.

Tratamento das pools com linfócitos

Tratamento com o sistema de tratamento de redução de patogénios (PRT)

Mirasol®

1. Identificou-se a alíquota e todas as soluções a adicionar;
2. Transferiu-se 35ml de solução de riboflavina para o saco;
3. Removeu-se todo o ar residual do saco a iluminar/tratar;
4. Selou-se a tubuladura de saída, deixando uma pequena tubuladura (aprox. 1cm) à saída do saco;
5. Registou-se o peso final do saco;
6. Verificou-se a calibração da “*perform light calibration bag*”;
7. Inseriu-se os dados no Iluminador e efectuou-se a inactivação;
8. Verificou-se se o tratamento decorreu e terminou com sucesso.

Tratamento com o sistema de irradiação GammaCell 3000 Elan, 33Gy

1. Identificou-se a alíquota e todas as soluções a adicionar;
2. Transferiu-se 35ml de soro fisiológico para o saco a irradiar;
3. Removeu-se todo o ar residual do saco a irradiar;
4. Selou-se e registou-se o peso final do saco;
5. Colocou-se uma etiqueta de irradiação no saco;
6. Verificou-se se o ciclo de irradiação e a etiqueta ocorreu com sucesso.

Alíquota sem tratamento

1. Identificou-se a alíquota e todas as soluções a adicionar;
2. Transferiu-se 35ml de soro fisiológico para outra alíquota;
3. Removeu-se todo o ar residual do saco;
4. “Clampou-se” e registou-se o peso final do saco.

Activação dos linfócitos com o CD69

1. Removeu-se 50 ml da amostra controlo (não tratada) e das amostras tratadas (PRT/irradiação) para tubos *falcon*;
2. Centrifugou-se todos os tubos a 800g durante 5 minutos;
3. Removeu-se e descartou-se o sobrenadante
4. Ressuspendeu-se os linfócitos em 10 ml soro fisiológico;
5. Mediu-se a concentração de linfócitos e ajustou-se a concentração das células a 1×10^6 cel./ml
6. Para cada amostra tratada e não tratada, identificou-se tubos 7,5ml de 450µl de amostra com 50µl de PMA (*phorbol myristate acetate* 1000ng/ml);
7. Homogeneizou-se as amostras e incubou-se durante 4 horas em banho-maria a 37°C;
8. Adicionou-se por cada 50µl amostra com 10 µl da mistura contendo CD3-PC5; CD8- FITC, CD69-PE;
9. Deixou-se incubar à temperatura ambiente e em zona escura, durante 15 minutos;
10. Passaram-se as amostras citometro de fluxo e analisaram-se os resultados
 - a. No caso de amostras com baixo volume, adicionou-se 100µl de soro fisiológico.

Deixou-se correr cerca de 1000 eventos.