

**MARIO IVO SERINOLLI**

**Estudo do método da extração da camada  
leucoplaquetária na produção de hemocomponentes-  
Avaliação Clínica e Laboratorial**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutor em Medicina.



**São Paulo  
2001**

**MARIO IVO SERINOLLI**

**Estudo do método da extração da camada  
leucoplaquetária na produção de hemocomponentes\*  
Avaliação Clínica e Laboratorial**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutor em Medicina.

*Área de concentração:* Hematologia

*Orientador:* Prof. Dr. Pedro Enrique Dorhiac-Llacer

**São Paulo  
2001**

Cancel

*[Handwritten signature]*  
BIBLIOTECA  
FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

*[Handwritten notes]*  
USP  
7-11-01  
4020

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Serinolli, Mario Ivo  
**Estudo do método da extração da camada leucoplaquetária na produção de hemocomponentes : avaliação clínica e laboratorial / Mario Ivo Serinolli. -- São Paulo, 2001.**  
 Tese(doutorado)—Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica.  
 Área de concentração: Hematologia.  
 Orientador: Pedro Henrique Dorlhiac Llacer.

Descritores: 1.REPRODUTIBILIDADE DE RESULTADOS 2.MÉTODOS 3.TRANSFUSÃO DE COMPONENTES SANGÜÍNEOS/métodos 4.ENSAIOS CLÍNICOS CONTROLADOS

USP/FM/SBD-332/01

*Aos meus pais, **Isabel e João Serinoli**,  
pelo amor e incentivo ao longo da vida  
e que tanta falta me fazem*

*À  
minha mulher, **Marcia**,  
com amor,*

## AGRADECIMENTOS

Para que esta tese pudesse ser realizada recebi a colaboração de inúmeras pessoas, às quais desejo expressar o meu profundo agradecimento.

*Ao Prof. Dr. Pedro Enrique Dorthiac-Llacer*, orientador e amigo, pelo encorajamento nos momentos difíceis e apoio na minha vida profissional e principalmente pela confiança em mim depositada. Pelo incentivo para eu começar, apoio para continuar e paciência para terminar esta tese.

*Ao Prof. Dr. Dalton de Alencar Fischer Chamone*, pelo espírito empreendedor, pelo apoio e constante estímulo profissional.

*Ao Prof. Michel Jamra* pelos conselhos sempre úteis.

*À Prof.<sup>a</sup>. Dra. Diana Helena Benedeto Pozzi*, pelo respeito à vida acadêmica e pelas sugestões.

A todos os colaboradores do *Estoque, Fracionamento e da Agência Central da Fundação Pró-Sangue*, que com incansável trabalho e espírito cooperativo ajudaram a transformar uma idéia em realidade.

Aos colegas do *Ambulatório Transfusional da Fundação Pró-Sangue*, que se dispuseram a compreender meus propósitos e colaboraram na coleta de dados clínicos.

Aos colegas *Gisela Julião* e *André Luis Miotto*, o meu agradecimento especial, pela dedicação e empenho na coleta e tabulação dos dados.

À *Marcia Vaz*, *Cristina Strufaldi* e *Patrícia Sierra*, pela responsabilidade e seriedade na análise laboratorial dos hemocomponentes.

À *Luciana Alfredo* pelo apoio logístico.

Aos amigos *Alfredo Mendroni Junior*, *Nelson Tatsui*, *Youko Nukui*, *Maria Celina Ribeiro*, *Marcelo Gil Cliquet*, *Cyrillo Cavalheiro Filho*, *Roberto Abi Rached*, *Thelma Terezinha Gonzales*, *Carlos Roberto Jorge*, *Bruna Maria Ozenda Fontes*, *Eliana Perina Gomes*, *Francisco Carlos Almeida Gomes*, *André Luis Albiero*, *Sergio Bydlowski*, *Sandra Gualandro*, *Paulo Silveira*, *Frederico Dulley*, *Gracia Martinez*, *Lucia Dias*, *Nancy Salles*, *Silvana Navarro*, *Eduardo Jens* pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas da *Hematologia* e *Hemoterapia* pela cooperação e incentivo.

À *Mariana Cury* pela precisa análise estatística dos resultados deste trabalho.

Ao *Prof. Amândula* pela revisão gramatical e sugestões.

Aos meus *familiares*, pelo carinho e motivação.

Aos *Pacientes*, principal motivo deste trabalho e de minha escolha profissional.

5	<b>RESULTADOS</b> .....	109
5.1.	Resultados da primeira fase do estudo em que se utilizou o método clássico (PRP) para a obtenção de componentes.....	110
5.1.1.	Sangue total.....	110
5.1.2.	Concentrado de hemácias .....	111
5.1.3.	Plasma rico em plaquetas.....	113
5.1.4.	Concentrado de plaquetas.....	114
5.1.5.	Plasma fresco .....	115
5.2.	Validação do método automatizado da ECLP com o uso de bolsas "top and bottom" triplas em CPD e CPDA1 (placa reta) na primeira fase de centrifugação. Segunda fase do estudo.....	116
5.2.1.	Sangue total .....	116
5.2.2.	Concentrado de hemácias .....	118
5.2.3.	Plasma fresco .....	122
5.2.4.	Camada leucoplaquetária .....	124
5.3.	Comparação da placa reta com a placa côncava no extrator automático, para a obtenção de componentes sangüíneos coletados em bolsas "top and bottom" triplas em CPD e SAGM pelo método automatizado da ECLP e centrifugadas a 3390 g/10 min. Complementação da segunda fase do estudo.....	128
5.4.	Validação da produção de concentrado de plaquetas pelo método da ECLP a partir de 4 ou 5 unidades de CLP com o uso de placa reta ou côncava. Resultados complementares da segunda fase da pesquisa.....	135
5.5.	Validação da melhor força g/min e tempo de Centrifugação para a obtenção dos componentes sangüíneos coletados em bolsas quádruplas tipo "top and bottom" com CPD e SAGM. Terceira fase do estudo.....	141
5.5.1.	Sangue total .....	141
5.5.2.	Concentrado de hemácias .....	143
5.5.3.	Plasma fresco .....	147
5.5.4.	Camada leucoplaquetária .....	149
5.5.5.	Concentrado de plaquetas .....	151



5.6.	Comparação entre os componentes obtidos pelo método do PRP (tabela 1, página 112) e os obtidos pelo método da ECLP na centrifugação validada, utilizando-se de bolsas triplas (ECLPT) centrifugadas a 3390 x g/10 minutos (tabela 8, página 131) e bolsas quádruplas (ECLPQ) centrifugadas a 3788 x g/10 .....	154
5.6.1.	Sangue total .....	154
5.6.2.	Concentrado de hemácias .....	156
5.6.3.	Plasma .....	158
5.6.4.	Camada leucoplaquetária .....	159
5.6.5.	Concentrado de plaquetas.....	160
5.7.	Comparação entre o número de unidade de plaquetas perdidas por agregação pelos métodos do PRP e da ECLP .....	163
5.8.	Resultados do estudo clínico .....	164
5.8.1.	Comparação entre o grupo de pacientes .....	164
5.8.1.1.	Sexo .....	164
5.8.1.2.	Idade .....	165
5.8.1.3.	Patologias dos pacientes estudados .....	166
5.8.1.4.	Número de transfusões anteriores .....	167
5.8.1.5.	Número de reações adversas anteriores ao episódio transfusional estudado .....	168
5.8.2.	Comparação entre a incidência das reações adversas com os componentes (CH e CP) obtidos pelos métodos do PRP e da ECLP nos episódios transfusionais realizados nos grupos dos pacientes incluídos neste estudo.....	169
5.8.2.1.	Número de transfusões realizadas por episódio transfusional .....	169
5.8.2.2.	Reações transfusionais ao concentrado de hemácias.....	170
5.8.2.3.	Comparação entre o número de pacientes que receberam medicação prévia ao episódio de transfusão de concentrado de hemácias estudado no grupo da ECLP e do PRP .....	172
5.8.2.4.	Efeito da medicação na incidência de reações adversas nos dois grupos estudados.....	173

	5.8.2.5. Efeito do número de transfusões anteriores na incidência de reações adversas no episódio transfusional estudado.....	176
	5.8.3. Reações transfusionais ao concentrado de plaquetas .....	178
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>180</b>
7	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>201</b>
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>206</b>

## Lista de Quadros

<b>Quadro 1.</b>	Densidade e volume dos principais constituintes do sangue.....	23
<b>Quadro 2.</b>	Componente sangüíneo, parâmetros que devem ser avaliados, especificações, freqüência e quantidade que deve ser controlada .....27 , 28 e	29
<b>Quadro 3.</b>	Componente sangüíneo, parâmetros que devem ser avaliados, especificações, freqüência e quantidade que deve ser controlada (Portaria 121) .....	30
<b>Quadro 4.</b>	Correlação das diferentes rotações (RPM) utilizadas neste estudo e forças de centrifugação relativa .....	70
<b>Quadro 5.</b>	Densidade considerada para avaliação do volume do sangue total e seus componentes .....	93
<b>Quadro 6.</b>	Descrição das forças g/min utilizadas na primeira fase da centrifugação, do tempo de centrifugação e do número de bolsas de sangue utilizadas (tripas tipo TAB).....	95
<b>Quadro 7.</b>	Número de bolsas processadas em diferentes forças g/min na primeira e segunda fase de centrifugação para a validade do método da ECLP com a utilização de bolsas quádruplas tipo TAB.....	98
<b>Quadro 8.</b>	Tipo do componente sangüíneo, temperatura de armazenamento e situação especial de armazenamento .....	100

## Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Médias, desvios-padrão e mediana dos resultados de testes laboratoriais realizados em 88 unidades de sangue total (ST) e de seus componentes: concentrados de hemácias (CH), plasma rico em plaquetas (PRP), concentrado de plaquetas (CP) e plasma fresco (PF) coletados em bolsas triplas em CPDA-1 e fracionadas pelo método clássico (PRP, também denominado de primeira fase deste estudo)..... 112
- Tabela 2.** Resultados dos testes laboratoriais realizados em 98 unidades de sangue total, coletadas em bolsas triplas do tipo "Top and Bottom" para validação da força g/min e tempo de centrifugação a serem utilizados na primeira centrifugação do método automatizado de extração da camada leucoplaquetária (média e desvio-padrão)..... 117
- Tabela 3.** Resultados dos testes laboratoriais realizados em 98 concentrados de hemácias (CH) obtidos a partir de unidades de sangue total coletadas em bolsas triplas do tipo "Top and Bottom" pelo método automatizado para validação da força g/min e tempo de centrifugação a serem utilizados (média e desvio-padrão)..... 120
- Tabela 4.** Volume e recuperação de plasma em 98 unidades de plasma fresco obtidas a partir de unidades de sangue total coletadas em bolsas triplas em SAGM pelo método automatizado para validação da força g/min e tempo de centrifugação a serem utilizados (média e desvio-padrão)..... 123
- Tabela 5.** Resultados laboratoriais de testes realizados em 98 unidades de camada leucoplaquetária (CPL) obtidas a partir de bolsas de sangue total coletadas em SAGM pelo método automatizado para validação da força g/min e tempo de centrifugação a serem utilizados (média e desvio-padrão)..... 125
- Tabela 6.** Avaliação do pH de unidades de camada leucoplaquetária mantidas em temperatura ambiente e armazenadas por até 96 horas..... 127
- Tabela 7.** Médias e desvios-padrão dos resultados de testes laboratoriais realizados em 12 unidades de sangue total (ST) e de seus componentes: concentrados de hemácias (CH), camada leucoplaquetária (CPL) e plasma fresco (PF) obtidos por centrifugação a 3399 x g/10 min com o uso de extrator automático com placa reta ..... 129

<b>Tabela 8.</b>	Médias e desvios-padrão dos resultados de testes laboratoriais realizados em 20 unidades de sangue total (ST) e de seus componentes: concentrados de hemácias (CH), camada leucoplaquetária (CPL) e plasma fresco (PF) obtidos por centrifugação a 3399 x g/10 min com o uso de extrator automático com placa côncava .....	131
<b>Tabela 9.</b>	Resultados dos testes laboratoriais realizados em 52 conjuntos de 4 ou 5 unidades de camada leucoplaquetária (CPL) com o uso de placa reta ou côncava e em unidades de concentrados de plaquetas em diferentes força-g e tempo de centrifugação para validação da produção de concentrado de plaquetas pelo método automatizado com o uso de bolsa tripla (média e desvio-padrão).....	136
<b>Tabela 10.</b>	Avaliação do pH em conjunto de 4 unidades de camada leuco-plaquetária produzidas por centrifugação de 1339 x g/ 3 min e armazenadas por até 5 dias.....	140
<b>Tabela 11.</b>	Resultados laboratoriais de testes realizados em 215 unidades de sangue total coletadas em bolsas quádruplas em SAMG pelo método automatizado (média, desvio-padrão) .....	142
<b>Tabela 12.</b>	Resultados laboratoriais de testes realizados em 215 unidades de concentrado de hemácias obtidos a partir de bolsas quádruplas em SAMG pelo método automatizado (média, desvio-padrão) .....	144
<b>Tabela 13.</b>	Resultados laboratoriais de testes realizados em 215 unidades de plasma fresco obtidas a partir de bolsas quádruplas em SAMG pelo método automatizado(média, desvio-padrão).....	148
<b>Tabela 14.</b>	Resultados laboratoriais de testes realizados em 215 unidades de camada leucoplaquetária (CLP) obtidas a partir de bolsas quádruplas em SAGM pelo método automatizado (média, desvio-padrão).....	150
<b>Tabela 15.</b>	Resultados laboratoriais de testes realizados em 215 unidades de concentrado de plaquetas (CP) obtidas a partir de bolsas quádruplas em SAGM pelo método automatizado (média, desvio-padrão) .....	153
<b>Tabela 16.</b>	Distribuição dos pacientes por sexo quanto ao tipo de hemocomponente recebido por transfusão obtidos pelo método de plasma rico em plaquetas (PRP) ou pelo método da extração da camada leucoplaquetária (ECLP) .....	164

<b>Tabela 17.</b>	Distribuição dos pacientes por idade quanto ao tipo de hemocomponente recebido por transfusão obtidos pelo método de plasma rico em plaquetas (PRP) ou pelo método da extração da camada leucoplaquetária (ECLP).....	165
<b>Tabela 18.</b>	Distribuição dos pacientes por patologia quanto ao tipo de hemocomponente recebido por transfusão obtidos pelo método de plasma rico em plaquetas (PRP) ou pelo método da extração da camada leucoplaquetária (ECLP).....	166
<b>Tabela 19.</b>	Distribuição dos pacientes por número de transfusões anteriores à inclusão neste estudo no grupo dos pacientes do plasma rico em plaquetas (PRP) e no grupo da extração da camada leucoplaquetária (ECLP).....	167
<b>Tabela 20.</b>	Distribuição dos pacientes por número de reações transfusionais anteriores à inclusão dos pacientes neste estudo (grupo do PRP e no grupo da ECPL).....	168
<b>Tabela 21.</b>	Distribuição dos episódios de reação transfusional ao concentrado de hemácias quanto ao tipo de hemocomponente recebido por transfusão obtidos pelo método de plasma rico em plaquetas (PRP) ou pelo método da extração da camada leucoplaquetária ECLP).....	170
<b>Tabela 22.</b>	Distribuição dos tipos de episódio de reação transfusional ao concentrado de hemácias quanto ao método de obtenção do hemocomponente recebido por transfusão (método de plasma rico em plaquetas-PRP ou método da extração da camada leucoplaquetária-ECLP) .....	171
<b>Tabela 23.</b>	Distribuição dos episódios transfusionais por uso ou não de medicação prévia à transfusão de concentrado de hemácias quanto ao método de obtenção do concentrado de hemácias transfundidos (método do plasma rico em plaquetas-PRP ou método da extração da camada leucoplaquetária-ECLP).....	172
<b>Tabela 24.</b>	Distribuição dos episódios de reações transfusionais e uso ou não de medicação prévia à transfusão de concentrado de hemácias quanto ao método de obtenção do concentrado de hemácias transfundidos (método do plasma rico em plaquetas-PRP ou método da extração da camada leucoplaquetária-ECLP).....	174
<b>Tabela 25.</b>	Distribuição dos pacientes por número de transfusões anteriores à inclusão neste estudo e ocorrência de reações transfusionais no episódio estudado conforme método de obtenção do CH transfundido ( plasma rico em plaquetas-PRP e da extração da camada leucoplaquetária ECLP).....	177

<b>Tabela 26.</b>	Distribuição dos episódios de reações transfusionais à transfusão de concentrado de plaquetas quanto método de obtenção do hemocomponente transfundido (método do plasma rico em plaquetas-PRP ou método da extração da camada leucoplaquetária-ECLP).....	178
<b>Tabela 27.</b>	Distribuição dos tipos de episódios de reações transfusionais ao Concentrado de Plaquetas quanto método de obtenção do hemocomponente transfundido (método do plasma rico em plaquetas- PRP ou método da extração da camada leucoplaquetária-ECLP).....	179

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Início do processo. Coleta de sangue total em homogeneizador de sangue automatizado. Homogeneização contínua e pinçamento automático.....	73
<b>Figura 2.</b>	Sangue total coletado em bolsa tripla convencional, contendo anticoagulante CPDA-1 para processamento pelo método clássico.....	73
<b>Figura 3.</b>	Balanceamento das bolsas triplas convencionais em CPDA-1, contendo sangue total para a primeira fase da centrifugação da primeira fase (1730 x g por 4 minutos).....	73
<b>Figura 4.</b>	Bolsas triplas convencionais com sangue total na centrífuga refrigerada de grande porte (Sorvall RC3B, Kendro, EUA).....	74
<b>Figura 5.</b>	Bolsas triplas convencionais após centrifugação. Início da separação do plasma rico em plaquetas para uma das bolsas satélites com auxílio de extrator manual de plasma.....	74
<b>Figura 6.</b>	Término da separação do plasma rico em plaquetas para uma das bolsas satélites com auxílio de extrator manual de plasma .....	74
<b>Figura 7.</b>	Retirada do plasma pobre em plaquetas (plasma fresco congelado) a partir do concentrado de plaquetas agregados após a centrifugação (2490 x g por 12 minutos) com auxílio de extrator manual de plasma.....	75
<b>Figura 8.</b>	Concentrado de plaquetas agregadas em repouso de no mínimo 2 horas em temperatura controlada para desagregação espontânea .....	75
<b>Figura 9.</b>	Fluxograma do processamento de hemocomponentes pelo método clássico.....	76
<b>Figura 10.</b>	Bolsa tripla "TOP AND BOTTOM", contendo como anticoagulante CPD na bolsa de coleta e como solução aditiva SAGM na bolsa que armazenará o concentrado de hemácias .....	80
<b>Figura 11.</b>	Extração do plasma sobrenadante para uma das bolsas satélites do concentrado de hemácias para a bolsa contendo SAGM .....	80



<b>Figura 12.</b>	Camada leucoplaquetária em repouso para posterior centrifugação e retirada do concentrado de plaquetas.....	81
<b>Figura 13.</b>	CP-ECPL à esquerda e resíduo da camada leucoplaquetária à direita .....	81
<b>Figura 14a.</b>	Fluxograma do processamento de hemocomponentes pelo sistema "Top and Bottom" com o uso de bolsa tripla .....	82
<b>Figura 14b.</b>	Fluxograma do preparo de concentrado de plaquetas pelo método de extração da camada leucoplaquetária (ECLP), sistema "top and Bottom" com o uso de bolsa tripla.....	83
<b>Figura 15.</b>	Bolsa quádrupla "TOP AND BOTTOM", contendo como anticoagulante CPD na bolsa de coleta e SAGM como solução aditiva na bolsa que armazenará o concentrado de hemácias.....	86
<b>Figura 16.</b>	Da esquerda para a direita: Concentrado de hemácias, camada leucoplaquetária, bolsa satélite vazia e plasma fresco .....	86
<b>Figura 17a.</b>	Fluxograma do processamento de hemocomponentes pelo método de extração da camada leucoplaquetária (ECLP), sistema "Top and Bottom" com o uso de bolsa quádrupla .....	87
<b>Figura 17b.</b>	Fluxograma do preparo de concentrado de plaquetas pelo método de extração da camada leucoplaquetária (ECLP). Sistema "Top and Bottom" com o uso de bolsa quádrupla.....	88

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AABB	Associação Americana de Bancos de Sangue
ACD	ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose
ATP	adenosina trifosfato
CH	concentrado de hemácias
CLP	camada leucoplaquetária
CMV	citomegalovírus
CP	concentrado de plaquetas
CPD	citrato, fosfato e dextrose
CPDA-1	citrato, fosfato, dextrose e adenina-1
CH-PRP	concentrado de hemácias obtido a partir do plasma rico em plaquetas
CP-PRP	concentrado de plaquetas obtido a partir do plasma rico em plaquetas
CH-ECLP	concentrado de hemácias obtido a partir da extração da camada leucoplaquetária
CP-ECLP	concentrado de plaquetas obtido a partir da extração da camada leucoplaquetária
2,3 DPG	2,3-difosfoglicerato
DEHP	di-etil-hexil-ftalato
DP	desvio-padrão
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
ECLP	extração da camada leucoplaquetária
ECLPT	extração da camada leucoplaquetária em bolsas triplas
ECLPQ	extração da camada leucoplaquetária em bolsas quádruplas
FCR	força de centrifugação relativa
FDA	Agência de Controle de Alimentos e Drogas
HLA	antígeno de histocompatibilidade

HTLV-1	virus linfotrófico de células T humanas de tipo 1
IFN	interferon
IL	interleucina
Min	minuto
nvCJD	nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
PF	plasma fresco
PRP	plasma rico em plaquetas
PVC	policloreto de vinila
RANTES	substância secretada, expressa e regulada pela ativação dos linfócitos do tipo T normais
RFNH	reação febril não hemolítica
Rh	fator Rhesus
r.p.m	rotações por minuto
RT	reação transfusional
SAGM	salina, adenina, glicose, manitol
SCD	equipamento de conexão estéril
ST	sangue total
TAB	"top and bottom
TOTM	tri-2-etil-hexil-melitato
TNF	fator de necrose tumoral
TRALI	injúria pulmonar relacionada aos leucócitos

## RESUMO

Serinolli, M.I. **Estudo do método da extração da camada leucoplaquetária na produção de hemocomponentes – Avaliação clínica e laboratorial.** São Paulo, 2001. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Dentre os métodos para a obtenção de hemocomponentes destaca-se o método do plasma rico em plaquetas (PRP), o mais utilizado no Brasil, e o método da extração da camada leucoplaquetária (ECLP), muito utilizado na Europa. Este estudo tem por objetivo descrever, padronizar e validar o método da ECLP e compará-lo através de parâmetros laboratoriais e estudo clínico com o método do PRP. A metodologia do estudo constitui-se de quatro etapas. Na primeira foram coletadas 88 bolsas triplas CPDA1, sendo os componentes obtidos pelo método do PRP. Na segunda etapa validou-se o método da ECLPT automatizado com bolsas triplas CPD-SAGM tipo "top and bottom"(TAB), bem como a produção de plaquetas a partir de um conjunto de 4 e 5 unidades de CLP. Na terceira etapa do estudo validou-se o método da ECLPQ com bolsas quádruplas CPD-SAGM TAB e produção de CP a partir de uma unidade de CLP. O estudo clínico foi realizado na quarta etapa deste trabalho, após implantação na rotina do Hemocentro do método da ECLP escolhido por comparação dos estudos descritos na segunda e terceira etapas deste trabalho. Os resultados foram respectivamente para o PRP, ECLPT e ECLPQ: Hb total por unidade de CH:  $\mu=64,6\pm 6,3$  g/bolsa,  $\mu=58,4\pm 5,0$  g/bolsa e  $\mu=53,5\pm 8,6$  g/bolsa ( $p<0,05$ ); recuperação de hemoglobina no CH: 108,3 $\pm$ 4,3, 89,2 $\pm$ 9,5% e 90,5 $\pm$ 11,7 ( $p=0,0001$ ); leucócitos no CH:  $\mu=3,0\pm 0,9 \times 10^9$ ,  $\mu=0,8\pm 0,6 \times 10^9$  e  $\mu=0,5\pm 0,3 \times 10^9$  ( $p<0,05$ ); depleção de leucócitos no CH:  $\mu=85,2\pm 12,8\%$ ,  $\mu=76,8\pm 14,0\%$  e  $\mu=74,8\pm 14,6\%$  ( $p=0,0001$ ); volume de plasma:  $\mu=174,6\pm 26,3$  ml,  $\mu=203,9\pm 17,0$  ml e  $\mu=214,5\pm 22,1$  ml ( $p=0,0001$ ); recuperação de plasma:  $\mu=72\pm 3,9\%$ ,  $\mu=73,9\pm 2,4\%$ ,  $\mu=79,1\pm 6,2\%$  ( $p<0,05$ ); plaquetas no CP:  $\mu=7,3\pm 1,5 \times 10^{10}$ ,  $\mu=7,2\pm 1,3 \times 10^{10}$ ,  $\mu=6,8\pm 0,8 \times 10^{10}$  ( $p>0,05$ ); "swirling" do CP:  $\mu=3,0\pm 0,1$ ,  $\mu=2,6\pm 0,5$  e  $\mu=3,0\pm 0,0$  ( $p=0,0001$ ); pH no CP:  $\mu=7,4\pm 0,2$ ,  $\mu=6,9\pm 0,2$  e  $\mu=7,3\pm 0,1$ ; leucócitos no CP:  $\mu=36,1\pm 20$ ,  $9,1\pm 4,3 \times 10^6$  e  $\mu=1,1\pm 0,5 \times 10^6$  ( $p<0,0001$ ). Os resultados do estudo clínico demonstraram que 2,4% dos episódios de transfusão com CH-ECLP foram acompanhados de reações adversas vs 8,0% com CH-PRP ( $p=0,001$ ), resultando em "odds ratio" de 3,46 vezes (IC 95%, 2,34 a 5,12). Nos pacientes que receberam CP-ECLP apresentaram reações transfusionais em 11,8% vs 16,7% nos pacientes que receberam CP-PRP ( $p>0,05$ ). Concluímos que o sistema Optipress® com a utilização de bolsas TAB quádruplas permite adequada padronização e operacionalização em nosso meio, melhorando a qualidade dos componentes obtidos que possuem menor quantidade de leucócitos e plasma, proporcionando benefícios clínicos com menor incidência de reações adversas pós-transfusionais.

## SUMMARY

Serinolli, M.I. **Clinical and laboratory evaluation of buffy-coat removal method for hemocomponents production.** Sao Paulo.2001. Thesis (Ph.D). Universidade de Sao Paulo, Faculdade de Medicina.

Among the methods to obtain blood components detach platelet rich plasma (PRP), which is the most used in Brazil, and the buffy-coat removal (BC), widely used in Europe. The purpose of this study is not only to describe, standardize and validate the BC but also to compare its method with the PRP. This study had four phases. In the first one, 88 CPDA-1 triple blood units were collected and its components obtained by PRP method. In the second phase, BC automated system (Optipress™) using CPD-SAGM triple top and bottom (TAB) blood units was validated (BCT), as well as platelets concentrate (PC) production from pool of four or five buffy-coat units. In the third study phase, BC method with quadruple CPD-SAGM TAB blood units (BCQ) and PC production from one buffy-coat unit was validated. Clinical evaluation was performed in the fourth phase, after introducing the BC method in the routine of Hemocentro de Sao Paulo. Adverse transfusion reactions to blood components obtained from BC method were compared to those from PRP method. The results for PRP, BCT and BCQ were: total Hb per RBC unit:  $\mu=64.6\pm 6.3\text{g/unit}$ ,  $\mu=58.4\pm 5.0\text{g/unit}$  and  $\mu=53.5\pm 8.6\text{g/unit}$  ( $p<0.01$ ); percentage of hemoglobin recovery from a RBC unit:  $\mu=108.3\pm 4.3$ ,  $89.2\pm 9.5$  and  $90.5\pm 11.7$  ( $p=0.0001$ ); residual leukocytes in the RBC unit:  $\mu=3.0\pm 0.9 \times 10^9$ ,  $0.8\pm 0.6 \times 10^9$  and  $0.5\pm 0.3 \times 10^9$  ( $p<0.05$ ); leukocyte depletion in the RBC unit:  $\mu=85.0\pm 12.8\%$ ,  $\mu=76.8\pm 14.0\%$  and  $\mu=74.8\pm 14.6\%$  ( $p=0.0001$ ); plasma volume:  $\mu=174 \pm 26.3\text{ml}$ ,  $\mu=203.9 \pm 17.0 \text{ml}$  and  $\mu=214.5 \pm 22.1\text{ml}$  ( $p=0.0001$ ); plasma recovery:  $\mu=72\pm 3.9\%$ ,  $\mu=73.9\pm 2.4\%$  and  $\mu=79.1\pm 6.2\%$  ( $p<0.05$ ); platelets in platelet concentrates (PC):  $\mu=7.3\pm 1.5 \times 10^{10}$ ,  $\mu=7.2\pm 1.3 \times 10^{10}$  and  $\mu=6.8\pm 0.8 \times 10^{10}$  ( $p>0.05$ ); swirling of PC:  $\mu=3.0\pm 0.1$ ,  $\mu=2.6\pm 0.5$  and  $\mu=3.0\pm 0.0$  ( $p=0.0001$ ); pH in PC:  $\mu=7.4\pm 0.2$ ,  $\mu=6.9\pm 0.2$  and  $\mu=7.3\pm 0.1$ ; residual leukocytes in PC:  $\mu=36.1\pm 20.8 \times 10^6$ ,  $\mu=9.1\pm 4.3 \times 10^6$  and  $1.1\pm 0.5 \times 10^6$ . Clinical study's results showed that 2.4% of the transfusion episodes with BC-RBCs were accompanied of adverse reactions vs. 8% with PRP-RBCs ( $p=0.001$ ), resulting in "odds-ratio" of 3.46 times (CI 95%- 2.34 to 5.12). Patients that received BC-PC had transfusion reactions of 11.8% vs. 16.7% in the ones who received PRP-PC ( $p>0.05$ ). We conclude that the Optipress™ system with quadruple TAB blood units allows adequate standardize and use in our blood center, improving the quality of the components obtained because of lower quantity of leukocytes and plasma comparing to PRP method, providing clinical benefits with lower rate of posttransfusion adverse reactions.

## 1.INTRODUÇÃO

Atualmente, a literatura tem discutido extensivamente os métodos de obtenção de componentes sangüíneos com a menor quantidade possível de leucócitos<sup>1</sup>. Os leucócitos estão relacionados a diversos fatores indesejáveis de uma transfusão de sangue, tais como as reações febris não hemolíticas (RFNH), formação de anticorpos HLA, refratariedade plaquetária, transmissão de doenças virais, como o citomegalovírus (CMV) e o HTLV (vírus linfotrófico de células do tipo T humanas), reações enxerto versus-hospedeiro e aumento da incidência de infecções pós-operatórias, dentre outros<sup>2</sup>, havendo assim consenso sobre a importância da redução dos leucócitos nos componentes sangüíneos<sup>3</sup>, buscando-se métodos eficazes e de baixo custo para retirá-los ou mesmo inativá-los.

Os efeitos deletérios dos leucócitos em pacientes transfundidos são conhecidos desde o final da década de 50. Brittingham et al<sup>4</sup> reportaram que pacientes que recebem múltiplas transfusões podiam tornar-se imunizados pelos leucócitos e provavelmente também pelas plaquetas, sendo comum apresentarem repetidas reações febris. Demonstraram também, que a retirada da camada leucoplaquetária (CLP) poderia preveni-las. Em 1959, Chaplin et al<sup>5</sup> descreveram o método da

centrifugação invertida do sangue total (ST), utilizando uma bolsa tripla convencional. O sistema foi centrifugado com a bolsa principal invertida, sendo o concentrado de hemácias (CH) pobre em leucócitos escoado para uma das bolsas satélites. Contendo a camada leucoplaquetária, plasma e quantidade significativa de hemácias residuais, a bolsa principal foi novamente centrifugada, sendo 70ml do plasma sobrenadante utilizados para ressuspensão do concentrado de hemácias pobre em leucócitos e plaquetas e o restante transferido para a outra bolsa satélite. Esse método apresentava vantagem sobre o das hemácias lavadas, pois mantinha o sistema fechado portanto, livre da possibilidade de contaminação bacteriana, possibilitando armazenar as hemácias por até 3 semanas. No entanto, o método da centrifugação invertida apresentava como inconveniência o fato de ser muito laborioso, removendo até 70% dos leucócitos à custa de grande perda de hemácias (mais de 30%).

Meryman et al<sup>6</sup> relataram que pesquisa conduzida pela Associação Americana de Bancos de Sangue em 1981, através de questionário enviado a seus membros, demonstrou que o método mais utilizado para a leucoredução era a lavagem de hemácias: 445.685 unidades contra 87.310 por outras técnicas. Esse número representava 7,3% do total de concentrado de hemácias preparado para a transfusão. Em 1984, a Cruz Vermelha Americana distribuiu 45.000 unidades de hemácias lavadas e 33.000 unidades leucoreduzidas por centrifugação



invertida. A criopreservação ofereceu um caminho alternativo que logo passou a ser utilizado pelos clínicos, pois as hemácias deglicerolizadas apresentavam 90% de redução de leucócitos. Isto ocorria porque os leucócitos eram fragmentados durante o processo de congelamento e seus debris removidos por sucessivas lavagens, necessárias para se retirar o crioprotetor<sup>7</sup>. Em 1981, Gray et al<sup>8</sup> constataram que a maioria dos médicos que utilizavam hemácias congeladas o faziam motivados pela necessidade de componentes pobres em leucócitos. Empregando unidades convencionais de concentrado de hemácias lavadas com o uso de uma processadora automática, demonstraram que o produto possuía igual efetividade e menor custo.

Em 1977, Polesky<sup>9</sup> e Rock et al<sup>10</sup> em 1984 descreveram os métodos mais utilizados até então para a remoção da camada leucoplaquetária como a centrifugação invertida, a utilização de hemácias lavadas, hemácias deglicerolizadas após o descongelamento e o uso de filtros de microagregados. Esses métodos eram trabalhosos e pouco eficientes para a remoção de leucócitos, com grande perda de hemácias e depleção de leucócitos nem sempre adequada, o que ensejou o desenvolvimento de outras técnicas.

O conceito da moderna técnica de filtração específica de leucócitos surgiu na década de 70, com o desenvolvimento de filtros de

microagregados, desenhados especificamente para remover debris que, por sua vez estavam relacionados com a síndrome pós-cirurgia cardíaca (perda de memória, distúrbios visuais e disfunção renal) <sup>11 12 13</sup> e com a síndrome da angústia respiratória pós-traumática <sup>14 15</sup>. Os filtros de microagregados foram desenvolvidos para se retirar fragmentos de plaquetas, granulócitos e fibrina, com poros variando entre 20 e 120 micra<sup>11</sup>. Assim, tinham por finalidade reter partículas amorfas relativamente grandes e, não, remover células individuais. Com o desenvolvimento da medicina transfusional demonstrou-se que os microagregados não são tão patológicos quanto se pensava <sup>14 16 17</sup>. Entretanto, o uso de filtros para a retirada de microagregados proporcionou menor incidência de reações febris não hemolíticas <sup>18 19</sup> e conduziu os pesquisadores ao desenvolvimento de filtros específicos para a retirada de leucócitos.

Em 1962, Grenwalt et al.<sup>20</sup> descreveram a utilização de um filtro composto de fibras de nylon e lã fortemente empacotadas, que poderiam ser esterilizadas a gás e permitir boa redução de leucócitos. Diepenhorst et al., em 1972<sup>21</sup>, descreveram a quase completa remoção de todos os leucócitos (98%) de plaquetas (90%) e uma boa recuperação de volume de hemácias com a utilização de colunas preenchidas com fibras de nylon e lã fortemente empacotadas, ou fibras de acetato de celulose.

Outros estudos realizados demonstraram a eficiência dos filtros de leucócitos<sup>22 23 24</sup>.

Atualmente a utilização de filtros é considerada o método mais eficiente para a remoção de leucócitos. Com os produtos atuais é possível remover mais de 99% dos leucócitos, ou seja, obter redução da ordem de 3 a 4 logs<sup>25 26</sup>. Isto é suficiente para diminuir ou mesmo evitar as RFNH, aloimunização, refratariedade plaquetária<sup>27 28</sup> e transmissão de CMV<sup>29</sup>. A Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB) recomenda que 99% dos componentes filtrados (corresponde a uma unidade de CH e a 06 unidades de concentrado de plaquetas) contenham menos de  $5,0 \times 10^6$  leucócitos<sup>30</sup>, enquanto o Conselho Europeu sugere que 97% dos componentes filtrados estejam abaixo de  $1 \times 10^6$ .<sup>31</sup> Atualmente existem três tipos de filtração: a pré-estocagem, que pode ser feita "in line", onde um ou vários filtros são diretamente acoplados à bolsa de sangue; logo após a coleta e preparo dos hemocomponentes (24 a 48h após a coleta); e a pós-estocagem, também chamada de filtração à beira do leito<sup>32 33</sup>. O mais recomendado é que se faça a filtração pré-estocagem, evitando-se assim a permanência e a degradação dos leucócitos responsáveis pela produção de citocinas<sup>34</sup>. Com a filtração sendo realizada em laboratório, 1% dos componentes pode ser controlado conforme recomendação do FDA<sup>35</sup>. Estudos clínicos confirmam que o percentual de reações agudas, após transfusão de concentrado de

plaquetas (CP) não filtrado, foi superior a 35%<sup>36</sup>. Com filtração pós-estocagem foi de 25%; com a filtração pré-estocagem foi de 12,5%<sup>37 38</sup>.

Embora existindo há pelo menos 20 anos, a tecnologia de filtração de componentes teve grande impulso após pesquisas científicas divulgarem o envolvimento dos leucócitos na infectividade e produção de prions, mesmo antes do aparecimento clínico da nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD)<sup>39</sup>. Em 1998, o Reino Unido iniciou um programa de leucoredução, e a partir de 2000, 100% das bolsas de sangue coletadas passaram a ser filtradas<sup>1</sup>. Desde então, outros países europeus adotaram a técnica pelo mesmo motivo, como a Irlanda, Portugal, ou como a França<sup>40</sup>, para evitar a aloimunização<sup>41</sup>. Entretanto há controvérsias sobre a utilização universal de filtros de leucócitos<sup>42</sup>. Faltam evidências científicas que comprovem a prevenção da nvCJD pela remoção dos leucócitos<sup>43</sup>. Outra questão contrária à leucoredução universal é que a maior parte dos pacientes que recebem transfusões são aqueles eventualmente, acometidos por complicações no puerpério, cirurgias de câncer, cirurgias reparadoras, cirurgias eletivas e trauma. Além do mais apenas, 1% das transfusões de hemácias nesses pacientes resulta em RFNH, das quais apenas 20% recorrem<sup>44</sup>.

Antes do desenvolvimento dos atuais filtros de leucoredução, os europeus retiravam a CLP através de método descrito por Prins et al,

em 1980<sup>45</sup>. Esse método era menos laborioso e oneroso que os utilizados na época, como a centrifugação invertida, hemácias lavadas ou deglicerolizadas e o uso de filtros de microagregados. Após a centrifugação do sangue total com a bolsa em posição vertical, segregava-se a CLP após a retirada do plasma para uma bolsa satélite. A camada leucoplaquetária era separada das hemácias por meio de uma pinça utilizada em cirurgia gástrica, posicionada 2,5 cm da parte superior da bolsa, clampeando-a. Aproximadamente 75ml eram transferidos para outra bolsa, deixando as hemácias na bolsa principal livre da CLP. Conseguiram também extrair plaquetas da CLP, alcançando maior depleção de leucócitos em relação às plaquetas obtidas de plasma rico em plaquetas<sup>46</sup>. Com o aumento da freqüência de refratariedade plaquetária e o alto custo das plaquetas por aférese, procurou-se um meio alternativo de obtenção de CP com baixa contaminação leucocitária, que apresentasse menor custo e qualidade similar.

O grande passo no desenvolvimento da metodologia de obtenção de componentes sangüíneos pela extração da camada leucoplaquetária (ECLP) foi dado por Högman et al., no final da década de 80,<sup>47 48</sup> que patentearam as bolsas tipo "top and bottom" (TAB) e um equipamento automático controlado por fotocélulas, que separa o sangue total em CH, plasma pobre em plaquetas e CLP, de forma surpreendentemente mais rápida e prática. A separação dura em média

cerca de 13 minutos. Com um técnico, uma centrífuga e seis equipamentos, aproximadamente 30 unidades de sangue total poderão ser processadas em uma hora, ou seja, 30 unidades homem/hora. Comparado ao método utilizado por Pietersz et al.<sup>49</sup>, que retiravam a CLP manualmente, o ganho em produtividade foi importante. Quanto ao método do plasma rico em plaquetas (PRP), a produtividade é a mesma. Em nosso meio, o tempo de centrifugação total é de oito minutos (incluindo tempo de carga e descarga), sendo que um técnico pode supervisionar até seis extratores manuais em média, por cinco minutos, o que totaliza a capacidade de 30 unidades de sangue total por homem/hora.

Na América do Norte, os componentes sangüíneos são produzidos geralmente pelo método do PRP, conforme preconiza a Associação Americana de Bancos de Sangue desde a década de 60<sup>50</sup>. Isso envolve centrifugação inicial utilizando menor força *g* para a obtenção de CH e PRP, e maior força *g* para extração das plaquetas do PRP, o que resulta em plaquetas com níveis de leucócitos em torno de  $10^6$  por unidade e CH em torno de  $10^9$ . Heddle e Kelton<sup>51</sup> ponderam que não está claro se a redução de contaminação de leucócitos em 01 log, alcançada pelo método de extração da camada leucoplaquetária, tanto no CH como no CP, traduz-se em benefícios clínicos, reduzindo a incidência de reações transfusionais quando comparado ao método do PRP. Brandt<sup>1</sup>

sugere que a incidência de RFNH, após transfusão de plaquetas, é, na Europa, muito mais baixa do que a observada na América do Norte (1% vs 20%), e atribui a diferença ao método de produção utilizado na Europa, que resulta em menor quantidade de leucócitos.

Neste estudo, pretendemos comparar as características dos componentes obtidos pelo método do PRP com os resultantes pelo método de extração da camada leucoplaquetária (ECLP), utilizando bolsas TAB e extrator automático. Também, avaliaremos a incidência das reações transfusionais dos componentes obtidos por um e outro métodos. Com os resultados, pretendemos analisar as vantagens e desvantagens das duas metodologias, baseando-nos em dados laboratoriais e clínicos. A redução de leucócitos, não necessariamente por filtração, poderá beneficiar pacientes que necessitem de transfusões de sangue<sup>1</sup>. Brand et al<sup>1</sup> acompanharam 404 pacientes pós-cirurgia cardíaca e concluíram não haver diferença significativa na formação de anticorpos HLA entre o grupo que recebeu hemácias filtradas e o que recebeu hemácias sem a CLP. Houve baixa incidência de aloimunização. Menos de 155 pacientes formaram anticorpos ou aumentaram os títulos preexistentes. Não se encontrou aloimunização nos pacientes sem história prévia de gestação e/ou transfusão. A metodologia de ECLP pode ser a resposta para melhorar a qualidade das transfusões em nosso meio, exigindo menor quantidade de componentes filtrados e menor dispêndio de recursos

financeiros. Cabe salientar, que até a presente data, não existem regulamentos definidos pelo Ministério da Saúde que descrevam as especificações dos componentes obtidos pelo método de ECLP.

Deve-se ratificar que a utilização de componentes do sangue reduzidos da CLP não substituiu, quando necessário, o uso de filtros de poliéster para se reduzir a quantidade de leucócitos<sup>52</sup>. Neste caso, a filtração é feita a partir de uma quantidade menor de leucócitos existentes nos componentes obtidos, tornando mais eficiente a remoção dos leucócitos residuais pela utilização de filtros<sup>53</sup>. Assim, o presente estudo será importante para validar a técnica de extração da CLP em nosso meio e poderá ajudar as instituições interessadas em melhorias na qualidade de seus produtos sangüíneos, bem como auxiliar o Ministério da Saúde na regulamentação e especificação da técnica de produção de componentes sangüíneos pela extração da camada leucoplaquetária.



## 2.OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos gerais padronizar, descrever e validar a técnica de produção de componentes pelo método de remoção da camada leucoplaquetária e compará-lo com o método clássico de obtenção de componentes sanguíneos, também denominado método de extração do plasma rico em plaquetas. São seus objetivos específicos:

1. Analisar as características dos concentrados de hemácias obtidos pelo método do PRP e CLP quanto ao hematócrito, a quantidade de hemoglobina total por unidade e a capacidade de se recuperar a hemoglobina a partir de uma unidade de sangue total.

2. Comparar o nível de redução de leucócitos dos componentes sanguíneos obtidos pelo método clássico, ou método do plasma rico em plaquetas

(PRP), com os componentes obtidos pela remoção da camada leucoplaquetária (CLP).

3. Estudar possíveis diferenças na quantidade e qualidade das plaquetas obtidas a partir do plasma rico em plaquetas (PRP), de uma unidade leucoplaquetária ou de um conjunto de unidades leucoplaquetárias.

4. Verificar e comparar eventuais diferenças no volume e recuperação de plasma entre os dois métodos estudados.

5. Analisar a reprodutibilidade e a operacionalidade do método de produção de componentes pela remoção da camada leucoplaquetária, como alternativa ao método do PRP.

6. Estudar a incidência de reações transfusionais febris não hemolíticas e alérgicas em pacientes que receberam transfusão de CH e plaquetas obtidos pela remoção da camada leucoplaquetária e compará-la com os resultados obtidos pelo método clássico.

### **3.Revisão da literatura**

### 3.1 Histórico

A utilização de frações de sangue e plasma faz parte da rotina da medicina transfusional atual. Entretanto, foi no século XX, em especial com as guerras mundiais, que os métodos de separação do sangue evoluíram para dar um suporte necessário ao atendimento dos soldados feridos nas frentes de batalha<sup>54</sup>. Até a Primeira Guerra Mundial, a transfusão de sangue era geralmente realizada braço a braço, por procedimentos invasivos (anastomose: artéria do doador e veia do receptor) ou através de instrumentos como seringas, "impellor" ou o "gravitator" de Blundell.<sup>55</sup> Outro fator limitante era a coagulação do sangue.

Em 1914, Hustin<sup>56</sup> descreveu o uso de citrato de sódio e glicose como solução anticoagulante. Lewinshon<sup>57</sup>, em 1915, determinou a quantidade mínima de citrato necessária à anticoagulação, demonstrando a pouca toxicidade da solução em animais. Assim, a transfusão de sangue tornou-se viável com o desenvolvimento da anticoagulação e pôde ser utilizada com sucesso durante a Primeira Guerra Mundial<sup>58</sup>.

Na batalha de Cambrai, em 1917, usando frascos de vidro contendo a solução de Rous-Turner<sup>59 60</sup>, a primeira solução anticoagulante e ao mesmo tempo conservante, Robertson<sup>61</sup> transfundiu sangue armazenado de 10 a 26 dias. Tratava-se de uma solução que continha cloreto de sódio, isocitrato e glicose; porém, apresentava o inconveniente de exigir grande volume, geralmente na proporção de 1:1 com o sangue, mas foi, durante quase 25 anos, a única solução preservante disponível<sup>61</sup>. A solução de Rous-Turner permitiu as primeiras transfusões de sangue preservado durante a I Guerra Mundial, tendo sido utilizada até meados da II Grande Guerra<sup>62</sup>. Estima-se que cerca de 13 milhões de unidades de sangue preservado tenham sido transfundidas durante o conflito<sup>63</sup>. Apesar de ter sido transfundido em grande escala, notou-se que o sangue possuía limitações logísticas para uso em campo de batalha, principalmente em função do seu curto período de armazenamento, e pelo fato de requerer provas de compatibilidade antes da transfusão. Na época, já se evidenciava a necessidade de um substituto mais prático para essas situações, o plasma. Composto por água, sais e proteínas, o líquido plasmático tem, entre suas muitas funções, a propriedade de manter o nível da pressão sangüínea dentro da faixa da normalidade.

A necessidade de plasma para reposição de volume intravascular nos pacientes, durante as duas grandes guerras mundiais, alertou os médicos para a importância da separação dos constituintes do

sangue<sup>54</sup>. Permanecendo em repouso entre 24 e 48 horas, o sangue se separa espontaneamente em três camadas distintas: uma camada de células vermelhas, uma camada fina branco-leitosa, rica em leucócitos e plaquetas, e uma camada líquida, de cor âmbar, denominada plasma. O frasco contendo sangue era colocado em um ângulo de 45°, horizontalmente a uma mesa, para diminuir a distância em que as células devem mover-se, melhorando o tempo de sedimentação e facilitando a obtenção do plasma<sup>64</sup>.

O plasma foi primeiramente empregado como expansor volêmico na I Guerra Mundial<sup>65</sup>. Strumia popularizou seu uso clínico transfundindo-o rotineiramente em pacientes hipovolêmicos, em 1931<sup>66</sup>. John Elliot, chefe do laboratório do hospital norte-americano Rowa, na Carolina do Norte, após separar vários frascos de plasma, utilizou-os com sucesso em um paciente com ferimento perfurante no coração, colocando-o em condições cirúrgicas e salvando sua vida. Convencido de que o plasma poderia ser utilizado com maior freqüência e vantagem, por dispensar testes de compatibilidade, além de possuir maior durabilidade que o sangue, Elliot entusiasmou o diretor da Cruz Vermelha Americana, Dr. Willian De Kleine, a envolver-se no assunto<sup>67</sup>.

Movidas pela necessidade de enviar plasma liofilizado à Inglaterra para tratamento dos feridos em guerra, em agosto de 1940, a

Cruz Vermelha Americana e a "Blood Betterment Association" lançaram uma campanha denominada "Plasma para os Ingleses". Os laboratórios da Cruz Vermelha fracionavam o plasma coletado em Nova Iorque e enviavam-no para Londres. Logo, porém, descobriram-se as limitações desse procedimento, como a questão da contaminação bacteriana dos lotes de plasma. Dr. Drew foi o primeiro a detalhar os procedimentos de coleta, processamento, armazenamento e transporte do plasma para a Europa<sup>68 69</sup>. A partir da Segunda Guerra Mundial, com o desenvolvimento do método de Cohn<sup>70</sup>, em Harvard-EUA, e o grande sucesso alcançado com o uso do plasma liofilizado, deflagrou-se a produção em grande escala das soluções de albumina, imunoglobulinas e fator VIII, ampliando-se ainda mais a demanda por plasma.

Com a disponibilidade de soluções preservantes e o desenvolvimento de refrigeradores elétricos, tornou-se possível o aparecimento dos centros de armazenamento de sangue. O primeiro banco de sangue foi idealizado em Leningrado, em 1932, e o primeiro funcional surgiu em Barcelona<sup>71</sup>, em 1936, durante a Guerra Civil espanhola. Fantus organizou o primeiro banco de sangue nos Estados Unidos da América, no Cook County Hospital, em Chicago, em 1937<sup>72 73</sup>. A partir de 1940, o conceito de banco de sangue hospitalar já possuía raízes fortes. Várias cidades norte-americanas incluindo São Francisco, Miami e Cincinnati começaram a estruturar bancos de sangue comunitários,



que coletavam e processavam centralmente e distribuíam para os hospitais locais<sup>74</sup>. O fato, no entanto, é que o desenvolvimento dos bancos de sangue deu-se durante e após a Segunda Guerra Mundial, principalmente com a estruturação dos bancos de sangue da Cruz Vermelha Americana<sup>75</sup>.

Em 1943, Loutit e Mollison<sup>76</sup> introduziram a solução de ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose (ACD), que oferecia como vantagens minimizar o problema da caramelização da glucose durante o processo de esterilização e necessitar de menores volumes em relação à solução de Rous-Turner<sup>77</sup>. A necessidade de diminuir a lesão celular e de prolongar o tempo de armazenamento do sangue além de 21 dias conduziria mais tarde ao desenvolvimento das soluções de CPD<sup>78</sup> (citrato, fosfato e dextrose) e de CPDA-1<sup>79</sup> (citrato, fosfato, dextrose, adenina), sendo esta última uma das soluções mais empregadas para preservação de sangue até os dias de hoje, proporcionando armazenamento por até 35 dias.

Um grande passo para o desenvolvimento da terapia por componentes sangüíneos foi a introdução das bolsas plásticas de coleta nos bancos de sangue. Em 1949, a Cruz Vermelha Americana realizou estudos clínicos com bolsas plásticas de coleta de sangue em alguns hospitais. Entretanto foram necessários 10 anos para que o método introduzido por Carl Walter fosse utilizado como rotina nos bancos de

sangue<sup>75</sup>. O uso das bolsas plásticas tornou possível a centrifugação do sangue total, separando-o em componentes ( CH, plasma, plaquetas e crioprecipitado), possibilitando a reposição específica de hemocomponentes, e o aumento da produtividade dos serviços de hemoterapia<sup>75</sup>.

### 3.2 Princípios físicos da separação de células

O uso de sangue total raramente é indicado para atender às necessidades do paciente, ainda que este possua deficiências múltiplas. Além disso, as condições de armazenamento do sangue total e o tempo necessário para a realização dos testes laboratoriais obrigatórios impedem o aproveitamento de todos os seus componentes. Após 24 horas de estocagem do sangue total, entre 1° e 6°C, já não há mais plaquetas e leucócitos viáveis. Os fatores lábeis da coagulação, como o fator V e o fator VIII<sup>80</sup> diminuem suas atividades com o passar do tempo. Assim, as diferenças na estocagem e na meia vida de cada componente justificam sua separação. Os constituintes do plasma preservam-se melhor quando congelados; as plaquetas, em temperatura ambiente (20° a 24°C) sob agitação constante; as hemácias, em refrigeração entre 1° e 6°C<sup>81</sup>.

O princípio da sedimentação das células do sangue é determinado pelo tamanho da célula e pela sua densidade (**Quadro 1**, página 23).

**Quadro 1.** Densidade e volume dos principais constituintes do sangue.

Principais constituintes do sangue	Densidade média (g/ml)	Volume médio $10^{-15}$ litros
Plasma	1.026	
Plaquetas	1.058	16
Monócitos	1.062	740
Linfócitos	1.070	230
Neutrófilos	1.082	270
Hemácias	1.100	87

Outros fatores que influenciam a velocidade da sedimentação são a viscosidade do meio e o grau de flexibilidade das células. Esses últimos fatores, são temperatura dependentes, sendo ideal que a sedimentação ocorra a 20°C ou mais. Na primeira fase da centrifugação, a parte fluida é constituída de plasma e solução anticoagulante. Os leucócitos e as hemácias sedimentam-se mais rapidamente, pois possuem maior volume que as plaquetas. Na fase mais tardia da centrifugação, dependendo do tempo e da velocidade de centrifugação, a maioria dos leucócitos e hemácias concentram-se na parte inferior da bolsa, e o plasma rico em plaquetas, na parte superior. Quanto mais prolongada for a centrifugação, maiores serão a sedimentação de plaquetas e a suspensão dos leucócitos, pois este agora

se move em meio mais denso (hemácias). No final da centrifugação, o plasma livre de células encontra-se na parte superior da bolsa, e as hemácias, na parte inferior. As plaquetas postam-se no topo da camada de hemácias e os leucócitos, imediatamente abaixo, nos primeiros 10ml da camada de hemácias.

A escolha a ser feita refere-se à velocidade e ao tempo de centrifugação, que determinam a composição final do componente desejado. Se o plasma rico em plaquetas for o componente desejado, deve-se interromper a centrifugação antes que as plaquetas comecem a sedimentar. Centrifugações de menor velocidade permitem maior amplitude na variação do tempo. Se for o plasma livre de células, então a centrifugação mais pesada e prolongada permitirá a obtenção de plasma pobre em células e hemácias densamente compactadas. Assim, o processo de centrifugação deve ser planejado quanto à velocidade, tempo e ao tipo de centrífuga utilizada, que se possa obter os hemocomponentes desejados <sup>62</sup>.

É importante que o processo de obtenção de componentes seja validado para cada centrífuga. O tamanho do rotador, a velocidade e a duração da rotação são variáveis críticas na centrifugação. Sempre que se introduzir uma técnica de fracionamento deve-se testar a combinação

da melhor velocidade e o tempo de centrifugação que proporcionará as características do hemocomponente adequado para utilização. O tempo de centrifugação inclui o tempo de aceleração e o tempo da velocidade de rotação desejada, excluindo o tempo de desaceleração. Este último também deve ser controlado não sendo rápido o suficiente para suspender as células, nem lento, a ponto de atrasar o processo. Obviamente, a rotação preferida será aquela que propiciar os melhores resultados com a menor velocidade e o menor tempo. As centrífugas devem ser avaliadas periodicamente, possibilitando a verificação da acurácia dos parâmetros no tocante à temperatura, velocidade e tempo. Uma maneira prática de monitorar o processo de fracionamento é verificar, periodicamente em cada centrífuga, a qualidade dos componentes obtidos<sup>82</sup>. O Conselho Europeu e a Associação Americana de Bancos de Sangue recomendam o controle de qualidade de pelo menos quatro componentes por mês<sup>81,82</sup>.

### 3.3 Especificações dos componentes sangüíneos e a importância do controle de qualidade

O controle de qualidade também é de fundamental importância para se garantir que o processo de obtenção dos componentes sangüíneos tenha a menor variabilidade possível permitida por órgãos reguladores ou pelo conhecimento existente<sup>83</sup>. Define-se como controle de qualidade como o conjunto de testes operacionais que demonstrem que o produto atende às especificações requeridas. Esses testes são executados em parâmetros considerados fundamentais para se ter um produto com a qualidade desejada. A AABB possui padrões para todos os hemocomponentes<sup>30</sup>. O Conselho Europeu define o tipo de componente, suas especificações, a freqüência e a quantidade que deve ser controlada (**quadro 2**, páginas 27, 28 e 29). No Brasil, a Portaria 121 regulamenta os parâmetros que devem ser avaliados, as especificações, a freqüência e a quantidade de hemocomponentes a serem testados<sup>84</sup> (**quadro 3**, página 30).

**Quadro 2.** Parâmetros que devem ser avaliados, especificações, frequência e quantidade que devem ser controladas dos componentes sangüíneos.

Componente sangüíneo	Parâmetros que devem ser avaliados	Especificações	Frequência e quantidade a ser controlada
Sangue Total	Volume	405 a 495ml	1% das unidades coletadas. No mínimo 4 unidades por mês
	Hemoglobina	mínimo de 45 g por unidade	4 unidades por mês
	Percentual de hemólise	<0,8%	4 unidades por mês
Concentrado de hemácias	Volume	230 a 330ml	1% das unidades
	Hematócrito	65 a 75%	4 unidades por mês
	Hemoglobina	mínimo de 45 g/unidade	4 unidades por mês
	Percentual de hemólise	<0,8%	4 unidades por mês
	Leucócitos	$2,5$ a $3,0 \times 10^9$	4 unidades por mês
	Plaquetas	Depende do método de centrifugação	não é realizado
Concentrado de hemácias sem a camada leucoplaquetária	Volume	200 a 300ml	1% das bolsas coletadas
	Hematócrito	65 a 75%	4 unidades por mês
	Hemoglobina	mínimo de 43 g/unidade	4 unidades por mês
	Leucócitos	$<1,2 \times 10^9$	4 unidades por mês
	Percentual de hemólise	<0,8 % no último dia de armazenamento	4 unidades por mês
	Plaquetas	$<20 \times 10^9$	Não é realizado
Concentrado de hemácias sem a camada leucoplaquetária com solução aditiva.	Volume	Depende do sistema utilizado. Com a remoção da camada leucoplaquetária perde-se de 10 a 30ml do volume de hemácias.	1% das bolsas coletadas
	Hematócrito	0,50 a 0,70	4 unidades por mês
	Hemoglobina	Mínimo de 43 g por unidade	4 unidades por mês
	Leucócitos	$<1,2 \times 10^9$	4 unidades por mês
	Percentual de hemólise	<0,8 %	4 unidades por mês
	Plaquetas	$<20 \times 10^9$	Não é realizado

(cont.)



**Quadro 2.** Parâmetros que devem ser avaliados, especificações, frequência e quantidade que devem ser controladas dos componentes sanguíneos ( cont.)

Componente sanguíneo	Parâmetros que devem ser avaliados	Especificações	Frequência e quantidade a ser controlada
Concentrado de hemácias lavadas	Volume	Definido pelo sistema utilizado	Todas as unidades
	Hematócrito	0,65 a 0,75	Todas as unidades
	Hemoglobina	Mínimo de 40 g por unidade	Todas as unidades
	Percentual de hemólise	<0,8%	Todas as unidades
	Conteúdo protéico do sobrenadante final	<0,5 g por unidade (assegurar nível de IgA menor que 0,2 mg/unidade)	Todas as unidades
Concentrado de hemácias leuco-depletadas com a utilização de filtros (até 48 horas da coleta)	Volume	Retenção no filtro de no máximo 15% do volume original	Todas as unidades
	Leucócitos	Menos que $1 \times 10^6$ Em 90% das unidades ou $5 \times 10^6$ em 99% das unidades	1% das unidades
	Hemoglobina	Mínimo de 40 g por unidade	1% das unidades (no mínimo 4 unidades por mês)
	Percentual de hemólise	<0,8%	4 unidades por mês
Concentrado de Plaquetas de PRP	Volume	50 a 70ml	Todas as unidades
	Número de plaquetas*	$6,0 \times 10^{10}$	1% das unidades (no mínimo 10 por mês)
	Leucócitos residuais*	$< 2 \times 10^8$	1% das unidades (no mínimo 10 por mês)
	PH	6.5 a 7.4	1% das unidades (no mínimo 4 por mês)
	Fenômeno de "swirling"	Presente	Todas as unidades

(cont.)

**Quadro 2.** Parâmetros que devem ser avaliados, especificações, frequência e quantidade que deve ser controladas dos componentes sanguíneos (cont.).

Componente sanguíneo	Parâmetros que devem ser avaliados	Especificações	Frequência e quantidade a ser controlada
Concentrado de Plaquetas da CLP	Volume	> 40ml	Todas as unidades
	Número de plaquetas*	$6,0 \times 10^{10}$	1% das unidades (no mínimo 10 por mês)
	Leucócitos residuais*	$< 5 \times 10^7$	1% das unidades (no mínimo 10 por mês)
	pH	6,5 a 7,4	1% das unidades (no mínimo 4 por mês)
	Fenômeno de "swirling"	Presente	Todas as unidades
Concentrado de Plaquetas leuco-depletadas com a utilização de filtros (até 6 horas após o preparo)	Volume	Pouca ou nenhuma retenção de volume pelo filtro	Todas as unidades
	Número de plaquetas*	$6,0 \times 10^{10}$	1% das unidades (no mínimo 10 por mês)
	Leucócitos residuais*	$< 2 \times 10^5$ em 90% dos casos ou $< 8,3 \times 10^5$ em 99%	1% das unidades (no mínimo 10 por mês)
	pH	6,5 a 7,4	1% das unidades (no mínimo 4 por mês)
	Fenômeno de "swirling"	Presente	Todas as unidades
Concentrado de Plaquetas obtidas de aférese	Volume	40ml por $6,0 \times 10^{10}$	Todas as unidades
	Número de plaquetas*	$2 \times 10^{11}$ por unidade	1% das unidades (no mínimo 10 por mês)
	Leucócitos residuais*	$< 1,0 \times 10^9$ por unidade (com algumas máquinas de aférese se obtém quantidade residual de leucócitos bem menor que esta quantidade)	1% das unidades (no mínimo 10 por mês)
	pH	6,5 a 7,4	1% das unidades (no mínimo 4 por mês)
	Fenômeno de "swirling"	Presente	Todas as unidades
Plasma fresco congelado	Volume	Depende da técnica utilizada	Todas as unidades
	Fator VIII	0,7 UI por ml	Cada 2 meses -realizar a dosagem de fator VIII em um conjunto de 6 unidades com 1 mês de armazenamento e no último mês de armazenamento.
	Células residuais	Hemácias: $< 6 \times 10^9/L$ Leucócitos: $< 0,1 \times 10^9/L$ Plaquetas: $> 50 \times 10^9/L$	1% das unidades (no mínimo 4 unidades por mês)

\*em pelo menos 75% dos casos analisados

**Quadro 3.** Parâmetros que devem ser avaliados, especificações, frequência e quantidade que devem ser controladas dos componentes sanguíneos. (Portaria 121).

Componente sanguíneo	Parâmetros que devem ser checados	Especificações	Frequência e quantidade a ser controlada
<b>Sangue Total</b>	Volume	400 a 500ml	1%
	Hemoglobina	de 50 a 70 g por unidade	1%
	Percentual de hemólise	<0,8% no último dia de armazenamento	1%
<b>Concentrado de hemácias</b>	Volume	> 250ml	1%
	Hematócrito	60 a 80 %	1%
	Hemoglobina	de 50 a 70 g/unidade	1%
	Percentual de hemólise	< 0,8 % no último dia de armazenamento	1%
<b>Concentrado de Plaquetas de PRP</b>	Volume	De 50 a 70ml	1%
	Número de plaquetas*	$5,5 \times 10^{10}$	1%
	Leucócitos residuais*	$< 1,0 \times 10^8$	1%
	PH	> 6,0 em qualquer momento do prazo de validade do produto	1%
<b>Concentrado de Plaquetas por aférese</b>	Volume	200 a 350ml	1%
	Número de plaquetas*	$> 2,5 \times 10^{11}$	1%
	Leucócitos residuais*	$< 1,0 \times 10^7$ (depende do equipamento)	1%
	PH	>6,0 em qualquer momento do prazo de validade do produto	1%
<b>Plasma fresco congelado</b>	Volume	>170ml	1%
	Aparência	Límpida	Todas as unidades

\*em pelo menos 75% dos casos analisados

Reesink<sup>85</sup>, em um fórum internacional, refere que cada bolsa de sangue é equivalente ao conceito de lote utilizado na indústria farmacêutica, em função das características biológicas de cada doador, que podem variar substancialmente. Assim, cada unidade de sangue é um lote; e por ser um produto escasso e de difícil obtenção, a coleta de amostras para se analisar as especificações muitas vezes implica descarte das unidades. Mesmo assim, o autor afirma que a maioria dos centros realiza o controle de qualidade em 1% dos componentes e em 100% dos componentes leucoreduzidos. Outros realizam o controle de qualidade em um número de unidades sem significado estatístico.

Sweeney<sup>86</sup> (1998) afirma que, em geral, os testes de controle de qualidade dos componentes sangüíneos são realizados mensalmente, na quantidade de 4 a 10 unidades, chegando a 1 % dos componentes sangüíneos. Podem ser realizados continuamente ou em lotes, para facilitarem a operação do serviço. Dependendo do produto, 75%, 90% ou mesmo 100% devem estar dentro dos padrões adequados. Para garantir a confiabilidade estatística necessária, ampliar o número de amostras pode ser impraticável pois poderia haver prejuízo no abastecimento de sangue aos hospitais. Outra dificuldade que aponta é a variabilidade das técnicas de contagem celular com equipamentos automáticos ou quando se utilizam hemocitômetros. O autor conclui que o

controle de qualidade dos componentes sangüíneos requerido pelas agências regulatórias não é suficiente para assegurar a estabilidade do processo de produção de componentes sangüíneos e que o aumento do número de amostras analisadas deve ser considerado sempre que se introduzirem modificações no processo de produção.

A Associação Americana de Bancos de Sangue considera os testes de controle de qualidade um dos componentes do sistema de qualidade, que engloba um programa amplo de garantia de qualidade que permeia toda a organização e proporciona elementos para o seu melhoramento contínuo, seja de seus processos e produtos, seja do relacionamento com os seus clientes. O sistema de qualidade da AABB é compatível com o sistema de qualidade da ISO 9000, sendo considerado um passo inicial importante para serviços que pretendam obter essa certificação. Os elementos essenciais desse sistema são: organização, pessoal, equipamentos, fornecedores, controle do processo, inspeção final e armazenamento; documentação e registros; gerenciamento de erros e acidentes; avaliação ou auditorias internas e externas; melhoria contínua do processo; instalações e segurança. A implantação dos 10 elementos essenciais da AABB assegura menor variabilidade ao processo de produção dos componentes sangüíneos e garante a obtenção e distribuição de componentes dentro das especificações desejadas<sup>30</sup>.

### 3.4 Método do PRP versus Método da ECLP

Com o desenvolvimento dos bancos de sangue e o emprego de bolsas plásticas em coleta de sangue, na década de 60, o método da separação de sangue pelo plasma rico em plaquetas (PRP) já era amplamente utilizado e considerado padrão em todo o mundo<sup>75</sup>. Isso durou cerca de 20 a 25 anos, quando surgiu na Europa outra metodologia, a da ECLP<sup>9</sup>. Atualmente nos Estados Unidos, o método do PRP é usado pela grande maioria dos bancos de sangue.<sup>87</sup> Preconizado pela Associação Americana de Bancos de Sangue<sup>81</sup>, o método consiste na produção de componentes sangüíneos a partir da centrifugação inicial leve de 2000 x g por 3 minutos de uma unidade de ST, obtendo-se os componentes CH e PRP. Centrifugando-se o PRP novamente a 5000 x g por 5 minutos, obtém-se o componente CP e plasma rico em fatores da coagulação.

O PRP foi utilizado no começo da década de 60 para tratamento de manifestações hemorrágicas de pacientes trombocitopênicos. Naquela época, o CP era obtido a partir do PRP (CP-PRP) mantido sob refrigeração, ocorrendo lesão irreversível nas

plaquetas. O problema foi resolvido quando se começou a processar o sangue e o PRP em temperatura ambiente (22°C), mantendo-os em repouso por 30 a 60 minutos antes de se obter o CP<sup>88</sup>.

O Ministério da Saúde descreve as especificações dos componentes sanguíneos obtidos por esta técnica<sup>84</sup>.

A metodologia clássica do PRP possui diversas limitações, entre elas a de manter, após centrifugação inicial com menor força g, em torno de 20% do plasma total e grande parte dos leucócitos (2,5 a 3,0 x 10<sup>9</sup>) no CH. Há perdas de 20 a 30% das plaquetas no CH e outros 5 a 10% após a segunda centrifugação com maior força g, resultando em recuperação de 60 a 75% das plaquetas.<sup>89</sup> A centrifugação com maior força g, ativa maior número de plaquetas, aumentando a proporção de unidades agregadas que não devem ser utilizadas em transfusão<sup>89</sup>. Para minimizar o problema, a AABB recomenda que as unidades de plaquetas fiquem em repouso por 60 minutos antes de serem colocadas sob agitação<sup>30</sup>. Quanto à quantidade, recomenda que 75% das unidades possuam mais que 5,5 x 10<sup>10</sup> de plaquetas. Assim, como os glóbulos vermelhos, as plaquetas também possuem grande quantidade de leucócitos, pois para maximizar a quantidade de plasma, a extração manual do PRP é realizada até a fronteira mais próxima das hemácias, ou seja, a CLP.

Já era conhecido que a existência de leucócitos no CH relacionava-se às RFNH em alguns pacientes<sup>4</sup>. Na década de 70 havia a preocupação de se obter produtos com menor quantidade de leucócitos a fim de se evitar tais reações. Polesky<sup>89</sup>, em seminário da AABB, descreve vários métodos para a redução de leucócitos nos hemocomponentes como medidas efetivas para a diminuição de RFNH. Schned e Silver<sup>90</sup> estudaram e compararam quatro métodos de redução de leucócitos no CH: a utilização de filtros de microagregados em bolsas de ST centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos, de onde se retiraram os microagregados imediatamente antes da transfusão; a técnica da centrifugação invertida onde, por força gravitacional, 80% das hemácias são retiradas e transferidas para outra bolsa, deixando a maioria dos leucócitos na bolsa principal; hemácias pobres em CLP (após centrifugação normal, retiram-se o plasma e a CLP); e hemácias congeladas e deglicerolizadas. Os pacientes foram separados em dois grupos: 361 que receberam 2.235 unidades de componentes pobres em leucócitos com antecedente de RFNH prévia e 922 que receberam 12.326 unidades de componentes pobres em leucócitos. Os autores concluíram que a técnica de utilização de filtros de microagregados era tão efetiva quanto à da centrifugação invertida e superior à da retirada da CLP. Enquanto que com a utilização de filtros de microagregados há perda de 5 a 7% de hemácias, nas outras duas técnicas, a perda varia de 20 a 40%. Já a utilização de



hemácias descongeladas e deglicerolizadas acusou menor incidência de RFNH, pois o número de leucócitos presentes nas hemácias descongeladas é bem menor (depleção de 75 a 90% dos leucócitos) se comparado à retirada de microagregados pela utilização de filtros de 40  $\mu$  (depleção de 50 a 60%).

Em 1986, Meryman e Hornblower<sup>7</sup> publicaram que os dois métodos mais utilizados para a redução de leucócitos nas hemácias à época eram o método da centrifugação inversa (em sistema fechado), que resulta em excessiva perda de hemácias e grande número de leucócitos residuais ( $1 \times 10^9$ ) e o da lavagem manual ou em processadora automática, que também deixa grande quantidade de leucócitos ( $0.5 \times 10^9$ ). Ambos, por serem realizados em sistema aberto diminuem a meia vida do CH para 24 horas. Sabia-se que esses níveis de leucócitos residuais não eram suficientes para impedir RFNH em pacientes aloimunizados<sup>8</sup>. Perkins et al.<sup>9</sup> estimavam que o número mínimo de leucócitos para evitar a maioria desse tipo de reação seria de  $0,5 \times 10^9$ . Utilizando esse padrão, a Cruz Vermelha Americana encontrou que 27% das hemácias lavadas em processadoras automáticas e 17% das hemácias lavadas manualmente em solução salina estavam fora dos padrões adotados. Meryman e Hornblower<sup>8</sup> chamam a atenção para a grande quantidade de perdas de hemácias nos métodos de depleção de

leucócitos utilizados como rotina, sugerindo que a utilização de filtros de microagregados em hemácias a 4° C seria mais efetiva, prática e econômica, pois a perda de hemácias seria menor. Rock et al<sup>10</sup>, no Canadá, encontraram resultados melhores quando compararam a quantidade residual de leucócitos em vários métodos utilizados (centrifugação invertida com a retirada da CLP –  $0,22 \times 10^9$ , a utilização de filtros de microagregados –  $0,19 \times 10^9$ , utilização de lavadora automática –  $0,21 \times 10^9$  e hemácias descongeladas e deglicerolizadas –  $0,13 \times 10^9$ ). A recuperação de hemácias variou de 62%, com o método da centrifugação invertida, a 85% com as hemácias descongeladas e deglicerolizadas. Snyder e Bookbinder<sup>11</sup> reafirmaram o papel futuro da utilização dos filtros de microagregados na prevenção de RFNH.

Insatisfeitos com a qualidade dos componentes obtidos pelo método clássico, que produzia CH com grande quantidade de leucócitos, freqüentemente maior que  $10^9$ , os europeus seguiram outro caminho<sup>87</sup>. Baseando-se em conhecimento adquirido nas décadas de 60 e 70, de que as plaquetas e os leucócitos formam agregados nas unidades de ST e em CH, centraram atenção na remoção da CLP<sup>9, 10</sup>. A formação desses microagregados (constituídos por plaquetas, leucócitos e fibrina) foi considerada a causa potencial de bloqueio dos capilares pulmonares, diminuindo a oxigenação, principalmente em pacientes que recebiam transfusão maciça. Prins et al.<sup>45</sup> removeram a CLP com a intenção de

diminuirem a formação de microagregados. Högman et al.<sup>92</sup>, estudando o armazenamento do CH com a utilização de soluções aditivas pobres em proteínas (solução de adenina, glicose e salina), encontraram que as enzimas liberadas pelos leucócitos produziam hemólise no CH armazenado. Lieden e Hiden<sup>93</sup> descrevem que em um hospital sueco de médio porte, após se utilizar o sistema proposto por Högman e Johansson<sup>94</sup> (hemácias pobres em CLP), houve diminuição da incidência de RFHN de 3,11% para 1,42%.

A necessidade de plasma como matéria-prima para a produção de fator VIII e a obtenção de CH de melhor qualidade foi determinante na escolha do método de produção de componentes sangüíneos na Suécia no começo da década de 70<sup>95</sup>. Assim, utilizando-se maior força (g) na centrifugação de ST, obtém-se maior quantidade de plasma pelo método da extração da CLP (ECLP) do que pelo método clássico (PRP). A centrifugação inicial com menor força g, utilizada no método do PRP mantém aproximadamente 20% do plasma no CH. Já com o método da ECLP, pode-se obter acima de 70 a 80ml de plasma adicional<sup>95</sup>. CH com solução aditiva SAGM, (salina, adenina, glicose e manitol), armazenados por 42 dias, tiveram sobrevida na circulação acima de 75%, quando experimentos com hemácias marcadas com cromo radioativo foram realizados por Högman et al.<sup>47</sup>.

Na Inglaterra em 1969, Cleghorn<sup>96</sup> passou a obter CP a partir de várias unidades de CLP. Um grupo holandês, Pietersz et al.<sup>46,49,97 98</sup>, publicou artigos demonstrando que a CLP poderia ser excelente fonte para a produção de plaquetas. Rock et al.<sup>99</sup> foram os primeiros a demonstrar a viabilidade do armazenamento das plaquetas em meio não-protéico. Com o progressivo uso de hemocomponentes derivados da CLP, pesquisou-se qual seria o melhor meio para preservar as hemácias, tendo sido descrito que, quando o CH era estocado em SAGM, o conteúdo de microagregados era menor do que quando em CPDA<sup>100</sup>. Vários pesquisadores também dedicaram-se à investigação de meios para armazenamento de hemocomponentes e tipos especiais de bolsas para o preparo de CP a partir da CLP<sup>101 102</sup>.

Eriksson e Hogman<sup>103</sup>, em 1990, já demonstravam que CP obtidos pela técnica da ECLP e preparados em solução aditiva poderiam ser estocados por 6 dias se existisse adequada relação volume de CP e superfície da bolsa que permitissem boa troca gasosa. Conseguiram melhores resultados com 4 unidades do que com 6 unidades de CLP. Preparada após repouso de 6 a 12 horas do ST com CPD em temperatura ambiente, a CLP foi mantida de 8 a 12 horas sem agitação. Maior quantidade de plasma na CLP foi utilizada para manter o hematócrito entre 40 e 50%, com o intuito de suprir as células com glicose e bicarbonato em quantidade suficiente. A seguir, as 4 unidades de CLP

foram unidas, por sistema de conexão estéril, a 300ml de solução aditiva (sódio, cloreto de potássio, citrato, fosfato e manitol). Após a segunda centrifugação, resultou em CP com  $3,16 \pm 0,52 \times 10^{11}$  com percentual de recuperação de plaquetas de  $77,3 \pm 8,3\%$ . Keegan et al<sup>104</sup>, em 1992, realizaram estudos comparando CP preparados por PRP com aqueles a partir da ECLP utilizando-se  $In^{111}$  e  $Cr^{51}$ , confirmando a equivalência de qualidade do PC e a diminuição do conteúdo de leucócitos pelo método da CLP.

Em trabalho publicado em 1990, Pietersz et al<sup>105</sup> descreveram a utilização do método da ECLP manualmente desde 1975, no banco de sangue de Amsterdam (Cruz Vermelha Holandesa). Bolsas quádruplas com SAGM com quatro corpos, sendo uma principal e outras três conectadas a tubos de transferência na parte superior foram empregadas. A bolsa principal continha anticoagulante CPD (citrato, fosfato, dextrose), outra continha solução aditiva SAGM e em outras duas eram transferidos, por compressão, pela ordem, o plasma e a CLP. A transferência da CLP, antes do surgimento dos separadores semi-automáticos ou automáticos, era realizada colocando-se uma pinça entre a camada compacta de hemácias e a CLP. Então, a CLP era transferida para a bolsa satélite e a solução aditiva para a bolsa principal, juntando-se às hemácias. Com as outras bolsas satélites, era produzido CP, a partir da CLP, ou crioprecipitado, a partir do plasma. Nesse experimento foram

utilizados 2960 g por 10 minutos, a 22°C, para a separação em CH, CLP e PL. Para o processamento da CLP utilizaram-se 380 g por 6 minutos, a 22°C.

Pietersz et al<sup>106</sup>, para diminuir a quantidade de macro-agregados, melhorarem o rendimento das plaquetas e evitarem o processamento do sangue em horas irregulares, passaram a armazenar o ST por um período de 20 a 24 horas, em temperatura ambiente. Foram utilizadas unidades de resfriamento rápido contendo butano-1,4-diol, de forma que o sangue atingisse a temperatura de 20°C em aproximadamente 2 horas (normalmente o sangue demora de 10 a 16 horas para atingir a temperatura ambiente). Conservado por 24 horas em temperatura ambiente, o ST não apresentou efeitos deletérios em hemácias e plaquetas, a não ser a constatação de importante diminuição dos níveis de 2-3 DPG nas hemácias. A atividade do fator VIII foi de 80% do valor inicial após 24 horas, não havendo contaminação bacteriana no sangue armazenado durante esse período. Em seguida, o ST foi fracionado em CH, CLP e PF ( plasma fresco). O rendimento das plaquetas, embora numericamente superior ( $66 \pm 5\%$  de recuperação), não foi diferente estatisticamente ( $p > 0,05$ ) quando comparado aos das plaquetas obtidas com o ST armazenado em temperatura ambiente por 3 horas ( $63 \pm 8\%$ ). Heaton<sup>107</sup> demonstrou que, apesar de o armazenamento por 24 horas do sangue total não diminuir o rendimento das plaquetas e

da recuperação de fator VIII, a diminuição de 2-3 DPG é importante e a sobrevivência das hemácias após a transfusão é menor.

Högman et al <sup>47</sup> considerando laborioso o método da remoção manual da CLP, descreveram uma técnica de processamento automático de componentes sanguíneos utilizando bolsas plásticas patenteadas com o nome de Optipac<sup>®</sup> (Fenwall, Baxter Division, Deerfield, EUA), também denominado de "top and bottom" (TAB) e um novo tipo de extrator de plasma, denominado de Optipress<sup>®</sup> (Fenwall, Baxter Division, Deerfield, EUA). O sistema Optipac<sup>®</sup> consiste em uma bolsa com duas saídas na parte inferior e uma saída na parte superior, contendo 63ml de CPD. Uma das saídas inferiores é conectada a um tubo para coleta do sangue do doador e a outra saída é conectada a uma bolsa contendo 100ml de solução aditiva SAGM. A saída superior está conectada, por meio de um tubo, em Y a duas bolsas vazias. O equipamento Optipress<sup>®</sup> consiste em uma placa móvel, controlada por fotocélula, que exerce pressão progressiva, transferindo as hemácias para as bolsas conectadas inferiormente com SAGM, e o plasma para as bolsas conectadas superiormente. Assim, a CLP tende a permanecer na porção central da bolsa principal. Com essa técnica automática utilizando as bolsas TAB, houve melhora na produtividade quando comparada ao método manual de ECLP utilizando bolsas quádruplas convencionais.

O sistema descrito foi testado em dois laboratórios na Suécia<sup>95</sup>, onde foram comparadas as características dos CH obtidos por centrifugação leve inicial (menor força g) com as dos CH obtidos com centrifugação pesada (maior força g inicial). Verificou-se que as unidades obtidas por centrifugação pesada removeram aproximadamente 80% dos leucócitos originais presentes no ST. O teste de sobrevivência das hemácias autólogas marcadas com cromo radioativo foi satisfatório, após 42 dias de armazenamento. Houve hemólise pouco superior às hemácias obtidas por centrifugação leve após 6 semanas de armazenamento, sendo inferior a 0,8%. Não houve formação de macroagregados; a dosagem de fibrinopeptídeo A, da atividade da calicreína e do sistema proteolítico e as alterações morfológicas das hemácias, foram menores quando comparada aos CH obtidos por centrifugação leve. O consumo de glicose, a diminuição de pH e do 2,3 DPG foram normais para o tempo de armazenamento.

Bertolini et al.<sup>108</sup> compararam a qualidade dos CP obtidos pelo método da ECLP (CP-ECLP) com os obtidos pelo método do PRP (CP-PRP). Os CP-ECLP foram preparados pela centrifugação a 5000 x g por 5 minutos do ST (450ml de sangue coletado em 63ml de CPD aos quais foram adicionados 100ml de SAGM) após 2 horas da coleta. A CLP foi mantida durante a noite em agitação constante a 6 ciclos por minuto,



entre 20 a 24°C. Seis unidades de CLP foram conectadas pelo dispositivo de conexão estéril a uma bolsa de 600ml de policloreto de vinila(PVC), contendo 300ml de Plasmalite A® (Baxter, EUA). A mistura da CLP com a solução foi centrifugada a 1000 x g por 7 minutos, e o sobrenadante (CP) transferido para uma bolsa de poliolefina (PL-732-Baxter, EUA). Para comparação, os CP-PRP também foram preparados com a solução de Plasmalite A® em mistura de 4 unidades em bolsa de poliolefina. A intenção era verificar se a solução sintética ou a forma de armazenamento influenciavam as análises realizadas. Os resultados com os CP-ECLP foram melhores quando comparados aos CP-PRP, tendo demonstrado boa atividade oxidativa metabólica, maior concentração de ATP, maior percentual de morfologia discóide, melhor resultado nos testes de agregação e menor atividade das plaquetas, confirmada pela menor expressão dos grânulos alfa da membrana protéica-140 (GMP-140).

Fijnheer et al<sup>109</sup> encontraram resultados similares quando estudaram e compararam a ativação das plaquetas dos CP-PRP com as dos CP-ECLP. As plaquetas produzidas a partir do PRP apresentavam maior percentual de morfologia esférica, maior liberação de beta-tromboglobulina e maior expressão dos seguintes marcadores de ativação: complexo glicoprotéico IIb/IIIa, GMP 140 e de uma glicoproteína

lisossomal de 53KDa. Porém, após dois dias de armazenamento não havia diferença da atividade das plaquetas obtidas pelo PRP e pela ECLP.

Um estudo em que as lesões de estocagem de CP-ECLP foram analisadas bioquimicamente (fator plaquetário-4, desidrogenase láctica, beta-tromboglobulina) considerou, na época que a CLP não poderia ser empregada como fonte para a produção de CP<sup>110</sup>. Já Boomgaard et al.<sup>111</sup> além de prepararem hemocomponentes a partir da ECLP, utilizaram dois diferentes tipos de filtros de leucócitos e não encontraram efeitos deletérios na função, metabolismo ou ativação plaquetária em quaisquer dos métodos avaliados. Outro estudo analisou a liberação do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), um importante mitógeno estocado nos grânulos alfa, nos CP-PRP e pelo CP-ECLP, concluiu que o conteúdo de PDGF diminui durante o preparo e armazenamento dos PC pelos dois métodos, sendo mais acentuado nos obtidos a partir do PRP<sup>112</sup>.

Uma das desvantagens do método da ECLP é o menor rendimento na obtenção de plaquetas, quando comparado ao do PRP<sup>113</sup>. Esse problema pode ser resolvido conforme experimentos de Kretschmer et al<sup>114</sup>. Quando eles mantiveram o ST em repouso por uma hora, antes do processamento, e a CLP em descanso por um período de 90 minutos seguido de homogeneização manual, o rendimento do CP foi menor ( $4,2 \times 10^{10}$  plaquetas por unidade, em um conjunto de 6 unidades de CLP).

Substituindo a homogeneização manual da CLP por agitação mecânica por 30 minutos, o rendimento foi melhor ( $7,2 \times 10^{10}$  plaquetas por unidade). Mantendo a CLP em repouso por 2 horas e após utilizar o agitador mecânico, obtiveram rendimento de até  $7,8/1,4 \times 10^{10}$  plaquetas por doador. Os resultados foram similares quando a CLP foi armazenada entre 3 e 12 horas à temperatura ambiente. Eriksson et al.<sup>103</sup> conseguiram rendimento de  $8,0 \times 10^{10}$  plaquetas por doador, mantendo o ST em repouso por 4 horas antes de se iniciar o processamento e 12 a 16 horas de repouso para a CLP. Boeri et al.<sup>115</sup> concluíram que a CLP pode ser mantida a 22° C por um período pouco superior a 12 horas, sem alterar a qualidade das plaquetas armazenadas por 5 dias. A possibilidade de se armazenar a CLP por um período não muito superior a 12 horas facilita a logística de trabalho no banco de sangue. Klüter et al.<sup>116</sup> descrevem que as plaquetas obtidas da CLP armazenada em repouso por um período de 24 horas resultou em aumento da ativação plaquetária, aumento do fator 4 plaquetário e da interleucina-8.

Manter o ST 6 a 8 horas de repouso melhora o rendimento dos CP-PRP<sup>117</sup>. A estimulação *in vitro* das plaquetas, após a sangria do doador, tem sido sugerida como explicação da melhora do rendimento na quantidade de plaquetas obtidas após longo período de repouso da CLP antes da preparação de plaquetas<sup>118</sup>. É importante assinalar que a CLP contém grande quantidade de células (hemácias, leucócitos e plaquetas)

que produzem ácido láctico e CO<sub>2</sub>, quando permanece em repouso por 24 horas em temperatura ambiente. Assim a bolsa que contém a CLP deve permitir a troca gasosa<sup>119</sup>. Outra questão fundamental é a possibilidade de crescimento bacteriano. Högman<sup>113</sup> argumenta que quando se preparam CP-ECLP, esta técnica possui as seguintes vantagens: período de incubação do ST e da CLP, onde os leucócitos fagocitam possíveis bactérias presentes pela contaminação do sangue proveniente da área de punção venosa; menor número de leucócitos no produto final (CP) onde, por desintegração, pode haver liberação de bactérias presentes nos fagócitos. Por outro lado, o risco de contaminação bacteriana presente nos concentrados de plaquetas conduziu o FDA a regulamentar a utilização do conjunto de plaquetas armazenadas entre 20 e 24° C em um período máximo de 4 horas após o preparo<sup>120</sup>.

Com o desenvolvimento da automação, o método da ECLP é atualmente amplamente utilizado na Europa<sup>121</sup>. Os componentes obtidos por essa metodologia possuem características distintas dos componentes obtidos pelo método clássico (PRP). Estudo<sup>89</sup> envolvendo 12 centros de transfusão comparou as características dos componentes obtidos pelo método da ECLP com o do PRP. Todos os centros participaram voluntariamente do estudo realizado entre janeiro e setembro de 1994. Em cada um dos centros foram coletadas 100 bolsas de ST, com exceção de um, onde foram coletadas 10 bolsas a mais para se resolverem resultados

discordantes. As unidades foram coletadas em um período de 90 dias e processadas em CH, CP e PF, conforme o método utilizado e padronizado em cada centro de transfusão. Amostras de sangue foram coletadas no final de cada doação e nos vários estágios de preparação dos componentes sangüíneos. Na análise dos CP-ECLP, 100 conjuntos de CLP foram analisados, requerendo coleta adicional de bolsas de sangue total. Neste último caso, amostras foram coletadas para análise, antes e após o preparo dos concentrados de plaquetas. Amostras do sangue do doador e dos componentes sangüíneos foram coletadas em tubos com EDTA e a contagem de células realizada em equipamento automático, nas diluições apropriadas para cada caso, ou manualmente quando fora dos limites do equipamento. As amostras dos componentes sangüíneos foram coletadas a partir dos segmentos obtidos dos tubos coletores, de transferência ou por conexão estéril de bolsas satélites. A contagem de plaquetas foi realizada um dia após a produção dos CP, sendo a contagem de células no CH realizada nos dias 5, 15 e 25 após a coleta. As análises laboratoriais foram realizadas nos centros que participaram do estudo, que também enviaram um questionário informando: como as bolsas foram homogeneizadas durante a coleta (manual ou por equipamento automático); o tempo de coleta (se monitorado por alarme ou não); o peso (medido por balança após a coleta ou por equipamento automático durante a coleta); anticoagulante utilizado; bolsa utilizada; configuração das bolsas; se a primeira centrifugação era realizada em até

8, 16 ou 24 horas após a coleta, em que temperatura a bolsa de sangue total era armazenada; as condições da primeira centrifugação (tempo, força g e desaceleração); método de separação (manual ou automático e obtenção do PRP ou plasma); remoção da CLP (manual ou automática, retenção da CLP na bolsa principal utilizando sistema "TAB" ou por expressão para uma bolsa satélite utilizando o sistema de bolsas quádruplas convencional); o volume da CLP (volume das hemácias e plasma); tempo e temperatura de armazenamento da CLP (<8hs ou 16-24 horas a 22<sup>o</sup> C); CP obtidos de uma unidade de PRP/CLP ou de um conjunto de CLP (1 ou 4 ou 6 unidades de CLP); diluição da CLP com plasma ou solução aditiva; as condições da segunda centrifugação (tempo, força g e desaceleração). Nesse estudo, os autores concluíram que, apesar da existência de padrões aplicáveis à produção dos componentes sanguíneos, existe grande variabilidade nas etapas intermediárias, resultando em processos e produtos com características finais diferentes. Três centros utilizavam o método do PRP, e nove o da ECLP. Dos nove centros, dois separavam a CLP manualmente, enquanto os outros sete utilizavam equipamentos automáticos, sendo que três as bolsas TAB. Todos os centros utilizaram soluções aditivas como AS (adenina e salina) e SAGM. O volume final dos CH-PRP variou de 296 a 349ml de volume total, 155 a 179ml de hemácias, 41 a 77ml de volume residual de plasma,  $0,97 \times 10^9$  a  $2,6 \times 10^9$  de leucócitos. Com o método da ECLP, o volume do CH variou de 275 a 303ml, 153 a 186ml de hemácias,

4 a 45ml de volume residual de plasma,  $0,57 \times 10^9$  a  $1,2 \times 10^9$  de leucócitos. Os centros que utilizavam o método clássico apresentavam em média 21% do plasma original no CH, contra 7,5% com as bolsas quádruplas convencionais e 6% com bolsas TAB. Os autores concluíram que os centros que utilizam o método do PRP possuem maior quantidade de plasma e leucócitos no CH. Dos centros que utilizaram o método da ECLP, três que usaram bolsas TAB possuíam menor quantidade de plasma e de leucócitos. A quantidade residual de leucócitos foi em média de  $7,03 \times 10^8$  para as bolsas TAB e  $10,37 \times 10^8$  com as bolsas convencionais para extração da CLP. Com o uso das bolsas TAB, 38% das unidades possuíam contagem de leucócitos menor que  $5 \times 10^8$  comparada aos 5% dos centros que utilizavam bolsas convencionais. Ainda no mesmo estudo multicêntrico, foram comparadas as características dos CP-PRP e CP-ECLP. Nos centros que obtiveram plaquetas de uma CLP, 56% das unidades possuíam menos que  $5,5 \times 10^{10}$  plaquetas. A média de plaquetas obtidas de uma CLP foi de  $5,4 \pm 1,7 \times 10^{10}$  por doador, que foi significativamente menor que as plaquetas obtidas de 4 a 6 unidades de CLP ( $7,0 \pm 1,2 \times 10^{10}$  por doador,) ou das plaquetas obtidas pelo método do PRP ( $7,3 \pm 2,2 \times 10^{10}$  por doador). Assim, quando se obtém esse produto pela mistura de várias unidades de CLP (4 a 6), a recuperação de plaquetas ( $75 \pm 9\%$ ) é maior quando se obtém plaquetas de uma CLP ( $66 \pm 21\%$ ). A quantidade de plaquetas obtidas de uma mistura de 4 CLP variou de 2,78 a  $3,32 \times 10^{11}$ , enquanto

que as obtidas de uma mistura de 6 CLP variou de  $3,6$  a  $4,3 \times 10^{11}$ , o que corresponde à quantidade de plaquetas existentes em uma unidade de aférese ( $3,0 \times 10^{11}$ ). A quantidade de leucócitos residuais foi maior nos CP-PRP ( $10^7$  a  $10^8$ ) do que nos CP obtidos a partir de uma unidade de CLP ( $10^6$ ) ou da mistura de CLP ( $10^7$ ).

Wildt-Eggen et al<sup>122</sup> compararam a quantidade de leucócitos residuais em CH preparados com bolsas quádruplas SAGM e em CH preparados com bolsas TAB. As bolsas quádruplas SAGM foram processadas com o equipamento Compomat<sup>®</sup>(modelo G4-NPBI, Holanda) e as bolsas TAB com o equipamento Optipress<sup>®</sup>(modelo I-Baxter, EUA). As amostras foram coletadas antes e depois da remoção da CLP, e os leucócitos contados por citometria de fluxo. Concluíram que todas as unidades de CH obtidas estavam dentro dos parâmetros recomendados pelo Conselho Europeu. O percentual de leucócitos residuais foi menor nos concentrados de hemácias obtidos com as bolsas TAB quando comparado aos das bolsas quádruplas SAGM, respectivamente de 18% e 43% ( $p < 0,001$ ). Os autores referem que os linfócitos T, B e os monócitos residuais nas hemácias também eram menores (2%) em bolsas TAB que nas hemácias obtidas com as bolsas quádruplas normais (25%). A perda de hemácias na CLP, nos dois sistemas utilizados, foi de 10 a 15%. Os autores justificam o resultado, pois com as bolsas quádruplas, a CLP é



retirada após o plasma pela parte superior da bolsa, ficando maior quantidade de leucócitos retidos no material plástico durante o trajeto, o que não ocorre com as bolsas TAB, pois a CLP permanece na bolsa principal.

Pieterz et al.<sup>123</sup> associaram o método de obtenção de CP-ECLP com filtração pré-estocagem utilizando um filtro denominado Autostop<sup>TM</sup> CLP, padronizando um método semi-automático, contendo mais que  $240 \times 10^9$  plaquetas; com níveis de leucócitos residuais  $< 1 \times 10^6$ , podendo com essa estratégia aumentar o tempo de estocagem dos CP por até 9 dias. As unidades de CLP foram obtidas pela utilização das bolsas TAB e do equipamento automático Compomat<sup>®</sup> (NPBI/Fresenius) que é programado para produzir a CLP com aproximadamente 50ml de volume e hematócrito de 45%. Cinco bolsas ABO idênticas de CLP e uma unidade de plasma (200ml) foram conectadas por sistema de conexão estéril a uma bolsa de 300ml capaz de formar 6 ligações. O produto obtido, em torno de 450ml, foi centrifugado a 1200 rpm por 8,3 minutos (345 g) e o PRP foi transferido para a bolsa de poliolefina (1.000ml) passando por um filtro denominado Autostop<sup>®</sup>-CLP, que automaticamente cessa a filtração quando as células vermelhas o alcançam.

A maior vantagem do método da ECLP é que o baixo número de leucócitos residuais é suficiente para prevenir a maioria das RFNH, devido à presença no receptor de aloanticorpos leucocitários<sup>124</sup>. Engelfriet e Reesink<sup>120</sup> referem que um centro de transfusão decidiu não utilizar o método da ECLP, em função das perdas de células vermelhas na camada leucoplaquetária. Essas perdas eram maiores quando o CH pobre em CLP era depletado de leucócitos pela utilização de filtros, sendo as perdas de células vermelhas consideradas substanciais. Aproximadamente 20 a 25ml de hemácias (10% do sangue doado) e mais de 90% das plaquetas e leucócitos permanecem na CLP. Em geral, há correlação entre a quantidade de hemácias presentes na CLP e a quantidade de plaquetas e leucócitos. Quanto menor a quantidade de hemácias, menor a quantidade de leucócitos na CLP e menor a depleção de leucócitos no CH<sup>87</sup>.

As plaquetas contêm vários mediadores, dentre estes, as citocinas. A liberação e acúmulo destas citocinas, fator plaquetário 4, beta-tromboglobulina e RANTES (substância secretada, expressa e regulada pela ativação dos linfócitos do tipo T normais), durante a estocagem dos CP, pode ser responsável pelas RFNH<sup>125</sup>. Kluter et al.<sup>126</sup> encontraram citocinas interleucina-2, IFN-gama e TNF-alfa em CP preparados a partir de conjunto de CLP, embora sem sinais de ativação linfocitária. Dentre as interleucinas, a IL-6 e o TNF-alfa<sup>127</sup> têm elevada correlação com a incidência de RFNH em CP, estando em níveis

indetectáveis nos CP produzidos a partir da CLP<sup>128</sup>. Em estudo conduzido por Flegel et al.<sup>129</sup>, observou-se que CP-ECLP podem ser virtualmente livres de citocinas (IL-1beta, IL-6, IL-8 e TNF) durante cinco dias de estocagem, sendo também desnecessária a filtração para se reduzir a exposição do receptor às citocinas.

Oksanen et al.<sup>130</sup> estudaram 86 transfusões em pacientes com doenças hematológicas e compararam a frequência de reações transfusionais (RFNH, reações urticariformes, reações pulmonares e outras) com dois tipos de CP-ECLP, sendo que um grupo de CP foi filtrado antes de ser estocado (CLP1) e outro filtrado 3 a 4 dias após o preparo (CLP3). Os pacientes receberam, alternadamente, de forma aleatória, as plaquetas CLP1 ou CLP3. Desta forma, os mesmos pacientes foram utilizados como grupo controle. Esse estudo foi comparado a outro realizado pela mesma equipe, onde 23 pacientes receberam 46 transfusões de CP-PRP e 12 pacientes receberam 23 transfusões de CP filtrados. Não houve diferença na incidência de reações adversas entre o grupo de pacientes que receberam CLP1 e CLP3, mas as plaquetas CLP1 e CLP3 causaram menor número de reações adversas e, quando ocorreram foram mais leves, em relação às do grupo de pacientes que receberam CP-PRP filtrados ou não. As RFNH ocorreram em 4,6% das transfusões (17 pacientes) e as reações urticariformes ocorreram em 21% (29 pacientes). Não foram observadas reações pulmonares. Os

concentrados de plaquetas CLP1 filtrados no primeiro dia apresentaram maior índice de incremento plaquetário que as unidades CLP3.

Dzieczkowski et al.<sup>131</sup> relataram que o número de RFNH e de aloimunização após transfusões exclusivas de hemocomponentes leuco-reduzidos diminuí, muito embora não seja completamente evitado. Já Goodnough et al.<sup>132</sup>, utilizando filtros de leucócitos de primeira geração (Pall-50) não encontraram diferença na prevalência de reações transfusionais pré e pós-implementação de CP filtrados.

### 3.5 Importância da leucoredução

Aloimunização e refratariedade plaquetária são complicações secundárias à transfusão da grande quantidade de leucócitos presentes nos hemocomponentes<sup>133 134</sup>. O risco da aloimunização é influenciado não só pela quantidade, como também pelo tipo de leucócito presente. Células mais imunogênicas são aquelas que expressam os antígenos HLA classe II, presentes em grande quantidade nos monócitos, linfócitos B e células dendríticas. A pouca expressão de antígenos HLA classe II nas plaquetas e nos linfócitos T, torna essas células menos imunogênicas.<sup>135</sup> Saarinen et al<sup>136</sup>, em experimento utilizando componentes pobres em CLP e em seguida filtrados (filtros de acetato de celulose), obtiveram CH com níveis de leucócitos da ordem de  $10^5$ , com menos de 2% de células que apresentavam antígenos HLA classe II (monócitos e células B). Os CP utilizados tinham ao redor de  $10^4$  leucócitos por unidade, sendo que menos de 4% destes eram monócitos e linfócitos B. Comparando o efeito da utilização desses produtos em pacientes com diagnóstico de leucemia, anemia aplástica ou tumores sólidos da infância, verificaram que nesse grupo de pacientes não houve nenhum caso de refratariedade plaquetária.

No grupo que recebeu componentes não leucoreduzidos, houve 11 casos de refratariedade, em um total de 21 pacientes (52,3%).

Oksanen et al<sup>137</sup> encontraram resultados semelhantes aos encontrados pelo grupo de Saarinen<sup>136</sup>. Obtendo componentes pobres em leucócitos com as mesmas características, estudaram pacientes com leucemia aguda. As perdas após a filtração de plaquetas recém-preparadas foram de 14% e 24% nas plaquetas armazenadas. No grupo controle utilizaram CP-PRP com níveis de leucócitos da ordem  $10^8$  por unidade e incidência de 6,7% de aloimunização. Esses níveis foram menores do que os descritos em literatura, que variam de 31 a 93% de aloimunização e aproximadamente 23% de refratariedade plaquetária. Concluíram que a aloimunização por antígenos HLA e a refratariedade plaquetária podem ser completamente evitada. Os métodos requeridos para a redução de leucócitos abaixo de 1 milhão de células são efetivos, porém, a utilização dos filtros requer padronização adequada e rígido controle de qualidade.

Em outra pesquisa Oksanen et al<sup>138</sup> estudaram o impacto do uso de componentes pobres em leucócitos na recuperação hematológica e no prognóstico dos pacientes portadores de Leucemia Mielóide Aguda, concluindo que os efeitos desses componentes influenciavam favoravelmente na recuperação hematopoética da medula, no consumo de

sangue e componentes, na ocorrência de infecções sérias e na sobrevivência dos pacientes. Os componentes usados nas transfusões possuíam as seguintes características: CH pobres em CLP e filtrados com níveis de leucócitos na ordem de  $10^5$ , e CP-PRP, filtrados com níveis de leucócitos de  $10^4$ . No grupo controle foram utilizados CH pobres em CLP e CP-PRP.

A quantidade residual de leucócitos nos componentes celulares também está relacionada com a transmissão de citomegalovírus (CMV) aos receptores de transfusão de sangue<sup>29</sup>. Quando presente na circulação sangüínea, o citomegalovírus encontra-se dentro do citoplasma dos leucócitos. A redução da quantidade de leucócitos diminui acentuadamente os riscos da transmissão do citomegalovírus, assim como o vírus Epstein-Barr e o vírus linfotrófico de células T humana (HTLV)<sup>139</sup>. Quanto às bactérias, estudos de Hogman et al.<sup>140</sup> indicam que o mecanismo de fagocitose pelos leucócitos é importante na eliminação de organismos viáveis.

Essas observações também estimularam pesquisas sobre os efeitos da redução leucocitária na diminuição de contaminação bacteriana presente nos componentes sangüíneos. Goldman et al.<sup>141</sup> dizem não haver estudos clínicos conclusivos demonstrando a eficácia da redução de leucócitos na freqüência de reações por contaminação bacteriana. Innerhofer et al.<sup>142</sup>, estudando pacientes submetidos à cirurgia ortopédica

não contaminada, tendo recebido transfusão de hemocomponentes com redução da CLP (autólogo ou alogeneicos) ou sem transfusão, encontraram que a transfusão de hemocomponentes CLP-reduzidos está associada ao aumento da incidência de infecção pós-operatória.

Quando pretendemos evitar as RFNH, o número de leucócitos em uma unidade de componente sangüíneo não deve ser superior a  $5 \times 10^8$ . Para a redução de aloimunização por antígenos HLA e a transmissão de CMV, o número residual de leucócitos não deve ser superior a  $5 \times 10^6$ . O método mais eficiente para a redução de leucócitos é a utilização de filtros de adsorção que removem até 99% do número de leucócitos<sup>1</sup>. Tendo em vista esses fatos, discute-se a filtração irrestrita de todos os componentes celulares<sup>2</sup>. O maior obstáculo a essa conduta seriam os custos<sup>143</sup>. Balducci et al.<sup>144</sup> concluíram que a utilização rotineira de filtros para pacientes com leucemia mielóide aguda oferece menor custo quando comparado à sua não utilização

Não somente os leucócitos estão implicados na incidência de reações adversas à transfusão de sangue. A quantidade residual de plasma nos componentes sangüíneos está diretamente relacionada a reações alérgicas<sup>145</sup>, anafiláticas<sup>146</sup>, ao passo que a injúria pulmonar aguda está relacionada à transfusão (TRALI)<sup>147</sup>. As reações alérgicas urticariformes são relativamente comuns. Estima-se sua incidência em



1,1% a 3,9%<sup>14</sup>. As reações anafiláticas graves possuem frequência muito baixa, variando de 1 para 20.000 a 1 para 47.000 transfusões. A TRALI possui frequência variável de 1 para 5.000 a 1 para 15.000 transfusões<sup>145</sup>.

Quanto ao efeito potencialmente imunomodulatório clinicamente significativo em receptores de transfusão, permanece ainda uma questão a ser resolvida. Esse efeito parece estar associado à transfusão de leucócitos presentes em hemocomponentes, sendo ainda dose-relacionado. Inúmeros estudos já foram publicados a respeito, a maioria observacionais<sup>148 149 150</sup>. Mesmo dentre os estudos controlados randomizados realizados, estes não são conclusivos<sup>151 152 153</sup>, parecendo que um grupo seletivo de pacientes estaria sujeito a um maior risco do efeito imunomodulatório que outros. Recentemente, publicou-se estudo prospectivo em que foi demonstrado que transfusões alogênicas tendem a prolongar o estado de ativação do sistema imune (TNF-alfa, IL-2, neopterin e linfólise mediada por células) ainda que se empreguem CH filtrados<sup>154</sup>. Entretanto, a redução de leucócitos dos hemocomponentes não deve ser retardada, até que essas evidências se confirmem<sup>155</sup>.

#### 4. METODOLOGIA

Neste estudo, realizado entre março de 1998 e maio de 1999 na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, foram comparados a qualidade e o rendimento de dois métodos diferentes de fracionamento do ST para a obtenção dos componentes sangüíneos de maior uso nos hospitais brasileiros: concentrado de hemácias (CH), plasma fresco (PF) e concentrado de plaquetas (CP). Um deles é o método clássico, também denominado de método da extração do plasma rico em plaquetas (PRP), e outro, denominado método da extração da camada leucoplaquetária (ECLP). Para o método do PRP, utilizou-se um tipo de bolsa e, para o da ECLP, utilizou-se dois tipos diferentes de bolsas "top and bottom" (TAB) para coleta de sangue, todas com registro no Ministério da Saúde. Inicialmente, foram coletadas 88 bolsas de ST em bolsas triplas, sendo todas fracionadas pelo método clássico em CH e em PRP. A partir de cada unidade de PRP, originou-se uma unidade de CP. Esta foi denominada de a *primeira fase do estudo*. Na *segunda fase do estudo*, utilizou-se o método da ECLP, onde foram coletadas 350 bolsas triplas TAB e processados em CH, PF e CLP. As unidades de concentrado de plaquetas foram produzidas a partir de um conjunto de 4 ou 5 unidades de CLP juntamente com uma unidade de PF. Na *terceira fase do estudo*, coletou-se 210 unidades de ST com bolsas quádruplas tipo TAB, sendo

todas fracionadas pelo método da ECLP em CH, PF e CLP. Cada unidade de CLP de origem a uma unidade de CP. Todas as unidades coletadas nas três fases iniciais foram analisadas laboratorialmente e seus parâmetros comparados. Na *quarta fase do estudo*, avaliou-se clinicamente a incidência de reações adversas dos hemocomponentes processados pelo método clássico, comparando-a com a incidência das reações adversas dos hemocomponentes obtidos pelo método da ECLP.

#### 4.1 Bolsas utilizadas

No estudo, foram empregados três tipos de bolsas plásticas de coleta de sangue: bolsas triplas CPDA-1, marca Baxter<sup>®</sup>, Fenwal Division- Baxter Deerfield, EUA; bolsas triplas modelo TAB Optipac<sup>®</sup> marca Baxter, Fenwal Division- Baxter Deerfield, USA (código do fabricante ZGR7324B); e bolsas quádruplas modelo TAB Optipac<sup>®</sup> marca Baxter, Fenwal Division- Baxter Deerfield, USA (código do fabricante ZGR7412B). A primeira bolsa foi utilizada para a preparação dos componentes sangüíneos pelo método clássico, que para facilitar a descrição, denominamos de *primeira fase*. As outras duas foram utilizadas para a obtenção dos componentes pelo método da ECLP, sendo respectivamente denominadas de *segunda e terceira fases do estudo*.

A bolsa tripla utilizada neste estudo consiste em uma bolsa principal com capacidade de 450ml, contendo 63ml de anticoagulante CPDA-1 ( Citrato, Fosfato, Dextrose e Adenina), que permite a armazenagem de sangue por 35 dias. Possui cantos arredondados e bordas laterais estreitas com alças que permite a fixação do tubo coletor.

O tubo coletor, de 100cm, é fixado no corpo principal da bolsa. Possui dois tubos de saída, com membrana perfurável, revestidos com protetores e lacre de segurança para transferência ("brake off"). O tubo de transferência, confeccionado em plástico translúcido, tem comprimento de 60cm, identificados numericamente com marcações idênticas em intervalos em torno de 75mm, com bifurcação em Y que conduz a duas bolsas satélites. A bolsa satélite para armazenagem de plaquetas por 5 dias, com capacidade de 400ml, é confeccionada em plástico tri-2-etil-hexil-melitato (TOTM) que permite a troca gasosa entre o ambiente externo e o conteúdo da bolsa, favorecendo desta forma a absorção de oxigênio ( $O_2$  do meio externo) e a eliminação do dióxido de carbono ( $CO_2$ ) da bolsa. A bolsa satélite, para armazenamento do plasma, é em PVC e tem a capacidade para 400ml.

As bolsas triplas tipo TAB consistem em um corpo principal em PVC e TOTM, com capacidade de 450ml, contendo a solução anticoagulante CPD (citrato, fosfato e dextrose). Com formato de cantos arredondados, possui um tubo de saída superior e um inferior que permitem a separação do plasma, CLP e CH, com o uso de extrator automatizado. Tem bordas laterais estreitas com alça que permite a fixação do tubo coletor. Na conexão superior com o tubo de transferência de componentes, existe um lacre de segurança ("break off") com sistema

prático e de fácil rompimento. O tubo de transferência superior, com comprimento de 60cm, é identificado numericamente com os mesmos números do tubo coletor. Na parte inferior da bolsa, localizam-se o tubo coletor de sangue do doador e o tubo de transferência inferior, de diâmetro maior para permitir bom fluxo de transferência do CH para uma bolsa satélite. A bolsa conectada pela parte inferior da bolsa principal que armazenará o CH, tem capacidade de 450ml, com 100ml de solução preservante de hemácias (SAGM), e é constituída em PVC com plastificante DEHP ( 2 Di-etil Hexilftalato), permitindo a armazenagem por 42 dias a uma temperatura entre 2 e 6°C. Possui bordas laterais estreitas e alças laterais e na base que permitem fixação no suporte para transfusão. Na parte superior do corpo principal, possui um tubo de transferência com lacre de segurança ("break off"), conectando-se a uma bolsa satélite para armazenar o plasma, com 400ml de capacidade, constituída em PVC e TOTM. Para a produção de plaquetas a partir do conjunto de 4 ou 5 unidades de CLP e uma unidade de plasma, utilizou-se uma bolsa de transferência em PVC de 600ml e outra de 1.000ml de poliolefina.

As bolsas quádruplas tipo TAB consistem em um corpo principal em PVC e TOTM, com capacidade de 450ml, contendo a solução anticoagulante CPD. Com formato de cantos arredondados, possui um

tubo de saída superior e um inferior, que permitem a separação do plasma, CLP e CH, com o uso de extrator automatizado. Possui bordas laterais estreitas com alça que permite a fixação do tubo coletor. Na conexão superior com o tubo de transferência de componentes, possui lacre de segurança ("break off") com sistema prático e de fácil rompimento. O tubo de transferência superior, com comprimento de 60cm, é identificado numericamente com os mesmos números do tubo coletor. Na parte inferior da bolsa, localizam-se o tubo coletor de sangue do doador e o tubo de transferência inferior, de diâmetro maior para permitir bom fluxo de transferência do CH para uma bolsa satélite. A bolsa conectada pela parte inferior da bolsa principal, que armazenará o CH, tem capacidade de 450ml, com 100ml de solução preservante de hemácias (SAGM), constituída em PVC com plastificante DEHP, permitindo a armazenagem por 42 dias a uma temperatura entre 2 e 6°C. Possui bordas laterais estreitas e alças laterais e na base que permitem fixação no suporte para transfusão. Na parte superior do corpo principal, possui um tubo de transferência com lacre de segurança ("break off") e bifurcação em Y, conectando-se a duas bolsas satélites ( uma para plasma e a outra para CP ou crioprecipitado) com 400ml de capacidade cada uma, constituída em PVC e TOTM, capaz de manter os CP durante cinco dias sob constante agitação, a 20 e 24°C.



#### 4.2 Coleta de sangue

Todas as coletas de ST, no estudo, foram realizadas segundo as normas do Ministério da Saúde, publicadas na Portaria n.1376 de 19 de novembro de 1993<sup>84</sup>. Os doadores de sangue eram voluntários e foram todos entrevistados por enfermeiras sob a supervisão de um médico. Todos os doadores realizaram a dosagem de hemoglobina com o uso de hemoglobinômetro marca Hemocue AB (Ängelholm, Suécia), tendo sido excluídas as mulheres com níveis de hemoglobina inferiores a 12g/dl e os homens com níveis menores que 13g/dl. O tempo de sangria não foi superior a 10 minutos, sendo coletados 450ml  $\pm$  50ml, sob homogeneização constante do equipamento Optimix V02, marca Fenwal Division- Baxter, Deerfield, EUA). As bolsas de ST com volume inferior a 400ml e superior a 500ml foram excluídas do estudo. Todas as bolsas utilizadas neste estudo foram provenientes do posto de coleta central da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo e mantidas por 2 horas em repouso em temperatura ambiente controlada entre 20°C e 24°C, sendo todas fracionadas em até 6 horas após o término da coleta.

### 4.3 Processamento

Após a coleta, a bolsa de ST foi pesada em uma balança digital, estando o peso entre 421 e 527 gramas, excluídos os pesos da bolsa plástica e da solução anticoagulante. Estando dentro da faixa de peso acima, as bolsas foram balanceadas duas a duas e colocadas em uma centrífuga de grande porte, refrigerada a 20<sup>o</sup> C, marca Sorvall, modelo RC3B ( Kendro, EUA). O tamanho do braço da centrífuga (raio de centrifugação), a velocidade e o tempo são variáveis críticas no preparo dos hemocomponentes. Neste estudo, a força de centrifugação relativa (g) foi calculada pela fórmula<sup>81</sup>:

$$\text{FCR (g)} = \text{raio (polegadas)} \times 28,38 \times \{ \text{rpm} / 1000 \}^2$$

Onde: FCR é a força de centrifugação relativa (g); o raio da centrífuga utilizada é de 250 mm ou 9,75 polegadas; rpm é rotações por minuto. O **quadro 4** ( página 70 ) descreve a transformação das rotações por minuto utilizadas neste estudo para a FCR (g) utilizando a fórmula acima.

**Quadro 4.** Correlação das diferentes rotações (rpm) utilizadas neste estudo e forças g (FCR).

Rpm	FCR (g)
1100	335
2200	1339
2500	1729
2800	2169
3000	2490
3200	2833
3300	3013
3400	3199
3500	3390
3600	3586
3700	3788
3800	3996
4000	4427
4500	5603

#### 4.3.1 Método clássico (manual)

Na **primeira fase do estudo**, foram coletadas e analisadas 88 bolsas de sangue total, CH, PF e CP, totalizando 440 unidades (**figura 1**, página 73). Estes componentes foram escolhidos aleatoriamente, sendo todos analisados no dia da coleta. A metodologia de obtenção desses componentes é a utilizada rotineiramente na Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo . Nesta fase foram usadas bolsas triplas (**figura 2**, página 73).

Para realizar o balanceamento utilizaram-se bolsas plásticas vazias como contra-peso e balança de dois pratos (**figura 3**, página 73). As bolsas de sangue total foram homogeneizadas manualmente antes de serem colocadas nas caçapas de uma centrífuga refrigerada, de grande porte, marca Sorvall, modelo RC3B (Kendro, EUA), (**figura 4**, página 74). As bolsas foram centrifugadas a 1730 g por 4 minutos (incluído o tempo de aceleração) com nível de desaceleração ajustado em 5 (3,14 minutos), o que corresponde a 7,14 minutos de centrifugação. Ao término da primeira centrifugação, as bolsas foram colocadas em um extrator manual (Fenwal Division-Baxter, Deerfield, EUA) que, por compressão do sentido

inferior para o superior, empurra o plasma rico em plaquetas para uma das bolsas satélites, (**figura 5**, página 74). No corpo principal da bolsa tripla CPDA-1 permanecem as hemácias, (**figura 6**, página 74). As unidades de CP e plasma foram obtidos a partir do PRP centrifugado a 2490g por 12 minutos, na mesma centrífuga, ajustada em nível de desaceleração 5 (3,14 minutos). Antes da segunda centrifugação, as unidades de PRP foram balanceadas da mesma forma que as unidades de ST. A seguir, as unidades de PRP foram colocadas no extrator manual, que expelle o plasma para a outra bolsa satélite, permanecendo na bolsa o CP, (**figura 7**, página 75). As bolsas de CP foram pesadas, devendo estar entre 50 e 70 gramas (**figura 8**, página 75).

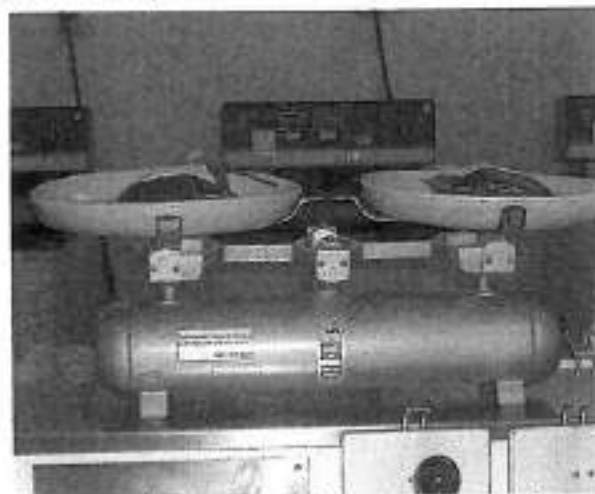
A **figura 9** (página 76) apresenta fluxograma do processamento de hemocomponentes pelo método clássico (PRP).



**Figura 1.** Início do processo. Coleta de sangue total em homogeneizador de sangue automatizado. Homogeneização contínua e pinçamento automático.



**Figura 2.** Sangue total coletado em bolsa tripla convencional, contendo anticoagulante CPDA-1 para processamento pelo método clássico.



**Figura 3.** Balanceamento das bolsas triplas convencionais em CPDA-1, contendo sangue total para a primeira fase da centrifugação da primeira fase ( 1730 x g por 4 minutos).



Figura 4. Bolsas triplas convencionais com sangue total na centrífuga refrigerada de grande porte (Sorvall RC3B, Kendro, EUA).



Figura 5. Bolsas triplas convencionais após centrifugação. Início da separação do plasma rico em plaquetas para uma das bolsas satélites com auxílio de extrator manual de plasma.

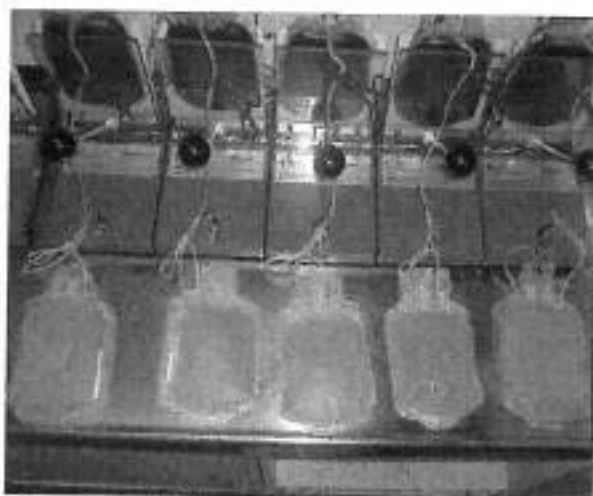


Figura 6. Término da separação do plasma rico em plaquetas para uma das bolsas satélites com auxílio de extrator manual de plasma.

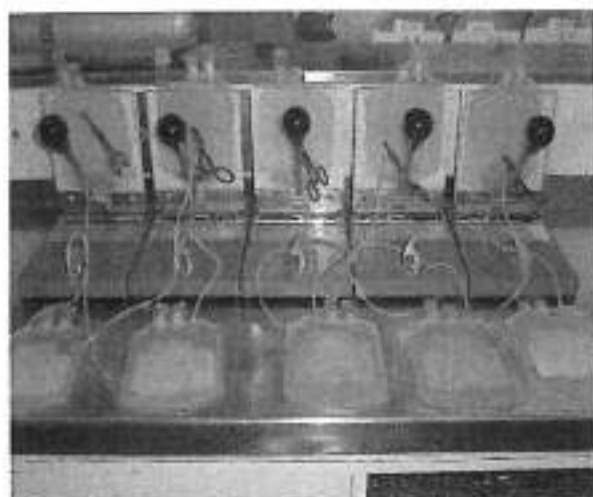


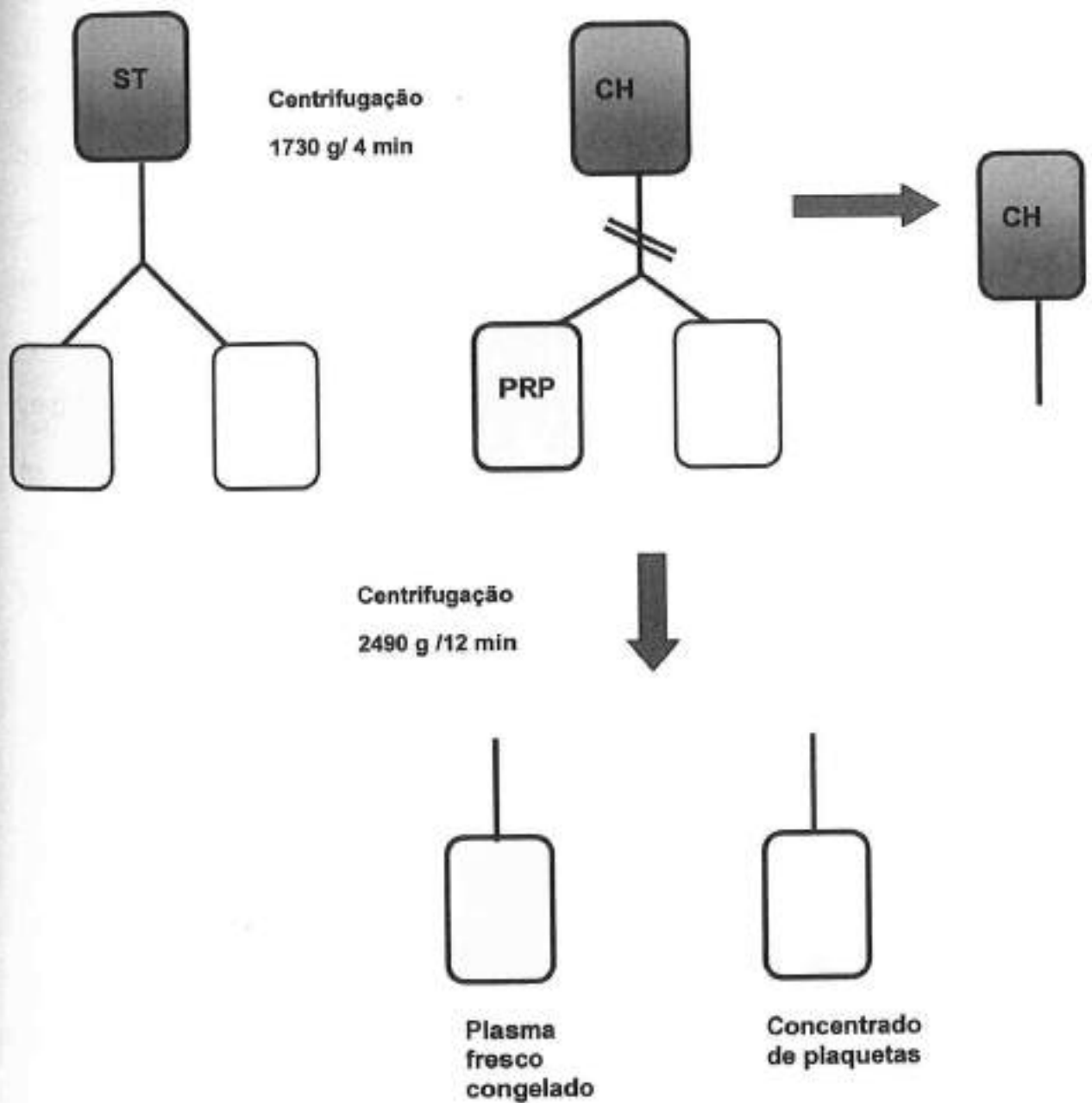
Figura 7. Retirada do plasma pobre em plaquetas (plasma fresco congelado) a partir do concentrado de plaquetas agregados após a centrifugação (2490 x g por 12 minutos) com auxílio de extrator manual de plasma.



Figura 8. Concentrado de plaquetas agregadas em repouso de no mínimo 2 horas em temperatura controlada para desagregação espontânea.



Figura 9. Fluxograma do processamento de hemocomponentes pelo método clássico



### 4.3.2 Método automatizado

#### 4.3.2.1 Uso de bolsas triplas

Na primeira fase da centrifugação obtém-se CH, CLP e plasma, (**figura 10**, página 80). As bolsas do tipo TAB-tripla com ST foram balanceadas com auxílio da balança de dois pratos. Após balanceamento, as bolsas foram colocadas nas caçapas das centrifugas de grande porte em posições opostas. Ao término da centrifugação, as bolsas foram colocadas no equipamento automatizado, onde ocorre a separação do CH, CLP e plasma. A CLP permaneceu no corpo principal da bolsa, o CH foi transferido para a bolsa satélite inferior (onde se encontra a solução preservadora SAGM) e o plasma, pelo tubo de transferência superior, fluiu para a bolsa satélite superior.

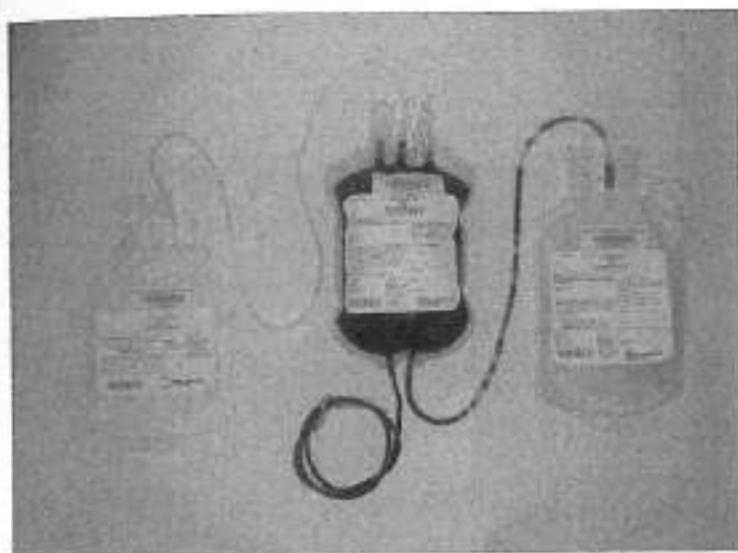
Para se obter a separação dos componentes após a centrifugação, foram utilizados extratores semi-automáticos Optipress® (Fenwall Division, Baxter, Deerfield, EUA). Esse equipamento consiste em uma placa móvel paralela ao seu corpo principal, onde se interpõe a bolsa centrifugada, (**figura 11**, página 80). A placa exerce pressão progressiva sobre a bolsa, que possui tubos de transferência superior e inferior

adaptados a um dispositivo que abre ou fecha o tubo de plástico. Esse dispositivo (que após a abertura dos lacres de segurança permite ou não a transferência do plasma para a bolsa satélite superior e a do CH para a bolsa inferior) é controlado por mecanismo de fotocélula localizado no meio da placa. Como o plasma possui menor viscosidade que o CH, o primeiro flui com velocidade maior em direção ao tubo superior do que as hemácias em direção ao tubo inferior. Assim, a CLP localizada entre o plasma e as hemácias tende a subir. Quando a camada celular é detectada pela fotocélula, o dispositivo superior é automaticamente acionado, impedindo o fluxo de plasma pelo tubo de transferência superior. A CLP tende a permanecer na porção média da bolsa, enquanto ocorre a transferência do plasma e do CH pelo aumento progressivo da pressão exercida na placa. Quando o processo chega ao final, os tubos são automaticamente clampeados e selados manualmente.

As unidades de CLP foram mantidas em repouso por um período de 12 a 24 horas, tempo necessário para que os testes sorológicos ficassem prontos, (**figura 12**, página 81). As unidades com testes sorológicos positivos não foram utilizadas para a preparação do conjunto de CLP. Os tubos de transferência das unidades de CLP foram unidos um a um (4 ou 5 unidades) com uma unidade de plasma e uma bolsa de transferência (PVC) de 600ml. A união dos tubos de transferência foi realizada com o uso de um equipamento de conexão estéril (SCD –

Terumo<sup>®</sup>, Japão). Esse equipamento realiza o corte estéril do tubo e faz a conexão com outro, mantendo o sistema fechado. O corte é realizado por intermédio de uma lamina de cobre que atinge altas temperaturas, garantindo a esterilidade. Após a preparação do conjunto, o sistema foi colocado em um suporte, em posição vertical, com a bolsa de plasma na posição superior, as de CLP em posição intermediária e a bolsa de transferência em posição inferior. Por gravidade, o conteúdo foi transferido para a bolsa em PVC de 600ml. A seguir, a bolsa de 600ml foi conectada a uma bolsa de transferência de poliolefina de 1.000ml pelo equipamento de conexão estéril. Posteriormente, o conjunto foi balanceado, dois a dois, em uma balança de dois pratos, e a seguir colocados na centrífuga Sorvall RC3B ( Kendro, E.U.A.). A segunda centrifugação, mais suave, foi realizada a 1339 x g por 3 minutos, com 2,3 minutos de desaceleração; ou a 2169 g por 5 minutos com 2,35 minutos de desaceleração. Após a centrifugação, a bolsa de 600ml foi colocada no extrator manual, que por pressão exercida de baixo para cima, transferiu o sobrenadante (CP) para a bolsa de 1.000ml de poliolefina. O resíduo que permaneceu na bolsa de 600ml foi descartado, (**figura 13**, página 81).

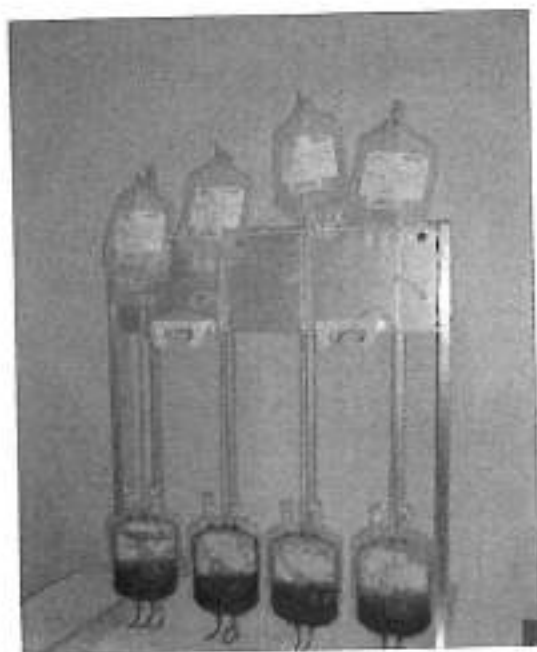
As **figuras 14a** ( página 82) e **14b** ( página 83) apresentam fluxograma do processamento de hemocomponentes pelo sistema TAB, em bolsas triplas.



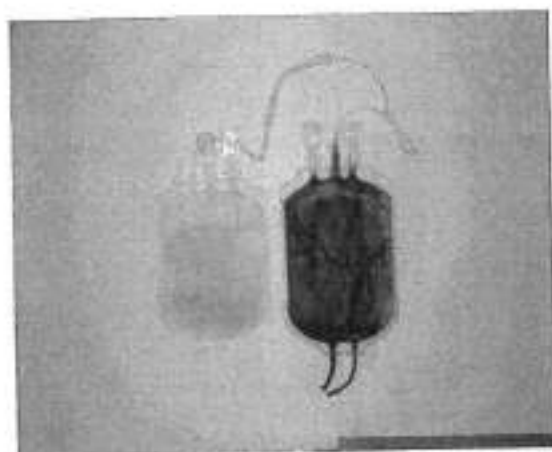
**Figura 10.** Bolsa tripla "TOP AND BOTTOM", contendo como anticoagulante CPD na bolsa de coleta e como solução aditiva SAGM na bolsa que armazenará o concentrado de hemácias



**Figura 11.** Extração do plasma sobrenadante para uma das bolsas satélites, do concentrado de hemácias para a bolsa contendo SAGM

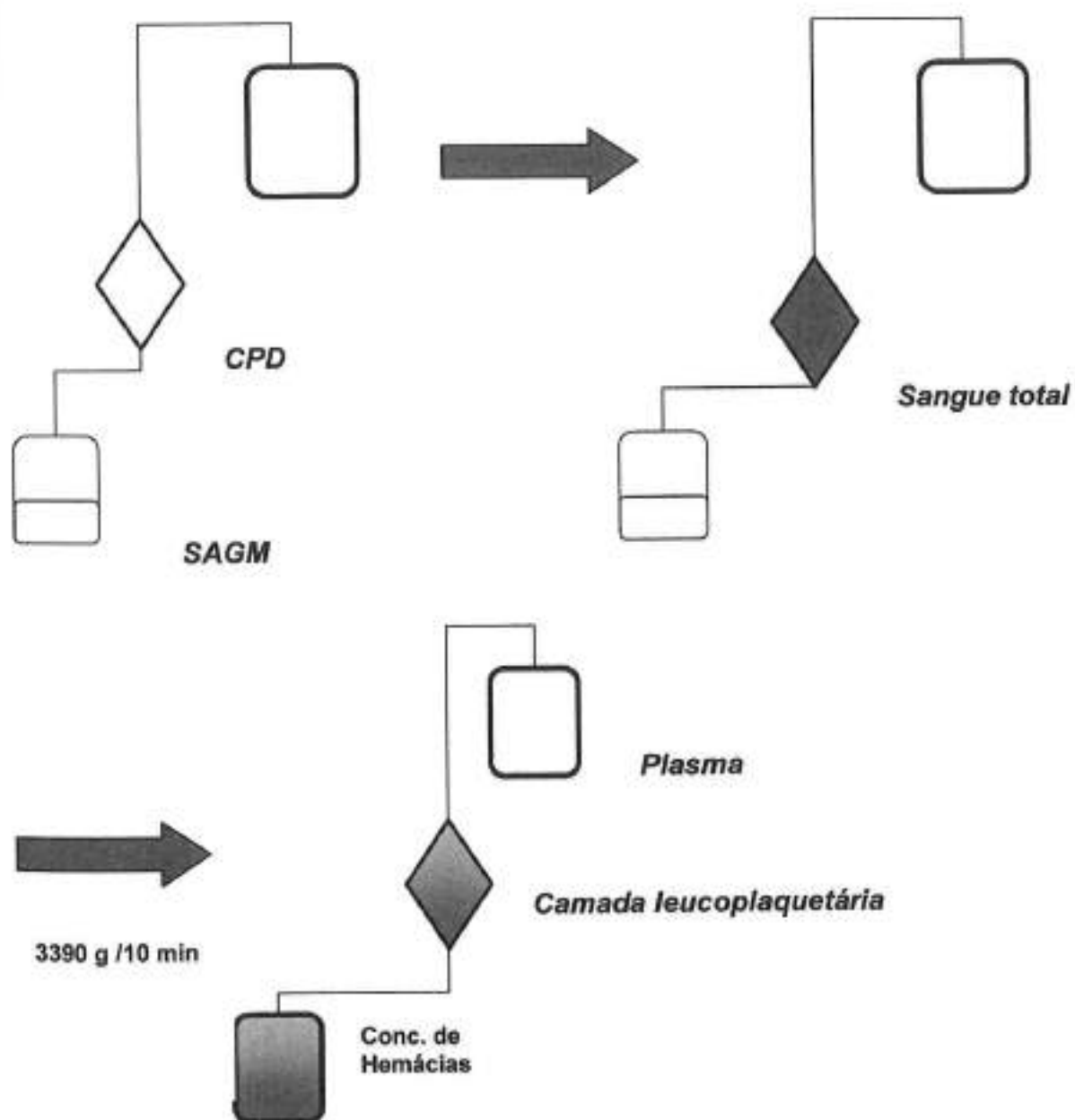


**Figura 12** . Camada leuco-plaquetária em repouso de para posterior centrifugação e retirada do concentrado de plaquetas.

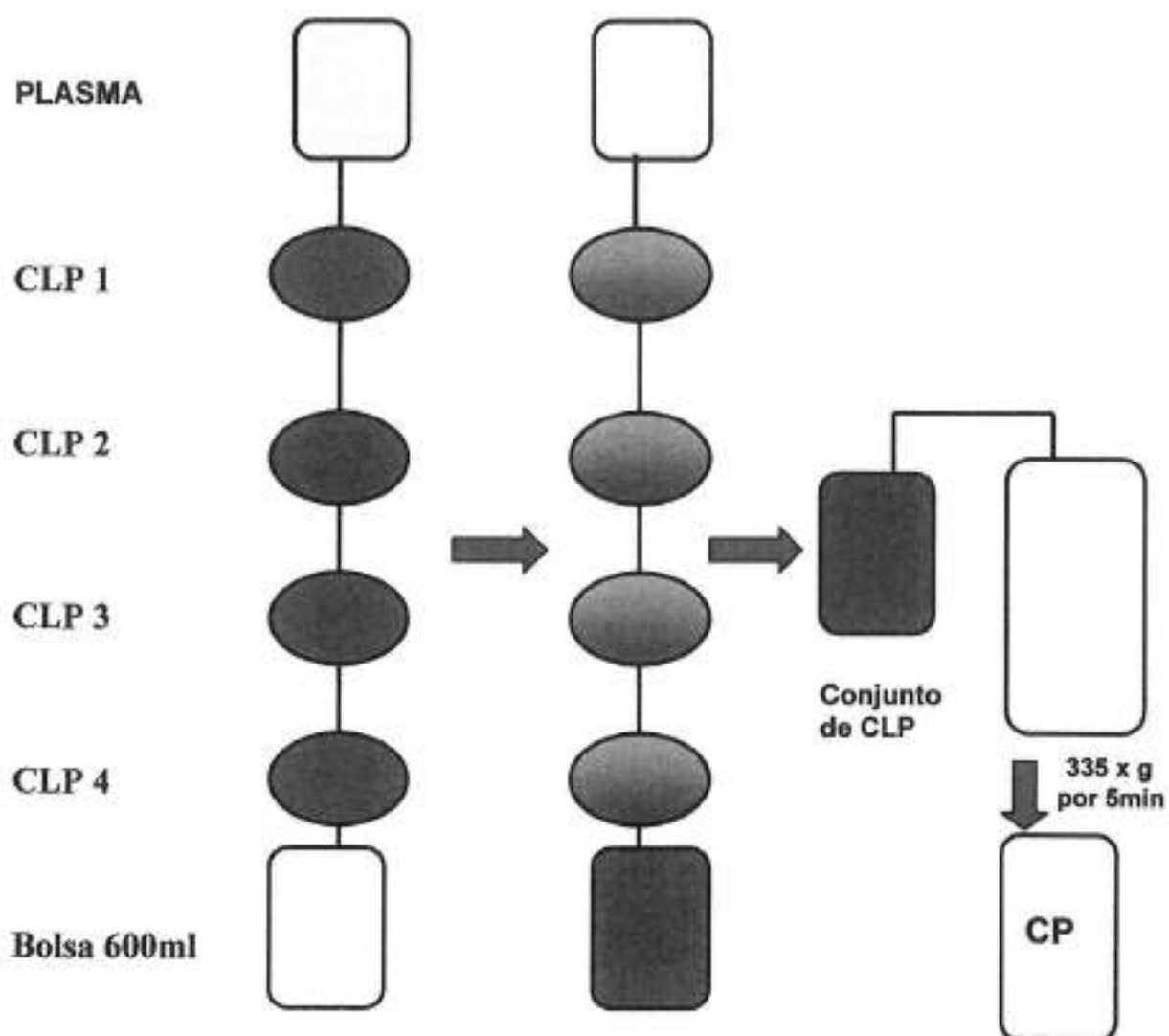


**Figura 13**. CP-ECLP à esquerda e resíduo da camada leuco-plaquetária à direita

**Figura 14a.** Fluxograma do processamento de hemocomponentes pelo sistema "Top and bottom" com o uso de bolsa tripla



**Figura 14b.** Fluxograma do preparo de concentrado de plaquetas pelo método de extração da camada leucoplaquetária (ECLP), sistema "Top and bottom" com o uso de bolsa tripla.





#### 4.3.2.2 Uso de bolsas quádruplas

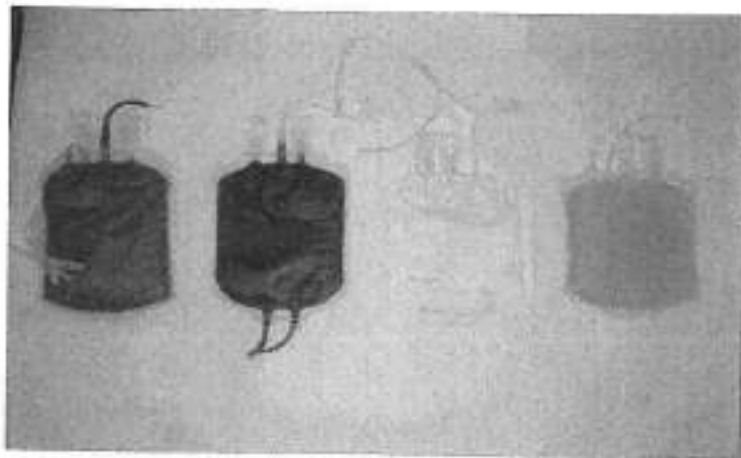
Na primeira fase da centrifugação, obtem-se CH, plasma e CLP e uma unidade satélite permanece vazia, ( **figuras 15 e 16**, página 86). As bolsas do tipo TAB -quádruplas com ST foram balanceadas com auxílio da balança de dois pratos. A seguir, foram colocadas nas caçapas das centrifugas de grande porte em posições opostas. Ao término da centrifugação, foram colocadas no equipamento automatizado (Optipress®, Fenwall, Baxter Division, Deerfield, EUA), onde ocorreu a separação do CH, CLP e plasma. A CLP permaneceu no corpo principal da bolsa conectado a uma bolsa satélite, para a qual foi transferido o CP após a segunda centrifugação. O CH foi transferido para a bolsa satélite inferior (onde se encontra a solução preservadora SAGM) e o plasma fluiu do tubo de transferência superior para a bolsa satélite superior. As bolsas satélites contendo CH e plasma foram separadas do corpo principal por um selador manual, (**figura 17a**, página 87 )

Quando foram utilizadas bolsas quádruplas TAB, a preparação de plaquetas foi realizada com uma unidade de CLP. Antes da centrifugação, a unidade de CLP permaneceu em repouso por pelo menos duas horas, para que ocorresse desagregação das plaquetas. Após o

balanceamento das unidades, duas a duas, em balança de dois pratos, a bolsa contendo a CLP e a unidade satélite foram colocadas duas a duas na centrífuga. A centrifugação foi realizada a 335 x g por 5 minutos com 2,05 minutos de desaceleração. Após a centrifugação, a bolsa foi colocada no extrator manual que, por pressão exercida de baixo para cima, transferiu o sobrenadante (CP) para a bolsa satélite. O resíduo que permaneceu na bolsa principal foi descartado ( **figura 17b**, página 88).

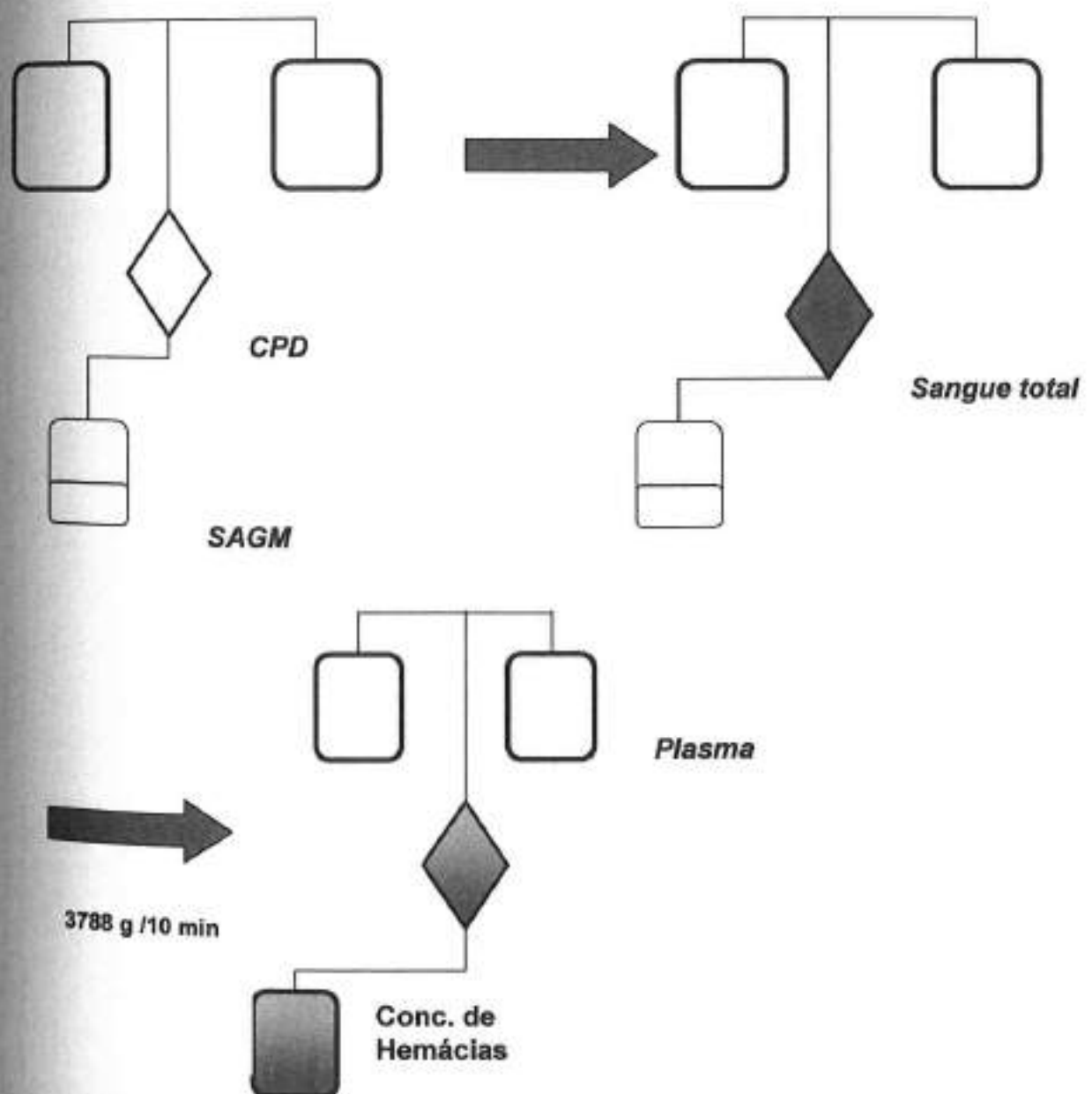


**Figura 15.** Bolsa quádrupla "TOP AND BOTTOM", contendo como anticoagulante CPD na bolsa de coleta e SAGM como solução aditiva na bolsa que armazenará o concentrado de hemácias

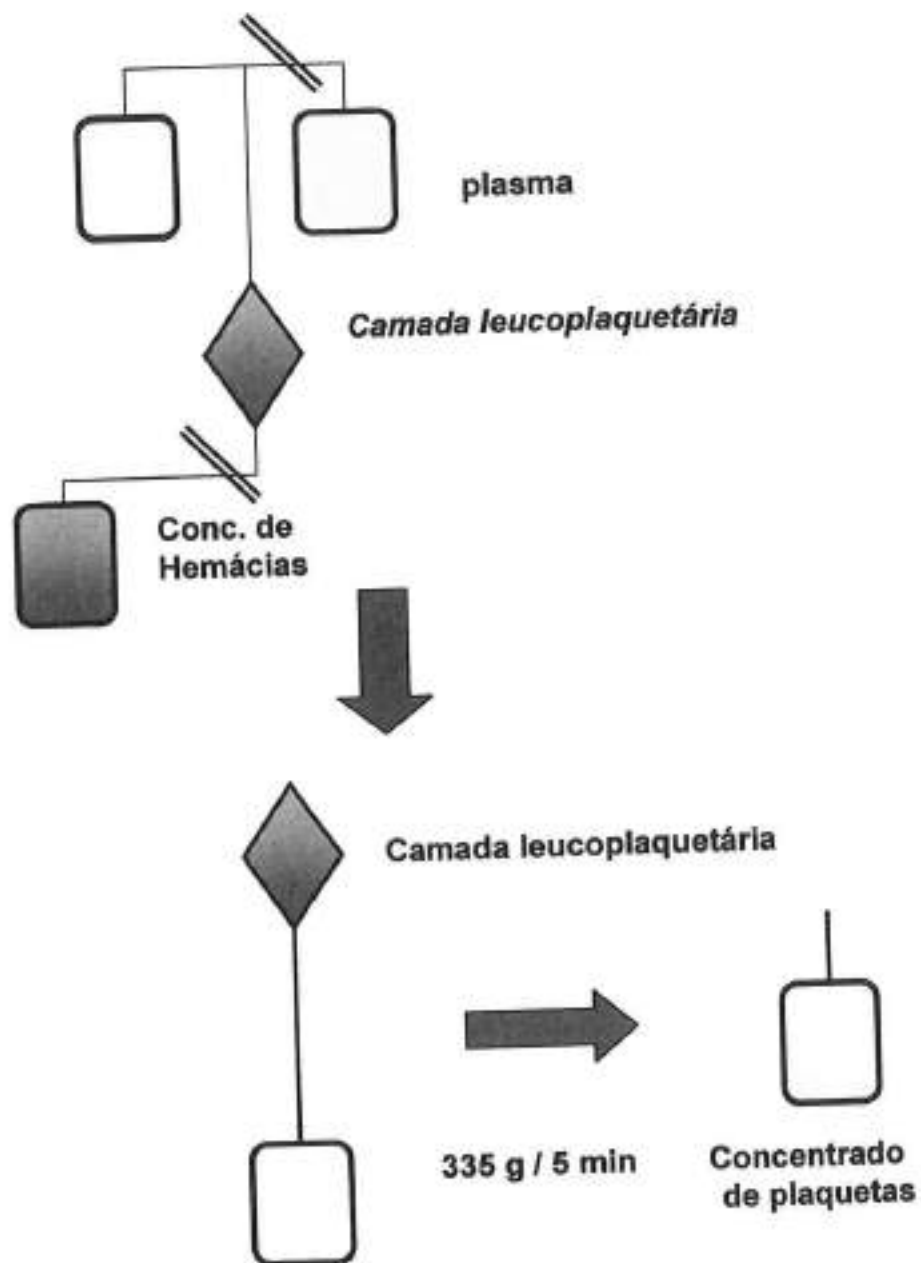


**Figura 16.** Da esquerda para a direita: Concentrado de hemácias, camada leuco-plaquetárias, bolsa satélite vazia e plasma fresco

**Figura 17a.** Fluxograma do processamento de hemocomponentes pelo método de extração da camada leucoplaquetária (ECLP), sistema "Top and bottom" com o uso de bolsa quádrupla.



**Figura 17b** Fluxograma do preparo de concentrado de plaquetas pelo método de extração da camada leucoplaquetária (ECLP), sistema "Top and bottom" com o uso de bolsa quádrupla.



#### 4.4 Análise laboratorial dos hemocomponentes

As análises laboratoriais foram realizadas em 440 componentes sendo 88 ST, 88 CH, 88 CP, 88 PF e 88 PRP processados pelo método do PRP em bolsas triplas. Foram também testadas laboratorialmente 215 unidades de ST, 215 CH, 215 PF, 215 CLP e 215 CP, processadas pelo método automatizado em bolsas quádruplas TAB e 520 componentes, sendo 130 ST, 130 CH, 130 PF, 130 CLP, processados pelo método automatizado em bolsas triplas TAB. Também, por este último método, foram analisados 24 componentes de conjuntos de 5 CLP (12 conjuntos de 5 unidades de CLP e 12 CP), 80 componentes em conjuntos de 4 CLP (40 conjuntos de 4 unidades de CLP e 40 CP) e 33 CP obtidos com 4 unidades de CLP.

Para realizar as análises laboratoriais, 2 a 4ml de cada componente estudado foram coletados em um tubo plástico de polipropileno de 5ml. As amostras foram retiradas dos tubos de coleta ou de transferência das bolsas utilizando um selador portátil de tubo em PVC. Os parâmetros analisados nas unidades de **sangue total** foram: volume (ml), concentração de hemoglobina total (g/dl e g/unidade), hematócrito, contagem de plaquetas e de leucócitos. Já nas unidades de **concentrado**

de hemácias foram analisados: volume (ml), concentração de hemoglobina total (g/dl e g/unidade), hematócrito, contagem de plaquetas e de leucócitos, percentual de recuperação de hemoglobina, percentual de depleção de leucócitos e de plaquetas. Nas unidades de **plasma rico em plaquetas** foi medido o volume (ml), e realizada a contagem de plaquetas e de leucócitos. Nas unidades de **plasma fresco** foram analisados: volume (ml), contagem de plaquetas e de leucócitos, e percentual de recuperação de plasma. Já nas unidades de **CLP** foram analisados: volume, concentração de hemoglobina total (g/dl e g/unidade), hematócrito, contagem de plaquetas e de leucócitos. Por fim, nas unidades de **CP** foram analisados: volume (ml), contagem de plaquetas e de leucócitos, recuperação de plaquetas, depleção de leucócitos, pH e "swirling". A análise dessas variáveis foi decisiva na escolha da melhor força g/min por minuto.

Para análise dos parâmetros hematimétricos utilizou-se o contador automático, marca Coulter – modelo T890 UFA-Miami, EUA. Para a contagem de plaquetas no CP utilizou-se a técnica da câmara de Neubauer. A fórmula utilizada para o cálculo da quantidade de plaquetas por  $\text{mm}^3$  foi :

{ número de plaquetas contadas nos 5 quadrados x volume do campo de contagem (10  $\mu\text{l}$ ) x 5 (número de quadrados existentes) / fator de diluição da amostra (1/200) }.

A contagem de leucócitos nas unidades de plaquetas foi realizada nas câmaras de contagem ou hemocitômetro de Nageotte. A fórmula utilizada para o cálculo da quantidade de leucócitos por  $\text{mm}^3$  foi :

{ número de leucócitos contadas nos 40 retângulos x volume do campo de contagem (50  $\mu\text{l}$ ) / fator de diluição da amostra (1/10) }.

A hemoglobina em gramas por unidade do hemocomponente foi calculada pela seguinte fórmula:

{ volume em ml do hemocomponente x hemoglobina total (g/dl) / 100 }.

A quantidade total de leucócitos por hemocomponente foi calculada pela seguinte fórmula:

{ número de leucócitos contados em  $\text{mm}^3$  ( $\mu\text{l}$ ) x 1000 x volume em ml do hemocomponente }.

A quantidade de plaquetas por hemocomponente foi calculada pela seguinte fórmula:

{ número de plaquetas por  $\text{mm}^3$  ( $\mu\text{l}$ ) x 1000 x volume em ml do hemocomponente }.



O pH no CP foi medido com o auxílio de um equipamento pH-metro B 317, (Micronal<sup>®</sup>, Brasil). O volume de cada hemocomponente foi determinado pela relação entre a massa (g) e a densidade (g/ml) (quadro 5, página 93). Para a determinação da massa, foi utilizada uma balança semi-analítica. Para avaliar o grau de heterogeneidade contra a luz ou efeito "swirling" do CP, utilizou-se a seguinte escala: 3 - Aspecto muito bem heterogêneo por toda a bolsa com bom contraste e definição; 2 - Aspecto bem heterogêneo, com bom contraste e definição através da bolsa; 1 - Aspecto pouco heterogêneo e contraste pobre em apenas alguns lugares; 0 - Sem swirling. A classificação de 0 a 3 foi realizada por avaliação visual.<sup>156 157</sup> O efeito "swirling" está relacionado à presença de plaquetas em formato discóide que indica a sua viabilidade "in vivo". O armazenamento de CP em temperaturas menores que 18°C e o pH abaixo de 6,7 são fatores que produzem a transformação das plaquetas de formato discóide para a forma esférica, diminuindo os efeitos terapêuticos da transfusão de CP.<sup>158 159</sup>

**Quadro 5.** Densidade considerada para avaliação do volume do sangue total e seus componentes.

<b>HEMOCOMPONENTE</b>	<b>DENSIDADE</b>
Sangue total (ST)	1,053 g/ml
Camada leucoplaquetária (CLP)	1,053 g/ml
Concentrado de Hemácias (CH)	1,065 g/ml
Plasma fresco (PF)	1,0 g/ml
Concentrado de plaquetas* (CP)	1,0 g/ml

#### 4.5. Validação do método de obtenção de hemocomponentes pela extração da camada leucoplaquetária (ECLP)

A segunda fase da pesquisa teve início com a instalação de 6 extratores automáticos Optipress® (Fenwall Division-Baxter, Deerfield, EUA). As bolsas, coletadas entre sete e dez horas, foram processadas em CH, PF e CLP. Os resultados sorológicos foram liberados no mesmo dia da coleta, em até 12 horas após o preparo da CLP. Para a preparação de CP, foram conectadas 4 ou 5 unidades de CLP, com o uso de um sistema de conexão estéril, em conjunto com uma unidade de plasma, e transferidos para uma bolsa de transferência em PVC, com capacidade para 600ml. Após a centrifugação dessa bolsa, obteve-se o CP que foi transferido para uma bolsa de transferência de poliolefina, de 1 litro de capacidade, pelo uso de um sistema de conexão estéril. Para tanto utilizou-se uma centrífuga refrigerada, de grande porte, da marca Sorvall modelo RC3B ( Kendro, EUA) com aceleração nível zero e desaceleração nível cinco .

Previamente à introdução da técnica da ECLP foram realizados testes para escolha da melhor combinação de tempo e força g por minuto. Informações obtidas junto a técnicos da empresa fabricante de bolsas, a rotação inicial recomendada foi de 5603 x g/min por 12 minutos. Com base nesses fatos, na experiência internacional e em dados da literatura <sup>27,31</sup> testaram-se 10 combinações de força g/ min (**Quadro 6**, página 95) em 96 bolsas de **ST**, coletadas nas mesmas condições do método clássico e centrifugadas, dando origem a **96 bolsas de CH, PF e de CLP**.

**Quadro 6.** Descrição das forças g/min utilizadas na primeira fase da centrifugação, do tempo de centrifugação e do número de bolsas de sangue total utilizadas (triplas tipo TAB).

FORÇA G POR MINUTO	TEMPO	NUMERO DE BOLSAS TESTADAS
2490	10	12
2490	12	14
2833	10	10
3013	8	15
3199	10	10
3199	12	11
3390	10*	7
3586	10	7
3996	10	6
4427	13	6

\* Desaceleração em 2,52 minutos.

A análise dos parâmetros laboratoriais foi decisiva na escolha da melhor força g a ser utilizada. Uma vez escolhida a melhor combinação de força g por minuto e tempo para a primeira fase, 12 unidades de ST foram processadas e os mesmos parâmetros analisados e os resultados confirmados.

Para a verificar a estabilidade da CLP, avaliou-se o pH em 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas. Foram utilizados para essas determinações 7 conjuntos de CLP contendo 5 unidades cada. A avaliação da estabilidade da CLP foi fator determinante para conhecer o período máximo de armazenamento deste subproduto sangüíneo.

Escolhida a melhor rotação por minuto para ser utilizada na primeira fase, onde se obtiveram os componentes CH, PF e CLP, avaliaram-se as especificações de 20 CP provenientes da mistura de quatro unidades de CLP e de 12 CP provenientes de cinco unidades de CLP. Na preparação do CP a partir de quatro e cinco unidades de CLP, utilizou-se a rotação de 2169 g por 5 minutos.

Para aumentar o percentual de recuperação de hemoglobina no CH a partir do sangue total centrifugado na força g por minuto escolhida, trocou-se a placa reta que acompanha os extratores automáticos Optipress<sup>®</sup> por outra de concavidade central (placa côncava).

Foram analisados laboratorialmente os parâmetros de 20 bolsas de ST e dos componentes obtidos após centrifugação: CH, plasma e CLP. Também foi estudada, com a placa côncava, a qualidade de 20 CP obtidos pela mistura de 4 unidades de CLP com uma unidade de plasma centrifugados a 1339 x g por 3 minutos. O pH de 33 unidades de CP foi medido nos dias 1, 2, 3, 4 e 5 de armazenamento.

Na **terceira fase da pesquisa**, foram utilizadas bolsas quádruplas tipo TAB com produção de plaquetas a partir de uma unidade de CLP, não sendo necessário o uso de lâminas de conexão estéril para as soldas das unidades de CLP (4 ou 5) com uma unidade de plasma. Para a produção de uma unidade de CP, o processamento ocorreu após duas horas de repouso da unidade de CLP. Não houve necessidade de aguardar o resultado dos testes sorológicos como se fez na segunda etapa do estudo, pois naquela ocasião se o resultado de uma unidade fosse positivo, isto determinaria o descarte da unidade de plaquetas obtidas do conjunto mesmo que as outras unidades fossem negativas.

Para a validação da técnica com a utilização de bolsas quádruplas realizaram-se testes para escolha da melhor combinação de força g por minuto para a primeira centrifugação. Foram avaliadas 5 diferentes forças g por minuto para a primeira centrifugação e foi produzido CP a partir da CLP após a segunda centrifugação a 335 g/min

por 5 minutos. Para a validação, foram coletadas 210 unidades de ST utilizando-se a mesma metodologia das fases anteriores. As 210 bolsas foram fracionadas em 210 unidades de CH, 210 unidades de plasma, 210 unidades de CLP e 210 unidades CP, utilizando as forças g descritas no **quadro 7** ( página 98). Foram coletadas amostra de cada componente para análises laboratoriais.

**Quadro 7.** Número de bolsas processadas em diferentes forças g /min na primeira e segunda fase de centrifugação para a validação do método da ECLP com a utilização de bolsas quádruplas tipo TAB.

Força g /min e tempo de centrifugação ( 1ª centrifugação)	Força g /min e tempo de centrifugação ( 2ª centrifugação)	Número de bolsas coletadas
5603/12	335/5	65
3390/10	335/5	49
4427/10	335/5	44
3390/12	335/5	35
3788/10*	335/5	22

\* desaceleração em 2,56 minutos

Após a validação, a técnica foi introduzida na rotina do banco de sangue, entre os meses de março de 1998 e maio de 1999, mantendo-se o número máximo de bolsas coletadas por dia de até 60 unidades. No período, foram utilizadas 11.533 bolsas quádruplas tipo TAB, sendo obtidos 11.533 CH, 11.533 unidades de plasma e 11.533 CP. Dois funcionários foram treinados para realizar o processamento destas bolsas nos 6 equipamentos Optipress®, entre 7 e 10 horas de segunda à sexta-feira. Dessas unidades de ST não foram processadas unidades de crioprecipitado, pois praticamente todas foram utilizadas para a produção de plaquetas. Durante o período em estudo, verificou-se o número de unidades de CP perdidas por agregação, comparando-o com as perdas, pelo mesmo motivo, de unidades de plaquetas produzidas pelo método do PRP.



#### 4.6 Condições de armazenamento do sangue e componentes

Após a coleta das amostras dos componentes para análise laboratorial conforme os itens 4.4 e 4.5, todas as unidades utilizadas para transfusão foram armazenadas como descreve o **quadro 8** (página 100).

**Quadro 8.** Tipo do componente sangüíneo, temperatura de armazenamento e situação especial de armazenamento

Tipo do componente sangüíneo	Temperatura de armazenamento	Situação especial de armazenamento
CH	2° a 6°C	Refrigeradores específicos para banco de sangue com temperatura controlada.
CP	20° a 24°C	Sob movimentação constante em agitadores planos colocados dentro de incubadoras.
Plasma	-20°C	Freezer específico para banco de sangue

#### 4.7 Estudo clínico

O estudo clínico realizado no ambulatório transfusional da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo teve por finalidade comparar a incidência de reações transfusionais entre um grupo de pacientes que recebeu CH-ECLP ou CP-ECLP (método descrito em 4.3.2.2) e um grupo controle de pacientes que recebeu CH coletado em CPDA1 ou CP-PRP (método descrito em 4.3.1).

As reações transfusionais foram classificadas em febril, alérgica (com e sem sintoma respiratório), alérgica e febril, anafilática e em outros tipos de reações pós-transfusionais. As reações febris foram caracterizadas pelo aumento de 1°C ou mais durante o período de transfusão, acompanhada ou não por calafrios, tremores ou sensação de frio. Quando o paciente recebeu antipiréticos antes da transfusão, considerou-se como reação febril a ocorrência de calafrios ou tremores na ausência de aumento de temperatura<sup>132</sup>. Em todos os casos, o diagnóstico de reação febril foi considerado após a exclusão de reação hemolítica transfusional por incompatibilidade sangüínea, reação febril por contaminação bacteriana ou reação febril decorrente da própria patologia

de base. A reação febril acompanhada de reação cutânea eritematosa ou urticariforme foi denominada reação febril e alérgica, após exclusão de outras causas.

Reações cutâneas durante o período de transfusão, tais como eritema local, prurido e reações urticariformes foram caracterizadas clinicamente como reações alérgicas decorrentes de proteínas plasmáticas. Essas reações alérgicas podem ser acompanhadas de sintomas respiratórios obstrutivos das vias aéreas superiores ou inferiores<sup>146</sup>, sendo neste estudo classificadas como alérgicas com sintomas respiratórios ( dispnéia, rouquidão, estridor, chiado e sibilos). Nesses casos, os pacientes foram medicados com anti-histamínico e/ou corticóides, e a transfusão suspensa temporariamente. Nos casos mais graves, a transfusão foi reiniciada após lavagem do hemocomponente com 1 litro de soro fisiológico a 0,9%.

A reação anafilática foi caracterizada pela presença, logo no início da transfusão, de hipotensão sem febre, geralmente acompanhada de manifestações cutâneas tipo alérgicas e/ou manifestações respiratórias tais como dispnéia e cianose, decorrentes de edema de glote ou de obstrução brônquica. Outras causas de hipotensão grave foram excluídas como as decorrentes de reações hemolíticas e de contaminação bacteriana.

Em outras reações transfusionais, foram classificados sintomas ou sinais inespecíficos ocorridos após o início da transfusão como náuseas, vômitos, hipertensão, dor em membros inferiores, dor lombar, cefaléia e dor abdominal após a exclusão das causas anteriormente descritas e de reação hemolítica. As reações hemolíticas foram excluídas não só por critérios clínicos como também por critérios laboratoriais. Rotineiramente, após uma reação febril coletou-se amostra de sangue do paciente ( 5ml em tubo com anticoagulante - EDTA e 5ml em tubo sem anticoagulante) que foi encaminhada em conjunto com a bolsa de sangue para repetição da tipagem sangüínea ABO e Rh, prova cruzada, pesquisa de anticorpos irregulares e pesquisa visual de hemólise no soro.

A comparação foi feita pelo número de episódios transfusionais, ou seja, pelo número de vezes que o paciente foi transfundido com uma ou mais unidades dos componentes sangüíneos dentro do escopo deste estudo. Desta forma, os dados tornaram-se mais confiáveis, pois se a comparação fosse feita por transfusão, poderia haver dúvidas sobre a unidade que de fato foi responsável pela reação adversa.

Entre março de 1998 e maio de 1999, parte dos componentes sangüíneos fracionados com as bolsas quádruplas TAB e

validados conforme item 4.5 foi enviada ao ambulatório transfusional. As requisições de transfusão provenientes do ambulatório eram enviadas para preparo na Agência Transfusional Central e, aleatoriamente, conforme a disponibilidade, encaminhadas para transfusão, de hemocomponentes obtidos pelo método do PRP ou pelo método da ECLP. O médico solicitante nem o corpo de enfermagem do ambulatório transfusional influenciaram na escolha do método de processamento do componente sangüíneo ( PRP ou ECLP).

Rotineiramente, todos os pacientes do ambulatório transfusional possuem prontuários organizados por data e nome. Nesse prontuário constam ainda a folha de primeiro comparecimento, a folha de procedimento diário e folha única. Na folha de primeiro comparecimento estão os dados de identificação do paciente como, endereço, profissão, diagnóstico principal, anamnese médica resumida, doenças associadas, doenças infecciosas, história gestacional e história transfusional pregressa.

A folha de procedimento diário é preenchida toda vez que o paciente comparece ao ambulatório, geralmente para receber transfusão de sangue, pelo corpo de enfermagem especializado em hemoterapia. Nela constam a data de comparecimento, diagnóstico, estado geral do paciente, avaliação da integridade cutâneo-mucosa, avaliação da ingesta

e das eliminações, história de febre, sangramentos, medicamentos em uso, queixas e/ou observações, dados da última transfusão (data, componente, quantidade, local, tipo de reação transfusional e assinatura do enfermeiro responsável). Na mesma folha, o médico do ambulatório transfusional faz a prescrição da transfusão e/ou medicação baseado na solicitação do médico assistente, bem como são anotados o diagnóstico e o tratamento de qualquer intercorrência durante a transfusão do componente sangüíneo. Rotineiramente são anotados, antes e após a transfusão, a pressão arterial, a frequência cardíaca, a temperatura, horário e assinatura do responsável pelos dados.

Todos os dados transfusionais do paciente são resumidos na folha única. Ela contém diagnóstico, resultado da tipagem ABO e Rh, da pesquisa de anticorpos irregulares e de fenotipagem eritrocitária do paciente. Cada episódio transfusional é relatado nessa folha com os seguintes dados: data, pesquisa e identificação de anticorpos irregulares, hemoglobina prévia a transfusão, o(s) hemocomponente(s) recebido(s), o(s) número(s) da(s) bolsa(s), volume da bolsa, data de validade da bolsa, ABO e Rh da bolsa, sorologia da bolsa, fenotipagem da bolsa e as reações transfusionais observadas.

No livro de entrada dos pacientes ao ambulatório transfusional, foram pesquisados retrospectivamente a data, os nomes

dos pacientes e os componentes recebidos no período de março de 1998 e maio de 1999. Foram estudados os prontuários de 524 pacientes que receberam 2.092 CH com redução de CLP em 1.354 episódios transfusionais, e 15 pacientes que receberam 104 unidades de CP-ECLP em 17 episódios transfusionais. Por intermédio das folhas de primeiro comparecimento, folhas de procedimento diário e folha única foram obtidos os seguintes dados: data da transfusão, nome do paciente, idade, diagnóstico, número de transfusões anteriores, número e tipo de reações transfusionais anteriores, tipo de hemocomponente(s) recebidos, pré-medicação recebida e reações transfusionais ocorridas. No mesmo período, foram sorteados pacientes para o grupo controle e analisados os mesmos dados. O grupo controle foi constituído por 912 pacientes que receberam 2.302 transfusões de CH coletadas em CPDA1 em 1.521 episódios transfusionais, e por 49 pacientes que receberam 239 unidades de CP-PRP em 54 episódios transfusionais. Foram excluídos dos dois grupos os pacientes que receberam transfusões de hemocomponentes filtrados (filtros de leucócitos) e os pacientes que receberam transfusão de CH e CP concomitantemente, ou hemocomponentes obtidos pelos dois métodos comparados (PRP ou ECLP) no mesmo episódio transfusional.

#### 4.8 Metodologia Estatística

As comparações das rotações quanto aos componentes de ST, CH, PF, CLP e CP foram realizadas pela análise de variância (nos casos de 3 ou mais forças g/min) e teste t de Student para amostras independentes<sup>160</sup> (nos casos de 2 forças g/min) com suposição de homocedasticidade, quando os desvios-padrão não diferiam significativamente, ou com suposição de heterocedasticidade, quando os desvios-padrão diferiam significativamente. Comparações múltiplas foram feitas com base na estatística de Wald. Para as situações em que a suposição de normalidade dos dados não estava satisfeita, utilizaram-se os testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon para amostras independentes<sup>161</sup>.

Para comparar os episódios transfusionais nos grupos de pacientes transfundidos com hemocomponentes pelos métodos da ECLP e PRP, com relação a cada uma das variáveis reação e uso de pré-medicação separadamente, realizaram-se os testes qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher<sup>162</sup>. A comparação entre os dois grupos quanto à reação e ao uso de pré-medicação, considerados conjuntamente, foi



realizada por um modelo linear para dados categorizados. Comparações múltiplas foram feitas com base na estatística de Wald.

O estudo da existência de associação entre as variáveis número de transfusões anteriores e reação foi feito pelo teste qui-quadrado de Pearson<sup>160</sup>.

O nível de significância utilizado para os testes foi de 5%.

## 5.RESULTADOS

## **5.1 Resultados da primeira fase do estudo em que se utilizou o método clássico (PRP) para a obtenção de componentes.**

### **5.1.1 Sangue total ( tabela 1, página 112)**

O volume médio de ST coletado em bolsas triplas com CPDA-1 foi de  $450 \pm 8,6$ ml, sendo o volume mínimo coletado de 415ml e o máximo de 473ml. O hematócrito médio foi de  $39,3 \pm 3,1\%$ , sendo o valor mínimo de 33% e o máximo de 45%. A mediana foi de 39%.

A hemoglobina total em g/dl apresentou valores de 10,1g/dl a 16,4g/dl, com mediana de 13,2g/dl e média de  $13,3 \pm 1,2$ g/dl. Quando calculamos a quantidade de Hb por bolsa, encontramos média de  $59,7 \pm 5,3$ g/bolsa e mediana de 59,8g/bolsa. A quantidade mínima de Hb por bolsa foi de 48,9g/dl e a máxima de 73,6g/bolsa.

A quantidade mínima de leucócitos encontrada por unidade de ST foi de  $1,5 \times 10^9$  e a máxima foi de  $8,7 \times 10^9$ , sendo a média  $3,4 \pm 1,3 \times 10^9$ , com mediana de  $3,1 \times 10^9$ . A quantidade média de plaquetas por unidade foi de  $7,7 \pm 1,6 \times 10^{10}$ . A mediana encontrada foi de  $7,4 \times 10^{10}$ , com valor mínimo de  $4,6 \times 10^{10}$  e máximo de  $12,0 \times 10^{10}$ . Duas unidades de ST (2,3%) apresentaram contagem de plaquetas inferior a  $5,5 \times 10^{10}$ .

#### 5.1.2 Concentrado de hemácias ( tabela 1, página 112)

O volume médio do concentrado de hemácias em CPDA1 foi de  $273,4 \pm 26,9$ ml e mediana de 277,5ml. O volume mínimo coletado foi de 211ml e o máximo de 336ml. O hematócrito médio foi de  $70,8 \pm 2,7\%$ , sendo o valor mínimo de 64% e o máximo de 79%. A mediana foi de 71%.

A hemoglobina total em g/dl variou de 20,4g/dl a 27,2g/dl, com mediana de 23,8g/dl e média de  $23,6 \pm 1,0$ g/dl. Quanto calculamos a quantidade de Hb por bolsa, a média foi de  $64,6 \pm 6,3$ g/bolsa, sendo a mediana de 65,0g/bolsa. A quantidade mínima de Hb por bolsa foi de 48,1g/bolsa e a máxima de 80,0g/bolsa.

**TABELA 1** - MÉDIAS, DESVIOS-PADRÃO E MEDIANA DOS RESULTADOS DE TESTES LABORATORIAIS REALIZADOS EM 88 UNIDADES DE SANGUE TOTAL (ST) E DE SEUS COMPONENTES: CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS (CH), PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP), CONCENTRADO DE PLAQUETAS (CP) E PLASMA FRESCO (PF) COLETADOS EM BOLSAS TRIPLAS EM CPDA-1 E FRACIONADAS PELO MÉTODO CLÁSSICO (PRP), TAMBÉM DENOMINADO DE PRIMEIRA FASE DESTA ESTUDO

HEM <sup>§</sup>	VOLUM E (ml)	REC. VOL.* (%)	SWIR LING	pH	H <sup>§</sup> (%)	Hb†† (g/dl)	Hb†† (g/dl)	LEUC <sup>¶</sup> /unidade	PLAQ <sup>¶</sup> /unidade	REC. HB* (%)	DEP. PLAQ <sup>¶</sup> (%)	REC.PLQ <sup>¶</sup> (%)	DEP. LEUC <sup>¶</sup> (%)
ST média±DP mediana	450±86 450	-	-	-	39,3±3,1 39	13,3±1,2 13,2	39,7±5,3 39,8	3,4x10 <sup>9</sup> ±1,3 3,1	7,3x10 <sup>9</sup> ±1,6 7,4	-	-	-	-
CH média±DP mediana	273,4±26,9 277,5	-	-	-	70,8±2,7 71,0	23,6±1,0 23,8	64,6±6,3 65,0	3,1x10 <sup>9</sup> ±0,9 2,9	20,8x10 <sup>9</sup> ±10,1 19,1	10,3±4,3 10,9	7,6±12,8 7,5	-	8,5±12,8 10
PRP média±DP mediana	241,6±27,0 239,5	-	-	-	-	-	-	8,2x10 <sup>9</sup> ±4,7 6,9	7,9x10 <sup>9</sup> ±1,7 7,5	-	-	-	-
CP média±DP mediana	61,9±3,8 62,0	-	3,0±0,1 3,0	7,4±0,2 7,4	-	-	-	3,6x10 <sup>7</sup> ±2,1 3,3	7,3x10 <sup>9</sup> ±1,5 7,0	-	-	93,6±8,6 94,0	56,4±24,9 44,0
PF média±DP mediana	174,6±26,3 172,0	72,0±3,9 72,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: FPS/HSP

§ - hemocomponente

\* percentual de recuperação de volume de plasma

§ hematócrito

† hemoglobina total

¶ número de leucócitos / unidade

¶ número de plaquetas / unidade

± percentual de recuperação de hemoglobina em CH

○ percentual de depleção de plaquetas em CH

□ percentual de recuperação de plaquetas do PRP

■ percentual de depleção do número total de leucócitos em CH e em CP

No concentrado de hemácias, a quantidade mínima de leucócitos por unidade foi de  $1,6 \times 10^9$  e a máxima foi de  $5,9 \times 10^9$ , com média de  $3,1 \pm 0,9 \times 10^9$  e mediana de  $2,9 \times 10^9$ . A quantidade média de plaquetas por unidade foi de  $28,0 \pm 10,1 \times 10^9$ . A mediana encontrada foi de  $19,1 \times 10^9$ , com valor mínimo de  $8,0 \times 10^9$  e máximo de  $75 \times 10^9$ .

O percentual de recuperação de hemoglobina foi de  $108,3 \pm 4,3\%$ . Quanto à depleção de plaquetas no CH, a média foi de  $74,6 \pm 12,8\%$  e a mediana de  $76,5\%$  (valor mínimo =  $18\%$  e máximo =  $98\%$ ). A depleção de leucócitos no CH foi em média de  $8,5 \pm 12,8\%$ . A mediana foi de  $3\%$  e os valores mínimo e máximo, de, respectivamente,  $0$  e  $53\%$ .

### 5.1.3 Plasma rico em plaquetas ( tabela 1, página 112)

O volume médio do plasma rico em plaquetas foi de  $241,6 \pm 27$ ml, com valor mínimo de  $172$ ml e máximo de  $290$ ml. A mediana foi de  $239,5$ ml. A quantidade de plaquetas encontrada foi, em média, de  $7,9 \pm 1,7 \times 10^{10}$ , e a mediana de  $7,5 \times 10^{10}$ . O valor máximo foi de  $12 \times 10^{10}$  e o mínimo de  $7,5 \times 10^{10}$ . O número médio de leucócitos foi de  $8,2 \pm 4,7 \times 10^7$ .

A mediana foi de  $6,9 \times 10^7$ , com valor mínimo de  $1,4 \times 10^7$  e máximo de  $23,3 \times 10^7$  (Tabela 1).

#### 5.1.4 Concentrado de plaquetas ( tabela 1, página 112)

As unidades de concentrado de plaquetas apresentaram volume médio de  $61,9 \pm 3,8$ ml e mediana de 62ml. O menor volume foi de 41ml e o maior de 70ml. Apenas uma unidade (1,1%) apresentou volume abaixo de 50ml e nenhuma acima de 70ml. O fenômeno de "swirling" apresentou média e mediana de  $3,0 \pm 0,1$ . O valor mínimo foi de 2,0 e o máximo de 3,0. Todas as unidades apresentaram pH acima de 6,0. O menor pH encontrado foi de 6,9 e o maior de 7,4, com mediana e média de  $7,4 \pm 0,2$ .

O número médio de plaquetas por unidade foi de  $7,3 \pm 1,5 \times 10^{10}$  e mediana de  $7,0 \times 10^{10}$ , com valor mínimo de  $3,5 \times 10^{10}$  e máximo de  $11,4 \times 10^{10}$ . Apenas 4 unidades (4,5%) em 88 apresentaram valores abaixo de  $5,5 \times 10^{10}$ . A recuperação de plaquetas do PRP foi em média de  $93,6 \pm 8,6\%$ . A mediana foi de 94%, sendo o valor mínimo de 72% e o máximo de 110%. O percentual de recuperação acima de 100% ocorreu em função da variação metodológica do equipamento Coulter.

Quanto ao número de leucócitos residuais no CP, este foi em média de  $3,6 \pm 2,1 \times 10^7$  e a mediana de  $3,3 \times 10^7$ . O valor mínimo foi de  $1,1 \times 10^7$  e o máximo de  $10,9 \times 10^7$ . Todas as unidades apresentaram número de leucócitos abaixo de  $1,0 \times 10^8$ . A depleção de leucócitos do PRP foi em média de  $56,4 \pm 24,9\%$ . A mediana foi de  $44,0\%$ . O percentual de depleção de leucócitos variou de 5% a 100%.

#### **5.1.5 Plasma fresco ( tabela 1, página 112)**

O volume médio de plasma fresco pobre em plaquetas foi de  $174,6 \pm 26,3\text{ml}$  e a mediana de  $172\text{ml}$ . O volume mínimo de plasma foi de  $104\text{ml}$  e o máximo de  $225\text{ml}$ . Das 88 unidades de plasma, 37 (42,0%) apresentaram volume menor que  $170\text{ml}$ . A média de recuperação de volume em relação à quantidade de plasma existente nas unidades de ST foi de  $72 \pm 3,9\%$ . A mediana foi igual à média, sendo o valor mínimo de recuperação de 60% e o máximo de 87%.



## 5.2 Validação do método automatizado da ECLP com o uso de bolsas "top and bottom" triplas em CPD e CPDA1 (placa reta) na primeira fase de centrifugação. Segunda fase do estudo

### 5.2.1. Sangue total (tabela 2, página 117)

Quando comparamos o volume do ST utilizado nas 10 forças g diferentes e tempos de centrifugação que variaram de 8 a 12 minutos, observamos que o valor mínimo coletado foi de 405ml e o máximo de 500ml nas 98 bolsas de ST analisadas. Quando a força g empregada foi de 3586 g por 10 minutos, encontramos a menor média ( $\mu=430,9 \pm 19,2$ ml, mediana =429ml). Já a maior média foi observada na utilização de 3996 g por 10 min, ( $\mu =467,5 \pm 25,5$ ml, mediana 465,5ml). Quando comparamos as unidades processadas a 3390 g por 10 minutos com todas as outras, verificamos que houve diferença estatisticamente significativa somente com aquelas centrifugadas a 3586 g por 10 minutos ( $p=0,0404$ ). Nas 98 unidades de ST testadas na etapa de validação do método da ECLP com bolsas triplas TAB, a quantidade de Hb em g/dl variou de 10,0g/dl a 18,6g/dl. O valor médio encontrado nos dez grupos variou de  $12,3 \pm 1,8$ g/dl (mediana=12,1g/dl) a  $13,9 \pm 1,4$ g/dl (mediana=14,5g/dl), não havendo diferença estatisticamente significativa ( $p=0,5530$ ).

**TABELA 2 – RESULTADOS DOS TESTES LABORATORIAIS REALIZADOS EM 98 UNIDADES DE SANGUE TOTAL, COLETADAS EM BOLSAS TRIPLAS DO TIPO "TOP AND BOTTOM" PARA A VALIDAÇÃO DA FORÇA G / MIN E TEMPO DE CENTRIFUGAÇÃO A SEREM UTILIZADOS NA PRIMEIRA CENTRIFUGAÇÃO DO MÉTODO AUTOMATIZADO DE EXTRAÇÃO DA CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA (MÉDIA E DESVIO-PADRÃO)**

Força g por min / tempo de centrifugação	AMOSTRAS (N) <sup>*</sup>	VOLUME (ml) P1	Hb/TOTAL <sup>†</sup> (g/dl) P2	Hb/TOTAL <sup>†</sup> (g/dl) P3	Hc <sup>‡</sup> (%) P4	PLAQUETAS (10 <sup>9</sup> /ml) P5	LEUCÓCITOS (10 <sup>9</sup> /ml) P6
2490/10	12	4543±93	13,7±2,1	60,4±6,8	39,0±3,7	79,2±20,2	3,1±0,6
2490/12	14	4464±178	13,6±1,2	60,8±5,2	39,8±3,8	72,5±15,5	3,1±0,9
2833/10	10	4428±94	13,3±1,3	58,7±5,8	38,7±3,6	65±16,4	2,4±0,8
3013/8	15	4404±177	12,9±1	57±5,7	37,7±3,3	76,6±16,1	3,1±1,1
3199/10	10	4481±159	13,7±1,5	61,7±6,9	40,4±4,3	78,8±11,8	2,9±0,7
3199/12	11	457,7±14	13,3±1,1	60,2±5,4	38,2±3,3	79,4±10,7	2,8±0,7
3390/10	7	4559±252	13,4±1,6	61,3±9,7	38,6±4,5	82,3±20,1	3,7±1,7
3586/10	7	4309±192	12,3±1,8	52,9±8,8	36,0±4,9	64,0±12,4	2,8±0,7
3996/10	6	467,5±25,5	13,9±1,4	64,9±8,1	40,3±3,8	84,6±11,2	3,5±0,5
4427/13	6	451,2±20,9	13,7±1,8	61,7±9,6	39,8±5,1	77,5±4,1	2,7±0,5

FORTE: FPS/ISF

\* número de amostras testadas

† hemoglobina total

‡ hematócrito

P1= 0,0052 ( há diferença entre 3390/10 e 3586/10, p=0,0404)

P2= 0,5530

P3= 0,1033

P4= 0,4648

P5= 0,0465

P6= 0,0468

A quantidade total de Hb por unidade variou, em média, de  $52,9 \pm 8,8$ g/bolsa (mediana=51,9g/bolsa) a  $61,7 \pm 9,6$ g/bolsa (mediana=60,5g/bolsa), não havendo diferença estatisticamente significativa ( $p=0,1033$ ) entre os grupos. Também não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,4648$ ) entre 10 grupos estudados quanto ao hematócrito, tendo a média variado de  $36,0 \pm 4,9\%$  ( mediana=34,6%) a  $40,4 \pm 4,3\%$  ( mediana=41,0%).

Encontramos diferença estatisticamente significativa na quantidade de leucócitos encontrada nos diversos grupos ( $p=0,0468$ ), tendo a média variado de  $2,4 \pm 0,8 \times 10^9$  (mediana=2,7) a  $3,7 \pm 1,7 \times 10^9$  (mediana=3,3). A quantidade de plaquetas por unidade variou de  $64 \pm 12,4 \times 10^9$  (mediana=62) a  $84,6 \pm 11,2 \times 10^9$  (mediana=79), sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0465$ ).

### 5.2.2. Concentrado de hemácias (tabela 3, página 120)

A tabela 3 apresenta os resultados dos testes laboratoriais realizados em 98 bolsas de CH para a validação da força g / min a ser utilizada para processamento quando coletadas em bolsas triplas TAB pelo método automatizado. O volume do CH, a Hb em g/dl, a Hb por

unidade e o hematócrito não apresentaram diferença estatisticamente significativa nas diversas forças g/min estudadas ( $p=0,3319$ ,  $p=0,0725$ ,  $p=0,2814$ ,  $p=0,2713$ , respectivamente). Houve diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de plaquetas no CH obtido a 3390 x g por 10 minutos ( $\mu = 0,3 \pm 0,3 \times 10^9$ , mediana=0,3) e o obtido a 2833 g por 10 minutos ( $\mu = 0,8 \pm 0,7 \times 10^9$ , mediana=0,1),  $p=0,0371$ . A menor quantidade de leucócitos foi encontrada nos CH obtidos a 3390 g por 10 minutos ( $\mu = 0,2 \pm 0,2 \times 10^9$ , mediana=0,1), porém não houve diferença estatisticamente significativa quando comparada aos outros grupos ( $p=0,1158$ ). O percentual de recuperação de Hb foi maior quando as unidades de CH foram centrifugadas a 3390 x g/10min, sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0001$ ). Realizada a análise pareada das unidades de CH centrifugadas a 3390 x g /10min e as outras, observamos que o percentual de recuperação de Hb foi igual aos processados a 2490g/10 min ( $p=0,2674$ ), a 2833 x g/10 min ( $p=0,8020$ ) e a 3013 x g/8min (0,1414). A maior depleção de leucócitos ocorreu a 3390 x g/10min, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ( $p=0,0006$ ). A análise pareada da centrifugação a 3390 x g/10min mostrou que não há diferença estatisticamente significativa na depleção de leucócitos quando comparada às unidades processadas a 2490g/10min ( $p=0,1144$ ) ou a 3996 x g/10min ( $p=0,1065$ ).

**TABELA 3-** RESULTADOS DOS TESTES LABORATORIAIS REALIZADOS EM 98 CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS (CH) OBTIDOS A PARTIR DE UNIDADES DE SANGUE TOTAL COLETADAS EM BOLSAS TRIPLAS DO TIPO "TOP AND BOTTOM" PELO MÉTODO AUTOMATIZADO PARA VALIDAÇÃO DA FORÇA G/MIN E TEMPO DE CENTRIFUGAÇÃO A SEREM UTILIZADOS ( MÉDIA E DESVIO-PADRÃO).

Força g por min/ tempo de centrifugação	AMOSTRAS (n) <sup>a</sup>	VOLUME (ml) P1	HbT <sup>1</sup> (g/dl) P2	HbT <sup>1</sup> (g/unic) P3	Hc <sup>2</sup> (%) P4	PLAQ. <sup>3</sup> (10 <sup>6</sup> /unic) P5	LEUC. <sup>4</sup> (10 <sup>6</sup> /unic) P6	REC.Hb <sup>5</sup> (%) P7	DEP.LEU (%) P8	DEP.PLAQ. (%) P9
2490/10	12	290,7±166	182±1,3	459±59	55±3,3	0,5±0,4	0,3±0,3	75,8±3,2	83,5±26,1	99,2±0,6
2490/12	14	235,3±202	18,3±1,2	43,1±6,3	55,1±3,2	0,7±0,5	0,5±0,4	70,7±5	85,9±10,3	99,1±0,7
2833/10	10	253,5±196	18,1±1,2	46±6,3	53,8±3,4	*0,8±0,7	0,2±0,1	78,1±3,8	91,5±5,7	98,8±0,9
3013/8	15	239,4±27	17,7±1	42,6±6,4	54±2,8	0,2±0,3	0,4±0,3	74,5±5,7	88,7±8,1	99,7±0,4
3199/10	10	246,2±22,1	17,9±1,3	44,2±6,8	53,7±3,6	0,2±0,3	0,3±0,3	71,3±4,3	89,3±8,5	99,9±0,3
3199/12	11	241,5±23,6	17,8±1	43±6,2	53,3±2,2	0,4±0,4	0,5±0,3	71,3±5,7	82,8±13,3	99,5±0,5
3390/10	7	252,3±17,4	18,9±1,3	48±6,8	56,1±3,4	*0,3±0,3	0,2±0,2	78,8±6,6	95,7±2,5	99,6±0,3
3586/10	7	228,6±29,9	16,3±2,2	37,9±9,4	49,2±5,8	0,6±0,7	0,5±0,5	70,8±8,1	81,2±16,2	99,0±1,2
3996/10	6	248,8±23	18,1±1,7	45,3±8,4	54,3±3,9	0,8±0,5	0,4±0,3	69,3±4,4	87,0±12,8	99,0±0,5
4427/13	6	240,3±23,2	18,1±1,3	40,8±7,1	53,9±3,6	0,3±0,3	0,3±0,2	70,9±2,8	90,0±7,3	99,7±0,5

FONTE: PPS/HSP. <sup>a</sup>número de amostras, <sup>1</sup>hemoglobina total, <sup>2</sup>hematócrito, <sup>3</sup>número de plaquetas/unidade, <sup>4</sup>número de leucócitos / unidade, <sup>5</sup>percentual de recuperação de hemoglobina em CH, <sup>6</sup>percentual de depleção do número total de leucócitos em CH, <sup>7</sup>percentual de depleção de plaquetas em CH

\*P1=0,3319

P2=0,0725

P3=0,2814

P4=0,2713

P5=0,0150 (há diferença entre 3390/10 e 2833/10, p = 0,037)

P6=0,1158

P7=0,0001 ( Não há diferença entre 3390/10 e 2490/10 p = 0,2674 entre 3390/10 e 2833/10 p = 0,8020, entre 3390/10 e 3013/8 p=0,1414)

P8=0,0006 (Não há diferença entre 3390/10 e 2490/10 p = 0,1144 entre 3390/10 e 3996/10 p = 0,1065)

P9=0,0001 (há diferença entre 3390/10 e 2490/10 p=0,0394, com 2490/12 p=0,0151, com 2833/10 p=0,0096 e com 3996/10 p=0,0043. Não há diferença entre 3390/10 e 3013/8 p=0,6703, com 3199/12 p=0,3759 e com 3586/10 p=0,1656)

A depleção de plaquetas no CH apresentou diferença estatisticamente significativa entre as diferentes forças g e tempo de centrifugação estudados. O CH obtido a 3390 x g/10min teve numericamente a quarta maior depleção de plaquetas, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as quatro centrifugações que mais depletaram o CH de plaquetas. Entretanto, essa diferença foi estatisticamente significativa quando comparada às das unidades centrifugadas a 2490g/10min ( $p=0,0394$ ), a 2490g/12min ( $p=0,0151$ ), a 2833 x g/10min ( $p=0,0096$ ) e a 3996 x g/10min ( $p=0,0043$ ).

Assim, constatamos que o CH obtido a 3390 x g por 10 minutos apresentou menor quantidade de leucócitos em números absolutos, a maior depleção de leucócitos e maior recuperação de hemoglobina em números absolutos, bem como boa depleção de plaquetas, tendo sido esta, a força g e o tempo de centrifugação escolhidos neste estudo quando as bolsas de ST fossem coletadas em bolsas triplas do tipo TAB pelo método automatizado.

### 5.2.3. Plasma fresco (tabela 4, página 123)

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os volumes de plasma obtidos nas 10 diferentes forças g e o tempo de centrifugação ( $p=0,4299$ ). O menor volume médio foi de 229,1ml (mediana=223ml) e o maior, de 253,1ml (mediana=254ml). Quanto ao percentual de recuperação de plasma a 3390 x g/10min (87,7%), houve diferença estatisticamente significativa apenas quando comparado às unidades centrifugadas a 3996 x g/10min (92,7%), ( $p=0,0094$ ).

**TABELA 4** – VOLUME E RECUPERAÇÃO DE PLASMA EM 98 UNIDADES DE PLASMA FRESCO OBTIDAS A PARTIR DE UNIDADES DE SANGUE TOTAL COLETADAS EM BOLSAS TRIPLAS EM SAGM PELO MÉTODO AUTOMATIZADO PARA VALIDAÇÃO DA FORÇA G POR MIN E TEMPO DE CENTRIFUGAÇÃO A SEREM UTILIZADOS ( MÉDIA, DESVIO-PADRÃO)

Força g Por min/Tempo de centrifugação	AMOSTRAS (N) <sup>•</sup>	VOLUME (ml)	REC. PLASMA <sup>†</sup> (%) P1
2490/10	12	236,3 ± 20,5	84,1 ± 6,1
2490/12	14	241,5 ± 26,7	88,0 ± 6,6
2833/10	10	241,4 ± 20	86,5 ± 4,6
3013/8	15	242 ± 24,9	87,7 ± 5,4
3199/10	10	243 ± 25,3	91,2 ± 3,8
3199/12	11	253,1 ± 24,1	89,5 ± 5,7
3390/10	7	244,9 ± 17,6	* 87,7 ± 4,6
3586/10	7	229,1 ± 19,3	87,5 ± 5,8
3996/10	6	259,3 ± 21,5	* 92,7 ± 1,8
4427/13	6	245,0 ± 15,1	90,3 ± 3,1

Fonte: FESBIS

<sup>•</sup> número de amostras testadas

<sup>†</sup> percentual de recuperação de plasma

P1 = 0,0002 ( há diferença entre 3390/10 e 3996/10 p = 0,0094 )



#### 5.2.4 Camada leucoplaquetária (Tabela 5, página 125 e Tabela 6, página 127 )

Analisando a **tabela 5**, verificamos que o volume médio da CLP obtido a 3390 x g/10min foi de  $120,4 \pm 3,8$ ml (mediana=119ml). Houve diferença estatisticamente significativa quando comparado à centrifugação a 2833 x g/10min ( $p=0,0001$ ) e 3013 x g/8min ( $p=0,0098$ ).

A quantidade de hemoglobina em g/dl variou em média de  $16,9 \pm 0,6$ g/dl (mediana 17,2g/dl) quando as unidades de CLP foram centrifugadas a 3586 x g/10min a  $18,8 \pm 2,6$ g/dl (mediana=19,1g/dl) a 3390 x g/10min, havendo diferença estatisticamente significativa entre as 10 rotações estudadas ( $p=0,0001$ ). Quando analisamos a centrifugação a 3390 x g/10min, encontramos a maior média de hemoglobina por unidade  $22,6 \pm 1,2$ g/bolsa (mediana=23,3g/bolsa). Verificamos ainda que apenas a centrifugação da CLP a 2833 x g/10min (média= $18,3 \pm 2,0$ g/bolsa, mediana=18,7g/bolsa) apresentou diferença estatisticamente significativa com os resultados obtidos da centrifugação da CLP a 3390 x g/10min ,  $p=0,0006$ .

**TABELA 5** – RESULTADOS LABORATORIAIS DE TESTES REALIZADOS EM 98 UNIDADES DE CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA (CLP) OBTIDAS A PARTIR DE BOLSAS DE SANGUE TOTAL COLETADAS EM SAGM PELO MÉTODO AUTOMATIZADO PARA A VALIDAÇÃO DA FORÇA G POR MIN E TEMPO DE CENTRIFUGAÇÃO A SEREM UTILIZADOS ( MÉDIA, DESVIO-PADRÃO)

Força g por min / tempo de centrifugação	AMOSTRAS (N) <sup>*</sup>	VOLUME (ml) P1	HbT <sup>†</sup> (g/dl) P2	HbT <sup>†</sup> (g/unid) P3	Ht(%) <sup>‡</sup> P4	PLAQUETAS <sup>§</sup> (10 <sup>7</sup> /unid) P5	LEUCÓCITOS <sup>¶</sup> (10 <sup>7</sup> /unid) P6
2490/10	12	137,5±31,1	17,1±1,5	22±19	49,6±5,1	59,4±15,6	3,1±0,9
2490/12	14	121,9±12,4	18,2±2	22,3±2,2	55,7±5,8	59,6±16,7	2,8±0,6
2833/10	10	*111,1±4,4	17±0,5	*18,3±2	50,5±1,5	53,4±21,2	2,3±0,7
3013/8	15	*114,1±7,5	17,9±1,7	20,5±2,3	54,5±6,2	56,9±15,4	2,8±0,9
3199/10	10	116,1±5,8	17,9±1,3	20,5±1,4	53,1±3,8	70,1±13,7	2,5±0,8
3199/12	11	121,8±2,2	18,1±1,3	22,1±1,5	54,5±3,8	67,5±13,3	2,5±0,7
3390/10	7	*120,4±3,8	18,8±2,6	*22,6±2,7	55,8±7,4	58,8±21,6	3,3±1,5
3586/10	7	123,3±4,1	16,9±0,6	20,9±0,9	51,2±2,1	54,7±10,6	2,4±0,7
3996/10	6	119±2,7	18,7±0,6	22,2±1,2	56±1,8	67,4±20,9	3,1±0,9
4427/13	6	121±6,8	18,7±1,1	22,5±1,4	55,4±2,1	77,8±14,2	2,3±0,4

FONTE: FFS/USP

\* número de amostras testadas

† hemoglobina total

‡ hematócrito

§ número de leucócitos / unidade

¶ número de plaquetas / unidade

P1 = 0,0001 ( há diferença entre 3390/10 com 2833/10 p = 0,0001 e com 3013/8 p=0,0098 )

P2 = 0,0001 ( não há diferença entre 3390/10 e outros p > 0,05 )

P3 = 0,0001 ( há diferença entre 3390/10 e 2833/10 p = 0,0006 )

P4 = 0,0001 ( não há diferença entre 3390/10 e outros p > 0,05 )

P5=0,0798

P6=0,0910

O hematócrito médio das unidades de CLP analisadas nas diferentes forças g e tempo de centrifugação teve como valor mínimo o da centrifugação a 2490g/10min ( $\mu = 49,6 \pm 5,1\%$ , mediana=51,3) e o maior com o processamento a 3390 x g/10min ( $\mu = 55,8 \pm 7,4\%$ , mediana=56,4), não havendo diferença estatisticamente significante ( $p=0,0526$ ). A quantidade média de plaquetas variou de  $53,4 \times 10^9 \pm 21,2 \times 10^9$  (mediana=5,4), quando a CLP foi centrifugada a 2833 x g/10min, a  $77,8 \pm 14,2 \times 10^9$  (mediana=7,8), quando processada a 4427 x g/13min, não havendo diferença estatisticamente significante no número de plaquetas existentes nas diversas forças g e tempo de centrifugação estudados ( $p=0,0798$ ). A quantidade média de leucócitos na CLP variou de  $2,3 \pm 0,4 \times 10^9$  (mediana=2,2) a  $3,3 \pm 1,5 \times 10^9$  (mediana=3,0). Não houve diferença estatisticamente significante na quantidade média de leucócitos na CLP, nas diferentes forças g e tempo de centrifugação estudados ( $p=0,0910$ ).

A **tabela 6** demonstra os resultados do pH encontrados a 24, 48, 72 e 96 horas em 7 unidades de CLP armazenadas em repouso em temperatura ambiente (20-24°C). O resultado do pH medido no final do primeiro dia foi em média de  $7,1 \pm 0,2$ ; no segundo dia, caiu para  $7,0 \pm 0,0$ ; no terceiro dia, para  $6,8 \pm 0,3$ ; e no final do quarto dia, para  $6,5 \pm 0,0$ .

**TABELA 6 – AVALIAÇÃO DO PH DE UNIDADES DE CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA MANTIDAS EM TEMPERATURA AMBIENTE E ARMAZENADAS POR ATÉ 96 HORAS.**

AMOSTRA (N) <sup>*</sup>	pH 24hs	pH 48hs	pH 72hs	pH 96hs
1	7,0	7,0	6,5	6,5
2	7,0	7,0	7,0	6,5
3	7,5	7,0	6,5	6,5
4	7,5	7,0	7,0	6,5
5	7,0	7,0	7,0	6,5
6	7,0	7,0	7,0	6,5
7	7,0	7,0	6,5	6,5
Média	7,1	7,0	6,8	6,5
Desvio Padrão	0,2	0,0	0,3	0,0

\* número de amostras testadas

**5.3 Comparação da placa reta com a placa côncava no extrator automático, para a obtenção de componentes sanguíneos coletados em bolsas "top and bottom" triplas em CPD e SAGM pelo método automatizado da ECLP e centrifugadas a 3390 g/10 min. Complementação da segunda fase do estudo**

A **tabela 7** ( página 129) descreve as características das 12 unidades de sangue total fracionadas com o uso da placa reta. Essas unidades foram centrifugadas a 3390 x g /10 min e separadas em concentrado de hemácias, camada leucoplaquetária e plasma. Os resultados, a média e os respectivos desvios-padrão (DP) foram: volume de 449,5 ± 14,3ml; hemoglobina total em g/dl de 13,4 ± 1,0g/dl; hemoglobina total por unidade de 63,4 ± 5,3g/bolsa; hematócrito de 38,9 ± 2,8%; número de plaquetas de 81,5 ± 21,3 x 10<sup>9</sup> e contagem de leucócitos de 3,1 ± 1,3 x 10<sup>9</sup>.

TABELA 7 - MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DOS RESULTADOS DE TESTES LABORATORIAIS REALIZADOS EM 12 UNIDADES DE SANGUE TOTAL (ST) E DE SEUS COMPONENTES: CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS (CH), CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA (CLP) E PLASMA FRESCO (PF) OBTIDOS POR CENTRIFUGAÇÃO A 3390 X G/10MIN COM O USO DE EXTRATOR AUTOMÁTICO COM PLACA RETA

HEM <sup>#</sup>	VOLUME (ml)	REC. VOL.*	Ht <sup>†</sup> (%)	Hb T <sup>†</sup> (g/dl)	Hb T <sup>†</sup> (g/unid)	LEUC. <sup>‡</sup> /unid x 10 <sup>9</sup>	PLAQ. <sup>§</sup> /unid x 10 <sup>9</sup>	REC. Hb <sup>¶</sup> (%)	DEP. PLAQ. <sup>Ⓞ</sup> (%)	DEP. LEUC. <sup>■</sup> (%)
ST média ± DP	485 ± 143	-	38 ± 2,8	134 ± 10	63,4 ± 5,3	3,1 ± 1,3	81,5 ± 21,3	-	-	-
CH média ± DP	240 ± 163	-	52 ± 2,6	178 ± 0,9	43,3 ± 4,9	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,6	71,8 ± 3,4	99,2 ± 0,8	92,1 ± 5,1
CLP média ± DP	115,1 ± 3,9	-	47,1 ± 7,5	16,1 ± 2,6	18,6 ± 3,3	2,1 ± 1,0	55,0 ± 1,7	-	-	-
PF média ± DP	248,2 ± 19,9	90,9 ± 4,1	-	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: FPS/HSP

<sup>#</sup> - hemocomponente

\* percentual de recuperação de volume de plasma

<sup>†</sup> hematócrito

<sup>‡</sup> hemoglobina total

<sup>§</sup> número de leucócitos / unidade

<sup>¶</sup> número de plaquetas / unidade

<sup>Ⓞ</sup> percentual de recuperação de hemoglobina em CH

<sup>■</sup> percentual de depleção de plaquetas em CH

<sup>■</sup> percentual de depleção do número total de leucócitos em CH

Na **tabela 8** (página 131), são apresentadas as características de 20 unidades de ST fracionadas com a placa côncava. Estas unidades também foram centrifugadas a 3390 x g por 10 minutos e separadas em CH, CLP e plasma. Os resultados, média e os respectivos desvios-padrão das unidades de ST foram: volume de  $458,7 \pm 15,8$  ml ; hemoglobina total em g/dl de  $13,8 \pm 1,0$ g/dl; hemoglobina total por unidade de  $63,4 \pm 5,4$ g/bolsa; hematócrito de  $40,0 \pm 3,2\%$ ; número médio de plaquetas de  $78,9 \pm 11,9 \times 10^9$  e contagem de leucócitos de  $3,2 \pm 1,0 \times 10^9$ .

A análise estatística dos parâmetros avaliados nas unidades de ST fracionadas com o uso de placa reta ou côncava, apresentados nas **tabelas 7 e 8**, demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa para os volumes coletados, na quantidade de hemoglobina em g/dl, na quantidade de hemoglobina total por unidade, no hematócrito, na quantidade de plaquetas existentes e na quantidade de leucócitos existentes ( $p=0,6736$ )

**TABELA 8 - MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DOS RESULTADOS DE TESTES LABORATORIAIS REALIZADOS EM 20 UNIDADES DE SANGUE TOTAL (ST) E DE SEUS COMPONENTES: CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS (CH), CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA (CLP) E PLASMA FRESCO (PF) OBTIDOS POR CENTRIFUGAÇÃO A 3390 X G/10MIN COM O USO DE EXTRATOR AUTOMÁTICO COM PLACA CÔNCAVA**

HEM <sup>§</sup>	VOL (ml)	REC. VOL. <sup>*</sup>	H <sup>§</sup> (%)	HbT <sup>†</sup> (g/dl)	HbT <sup>†</sup> (g/unid)	LEUC <sup>¶</sup> /uncl 10 <sup>9</sup>	PLAQ <sup>‡</sup> /uncl 10 <sup>9</sup>	REC. HB <sup>•</sup> (%)	DEP. PLAQ <sup>◊</sup> (%)	DEP. LEUC <sup>■</sup> (%)
ST média±DP	458,7±15,8	-	40,0±3,2	13,8±1,0	63,4±5,4	32±1,0	78,9±11,9	-	-	-
CH média±DP	286,9±15,8	-	60,8±2,8	20,3±0,8	58,4±5,0	0,8±0,6	0,6±0,6	89,2±9,5	76,9±14,1	99,3±0,7
CLP média±DP	111,5±11,7	-	34,6±3,1	8,1±1,0	9,1±2,0	2,6±0,9	74,9±16,9	-	-	-
PF média±DP	204,0±17,0	74,0±2,4	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: FPS/HSP

§ - hemocomponente

\* percentual de recuperação de volume de plasma

§ hematócrito

† hemoglobina total

¶ número de leucócitos / unidade

‡ número de plaquetas / unidade

• percentual de recuperação de hemoglobina em CH

◊ percentual de depleção de plaquetas em CH

■ percentual de depleção do número total de leucócitos em CH



As unidades de CH obtidas com a placa reta (**tabela 7**) apresentaram os seguintes resultados: volume médio de  $242,0 \pm 16,3$ ml; hemoglobina média total em g/dl de  $17,8\text{g/dl} \pm 0,9\text{g/dl}$ ; hemoglobina média total por unidade de  $43,3 \pm 4,9\text{g/bolsa}$ ; hematócrito médio de  $52,3 \pm 2,6\%$ ; número médio de plaquetas de  $0,6 \pm 0,6 \times 10^9$ ; quantidade média de leucócitos de  $0,2 \pm 0,2 \times 10^9$ . A recuperação de hemoglobina foi, em média, de  $71,8 \pm 3,4\%$ ; a depleção de leucócitos encontrada foi, em média, de  $92,1 \pm 5,1\%$  e a depleção de plaquetas de  $99,2 \pm 0,8\%$ .

As unidades de CH obtidas com a placa côncava (**tabela 8**) apresentaram os seguintes resultados: volume médio de  $286,9 \pm 15,8$ ml; hemoglobina média total em g/dl de  $20,3 \pm 0,8\text{g/dl}$ ; hemoglobina média total por unidade de  $58,4 \pm 5,0\text{g/bolsa}$ ; hematócrito médio de  $60,8 \pm 2,8\%$ ; número médio de plaquetas de  $0,6 \pm 0,6 \times 10^9$ ; quantidade média de leucócitos de  $0,8 \pm 0,6 \times 10^9$ . A recuperação de hemoglobina foi, em média, de  $89,2 \pm 9,5\%$ ; a depleção de leucócitos foi, em média, de  $76,9 \pm 14,1\%$  e a depleção de plaquetas, de  $99,3 \pm 0,7\%$ .

A comparação estatística entre os parâmetros avaliados nas **tabelas 7 e 8** demonstrou que o volume, a quantidade de hemoglobina em g/dl, a quantidade total de hemoglobina por unidade e o hematócrito do CH foram maiores com a placa côncava, sendo essas

diferenças significantes ( $p=0,0001$ ). Houve diferença estatisticamente significativa no CH obtido com a placa côncava, quanto à quantidade de leucócitos residuais ( $p=0,0036$ ), quanto à recuperação de hemoglobina ( $p=0,0001$ ) e quanto à depleção de leucócitos ( $p=0,0013$ ). Quando comparamos a quantidade de plaquetas e o percentual de depleção de plaquetas no CH, não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,9942$  e  $p=0,6798$ , respectivamente).

Na **tabela 7** encontram-se os resultados do volume de plasma obtido com a placa reta ( média=  $248,2 \pm 19,9$ ml ) e o percentual de recuperação de plasma ( $90,9 \pm 4,1\%$ ). A **tabela 8** mostra os mesmos parâmetros analisados com a placa côncava, sendo obtidos, em média,  $204,0 \pm 17,0$ ml de volume plasmático e recuperação de plasma de  $74 \pm 2,4\%$ . Houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados encontrados, tanto para o volume ( $p=0,0001$ ) como para a recuperação de plasma ( $p=0,0001$ ).

A **tabela 7** mostra que as médias de volume de CLP obtidas com a placa reta foram de  $115,1 \pm 3,9$ ml; hemoglobina em g/dl,  $16,1 \pm 2,6$ g/dl; quantidade total de hemoglobina por unidade de CLP,  $18,6 \pm 3,3$ g/bolsa; hematócrito médio, de  $47,1 \pm 7,5\%$ ; quantidade média de plaquetas,  $55,0 \pm 18,9 \times 10^9$ ; quantidade de leucócitos de  $2,1 \pm 1,0 \times 10^9$ .

Já na **tabela 8** são apresentados as respectivas médias e desvios-padrão encontrados com o uso de placa côncava nas unidades de CLP analisadas: volume de  $111,5 \pm 11,7$ ml; hemoglobina em g/dl de  $8,1 \pm 1,0$ g/dl; quantidade total de hemoglobina por unidade de CLP de  $9,1 \text{ g} \pm 2,0$ g/bolsa; hematócrito de  $24,6 \pm 3,1\%$ ; quantidade média de plaquetas de  $74,9 \pm 16,9 \times 10^9$  e quantidade de leucócitos de  $2,6 \pm 0,9 \times 10^9$ .

A comparação estatística entre os dados das **tabelas 7 e 8** revela que não houve diferença estatisticamente significativa no volume da CLP com o uso de placa reta ou côncava ( $p=0,2363$ ). Houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de hemoglobina em g/dl, na hemoglobina em g por unidade de CLP e no hematócrito, ( $p=0,0001$ ). A quantidade de plaquetas na CLP com a placa côncava foi maior que a obtida com a placa reta ( $p=0,0049$ ). Quanto ao número de leucócitos, a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,2532$ ).

**5.4 Validação da produção de concentrado de plaquetas pelo método da ECLP a partir de 4 ou 5 unidades de CLP com o uso de placa reta ou côncava. Resultados complementares da segunda fase da pesquisa (tabela 9, página 136).**

A **tabela 9** mostra os resultados obtidos da avaliação do conjunto de 5 CLP obtidos com a placa reta. O volume médio das 12 amostras foi de  $553,8 \pm 32,4$ ml. O hematócrito médio foi de  $60,3 \pm 2,2\%$ . A quantidade média de plaquetas foi de  $32,1 \pm 3,3 \times 10^{10}$ . O número médio de leucócitos foi de  $9,0 \pm 1,5 \times 10^9$ . A partir do conjunto de 5 unidades de CLP, foram obtidos CP por centrifugação a  $2169 \times g$  por 5 min, com os seguintes resultados: volume médio de  $173,4 \pm 19,9$ ml; quantidade média de plaquetas de  $32,8 \pm 7,5 \times 10^{10}$ ; quantidade residual de leucócitos de  $0,05 \times 10^9 \pm$  de  $0,02 \times 10^9$ ; percentual médio de recuperação de plaquetas de  $101,6 \pm 22,5\%$ ; depleção de leucócitos, em média,  $99,4 \pm 0,4\%$ ; pH médio de  $6,6 \pm 0,3$ , e média do efeito "swirling", de  $2,5 \pm 0,9$ .

**TABELA 9-** RESULTADOS DOS TESTES LABORATORIAIS REALIZADOS EM 52 CONJUNTOS DE 4 OU 5 UNIDADES DE CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA (CLP) COM O USO DE PLACA RETA OU CÔNCAVA E EM UNIDADES DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS EM DIFERENTES FORÇA-G E TEMPO DE CENTRIFUGAÇÃO PARA VALIDAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS PELO MÉTODO AUTOMATIZADO COM O USO DE BOLSA TRIPLA (MÉDIA E DESVIO-PADRÃO).

Tipo de Hemocomponente	AMOSTRAS (N) <sup>a</sup>	VOLUME (ml)	SWID. ING	pH	Ht <sup>b</sup> (%)	LEUC <sup>c</sup> (10 <sup>9</sup> /unidade)	PLAQ <sup>d</sup> (10 <sup>9</sup> /unidade)	REC. PLAQ <sup>e</sup> (%)	DEP. LEUC <sup>f</sup> (%)
*Conjunto de 5 CLP (Placa reta)	12	553,8 ± 32,4 P10	-	-	60,3 ± 2,2 P8	9,0 ± 1,5	32,1 ± 3,3 P9	-	-
*CP (2169 x g / 5m)	12	173,4 ± 19,9 P1	25 ± 0,9 P7	6,6 ± 0,3 P6	-	0,06 ± 0,002 P3	3,28 ± 7,5 P2	101,6 ± 22,5 P5	99,4 ± 0,4 P4
**Conjunto de 4 CLP (Placa reta)	20	418,9 ± 34,9 P10	-	-	62,7 ± 1,5 P8	8,5 ± 1,7	33,0 ± 3,4 P9	-	-
**CP (2169 x g / 5m)	20	132,3 ± 10,2 P1	27 ± 0,5 P7	7,0 ± 0,2 P6	-	0,06 ± 0,005 P3	25,5 ± 3,8 P2	75,9 ± 9,3 P5	98,4 ± 3,9 P4
***Conjunto de 4 CLP (Placa côncava)	20	433,3 ± 27,7 P10	-	-	24,3 ± 3,8 P8	7,6 ± 1,1	32,8 ± 5,6 P9	-	-
***CP (1339 x g / 3m)	20	264 ± 12,6 P1	27 ± 0,5 P7	-	-	0,04 ± 0,002 P3	28,8 ± 5,1 P2	88,7 ± 16,1 P5	99,5 ± 0,2 P4

FORTE: P25259

NOTA \* conjunto contendo 5 unidade de CLP. Após a validação da primeira fase de preparação de hemocomponentes pelo método automatizado, efetuou-se a validação da Segunda fase da produção de hemocomponentes (preparação de CP a 2169 x g/min)

\*\* conjunto contendo 4 unidades de CLP. Após a validação da primeira fase de preparação de hemocomponentes pelo método automatizado, efetuou-se a validação da Segunda fase da produção de hemocomponentes (preparação de CP a 2169 x g/min)

\*\*\* conjunto contendo 4 unidades de CLP. Após a validação da primeira fase de preparação de hemocomponentes pelo método automatizado com a placa côncava, efetuou-se a validação da Segunda fase da produção de hemocomponentes (preparação de CP a 1339 x g/min)

<sup>a</sup> número de amostras testadas

<sup>b</sup> hematócrito

<sup>c</sup> hemoglobina total

<sup>d</sup> número de leucócitos / unidade

<sup>e</sup> número de plaquetas / unidade

<sup>f</sup> percentual de recuperação de plaquetas em CH

<sup>g</sup> percentual de depleção do número total de leucócitos em CH

P1=0,0001

P2= 0,0019 ( Não há diferença entre 4 BC 1339/3 em placa côncava com 5 BC 2169/5 em placa reta p=0,0500)

P3=0,3733

P4=0,3440

P5=0,0004 ( Não há diferença entre 4 BC 1339/3 placa côncava com 5 BC 2169/5 placa reta p= 0,0951 )

P6=0,0004

P7=0,9243

P8=0,0001

P9=0,6242

P10=0,0001

Na **tabela 9** podemos observar os resultados da avaliação do conjunto de 4 unidades de CLP obtidos com a placa reta. O volume médio das 20 amostras analisadas foi de  $418,9 \pm 34,9$ ml. O hematócrito médio foi de  $62,7 \pm 1,5\%$ . A quantidade média de plaquetas foi de  $33,6 \pm 3,4 \times 10^{10}$ . O número médio de leucócitos foi de  $8,5 \pm 1,7 \times 10^9$ . A **tabela 9** mostra ainda os resultados dos CP obtidos por centrifugação das unidades de CLP a  $2169 \times g$  por 5 minutos. O volume médio do CP foi de  $132,3 \pm 10,2$ ml. A quantidade média de plaquetas foi de  $25,5 \pm 3,8 \times 10^{10}$ . A quantidade residual de leucócitos foi de  $0,05 \pm 0,05 \times 10^9$ . O percentual médio de recuperação de plaquetas foi de  $75,9 \pm 9,3\%$ . A depleção de leucócitos foi, em média, de  $98,4 \pm 3,9\%$ . O pH médio foi de  $7,0 \pm 0,2$  e a média do efeito "swirling",  $2,7 \pm 0,5$ .

Os resultados da avaliação do conjunto de 4 unidades de CLP obtidas com a placa côncava também são apresentados na **tabela 9**. O volume médio das 20 amostras testadas foi de  $433,3 \pm 27,7$ ml. O hematócrito médio foi de  $24,3 \pm 3,8\%$ . A quantidade média de plaquetas foi de  $32,8 \pm 5,6 \times 10^{10}$ . O número médio de leucócitos foi de  $7,6 \pm 1,1 \times 10^9$ . Os CP obtidos a partir da centrifugação de unidades de CLP a  $1339 \times g$  por 3 minutos apresentaram os seguintes resultados: volume médio de  $264,4 \pm 12,6$ ml; quantidade média de plaquetas foi de  $28,8 \pm 5,1 \times 10^{10}$ ;

quantidade residual de leucócitos de  $0,04 \pm 0,02 \times 10^9$ . O percentual médio de recuperação de plaquetas foi de  $88,7 \pm 16,1\%$ ; a depleção de leucócitos foi, em média, de  $99,5 \pm 0,2\%$  e a média do efeito "swirling" foi de  $2,7 \pm 0,5$ .

Comparados os parâmetros da **tabela 9**, verifica-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os volumes de CLP ( $p=0,0001$ ) obtidos de um conjunto de 4 ou 5 unidades de CLP e o uso de placa reta ou côncava. A análise pareada demonstra que não houve diferença entre os volumes dos conjuntos de 4 unidades de CLP ( $p=0,1577$ ); porém, houve diferença entre o volume dos conjuntos constituídos de 4 e 5 unidades de CLP ( $p=0,0001$ ). Houve diferença estatisticamente significativa para os valores do hematócrito dos conjuntos de CLP ( $p=0,0001$ ). A análise pareada demonstra que o hematócrito da CLP, constituída por um conjunto de 4 unidades de CLP centrifugadas a  $1339 \times g/3\text{min}$ , é estatisticamente diferente da CLP formada por um conjunto de 4 unidades centrifugadas a  $2169 \times g$  por 5 minutos ( $p=0,0001$ ), sendo também diferente da CLP de 5 unidades a  $2169 \times g$  por 5 minutos ( $p=0,0001$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de plaquetas nas bolsas de CLP ( $p=0,6242$ ). A quantidade de leucócitos nas bolsas de CLP com 4 unidades a  $1339 \times g$  por 3 minutos é diferente estatisticamente da quantidade média de

leucócitos existentes na CLP constituída por 5 unidades de CLP ( $p=0,0155$ ). O volume do CP mostrou diferença estatisticamente significativa na análise pareada nas três comparações possíveis ( $p=0,0001$ ). Houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de plaquetas obtidas de 4 CLP ( $2169 \times g/5min$ ) e a quantidade de plaquetas obtidas de 5 CLP ( $2169 \times g/5min$ ) ( $p=0,0005$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de plaquetas obtidas de 4 CLP ( $1339 \times g/3minutos$ ) e de 5 CLP ( $2169 \times g/5 minutos$ ), ( $p=0,0450$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade residual de leucócitos no concentrado de plaquetas obtidos nos três métodos de produção; no percentual de recuperação de plaquetas obtidas com 4 CLP a  $1339 \times g$  por 3 min e 5 CLP a  $2169 \times g$  por 5 minutos ( $p=0,0450$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na depleção de leucócitos nas três comparações estudadas ( $p=0,3440$ ). Houve diferença estatisticamente significativa quanto aos valores do pH ( $p=0,0004$ ).

A **tabela 10** ( página 140) demonstra a média do pH e DP do primeiro ao quinto dia de armazenamento de 33 unidades de CP obtidos de um conjunto de 4 unidades de CLP. A média do pH variou no primeiro dia de  $6,9 \pm 0,2$  a  $6,6 \pm 0,2$  no quinto dia de armazenamento. Nenhuma unidade apresentou pH abaixo de 6,0 no último dia de armazenamento.



**TABELA 10** – AVALIAÇÃO DO PH EM CONJUNTO DE 4 UNIDADES DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS OBTIDOS A PARTIR DE CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA PRODUZIDAS POR CENTRIFUGAÇÃO DE 1339 X G/ 3 MIN E ARMAZENADAS POR ATÉ 5 DIAS.

AMOSTRAS (N) <sup>•</sup>	1 DIA	2 DIAS	3 DIAS	4 DIAS	5 DIAS
1	6,5	7,0	7,0	7,0	6,5
2	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
3	7,0	7,0	6,5	6,5	6,5
4	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
5	7,0	7,0	6,5	6,5	6,5
6	7,0	7,0	6,5	6,5	6,5
7	7,0	7,0	6,5	6,5	6,5
8	7,0	7,0	7,0	7,0	6,5
9	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
10	6,5	7,0	7,0	7,0	7,0
11	6,5	7,0	7,0	7,0	7,0
12	7,0	6,5	6,5	6,5	6,5
13	7,0	7,0	7,0	7,0	6,5
14	7,0	6,5	6,5	6,5	6,5
15	7,0	6,5	6,5	6,5	6,5
16	7,0	7,0	7,0	6,5	6,5
17	7,0	7,0	7,0	6,5	6,5
18	7,0	7,0	6,5	6,5	6,5
19	7,0	7,0	6,5	6,5	7,0
20	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
21	7,0	7,0	6,5	6,5	6,5
22	7,0	7,0	7,0	6,5	6,5
23	7,0	7,0	7,0	7,0	6,5
24	7,0	6,5	6,5	6,5	6,5
25	7,0	6,5	6,5	6,5	6,5
26	7,0	7,0	7,0	6,5	6,5
27	7,0	6,5	6,5	6,5	6,5
28	7,0	6,5	6,5	6,0	6,0
29	6,5	6,5	6,0	6,0	6,0
30	7,0	6,5	6,5	6,5	6,5
31	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
32	7,0	6,5	6,5	6,5	6,5
33	7,0	6,5	6,5	6,5	6,5
Média	6,9	6,8	6,7	6,6	6,6
Desvio padrão	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2

FORTE: FFS/HSP

• número de amostras testadas

## 5.5 Validação da melhor força g /min e tempo de centrifugação para a obtenção dos componentes sanguíneos coletados em bolsas quádruplas tipo "top and bottom" com CPD e SAGM. Terceira fase do estudo

### 5.5.1 Sangue total (tabela 11, página 142)

A **tabela 11** mostra que, realizada a análise estatística pareada das bolsas de ST centrifugadas a 3788 x g por 10 minutos com as outras forças g e tempo de centrifugação, houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0219$ ), assim como quando comparada às bolsas utilizadas a 3390 x g por 10 minutos ( $p=0,0354$ ). A média do volume das bolsas de sangue total utilizadas no estudo variou de  $442,2 \pm 21,4\text{ml}$  (mediana=440,5) a  $453,3 \pm 17,2\text{ml}$  (mediana=454,0).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os hematócritos das bolsas utilizadas na terceira fase deste estudo ( $p=0,4742$ ). Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente

significante entre os valores de hemoglobina em g/dl ( $p=0,6976$ ) e mesmo em gramas por unidade de ST ( $p=0,8762$ ).

**TABELA 11-** RESULTADOS LABORATORIAIS DE TESTES REALIZADOS EM 215 UNIDADES DE SANGUE TOTAL COLETADAS EM BOLSAS QUÁDRUPLAS EM SAGM PELO MÉTODO AUTOMATIZADO ( MÉDIA, DESVIO-PADRÃO).

Força g/min/tempo de centrifugação	AMOSTRAS (N) <sup>*</sup>	VOLUME (ml) P1	H <sup>§</sup> (%) P2	HbT <sup>†</sup> (g/dl) P3	HbT <sup>†</sup> (g/unid) P4	LEUCÓCITOS (10 <sup>9</sup> /unid) P5	PLAQUETAS (10 <sup>9</sup> /unid) P6
3390/10	49	*442,2±21,4	39,9±4,0	13,0±1,4	57,4±7,3	3,0±1,1	68,5±16,5
3390/12	35	453,3±17,2	38,2±3,4	12,5±1,1	56,7±5,7	*2,0±0,8	65,5±16,2
3788/10	22	*451,7±15,0	39,8±3,8	13,0±1,2	58,5±6,2	*2,1±0,4	80,4±8,5
4427/10	44	444,7±14,9	39,7±3,6	12,8±1,2	56,9±5,9	3,3±1,1	68,0±13,0
5603/12	65	450,8±17,2	38,9±5,4	12,6±1,7	56,8±8,1	2,8±0,9	65,4±16,1

FORÇA: P1/P2/P3/P4

\* número de amostras testadas

§ hematócrito

† hemoglobina total

P1= 0,0219 ( Há diferença entre 3788/10 com 3390/10  $p=0,0354$  )

P2= 0,4742

P3= 0,6976

P4= 0,8762

P5= 0,0001 ( Não há diferença entre 3788/10 com 3390/12  $p=0,6841$  )

P6= 0,0019 ( Há diferença entre 3788/10 com todas as outras )

Quanto à quantidade de leucócitos e plaquetas nas cinco forças g/min e tempos de centrifugação estudados, encontramos diferença estatisticamente significativa, respectivamente  $p=0,0001$  e  $p=0,0019$ . Para

os leucócitos a análise pareada mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre 3390 x g/12min e 3788 x g/10min, ( $p=0,6841$ ). Encontramos diferença estatisticamente significativa na análise pareada entre a quantidade de plaquetas nas unidades de ST a 3788 x g/10 min e nas outras forças g/ tempo de centrifugação utilizados ( $p=0,0019$ ), inclusive quando comparada a centrifugação escolhida (3788g por 10 min e as outras estudadas.

#### 5.5.2 Concentrado de hemácias (tabela 12, página 144)

Quando comparamos as médias dos volumes de CH, verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,5590$ ). O hematócrito médio variou de  $59,0 \pm 4,2\%$  (mediana=60) a  $62,7 \pm 4,2\%$  (mediana=65,7), sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0012$ ). Na análise pareada da centrifugação a 3788 x g/10min, não houve diferença estatisticamente significativa com a média obtida a 3390 x g/12min ( $p=0,3927$ ). Quanto à hemoglobina em g/dl, houve diferença estatisticamente significativa entre as médias ( $p=0,0066$ ), sendo que na análise pareada da centrifugação a 3390 x g/12min, não encontramos diferença estatisticamente significativa com a centrifugação a 3788 x g/10min ( $p=0,7631$ ). Quando analisamos a quantidade de

hemoglobina por unidade de CH, constatamos que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,6014$ ).

**TABELA 12-** RESULTADOS LABORATORIAIS DE TESTES REALIZADOS EM 215 UNIDADES DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS OBTIDOS A PARTIR DE BOLSAS QUÁDRUPLAS EM SAGM PELO MÉTODO AUTOMATIZADO (MÉDIAS, DESVIOS-PADRÃO).

Força g/min / tempo de centrifugação	Amostras (N) <sup>•</sup>	Volume (ml)		Hb T <sup>†</sup> (g/dl)			Leucócitos (10 <sup>9</sup> /unid) P5	Plaquetas (10 <sup>9</sup> /unid) P6	Rec. Hb <sup>*</sup> (%) P7	Dep. Leuc. <sup>■</sup> (%) P8	Dep. Plaquet. <sup>◦</sup> (%) P9
		P11	P2	P3	P4						
1190/10	49	2823±205	62,1±4,1	198±14	56,1±6,6	1,2±0,7	0,6±0,4	98,2±8,1	98,5±18,1	99,1±0,6	
1190/12	35	2839±213	*92,5±4,0	*19,1±1,0	54,4±6,6	*0,6±0,4	0,4±0,7	*95,7±4,2	*72,8±15,8	*99,4±1,2	
1188/10	22	2872±21,6	*90,1±4,2	*19,1±1,4	54,6±7,0	*0,5±0,3	0,08±0,02	*92,7±6,3	*74,8±14,6	*99,6±0,2	
4427/10	44	2885±19,7	62,0±3,8	198±14	55,2±7,2	1,2±0,6	0,7±0,4	96,9±6,0	63,3±17,8	99,0±0,6	
5603/12	65	2808±24,6	62,7±4,2	202±1,6	56,9±8,0	1,1±0,6	1,4±1,0	101,2±14,5	60,3±18,0	95,2±4,2	

FONTE: FFS/HSF

• número de amostras testadas

† hematócrito

† hemoglobina total

\* percentual de recuperação de hemoglobina

■ percentual de depleção de leucócitos

◦ percentual de depleção de plaquetas

P1=0,5590

P2= 0,0012 ( Não há diferença entre 3788/10 e 3390/12  $p=0,3927$  )

P3=0,0066 ( Não há diferença entre 3788/10 e 3390/12  $p=0,7631$  )

P4=0,6014

P5= 0,0001 ( Não há diferença entre 3788/10 e 3390/12  $p=0,7452$  )

P6= 0,0001 ( Não há diferença entre 3788/10 e todas as outras )

P7= 0,0222 ( Não há diferença entre 3788/10 e 3390/12  $p=0,1112$  )

P8= 0,0001 ( Não há diferença entre 3788/10 e 3390/12  $p=0,7087$  )

P9= 0,001 ( Não há diferença entre 3788/10 e 3390/12  $p=0,2573$  )

A quantidade de leucócitos residuais no CH variou de  $0,5 \pm 0,3 \times 10^9$  na centrifugação a  $3788 \times g/10\text{min}$  a  $1,2 \pm 0,7 \times 10^9$  para a centrifugação a  $3390 \times g/10\text{min}$ . Houve diferença estatisticamente significativa entre as várias forças g e tempo de centrifugação analisados ( $p=0,0001$ ). Na análise pareada da centrifugação a  $3788 \times g/10\text{min}$  com as outras, verificamos que com a centrifugação a  $3390 \times g/12\text{min}$ , não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,7452$ ) na quantidade de leucócitos residuais no CH.

A recuperação de hemoglobina do ST variou de  $92,7 \pm 6,3\%$  (mediana=93,1) na centrifugação a  $3788 \times g/10\text{min}$ , a  $101,2 \pm 14,5\%$  (mediana=99,5), na centrifugação  $5603 \times g/12\text{min}$ , não ocorrendo diferença estatisticamente significativa na análise pareada da centrifugação escolhida ( $3788 \times g/10\text{min}$ ) com  $3390 \times g/10\text{min}$  ( $p=0,1112$ ), mas sim com  $4427 \times g/10\text{min}$  ( $p=0,0144$ ) e com  $5603 \times g/12 \text{ min}$  ( $p=0,0004$ ).

O menor percentual de depleção de leucócitos foi obtido com a centrifugação a  $3390 \times g/10\text{min}$  ( $\mu=58,5 \pm 18,1\%$ , mediana=60,4%), e o maior, com a centrifugação a  $3788 \times g/10\text{min}$  ( $\mu=74,8 \pm 14,6\%$ , mediana=74,5%). Na análise pareada da centrifugação escolhida houve

diferença estatisticamente significativa entre as centrifugações: 3390 x g/10min ( $p=0,0004$ ), 4427 x g/10min ( $p=0,0127$ ), 5603 x g/12min ( $p=0,0011$ ). Não houve diferença entre os resultados obtidos e aqueles com a centrifugação a 3390 x g/12min ( $p=0,7087$ ).

Na centrifugação a 3788 x g/10min, houve o maior percentual de depleção de plaquetas ( $\mu=99,6 \pm 0,2\%$ , mediana=99,6%) e na centrifugação a 5603 x g/12min, o menor percentual de depleção de plaquetas ( $\mu=95,2 \pm 4,2\%$ , mediana=96,3%). Na análise pareada da centrifugação escolhida, houve diferença estatisticamente significativa entre as centrifugações: 3390 x g/10min ( $p=0,0001$ ), 4427 x g/10min ( $p=0,0001$ ) e 5603 x g/12min ( $p=0,0001$ ). Não houve diferença entre os resultados obtidos com a centrifugação a 3390 x g/12min ( $p=0,2573$ ).

### 5.5.3 Plasma fresco (tabela 13, página 148)

O volume do plasma obtido variou, em média, de  $213,9 \pm 19,8$ ml (mediana=209ml) a  $223,4 \pm 17,8$ ml (mediana=224ml), não havendo diferença estatisticamente significativa nas cinco centrifugações estudadas ( $p=0,3674$ ). A quantidade de leucócitos no plasma foi menor com a centrifugação a  $3788 \times g/10$ min, ( $\mu=1,5 \pm 1,6 \times 10^9$ , mediana=1,1). Na análise pareada da centrifugação escolhida, houve diferença estatisticamente significativa entre as centrifugações:  $3390 \times g/10$ min ( $p=0,0384$ ) e  $3390 \times g/12$ min ( $p=0,0046$ ). Não houve diferença entre os resultados obtidos com a centrifugação a  $4427 \times g/10$ min ( $p=0,1444$ ) e  $5603 \times g/12$ min ( $p=0,4969$ ). A quantidade de plaquetas no plasma na centrifugação escolhida, foi de  $2,5 \pm 0,9 \times 10^9$  ( mediana=2,6), sendo diferente estatisticamente somente da centrifugação a  $4427 \times g/10$ min ( $p=0,0011$ ) que apresentou os seguintes resultados:  $\mu=1,6 \pm 0,9 \times 10^9$  ( mediana=1,4).



**TABELA 13 - RESULTADOS LABORATORIAIS DE TESTES REALIZADOS EM 215 UNIDADES DE PLASMA FRESCO OBTIDAS A PARTIR DE BOLSAS QUÁDRUPLAS EM SAGM PELO MÉTODO AUTOMATIZADO ( MÉDIA, DESVIO-PADRÃO)**

Força g/min) /tempo de centrifugação	AMOSTRAS (N)*	VOLUME (ml) P1	LEUCÓCITOS (10 <sup>9</sup> /unid) P2	PLAQUETAS (10 <sup>9</sup> /unid) P3
3390/10	49	213,9 ± 19,8	*2,9± 3,8	2,4± 1,5
3390/12	35	223,4 ± 17,8	*6,1± 9,2	2,0 ± 0,9
3788/10	22	214,5 ± 22,1	*1,5± 1,6	*2,5± 0,9
4427/10	44	219,9 ± 23,3	2,8 ± 4,6	*1,6 ± 0,9
5603/12	65	220,0 ± 24,7	1,7 ± 1,1	2,6± 2,2

FONTE: FFS/BSF

\* número de amostras testadas

P1=0,3674

P2= 0,0112 ( Há diferença entre 3788/10 com 3390/12 p= 0,0046 e com 3390/10 p=0,0384)

P3= 0,0032 ( Há diferença entre 3788/10 com 4427/10 p=0,0011 )

#### 5.5.4 Camada leucoplaquetária (CLP) (tabela 14, página 150)

As centrifugações que apresentaram maior volume de CLP foram a 3390 x g/12min e a 3788 x g/10min. Respectivamente, os valores foram:  $\mu=116,4 \pm 5,9\text{ml}$  (mediana=116ml) e  $\mu=113,7 \pm 7,0\text{ml}$  (mediana=114ml) não havendo diferença estatisticamente significativa ( $p=0,1113$ ) entre a centrifugação a 3390g/12 min e 3788g/10 min. O maior hematócrito encontrado foi na CLP obtida a 3788 x g/10min ( $\mu=31,0 \pm 3,2\%$ , mediana=31), havendo diferença estatisticamente significativa com os outras quatro centrifugações estudadas: 3390 x g/10min ( $p=0,0024$ ), 3390 x g/12min ( $p=0,0007$ ), 4427 x g/10min ( $p=0,0022$ ) e 5603 x g/12min ( $p=0,0021$ ).

Não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de hemoglobina em g/dl nas cinco centrifugações estudadas ( $p=0,1832$ ), porém a maior quantidade de Hb por unidade foi encontrada nas unidades de CLP obtidas a 3788 x g/10min ( $\mu=12,1 \pm 3,6\text{g/dl}$ , mediana=11,1). Na análise estatística pareada, encontramos resultados estatisticamente significantes nas seguintes centrifugações: 3390 x g/10min ( $p=0,0001$ ), 3390 x g/12min ( $p=0,0381$ ), 4427 x g/10min

( $p=0,0001$ ), 5603 x g/12min ( $p=0,0014$ ). Não houve diferença estatisticamente significante quanto à quantidade de leucócitos ( $p=0,2638$ ) e plaquetas ( $p=0,1576$ ) na CLP.

**TABELA 14 - RESULTADOS LABORATORIAIS DE TESTES REALIZADOS EM 215 UNIDADES DE CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA (CLP) OBTIDAS A PARTIR DE BOLSAS QUÁDRUPLAS EM SAGM PELO MÉTODO AUTOMATIZADO (MÉDIA, DESVIO-PADRÃO)**

Força g/min) / tempo de centrifugação	AMOSTRAS (N) <sup>•</sup>	VOLUME (ml) P1	Ht <sup>‡</sup> (%)		Hb T <sup>†</sup> (g/dl)		Leucócitos (10 <sup>9</sup> /unid) P5	Plaquetas (10 <sup>10</sup> /unid) P6
			P2	P3	P4			
3390/10	49	85,7±10,9	28,2±3,0	9,1±0,8	7,8±1,3	2,0±0,7	7,0±1,6	
3390/12	35	*116,4±5,8	27,7±2,9	9,0±0,9	10,4±1,3	1,8±0,8	7,9±2,4	
3788/10	22	*113,7±7,0	31,0±3,2	10,8±3,9	12,1±3,6	1,8±0,7	7,6±1,1	
4427/10	44	95,7±17,2	28,2±3,5	9,1±1,1	8,8±2,1	2,1±0,8	7,1±2,3	
5603/12	65	99,4±19,8	28,3±4,1	9,3±1,6	9,3±2,9	1,9±0,7	7,4±1,5	

Fonte: FFS/RSP

• número de amostras testadas

‡ hematócrito

† hemoglobina total

P1= 0,0001 ( não há diferença entre 3788/10 com 3390/12  $p= 0,1113$  )

P2= 0,0121 ( há diferença entre 3788/10 e todas as outras )

P3= 0,1832

P4= 0,0001 ( há diferença entre 3788/10 e todas as outras )

P5= 0,2638

P6= 0,1576

### 5.5.5 Concentrado de plaquetas (tabela 15, página 153)

O volume de CP variou de  $56,2 \pm 5,6$ ml (mediana=56,5ml) obtidos nas centrifugações a  $3788 \times g/10$ min (primeira centrifugação), a  $61,5 \pm 9,4$ ml (mediana=62ml) obtidos com a centrifugação a  $5603 \times g/12$ min. Não houve diferença estatisticamente significativa nos volumes dos CP obtidos a  $3390 \times g/12$ min ( $p=0,2001$ ) e  $4427 \times g/10$ min ( $p=0,1160$ ). A segunda centrifugação foi igual para todos os grupos estudados  $335 \times g$  por 5 minutos. Não houve diferença estatisticamente significativa no pH ( $p=0,4962$ ) nem no efeito "swirling" ( $p=0,4578$ ).

A quantidade de leucócitos residuais no CP variou de  $0,7 \pm 0,2 \times 10^6$ , para a centrifugação a  $3390 \times g/10$ min, a  $1,5 \pm 2,6 \times 10^6$  para a centrifugação a  $5603 \times g/12$ min. Houve diferença estatisticamente significativa entre a centrifugação escolhida ( $3788 \times g/10$ min) e as centrifugações a  $3390 \times g/10$  ( $p=0,0001$ ) e a  $3390 \times g/12$  ( $p=0,0001$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as centrifugações a  $4427 \times g/10$ min ( $p=0,2772$ ) e  $4427 \times g/12$ min ( $p=0,4761$ ) na quantidade de leucócitos residuais no CP. A quantidade de plaquetas no CP variou de  $5,2 \pm 1,8 \times 10^{10}$  (mediana=5,0) para a centrifugação a  $3390 \times g/12$ min,

a  $6,8 \pm 0,8 \times 10^{10}$  (mediana=6,8) para a centrifugação a 3788 x g/10min. Houve diferença estatisticamente significativa entre a centrifugação escolhida (3788 x g/10min) e as centrifugações a 3390 x g/10 ( $p=0,0001$ ) e a 4427 x g/12min ( $p=0,0107$ ), mas não houve diferença estatisticamente significativa entre as centrifugações a 3390 x g/10 ( $p=0,2107$ ) e a 5603 x g/12 ( $p=0,3087$ ) para a quantidade de plaquetas no CP.

A depleção de leucócitos, no CP, variou de  $99,8 \pm 0,2\%$  (mediana=99,96%) a  $99,96 \pm 0,02\%$  (mediana=99,97%), não havendo diferença estatisticamente significativa entre as centrifugações avaliadas. A recuperação de plaquetas na centrifugação escolhida foi de  $89,6 \pm 9,6\%$  (mediana=91,5). Houve diferença estatisticamente significativa entre a centrifugação a 3390 x g/12min ( $p=0,0001$ ), que apresentou o menor percentual de recuperação de plaquetas e com as outras forças x g/ min e tempo de centrifugação estudados não houve diferença estatisticamente significativa.

**TABELA 15- RESULTADOS LABORATORIAIS DE TESTES REALIZADOS EM 215 UNIDADES DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS (CP) OBTIDOS A PARTIR DE BOLSAS QUÁDRUPLAS EM SAGM PELO MÉTODO AUTOMATIZADO (MÉDIA, DESVIO-PADRÃO)**

Força g/min) /tempo de centrifugação	AMOSTRAS (N) <sup>a</sup>	VOLUME (ml) P1	pH P2	SWIRL ING P3	Leucócitos (10 <sup>9</sup> /unid) P4	Plaquetas (10 <sup>10</sup> /unid) P5	Dep. Leuc. <sup>b</sup> (%) P6	Rec. Plaquet. <sup>c</sup> (%) P7
3390/10	49	61,3±5,4	7,3±0,1	3,0±0,1	0,7±0,2	*6,5±1,3	99,6±0,02	95,78±19,39
3390/12	35	*38,6±5,6	7,3±0,1	2,9±0,2	3,4±2,2	5,2±1,8	99,8±0,2	*60,9±12,6
3788/10	22	*56,2±5,6	7,3±0,1	3,0±0,0	*1,1±0,5	*6,8±0,8	99,9±0,2	*89,6±9,6
4427/12	44	*59,6±7,5	7,4±0,1	3,0±0,0	*0,8±1,2	6,1±1,2	99,96±0,03	88,8±27,6
5603/12	66	61,5±9,4	7,3±0,1	3,0±0,1	*1,5±2,6	*5,4±1,6	99,9±0,1	86,0±21,6

FONTE: FFS/RSF

<sup>a</sup> número de amostras testadas

<sup>b</sup> percentual de depleção de leucócitos

<sup>c</sup> percentual de recuperação de plaquetas

P1= 0,0301 ( Não há diferença entre 3788/10 com 3390/12 p=0,2001 e com 4427/10 p=0,1160 )

P2=0,4962

P3=0,4578

P4= 0,0001 ( Não há diferença entre 3788/10 com 4427/10 p=0,2772 e com 5603/12 p=0,4761 )

P5= 0,0002 ( Não há diferença entre 3788/10 com 3390/10 p=0,2107 e com 5603/12 p=0,3087 )

P6= 0,0001 ( Não há diferença entre 3788/10 com todas as outras )

P7= 0,0001 ( Há diferença entre 3788/10 e 3390 x g/12 p=0,0001 )

**5.6 Comparação entre os componentes obtidos pelo método do PRP (tabela 1, página 112) e os obtidos pelo método da ECLP na centrifugação validada, utilizando-se bolsas triplas (ECLPT) centrifugadas a 3390 x g/10 minutos (tabela 8, página 131) e bolsas quádruplas (ECLPQ) centrifugadas a 3788 x g/10 minutos (tabelas 11 a 15, páginas 142,144, 148, 150 e 153)**

#### **5.6.1 Sangue total**

Quando comparamos o volume das unidades de ST, verificamos que houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0024$ ) entre os métodos PRP ( $\mu = 449,9 \pm 8,6\text{ml}$ , mediana=450) e ECLPT ( $\mu = 458,7 \pm 16,6\text{ml}$ , mediana=456), embora o volume coletado nos três grupos estivesse entre 415ml e 497ml. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os hematócritos encontrados ( $p=0,6457$ ). Os valores para o PRP, ECLPT e ECLPQ foram:  $\mu = 39,3 \pm 3,1\%$  (mediana=39);  $\mu = 39,9 \pm 3,2\%$  (mediana=40,5) e  $\mu = 39,8 \pm 3,8\%$  (mediana=40,5) Também não houve diferença estatisticamente significativa para a quantidade de

hemoglobina em g/dl ( $p=0,580$ ), sendo os valores encontrados para o PRP, ECLPT e ECLPQ:  $\mu = 13,3 \pm 1,1$ g/dl (mediana=13,2);  $\mu = 13,8 \pm 1,0$ g/dl (mediana=13,9) e  $\mu = 13,0 \pm 1,2$ g/dl (mediana=13,0). Houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de Hb total por unidade existente entre a ECLPT e a ECLPQ ( $p=0,0051$ ), entre a ECLPT e o PRP ( $p=0,0073$ ), não havendo diferença e entre a ECLPQ e o PRP ( $p=0,3797$ ). Os valores encontrados para o PRP, ECLPT e ECLPQ foram:  $\mu = 59,6 \pm 5,3$ g/bolsa (mediana=59,8);  $\mu = 63,4 \pm 5,4$ g/bolsa (mediana=63,6) e  $\mu = 58,5 \pm 6,2$ g/bolsa (mediana=58,7).

Quanto à quantidade de leucócitos nas unidades de ST, foram, respectivamente, para o PRP, ECLPT e ECLPQ:  $\mu = 3,4 \pm 1,3 \times 10^9$  (mediana=3,1);  $\mu = 3,3 \pm 1,0 \times 10^9$  (mediana=2,9) e  $\mu = 2,1 \pm 0,4 \times 10^9$  (mediana=2,0). Houve diferença estatisticamente significativa entre a ECLPT e ECLPQ ( $p=0,0001$ ) e entre a ECLPQ e PRP ( $p=0,0001$ ), porém não entre a ECLPT e PRP ( $p=0,8677$ ). A quantidade de plaquetas presentes nas unidades de ST para o PRP, ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu = 7,7 \pm 1,6 \times 10^{10}$  (mediana=1,6);  $\mu = 7,9 \pm 1,2 \times 10^{10}$  (mediana=8,0) e  $\mu = 8,0 \pm 0,8 \times 10^{10}$  (mediana=8,1). Houve diferença estatisticamente significativa entre a ECLPT e ECLPQ ( $p=0,0001$ ) e entre a ECLPQ e o PRP ( $p=0,0001$ ), mas não houve diferença estatisticamente significativa entre a ECLPT e o PRP ( $p=0,5318$ ).



### 5.6.2 Concentrado de hemácias

Os volumes de CH encontrados, respectivamente, para o PRP, ECLPT e ECLPQ foram:  $\mu = 273,3 \pm 26,8\text{ml}$  (mediana=277,5);  $\mu = 286,8 \pm 15,8\text{ml}$  (mediana=287) e  $\mu = 287,2 \pm 21,6\text{ml}$  (mediana=284). Houve diferença estatisticamente significativa entre a ECLPT e o PRP ( $p=0,0291$ ) e entre a ECLPQ e o PRP ( $p=0,0222$ ); porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre a ECLPT e a ECLPQ ( $p=0,9600$ ). Os grupos apresentaram, respectivamente, para o PRP, ECLPT e ECLPQ, os seguintes valores de hematócrito no CH:  $\mu = 70,8 \pm 2,6\%$  (mediana=71),  $\mu = 60,8 \pm 2,8\%$  (mediana=62) e  $\mu = 59,0 \pm 4,2\%$  (mediana=60). Houve diferença estatisticamente significativa entre a ECLPT e o PRP ( $p=0,0001$ ) e entre a ECLPQ e o PRP ( $p=0,0001$ ), mas, não entre a ECLPT e a ECLPQ ( $p=0,0619$ ). Quando analisamos o percentual de recuperação de HB do CH, encontramos os seguintes resultados para o PRP, ECLPT e ECLPQ:  $\mu = 108,3 \pm 4,3\%$  (mediana=109),  $\mu = 89,2 \pm 9,5\%$  (mediana=91,8) e  $\mu = 90,5 \pm 11,7\%$  (mediana=92,3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a

ECLPT e ECLPQ ( $p=0,7010$ ), havendo porém, entre a ECLPT e o PRP ( $p=0,0001$ ) e entre a ECLPQ e o PRP ( $p=0,0001$ ).

Para a quantidade de Hb em g/dl, os resultados para o PRP, ECLPT e ECLPQ foram:  $\mu= 23,6 \pm 1,0\text{g/dl}$  (mediana=23,8),  $\mu= 20,3 \pm 0,8\text{g/dl}$  (mediana=20,4) e  $\mu= 18,6 \pm 2,4\text{g/dl}$  (mediana=19,2). Houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos: ECLPT e ECLPQ ( $p=0,0040$ ), ECLPT e PRP ( $p=0,0001$ ), ECLPQ e PRP ( $p=0,0001$ ). Quando calculamos a Hb total por unidade de CH, os resultados obtidos para o PRP, ECLPT e ECLPQ foram:  $\mu= 64,6 \pm 6,3\text{g/bolsa}$  (mediana=65,0),  $\mu= 58,4 \pm 5,0\text{g/bolsa}$  (mediana=58,7) e  $\mu= 53,5 \pm 8,6\text{g/bolsa}$  (mediana=54,0). Houve diferença estatisticamente significativa entre a ECLPT e a ECLPQ ( $p=0,0191$ ), entre a ECLPT e o PRP ( $p=0,0002$ ) e entre a ECLPQ e o PRP ( $p=0,0001$ ).

O número de leucócitos encontrados nas unidades de CH para o PRP, ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu= 3,0 \pm 0,9 \times 10^9$  (mediana=2,9),  $\mu= 0,8 \pm 0,6 \times 10^9$  (mediana=0,6) e  $\mu= 0,5 \pm 0,3 \times 10^9$  (mediana=0,4). Houve diferença estatisticamente significativa entre a ECLPT e PRP ( $p=0,0001$ ) e entre a ECLPQ e o PRP ( $p=0,0001$ ), mas, não entre a ECLPT e ECLPQ ( $p=0,0904$ ). A depleção de leucócitos para o PRP, ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu= 85,0 \pm 12,8\%$  (mediana=80,0),  $\mu= 76,9 \pm 14,0\%$  (mediana=80,6) e  $\mu=$

74,8 ± 14,6% (mediana=74,5). Houve diferença estatisticamente significativa entre a ECLPT e PRP (p=0,0001) e entre a ECLPQ e o PRP (p=0,0001), porém, não entre a ECLPT e ECLPQ (p=0,6218).

A quantidade de plaquetas encontradas nas unidades de CH para o PRP, ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu = 20,8 \pm 10,1 \times 10^9$  (mediana=19,1),  $\mu = 0,6 \pm 0,6 \times 10^9$  (mediana=0,6) e  $\mu = 0,03 \pm 0,02 \times 10^9$  (mediana=0,03). Houve diferença estatisticamente significativa entre a ECLPT e ECLPQ (p=0,0001), entre a ECLPT e PRP (p=0,0001) e entre a ECLPQ e PRP (p=0,0001). A depleção de plaquetas para o PRP, ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu = 74,6 \pm 12,8\%$  (mediana=76,5),  $\mu = 99,3 \pm 0,7\%$  (mediana=99,5) e  $\mu = 99,6 \pm 0,2$  (mediana=99,6). Houve diferença estatisticamente significativa entre a ECLPT e o PRP (p=0,0001) e entre a ECLPQ e o PRP (p=0,0001), porém não entre a ECLPT e ECLPQ (p=0,0828).

### 5.6.3 Plasma

O volume de plasma encontrado para o PRP, ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu = 174,6 \pm 26,3\text{ml}$  (mediana=172),  $\mu = 203,9 \pm 17,0\text{ml}$  (mediana=203) e  $\mu = 214,5 \pm 22,1\text{ml}$  (mediana=217). Houve diferença

estatisticamente significante entre a ECLPT e PRP ( $p=0,0001$ ), e entre a ECLPQ e o PRP ( $p=0,0001$ ); entretanto não houve diferença estatisticamente significante entre a ECLPT e ECLPQ ( $p=0,1704$ ). O percentual de recuperação de plasma existente no sangue total para o PRP, a ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu = 72 \pm 3,9\%$  (mediana=72),  $\mu = 73,9 \pm 2,4\%$  (mediana=73,1) e  $\mu = 79,1 \pm 6,2\%$  (mediana=80,0). Houve diferença estatisticamente significante entre a ECLPT e ECLPQ ( $p=0,0010$ ), entre a ECLPT e PRP ( $p=0,0066$ ) e entre a ECLPQ e o PRP ( $p=0,0001$ ).

#### 5.6.4 Camada leucoplaquetária

O volume de CLP encontrado para a ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu=111,50 \pm 11,67$  ml (mediana =110,5ml),  $\mu = 113,67 \pm 6,96$ ml (mediana = 114ml). Não houve diferença estatisticamente significante entre a ECLPT e ECLPQ ( $p=0,4720$ ). A hemoglobina em g/dl encontrada para a ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu= 8,1 \pm 1,0$ g/dl (mediana=8,0) e  $\mu= 10,8 \pm 3,9$ g/dl (mediana=10,0). Houve diferença estatisticamente significante entre a ECLPT e ECLPQ ( $p=0,0066$ ). Quanto à quantidade total de Hb por unidade, os resultados para a ECLPT e ECLPQ foram:  $\mu= 9,1 \pm 2,0$ g/bolsa (mediana=8,9) e  $\mu= 12,1 \pm 3,6$ g/bolsa (mediana=11,1), sendo a diferença

estatisticamente significativa ( $p=0,0021$ ). O hematócrito da CLP foi respectivamente para a ECLPT e ECLPQ:  $\mu = 24,6 \pm 3,1\%$  (mediana=24) e  $\mu = 31,0 \pm 3,2\%$  (mediana=31), sendo a diferença também estatisticamente significativa ( $p=0,0001$ ). A quantidade de plaquetas encontrada para a ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu = 74,9 \pm 16,9 \times 10^9$  (mediana=75,8) e  $\mu = 76,4 \pm 10,6 \times 10^9$  (mediana=80), entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre a ECLPT e ECLPQ ( $p=0,7298$ ). O número de leucócitos encontrados para a ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu = 2,5 \pm 0,9 \times 10^9$  (mediana=2,2) e  $\mu = 1,8 \pm 0,7 \times 10^9$  (mediana=1,7), com diferença estatisticamente significativa entre a ECLPT e ECLPQ ( $p=0,0010$ ).

### 5.6.5 Concentrado de plaquetas

O volume de plaquetas encontrado respectivamente para o PRP, ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu = 61,9 \pm 3,8\text{ml}$  (mediana=62),  $\mu = 66,1 \pm 3,2\text{ml}$  (mediana=66) e  $\mu = 56,2 \pm 5,6$  (mediana=56,5), havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,0001$ ). Os grupos apresentaram para o PRP, ECLPT e ECLPQ os seguintes valores para o efeito "swirling" do CP:  $\mu = 3,0 \pm 0,1$  (mediana=3,0),  $\mu = 2,6 \pm 0,5$

(mediana=3,0) e  $\mu = 3,0 \pm 0,0$  (mediana=3), sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0001$ ). Quando analisamos o pH, encontramos os seguintes resultados para o PRP e ECLPQ:  $\mu = 7,4 \pm 0,2$  (mediana=7,4),  $\mu = 7,3 \pm 0,1$  (mediana=7,3), não tendo havido diferença estatisticamente significativa entre o PRP e ECLPQ ( $p=0,0595$ ).

Os resultados estatísticos demonstram não haver diferença estatisticamente significativa na quantidade de plaquetas encontradas ( $p=0,3665$ ) no CP para o PRP, a ECLPT e ECLPQ:  $\mu = 7,3 \pm 1,5 \times 10^{10}$  (mediana=7,0),  $\mu = 7,2 \pm 1,3 \times 10^{10}$  (mediana=7,0) e  $\mu = 6,8 \pm 0,8$  (mediana=6,8). A recuperação de plaquetas para o PRP, ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu = 93,6 \pm 8,6\%$  (mediana=94,0),  $\mu = 88,7 \pm 16,1\%$  (mediana=87,4) e  $\mu = 89,6 \pm 9,6\%$  (mediana=91,0), mas não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,00808$ ).

O número de leucócitos encontrados nas unidades de CP para o PRP, a ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu = 36,1 \pm 20,8 \times 10^6$  (mediana=32,9),  $\mu = 9,1 \pm 4,3 \times 10^6$  (mediana=7,5) e  $\mu = 1,1 \pm 0,5 \times 10^6$  (mediana=1,2), havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,0001$ ). A depleção de leucócitos para o PRP, a ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu = 43,6 \pm 24,9\%$  (mediana=44,0),  $\mu = 99,5 \pm 0,2\%$  (mediana=99,5) e  $\mu =$

99,9 ± 0,2% (mediana=99,9), havendo diferença estatisticamente significativa entre o PRP e os dois outros, ECLPT e ECLPQ, (p=0,0001).

### **5.7 Comparação entre número de unidades de plaquetas perdidas por agregação pelos métodos do PRP e da ECLP**

Entre março de 1998 e maio de 1999, foram produzidas 99.242 unidades de plaquetas pelo método do PRP, sendo 16.444 descartadas por excesso de agregados plaquetários (16,6%), 14.831 (14,9%) por outros motivos, incluindo as com testes sorológicos positivos, e 67.967 (68,5%) foram distribuídas entre os hospitais. No mesmo período foram produzidas 11.533 (100%) unidades de plaquetas a partir de uma unidade de ECLP, sendo apenas 13 descartadas por excesso de agregação plaquetária (0,1%), 1.820 (17,8%) descartadas por outros motivos incluindo as com testes sorológicos positivos e 9.700 (84,1%) enviadas aos hospitais para transfusão, sendo esta diferença estatisticamente significante ( $p=0,0001$ )



## 5.8 Resultados do estudo clínico

### 5.8.1 Comparação entre o grupo de pacientes

#### 5.8.1.1 Sexo (tabela 16, página 164)

Dos 615 pacientes que receberam componentes pelo método da ECLP, 297 (48,3%) são do sexo feminino e 318 (51,7%) do sexo masculino. O grupo de pacientes que recebeu componentes pelo método do PRP era constituído por 443 (47,3%) do sexo feminino e 494 (52,7%) do sexo masculino. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,696$ ).

**TABELA 16** –DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES POR SEXO QUANTO AO TIPO DE HEMOCOMPONENTE RECEBIDO POR TRANSFUSÃO, OBTIDO PELO MÉTODO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) OU PELO MÉTODO DA EXTRAÇÃO DA CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA (ECLP).

SEXO	GRUPO ECLP		GRUPO PRP		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Feminino	297	48,3	443	47,3	740	47,7
Masculino	318	51,7	494	52,7	812	52,3
<b>TOTAL</b>	<b>615</b>	<b>39,6</b>	<b>937</b>	<b>60,4</b>	<b>1552</b>	<b>100,0</b>

FONTE:FPS/HSP  
P=0,696

### 5.8.1.2 Idade (tabela 17, página 165)

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias dos pacientes estudados que receberam transfusões pelo método do PRP e as daqueles que receberam transfusões pelo método da ECLP ( $p=0,625$ ). As duas faixas etárias de maior prevalência foram os maiores de 60 anos (33,5% no grupo da ECLP e 30,9% no grupo do PRP) e entre 0 a 10 anos (16,4% no grupo da ECLP e 18,9% no grupo do PRP).

**TABELA 17** –DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES POR IDADE QUANTO AO TIPO DE HEMOCOMPONENTE RECEBIDO POR TRANSFUÇÃO OBTIDO PELO MÉTODO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) OU PELO MÉTODO DA EXTRAÇÃO DA CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA (CLP)

IDADE	GRUPO CLP		GRUPO PRP		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
0-10	101	16,4	149	15,9	250	16,1
10-20	56	9,1	90	9,6	146	9,4
20-30	33	5,4	69	7,4	102	6,6
30-40	49	8,0	72	7,7	121	7,8
40-50	87	14,1	123	13,1	210	13,5
50-60	83	13,5	144	15,4	227	14,6
60	206	33,5	290	30,9	496	32,0
<b>TOTAL</b>	<b>615</b>	<b>39,6</b>	<b>937</b>	<b>60,4</b>	<b>1552</b>	<b>100,0</b>

FORTE: IFS/HSF

P = 0,625

### 5.8.1.3 Patologias dos pacientes estudados (tabela 18, página 166)

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto às patologias dos pacientes estudados ( $p=0,200$ ). A maior parte dos pacientes era portador de tumores sólidos (43,1% no grupo da ECLP e 38,7% no grupo do PRP) e de patologias onco-hematológicas (34,6% no grupo da ECLP e 32,0% no grupo do PRP).

**TABELA 18** – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES POR PATOLOGIA QUANTO AO TIPO DE HEMOCOMPONENTE RECEBIDO POR TRANSFUSÃO OBTIDO PELO MÉTODO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) OU PELO MÉTODO DA EXTRAÇÃO DA CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA (CLP)

PATOLOGIAS	GRUPO CLP		GRUPO PRP		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Tumores sólidos	265	43,1	363	38,7	628	40,5
Doenças onco-hematológicas	213	34,6	300	32,0	513	33,0
Outras doenças hematológicas	60	9,8	111	11,8	171	11,0
Doenças infecto-contagiosas	26	4,2	47	5,0	73	4,7
Hepatopatias crônicas	16	2,6	42	4,5	58	3,7
Doença renal crônica	7	1,1	26	2,8	33	2,1
Doenças do aparelho digestivo	12	1,9	17	1,8	29	1,9
Doenças congênitas	6	1,0	11	1,2	17	1,1
Doenças cardíacas	4	0,6	8	0,8	12	0,8
Outras patologias	4	0,6	7	0,7	11	0,7
Doenças reumáticas	2	0,3	5	0,5	7	0,4
<b>TOTAL</b>	<b>615</b>	<b>39,6</b>	<b>937</b>	<b>60,4</b>	<b>1552</b>	<b>100,0</b>

FONTE: FPS/MSP

$P=0,200$

#### 5.8.1.4 Número de transfusões anteriores (tabela 19, página 167)

A comparação entre os dois grupos demonstra que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,484$ ) entre o número de transfusões recebidas pelos pacientes previamente a este estudo. A maior parte recebeu menos que 25 transfusões (68,8% no grupo de pacientes da ECLP e 68,4% no grupo de pacientes do PRP), ou nenhuma (29,3% no grupo da ECLP e 30,4% no grupo do PRP).

**TABELA 19** - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES POR NÚMERO DE TRANSFUSÕES ANTERIORES À INCLUSÃO NESTE ESTUDO NO GRUPO DOS PACIENTES DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) E NO GRUPO DA EXTRAÇÃO DA CAMADA LEUCO-PLAQUETÁRIA (ECLP).

TRANSFUSÃO ANTERIOR	GRUPO ECLP		GRUPO PRP		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Nenhuma	180	29,3	285	30,4	465	30,0
1-25	423	68,8	641	68,4	1064	68,5
26-50	7	1,1	6	0,6	13	0,8
51-100	2	0,3	4	0,4	6	0,4
>100	3	0,5	1	0,1	4	0,3
<b>TOTAL</b>	<b>615</b>	<b>39,6</b>	<b>937</b>	<b>60,4</b>	<b>1552</b>	<b>100,0</b>

FONTE: FPS/HSP

$P=0,484$

### 5.8.1.5 Número de reações adversas anteriores ao episódio transfusional estudado (tabela 20, página 168)

Os pacientes que receberam os componentes obtidos pelo método da ECLP tiveram maior proporção de reações transfusionais antes de serem incluídos neste estudo (17,7%), quando comparados ao grupo que recebeu os componentes preparados pelo método do PRP (13,1%), sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p=0,007$ ).

**TABELA 20 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES POR NÚMERO DE REAÇÕES TRANSFUSIONAIS ANTERIORES À INCLUSÃO DOS PACIENTES NESTE ESTUDO (GRUPO DO PRP E GRUPO DA ECLP)**

REAÇÃO TRANSFUSIONAL ANTERIOR	GRUPO ECLP		GRUPO PRP		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Nenhuma	506	82,3	813	86,9	1319	11,5
1	77	12,6	102	10,9	179	11,5
2	18	2,9	15	1,6	33	2,2
3	7	1,1	5	0,5	12	0,8
4 ou mais	7	1,1	1	0,1	8	0,5
<b>TOTAL</b>	<b>615</b>	<b>39,6</b>	<b>936</b>	<b>60,4</b>	<b>1551</b>	<b>100,0</b>

FONTE: FFS/HSP

P= 0,007

**5.8.2 Comparação entre a incidência das reações adversas com os componentes (CH e CP) obtidos pelos métodos do PRP e da ECLP nos episódios transfusionais realizados nos grupos dos pacientes incluídos neste estudo.**

**5.8.2.1 Número de transfusões realizadas por episódio transfusional**

O grupo da ECLP recebeu um total de 2.092 unidades de CH em 1354 episódios transfusionais (média de 1,5 unidades de CH por episódio) e 104 unidades de CP em 17 episódios (média de 6,1 unidades de CP por episódio). O grupo do PRP recebeu 2.292 unidades de CH em 1521 episódios transfusionais (média de 1,5 unidades de CH por episódio) e 249 unidades de CP em 54 episódios (média de 4,6 unidades de CP por episódio).

### 5.8.2.2 Reações transfusionais ao Concentrado de hemácias (tabelas 21, página 170 e tabela 22, página 171)

No grupo de pacientes que recebeu componentes pelo método da ECLP em 1.354 episódios de transfusão, 1.321 (97,6%) não apresentaram reações adversas pós-transfusionais e 33 (2,4%) tiveram reações. Comparando esses pacientes com os que receberam componentes pelo método do PRP em 1.521 episódios, 1.400 (92,0%) não apresentaram reações adversas e 121 (8,0%) desenvolveram reações transfusionais. Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,001$ ). O risco relativo calculado pelo "odds ratio" foi de 3,46 vezes, com intervalo de confiança de 95%, variando de 2,34 a 5,12.

**TABELA 21** DISTRIBUIÇÃO DOS EPISÓDIOS DE REAÇÃO TRANSFUSIONAL AO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS QUANTO AO TIPO DE HEMOCOMPONENTE RECEBIDO POR TRANSFUSÃO OBTIDO PELO MÉTODO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) OU PELO MÉTODO DA EXTRAÇÃO DA CAMADA LEUCO-PLAQUETÁRIA (ECLP)

REAÇÃO TRANSFUSIONAL AO CONC. DE HEMÁCIAS	GRUPO ECLP		GRUPO PRP		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Não	1321	97,6	1400	92,0	2721	94,6
Sim	33	2,4	121	8,0	154	5,4
<b>TOTAL</b>	1354		1521		2875	100,0

FUNTE: FFS/RSF

P=0,001

Quanto ao tipo de reações transfusionais verificamos na **tabela 22**, que as reações alérgicas apresentaram a incidência de 0,4% no grupo da ECLP e de 3,1% no grupo do PRP. Reações febris não hemolíticas ocorreram em 1,0% no grupo da ECLP e em 3,6% no grupo do PRP. Já as reações anafiláticas foram observadas em 0,1% no grupo da ECLP e em 0,3% no grupo do PRP. A análise estatística mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos do PRP e da ECLP quanto aos tipos mais freqüentes de reação alérgica, febril e nenhuma ( $p=0,001$ ).

**TABELA 22** – DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS DE EPISÓDIO DE REAÇÃO TRANSFUSIONAL AO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS QUANTO AO MÉTODO DE OBTENÇÃO DO HEMOCOMPONENTE RECEBIDO POR TRANSFUSÃO (MÉTODO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS-PRP OU MÉTODO DA EXTRAÇÃO DA CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA-ECLP)

TIPO DE EPISÓDIO DE REAÇÃO	GRUPO ECLP		GRUPO PRP		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Nenhum	1321	97,6	1400	92,0	2721	94,7
Febril	13	1,0	55	3,6	68	2,4
Alérgica	6	0,4	47	3,1	53	1,8
Alérgica com sintoma respiratório	3	0,2	4	0,3	7	0,2
Alérgica e febril	3	0,2	3	0,2	6	0,2
Reação anafilática	1	0,1	5	0,3	6	0,2
Outras	7	0,5	7	0,5	14	0,5
<b>TOTAL</b>	<b>1354</b>		<b>1521</b>		<b>2875</b>	

FORTE: FPS/MSP

P=0,001



**5.8.2.3 Comparação entre o número de pacientes que receberam medicação prévia ao episódio de transfusão de concentrado de hemácias estudado no grupo da ECLP e do PRP (tabela 23, página 172)**

Houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,001$ ) entre o número de pacientes medicados antes do episódio transfusional estudado no grupo da ECLP (32,4%) e no grupo do PRP (24,9%).

**TABELA 23 -DISTRIBUIÇÃO DOS EPISÓDIOS TRANSFUSIONAIS POR USO OU NÃO DE MEDICAÇÃO PRÉVIA À TRANSFUSÃO DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS QUANTO MÉTODO DE OBTENÇÃO DO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS TRANSFUNDIDO (MÉTODO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS-PRP OU MÉTODO DA EXTRAÇÃO DA CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA-ECLP)**

MEDICAÇÃO PRÉVIA A TRANSFUSÃO DE CH	GRUPO ECLP		GRUPO PRP		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Não	916	67,6	1142	75,1	2058	71,6
Sim	438	32,4	379	24,9	817	28,4
<b>TOTAL</b>	<b>1354</b>		<b>1521</b>		<b>2875</b>	

FONTE: FPMHSP

P = 0,001

**5.8.2.4 Efeito da medicação na incidência de reações adversas nos dois grupo estudados (tabela 24, página 174)**

Com relação aos episódios transfusionais estudados, dos pacientes que não foram medicados previamente, os que receberam CH-ECLP (66,5%) apresentaram menor número de reações adversas pós-transfusionais comparativamente aos que receberam CH-PRP (70,2%), sendo a diferença estatisticamente significante ( $p=0,0347$ ). Quando foram comparados os grupos de pacientes que tiveram reações adversas pós-transfusionais, mas que não receberam medicações antes do episódio transfusional estudado, observou-se que o grupo que recebeu CH-ECLP apresentaram menor ocorrência de reações transfusionais (1,1%) que aquele que recebeu CH-PRP (4,9%), sendo a diferença estatisticamente significante ( $p=0,00001$ ).

**TABELA 24 - DISTRIBUIÇÃO DOS EPISÓDIOS DE REAÇÕES TRANSFUSIONAIS E USO OU NÃO DE MEDICAÇÃO PRÉVIA À TRANSFUSÃO DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS QUANTO AO MÉTODO DE OBTENÇÃO DO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS TRANSFUNDIDO (MÉTODO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS-PRP OU MÉTODO DA EXTRAÇÃO DA CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA-ECLP)**

REAÇÃO TRANSFUSIONAL/ MEDICAÇÃO PRÉVIA	GRUPO ECLP		GRUPO PRP		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Nenhuma / Nenhum P1	901	66,5	1068	70,2	1969	68,5
Sim / Nenhum P2	15	1,1	74	4,9	89	3,1
Nenhuma / Antitérmico P3	188	13,9	154	10,1	342	11,9
Febril / antitérmico P4	4	0,3	7	0,5	11	0,4
Outras / Antitérmico P5	3	0,2	6	0,4	9	0,3
Nenhuma / Anti-alérgico P6	189	14,0	125	8,2	314	11,0
Alérgica / Antialérgico P7	4	0,3	17	1,1	21	0,7
Outras / Antialérgico P8	0	0,0	13	0,8	13	0,4
Nenhuma / antitérmico e antialérgico P9	28	2,1	25	1,6	53	1,9
Febril e/ou alérgica / antitérmico e antialérgico P10	4	0,3	0	0,0	4	0,1
Outras / antitérmico e antialérgico P11	1	0,1	0	0,0	1	0,0
Nenhum / Outros P12	15	1,1	28	1,9	43	1,5
Sim / Outros P13	2	0,1	4	0,3	6	0,2
<b>TOTAL</b>	<b>1354</b>		<b>1521</b>		<b>2875</b>	

FORTE: FFS/RSP

P = 0,0010  
P1 = 0,0347  
P2 = 0,00001  
P3 = 0,0020  
P4 = 0,4694  
P5 = 0,3698  
P6 = 0,0000  
P7 = 0,0075  
P8 = 0,0004  
P9 = 0,4015  
P10 = 0,0525  
P11 = 0,3804  
P12 = 0,1010  
P13 = 0,4920

Comparado o efeito do uso de antitérmico com a ocorrência ou não de reações adversas, notou-se que em 188 (13,9%) dos episódios transfusionais no grupo da ECLP e em 154 (10,1%) no grupo do PRP, não ocorreu reação transfusional após o uso de antitérmico pré-transfusional, sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p=0,002$ ). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na incidência de episódios transfusionais acompanhados de reação febril não hemolítica ou de outros tipos de reações adversas em pacientes que receberam antitérmicos nos dois grupos estudados ( $p=0,3998$ ).

Observamos que em 189 (14,0%) dos episódios transfusionais no grupo da ECLP, nos quais foram utilizados antialérgicos previamente à transfusão, não ocorreram reações adversas, enquanto que em 125 (8,2%) no grupo do PRP não foi detectada reação pós-transfusional, sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p=0,00001$ ). Houve também diferença estatisticamente significativa ( $p=0,007$ ) na frequência de episódios transfusionais em que os pacientes foram medicados previamente com anti-alérgicos e apresentaram reação alérgica ou outros tipos de reações adversas. Essas diferenças foram estatisticamente significantes:  $p=0,0075$  e  $0,0004$  respectivamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados quando os pacientes recebiam concomitantemente medicações antitérmicas e antialérgicas quanto à ocorrência de reações pós-transfusionais ( $p=0,4015$ ) ou não, independentemente do tipo de reação apresentada, quando esta (s) ocorreu (ocorreram), ( $p=0,4920$ ).

**5.8.2.5 Efeito do número de transfusões anteriores na incidência de reações adversas no episódio transfusional estudado. (tabela 25, página 177)**

No grupo de pacientes que receberam CH-ECLP e no de transfundidos com CH-PRP, não se observou diferença estatisticamente significativa quando comparados a ocorrência de reações transfusionais e o número de transfusões anteriores ao episódio estudado ( $p=0,258$ ).

TABELA 25 -DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES POR NÚMERO DE TRANSFUSÕES ANTERIORES À INCLUSÃO NESTE ESTUDO E OCORRÊNCIA DE REAÇÕES TRANSFUSIONAIS NO EPISÓDIO ESTUDADO CONFORME MÉTODO DE OBTENÇÃO DO CH TRANSFUNDIDO ( PLASMA RICO EM PLAQUETAS-PRP E DA EXTRAÇÃO DA CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA- ECLP).

TRANSFUSÃO ANTERIOR	GRUPO ECLP		GRUPO PRP		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Nenhuma	4	0,3	18	1,2	22	
1-25	26	1,9	97	6,4	123	
26-50	1	0,07	5	0,3	6	
51-100	1	0,07	0	0,0	1	
>100	1	0,07	1	0,07	1	
<b>TOTAL</b>	<b>33</b>		<b>121</b>		<b>154</b>	

FONTE: FPS/HSP

P=0,258

### 5.8.3 Reações transfusionais ao Concentrado de plaquetas (tabela 26, página 178 e tabela 27, página 179)

No grupo de pacientes que receberam CP-ECLP, em 17 episódios transfusionais, 15 (88,2%) não tiveram reações adversas pós-transfusionais e apenas 2 (11,8%) tiveram. Os pacientes que receberam CP-PRP em 54 episódios transfusionais, 45 (83,3%) não apresentaram reações adversas e 9 (16,7%) apresentaram. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,626$ ). O risco relativo calculado pelo "odds ratio" foi de 1,5 vezes (0,3 a 7,7), com intervalo de confiança de 95%.

**TABELA 26-** DISTRIBUIÇÃO DOS EPISÓDIOS DE REAÇÕES TRANSFUSIONAIS À TRANSFUÇÃO DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS QUANTO MÉTODO DE OBTENÇÃO DO HEMOCOMPONENTE TRANSFUNDIDO (MÉTODO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS-PRP OU MÉTODO DA EXTRAÇÃO DA CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA-ECLP)

REAÇÃO TRANSFUSIONAL	GRUPO ECLP		GRUPO PRP		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Não	15	88,2	45	83,3	60	84,5
Sim	2	11,8	9	16,7	11	15,5
<b>TOTAL</b>	<b>17</b>		<b>54</b>		<b>71</b>	

FORNTE: FRENISF  
P=0,626

Quanto ao tipo de reações adversas pós-transfusionais ao CP, verificamos, na **tabela 27**, que as reações alérgicas apresentaram a incidência de 11,8% no grupo da ECLP e de 5,6% no grupo do PRP. As reações febris não hemolíticas apresentaram a incidência de 0,0% no grupo da CLP e de 11,1% no grupo do PRP. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados ( $p=0,268$ ).

**Tabela 27** - DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS DE EPISÓDIOS DE REAÇÕES TRANSFUSIONAIS AO CONCENTRADO DE PLAQUETAS QUANTO MÉTODO DE OBTENÇÃO DO HEMOCOMPONENTE TRANSFUNDIDO (MÉTODO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS- PRP OU MÉTODO DA EXTRAÇÃO DA CAMADA LEUCOPLAQUETÁRIA-ECLP)

TIPO DE REAÇÃO TRANSFUSIONAL	GRUPO ECLP		GRUPO PRP		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Alérgica	2	11,8	3	5,6	5	7,0
Febril	0	0,0	6	11,1	6	8,5
Nenhum	15	88,2	45	83,3	60	84,5
<b>TOTAL</b>	17		54		71	

FONTE: FPS/HSP

$P = 0,268$



## 6. Discussão

O suporte transfusional é vital no manuseio de diversas situações clínico-cirúrgicas como tumores sólidos, doenças onco-hematológicas, cirurgias e transplantes, dentre outras. Trata-se de um produto de difícil obtenção, pois, até o momento, o sangue é conseguido de doações de indivíduos voluntários, sendo submetido a testes laboratoriais que garantam sua segurança e qualidade, respeitando-se a legislação em vigor. Portanto, toda e qualquer metodologia que possa vir a ser implementada com o intuito de obter componentes de melhor qualidade, maior eficácia e segurança transfusional, deve ser almejada e, quando possível, avaliada. Antes, porém, da implantação de um método na rotina laboratorial, há a fase de validação, que é o estabelecimento de evidência documental, que possibilita que o mais alto grau de segurança de um processo específico resulte, consistentemente, em um produto com características predeterminadas e de qualidade, sendo que, em relação ao sangue e seus componentes, a literatura existente é escassa<sup>83</sup>.

Na primeira fase do estudo avaliamos as características dos componentes sangüíneos produzidos pelo método atualmente em uso na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. O sangue total utilizado para a obtenção de componentes pelo método do PRP estava dentro das

especificações do Ministério da Saúde: volume entre 400 e 500 ml e quantidade de hemoglobina total entre 50 e 70 g por unidade. O CH obtido apresentou volume médio superior a 250 ml, hematócrito entre 60 e 80% e quantidade de hemoglobina total entre 50 e 70 gramas por unidade, com 100% de recuperação de hemoglobina. Pela pequena depleção de leucócitos do método do PRP, a quantidade de leucócitos residuais no CH encontrada neste estudo é compatível com os dados encontrados por Heaton<sup>89</sup> em três centros:  $10^9$  leucócitos por unidade. Por outro lado, a depleção de plaquetas do CH é acentuada, permanecendo grande parte delas suspensas no PRP. As unidades de plaquetas estiveram dentro das especificações do Ministério da Saúde<sup>84</sup>, sendo os resultados obtidos próximos aos encontrados no estudo de Heaton<sup>89</sup>, ou seja, quantidade média de plaquetas por unidade na ordem de  $7,0 \times 10^{10}$ , e de leucócitos residuais, na ordem de  $10^7$ .

As características dos componentes obtidos com o método do PRP foram comparadas às dos componentes obtidos pelo método da ECLP. Para tornar a comparação possível, procuramos inicialmente padronizar, descrever e validar a técnica de produção de componentes sangüíneos pelo método da ECLP no Departamento de Fracionamento e Estoque da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo. A padronização desse método seguiu os preceitos descritos pelos pesquisadores que o idealizaram<sup>45 96 95 98</sup>, sendo que analisadas

laboratorialmente unidades de ST, CH, PF,CLP e de CP. A etapa de validação do método da ECLP incluiu a análise de bolsas triplas e de quádruplas. Como existe variabilidade nas características biológicas do sangue total, os critérios para se decidir a melhor força g e o tempo foram aqueles que indicam percentuais de recuperação ou de depleção de células, hemoglobina e volume.

Após a análise dos resultados laboratoriais obtidos em diferentes forças g e tempo de centrifugação, foram escolhidos aqueles que produziram hemocomponentes de melhor qualidade. A validação foi feita tanto na primeira centrifugação, quando o ST é centrifugado e fracionado em CH, plasma e CLP, como na segunda centrifugação, para validar a produção de CP. Para as 350 bolsas triplas processadas pelo método da ECLP, foi escolhida a primeira centrifugação a 3390 x g por 10min, onde o CH apresentou menor quantidade e maior depleção de leucócitos, maior recuperação de hemoglobina e boa depleção de plaquetas. Os melhores resultados foram obtidos com o uso do extrator automático tipo côncavo quando comparados ao da placa tipo reta. O uso da placa côncava permite melhor recuperação de hemoglobina e maior depleção de leucócitos nas unidades de CH, melhorando o rendimento e qualidade do produto. É descrito que o método da ECLP está associado a perdas de hemácias que permanecem na CLP, em média 24 ml (IC 95%, 23,5 –24,5 ml), o que representa a média de 12,7% da quantidade total de

hemácias (IC 95% 12,5-12,9%)<sup>89</sup>. Utilizando a placa côncava, a quantidade de hemoglobina que permanece na CLP é menor, melhorando o seu aproveitamento.

Quando foram estudados as melhores centrifugações e o tempo para a produção de CP a partir dos 52 conjuntos de CLP coletadas em bolsas triplas, a escolhida foi a 2169 x g por 5min com 4 CLP, obtidos com a placa reta. O CP obtido a partir de 4 unidades de CLP nesta combinação de força g por minuto apresentou maior valor de pH no primeiro dia de armazenamento. Trocando a placa reta pela placa côncava e utilizando força de 1339 x g por 3 minutos, obteve-se CP com maior quantidade e recuperação de plaquetas. Adicionalmente, avaliou-se o pH dessas unidades de CP, estando 31 unidades acima de 6,5 no último dia de armazenamento e apenas duas com pH de 6,0. Em 1996, Wildt-Eggen et al<sup>163</sup>, relataram que, em muitos centros, o CP é obtido de um conjunto de CLP suspensa em uma unidade de plasma ou solução aditiva e armazenadas por 5 dias em bolsas de poliolefina de 1.000ml. Os autores afirmam que apesar do armazenamento nessas bolsas, 29 entre 39 unidades de CP que apresentam mais de  $3,1 \times 10^{11}$  de plaquetas possuem queda acentuada de pH, ou seja, pH menor que 6,8 e fenômeno de "swirling" não satisfatório, sugerindo que, nesses casos, as unidades de plaquetas sejam separadas em duas bolsas ou a quantidade de plaquetas ajustada. Em nosso estudo, 27 de 33 unidades apresentaram

pH menor que 6,5 no quinto dia de armazenamento, indicando a necessidade de redução do período de armazenamento para 3 dias ou ajustes na quantidade de plaquetas armazenadas em cada bolsa. Outra possível causa da queda do pH pode ser o período de espera de até 24 horas para processamento dos conjuntos de CLP para a produção de CP, em função do grande número de células presentes<sup>116</sup>. Os conjuntos de CLP só foram processados após a expedição dos resultados dos testes sorológicos.

Já para as 215 bolsas quádruplas, escolheu-se a primeira centrifugação a 3788 x g por 10min, e a segunda a 335 x g, por 5 min. Os produtos resultantes apresentaram as seguintes características: CH com maior percentual de depleção de leucócitos e plaquetas, boa recuperação de hemoglobina e menor quantidade de leucócitos em números absolutos; CP com maior quantidade de plaquetas em números absolutos e excelente percentual de recuperação de plaquetas e depleção de leucócitos. Somente após a validação do método da ECLP, com a escolha da melhor força g e tempo de centrifugação para a produção de unidades de CP é que esse método foi implementado na FPS/HSP. Foram então coletadas 11.533 bolsas quádruplas tipo TAB ( método da ECLP escolhido), tendo sido então realizado o estudo clínico. O método do ECLP com bolsas quádruplas TAB foi escolhido por motivos operacionais e técnicos. Com bolsas quádruplas, as unidades de CP são obtidas a

partir de uma unidade de CLP, não havendo necessidade de se realizar conexões estéreis entre as unidades de CLP, plasma, bolsa de 600 ml e bolsa de 1.000ml de poliolefina. Também não há necessidade de se aguardar o resultado dos testes sorológicos para o preparo das unidades de CP, que é necessário quando se obtém CP a partir de um conjunto de CLP. Conexões estéreis só devem ser realizadas após todos os testes sorológicos serem negativos, pois, de outra forma, uma unidade positiva definiria o descarte do conjunto. Por outro lado, o tempo para o processamento da CLP não deve exceder 24 horas, pois o pH cai de forma acentuada, diminuindo o rendimento e a qualidade das plaquetas obtidas.

Após a padronizarmos e validarmos o método da ECLP em nossa instituição, compararmos os hemocomponentes obtidos pelo método do plasma rico em plaquetas (PRP), atualmente o mais utilizado em bancos de sangue brasileiros com o da extração da camada leucoplaquetária (ECLP), amplamente difundido e realizado na Europa.

Em trabalho recentemente publicado, Hurtado et al<sup>164</sup> apresentaram os resultados obtidos na análise de qualidade de hemocomponentes produzidos pelo método da ECLP utilizando bolsas TAB e extrator automático Optipress®. O volume de CH no referido estudo foi de  $279 \pm 20$ ml, valores similares aos obtidos por nós tanto nos CH-

ECLPT ( $286,8 \pm 15,8$ ml) quanto nos CH-ECLPQ ( $287,2 \pm 21,6$ ml). Quanto à quantidade de Hb por bolsa,  $Hb=54,92 \pm 7,16$ g, a casuística de Hurtado<sup>164</sup> foi semelhante à por nós observada para CH-ECLPT ( $58,4 \pm 5$ g/bolsa) e para CH-ECLPQ ( $53,5 \pm 8,6$ g/bolsa). A quantidade de leucócitos nos CH, em nosso estudo, variou de  $0,8 \pm 0,6 \times 10^9$  (CH-ECLPT) a  $0,5 \pm 0,3 \times 10^9$  (CH-ECLPQ), enquanto que em Hurtado et al<sup>164</sup>, a quantidade de leucócitos encontrada foi de até  $1,2 \times 10^9$ , em 96% das unidades de CH.

Nos CH-PRP, o número de leucócitos residuais foi, em média,  $3,0 \pm 0,9 \times 10^9$  por unidade, valores bastante próximos dos encontrados por Greenwalt et al.<sup>165</sup> ( $2,88 \pm 0,97 \times 10^9$ ). Porém, quando comparamos os resultados obtidos pelos pesquisadores para o CH-ECLP ( $0,29 \pm 0,07 \times 10^9$ ), estes foram inferiores aos dos por nós encontrados em CH-ECLPT ( $0,8 \pm 0,6 \times 10^9$ ) e em CH-ECLPQ ( $0,5 \pm 0,3 \times 10^9$ ).

Na análise do plasma obtido por PRP, ECLPT e ECLPQ, nossos resultados para volume, ( $174,6 \pm 26,3$  ml,  $248,2 \pm 19,0$  ml e  $214,5 \pm 22,1$  ml respectivamente), foram inferiores aos descritos por Hurtado et al<sup>164</sup>, ( $279 \pm 19$  ml.). O percentual de recuperação de plasma foi maior com a utilização do método da ECLPQ ( $79,1 \pm 6,2\%$ ) do que com o método do PRP ( $72 \pm 3,9\%$ ). Heaton et al<sup>89</sup> descrevem em seus resultados que maior quantidade de plasma residual permanece no CH-PRP (21%) em



relação ao CH-ECLP com bolsas TAB (6%). A menor quantidade de plasma nos concentrados de hemácias obtidos pelo método da ECLP pode justificar o menor índice de reações transfusionais do tipo alérgicas relacionadas às proteínas plasmáticas que ocorreram neste estudo.

A recuperação de plaquetas, na CLP-ECLPT e na CLP-ECLPQ, foi acima de 90% da quantidade total de plaquetas existentes nas unidades de sangue total na nossa casuística e na casuística de Hurtado et al.<sup>164</sup> O percentual de remoção de leucócitos na CLP encontrado por esse grupo foi de  $74 \pm 10\%$  da quantidade de leucócitos existentes nas unidades de sangue total, sendo compatível com os dados encontrados por nós, que foi de  $74,8 \pm 14,6\%$  de remoção de leucócitos nas unidades de CH-ECLPQ e com a grande quantidade de leucócitos presentes nas unidades de CLP-ECLPQ em nosso estudo ( $1,8 \pm 0,7 \times 10^9$  por unidade). O mesmo grupo descreve que 13 a 15% das hemácias são perdidas nas unidades de CLP. Neste estudo, o percentual de recuperação de hemoglobina do CH em relação ao ST foi de  $89,2 \pm 9,5\%$  para o CH-ECLPT e de  $92,7 \pm 6,3\%$  para o CH-ECLPQ.

Quando o volume dos CP-PRP ( $\mu=61,9 \pm 3,8$  ml) foi comparado com aqueles por ECLPT ( $\mu=66,1 \pm 3,2$ ml) e ECLPQ ( $\mu=56,2 \pm 5,6$  ml), a diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Bertolini

et al.<sup>108</sup>, encontraram valores bastante próximos para o CP-PRP ( $62 \pm 3,2$ ml), porém muito inferiores para os CP-ECLP ( $45 \pm 3,2$ ml), assim como para os descritos por Boeri et al.<sup>115</sup> ( $46 \pm 6$ ml). Koerner et al.<sup>166</sup> ( $68 \pm 18$  ml) e Kluter et al.<sup>167</sup> ( $67,4 \pm 3,4$  ml) encontraram volumes semelhantes aos por nós observados nos CP-ECLPQ.

Em nosso estudo, o número de leucócitos encontrados nos CP obtidos a partir do PRP foi de  $36,1 \pm 20,8 \times 10^6$ , próximo aos descritos por Muylle e Peetermans<sup>127</sup> ( $39 \pm 21 \times 10^6$ ) e inferior aos encontrados por Anderson et al.<sup>168</sup> ( $73 \times 10^6$ ), porém superior aos observados por Bertolini et al.<sup>108</sup> ( $25,6 \times 10^6$ ). Anderson et al.<sup>168</sup> e Bertolini et al.<sup>108</sup> ao estudarem a quantidade de leucócitos em CP-ECLP, encontraram níveis que variaram de  $1$  a  $13,6 \times 10^6$  a  $1,9 \times 10^6$ , respectivamente, valores próximos aos dos obtidos por nós em CP-ECLP ( $1,1 \pm 0,5 \times 10^6$ ).

Eriksson et al conduziram elegantes estudos nos quais demonstraram que CP preparados a partir de conjuntos de 4 unidades de camada leucoplaquetária no dia da coleta de sangue apresentaram, *in vivo*, resultados semelhantes aos observados após a transfusão de CP por aférese, pela análise do cálculo do CCI<sup>169</sup> (cálculo do incremento plaquetário corrigido) e pelo teste de sangramento de Ivy<sup>170</sup>.

Em nossa casuística, não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de plaquetas em CP-PRP ( $\mu=7,3 \times 10^{10}$ ), CP-ECLPT ( $\mu=7,2 \times 10^{10}$ ) e CP-ECLPQ ( $\mu=6,8 \times 10^{10}$ ). Nossos dados em CP-ECLPT mostraram-se similares aos descritos por Bubel et al<sup>125</sup> ( $7,0 \times 10^{10}$ ), inferiores aos obtidos por Boomgard et al<sup>111</sup>, ( $9,0 \times 10^{10}$ ), mas superiores aos descritos por Kluter et al<sup>167</sup> ( $5,4 \pm 0,9 \times 10^{10}$ ). De acordo com a experiência de Hogman et al<sup>95</sup>, a quantidade de plaquetas obtidas pelo método da ECLP varia consideravelmente conforme o hematócrito do conjunto de CP-ECLP. Uma explicação para as baixas contagens de plaquetas encontradas por alguns autores em CP-ECLP foi recentemente atribuída à síndrome denominada "cherry buffy-coat", em que os CP-ECLP que apresentavam coloração vermelho-cereja estavam associados ao acúmulo de  $O_2$ , menor  $CO_2$ , maior pH e menor contagem plaquetária, quando comparados aos CP-ECLP com coloração normal usados como controles<sup>121</sup>.

A análise do método da ECLP mostrou que os hemocomponentes produzidos a partir dessa metodologia são seguros para transfusão de ST, CH, plasma e de CP, sendo a redução de leucócitos maior que no método do PRP.

Com base nos resultados desse estudo, após a validação do método da ECLP, procedemos à implementação do método da ECLP a

partir de bolsa única na rotina de processamento de hemocomponentes da FPS/HSP, que mostrou ser mais eficiente e eficaz na redução de leucócitos dos hemocomponentes, ainda que não substitua a leucoredução por filtro; esta, quando for realizada em hemocomponentes preparados a partir da ECLP, poderá apresentar eficácia ainda maior que nas unidades processadas a partir do PRP, pois o número de leucócitos pré-filtração é inferior aos dos hemocomponentes obtidos por PRP, sendo a diferença estatisticamente significativa, já tendo sido documentado que a filtração de conjuntos de PC a partir da ECLP não afeta a função plaquetária<sup>171</sup>. Os mesmos autores relatam que a filtração em CP-ECLP pode inclusive ser clinicamente importante, reduzindo o risco de desenvolvimento de alo-imunização HLA e de transmissão viral.

As transfusões de CP podem ser acompanhadas de efeito adversos, como o são freqüentemente de RFNH. Aparentemente causadas por diferentes mecanismos, estas podem ser, em parte, explicadas pela liberação de citocinas e fator alfa de necrose tumoral e dos leucócitos para o plasma durante a estocagem dos CP<sup>34</sup>. Daí ser importante o método de obtenção de CP-ECLP, que permite uma redução na quantidade de leucócitos no CP quando comparado ao CP-PRP e portanto, de RT relacionadas aos leucócitos e aos produtos por eles liberados.

Chaplin et al<sup>5</sup>, já descreviam que a retirada da CLP reduzia a freqüência de reações pós-transfusionais. Anderson et al<sup>168</sup> estudando pacientes com doenças onco-hematológicas que foram transfundidos com CH filtrados e CP por aférese, CP-ECLP ou CLP-PRP, observaram que as RFHN foram mais freqüentes em pacientes que receberam hemocomponentes a partir deste último método (62%), enquanto que 29% dos que receberam CP-ECLP tiveram reações, diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Em nossa casuística, 11% dos pacientes apresentaram RFNH pós-transusão de CP-PRP, e nenhum após CP-ECLP, diferença porém não estatisticamente significativa.

Quanto às RT pós-CH, nossos resultados em CH-ECLP (2,4%) foram semelhantes aos reportados por Dzieczkowski et al.<sup>131</sup>, com CH filtrados à beira do leito (2,68%), assim como para as reações alérgicas (0,51%) e 0,4% por nós. Entretanto, a incidência de reações transfusionais relacionadas à infusão de CH-PRP em nossa casuística foi de 8%, enquanto as alérgicas contribuíram com 3,1%, sendo muito mais elevadas que as acima descritas, diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). A freqüência de reações febris após a transfusão de CH-PRP e de CH-ECLP foi de 3,6% e de 1,0%, respectivamente, tendo sido similar às observadas por Liéden e Hildén<sup>93</sup>: 3,1 e 1,4%.

Um estudo retrospectivo recentemente publicado<sup>172</sup>, em que foram analisados os prontuários referentes à transfusão de 31.543 CH não leucoreduzidos e de 16.093 CH filtrados pré-estocagem, os pesquisadores não observaram redução na incidência de RFNH: 0,12% (CH não leucoreduzidos) e 0,08% (CH filtrados). Concluíram que os resultados poderiam ser explicados, em parte, pelo uso de acetoaminofeno de rotina em pacientes que recebem transfusões freqüentes e que reações leves simplesmente podem não ter sido adequadamente documentadas e reportadas ao banco de sangue. Deve-se, porém, levar em conta que a incidência de RFNH descrita por esses pesquisadores é muito inferior à apontada por outros<sup>93 131</sup>.

Assim como no estudo de Heddle et al.<sup>36</sup>, a freqüência de RT pós-CP foi maior que após a transfusão de CH, por quaisquer dos métodos por nós testados. Esses autores encontraram 30,8% de RT pós-transfusão de CP e 6,8% após a transfusão de CH. Os mesmos autores afirmam ainda que o uso rotineiro de antipirético previne a maioria dos episódios de febre, mas não evita a ocorrência de outros sintomas, tais como calafrios e mal-estar geral, entre outros.

A freqüência de RT pós-transfusão de CP-ECLP, descrita por Heddle et al.<sup>36</sup>, foi de 4,6%. Muylle e Peetermans<sup>127</sup>, descreveram a freqüência de RT pós CP-PRP (9,3%) e pós CP-ECLP (2,7%). Os dois

estudos encontraram incidência menor que em nossa casuística, tanto para CP-PRP (16,7%), como para CP-ECLP (11,8%). Oksanen et al<sup>184</sup> descreveram RT pós CP-PRP em 83% dos episódios transfusionais estudados, mas em 27% dos CP-ECLP em pacientes hematológicos. Com base nos resultados encontrados, podemos afirmar que as reações adversas são minimizadas após a transfusão de CP-ECLP.

Riccardi et al<sup>173</sup>, avaliando a incidência de RT em CP-ECLP concluíram que o tempo de estocagem foi uma variável importante, sendo maior o número de RT nos cinco dias de estocagem de CP-ECLP (risco relativo 10 vezes maior que nos CP com um dia de estocagem)

Quanto ao efeito da pré-medicação na incidência de RFNH pós-transfusão de CP, um estudo prospectivo canadense, realizado em grupo de pacientes onco-hematológicos, mostrou que a maioria destes (73%) era pré-medica e que, mesmo assim, 30% apresentavam reação. Depois que esse grupo estabeleceu e implementou orientações quanto ao uso de medicação prévia à transfusão de CP, observou-se uma redução no uso de medicação, mas que não foi acompanhada pela queda significativa das RFNH (26%), indicando que, em pacientes onco-hematológicos, a pré-medicação pode ser reduzida sem aumentar o risco de desenvolvimento de RFNH<sup>174</sup>.

Além da preocupação em reduzir o número de leucócitos de hemocomponentes, com o intuito de diminuir a frequência de RT e efeitos imunomodulatórios da transfusão<sup>175</sup>, é importante o tempo em que a leucoredução é realizada, após a coleta do sangue. Estudo de Bordin et al<sup>176</sup>, mostra que leucoredução pós-estocagem de produtos sanguíneos pode não ser tão eficiente como a feita no período pré-estocagem na prevenção do efeito promotor de crescimento tumoral das transfusões alogeneicas em modelos animais.

Em nossa casuística de menor número de RT pós-transfusão de CP-ECLP pode ser em parte explicada pelo volume de plasma desses hemocomponentes, que foi estatisticamente menor quando comparado aos de CP-PRP, pois observou-se recentemente que reações pós-transfusionais ao CP foram menos freqüentes nos CP com remoção de plasma do que nos CP filtrados pós-estocagem<sup>37</sup>. Neste estudo, a IL-6 foi o fator avaliado que mostrou ter maior significância na sua correlação com o risco de reação<sup>37</sup>. Muylle et al.<sup>177</sup> já assinalavam, em 1993, que a IL-6 e TNF-alfa estavam relacionados com as reações transfusionais, e que haveria uma relação entre o número de leucócitos nos CP e a síntese ativa dessas substâncias .

O número de RT ao CH-PRP foi de 8% em nosso estudo e de 6,8% na casuística de Hedlle et al<sup>36</sup>.



Em nosso estudo o descarte de CP por excesso de agregados foi estatisticamente maior nos CP-PRP (16,6%) que nos CP-ECLP (0,1%). Bertolini et al<sup>108</sup>, avaliando os CP-ECLP encontraram uma diferença estatisticamente significante entre CP-PRP e CP-ECLP nos resultados de testes de agregação com colágeno (tanto a 50µg/ml quanto a 10µg/ml) sugerindo que a função plaquetária estaria melhor preservada nos CP-ECLP que nos CP-PRP. Operacionalmente, podemos dizer que as perdas desse hemocomponente tão precioso foram menores nos CP-ECLP que nos CP-PRP, apontando uma vantagem para os CP-ECLP.

A queda do pH e a alteração da morfologia plaquetária (efeito de "swirling") foram analisadas em nosso estudo. O bicarbonato plasmático é utilizado durante a estocagem dos CP-PRP como principal tampão para estabilizar o pH.<sup>178</sup> Diferentemente do que descreveram Bertolini et al<sup>108</sup>, em que o pH nos CP-ECLP manteve-se, durante o armazenamento, praticamente igual ao observado no primeiro dia de estocagem ( $6,9 \pm 0,13$ ), outros autores, como Boeri et al<sup>115</sup>, observaram uma queda significativa durante a estocagem. O mesmo foi por nós encontrado, principalmente nos CP-ECLPT, sendo o pH no primeiro dia de  $6,9 \pm 0,2$  e no quinto dia foi de  $6,6 \pm 0,2$ . Nos CP-ECLPQ, o pH no primeiro dia de estocagem em nosso estudo ( $7,3 \pm 0,1$ ), apresentou níveis

superiores ao do CP-ECLPT ( $6,9 \pm 0,2$ ), praticamente iguais aos observados por Boeri et al.<sup>115</sup> ( $7,3 \pm 0,08$ ), similares aos reportados por Kluter et al.<sup>116</sup>, ( $7,2 \pm 0,04$ ), mas superiores aos descritos por Muylle e Peetermans<sup>127</sup> ( $7,05 \pm 0,17$ ).

A presença de swirling correlaciona-se bem com os valores de pH de CP, sendo um método não-invasivo e que possibilita avaliar visualmente a viabilidade dos CP produzidos<sup>156-179</sup>. Os escores de swirling foram maiores nos ECLPQ e PRP ( $3,0 \pm 0,0$ ) que nos CP-ECLPT (2,6) em todos os CP analisados, sendo que Boeri et al.<sup>115</sup> encontraram escore de swirling maior ou igual a 2,5 em 94% das bolsas avaliadas. O menor escore obtido pelo CP-ECLPT deve-se ao fato de as unidades de plaquetas terem sido obtidas a partir de um conjunto de CLP após período de quarentena de até 24 horas para liberação dos testes sorológicos.

Um das vantagens apontadas para os CP-ECLP é que a remoção dos leucócitos do conteúdo plaquetário é precoce evitando a ativação das plaquetas. A prevenção da ativação plaquetária é importante para adequada função *in vivo* das plaquetas após a transfusão<sup>180</sup>.

Em 1984, Gottschall et al, chamavam a atenção para a importância da quantificação dos leucócitos no controle de qualidade dos CP<sup>181</sup>.

O controle de qualidade das preparações de CP deveriam ser rotina, de acordo com M. Contreras, do North London Blood Transfusion Centre-Londres, além de incluir métodos mais acurados para a quantificação de leucócitos residuais, assim como da quantidade de plaquetas, além de testes microbiológicos e métodos rápidos para a detecção de ácido nucleico viral nos CP<sup>52</sup>.

Em 1993, Goodnough et al<sup>132</sup> não encontraram diferença estatisticamente significativa na incidência de RT pré e pós-implementação da filtração de CP em pacientes hematológicos internados.

Muitos países na Europa e ao redor do mundo ou estão em prestes a implementar a leucoredução universal para os CH e CP ou já o fizeram, sempre levando-se em consideração os benefícios da remoção precoce dos leucócitos desses hemocomponentes para aumentar a segurança transfusional<sup>182</sup>. Para tanto, controle dos processos e de validação da produção de componentes sanguíneos têm sido desenvolvidos e são cruciais para se atingirem os níveis de leucoredução desejados ( 1 ou  $5 \times 10^6$  leucócitos residuais)<sup>183</sup>.

Ultimamente atenção tem sido dedicada à produção de conjunto de CP pelo método da ECLP associado à filtração pré-

estocagem. Pietersz et al<sup>123</sup> estudaram os efeitos da preparação de CP-ECLP e a filtração pré-estocagem com o filtro Autostop™, tendo conseguido um nível de leucoredução (leucócitos  $< 1 \times 10^6$ ) em 99% dos CP assim processados. Recentemente, foi publicado estudo em que foi comparada a eficácia da transfusão de CP-ECLP associados à filtração pré-estocagem e à beira do leito, quando ficou constatado que ambas preparações apresentaram excelentes resultados na avaliação da contagem corrigida do incremento plaquetário<sup>53</sup>.

Já existem no mercado sistemas integrados que consistem em uma bolsa, um filtro e um container para a estocagem de plaquetas. Após avaliarem esses sistemas, van der Meer et al<sup>184</sup> concluíram que conjuntos de CP assim produzidos possuem vários benefícios, como menor sobrecarga de trabalho, facilitando a operacionalização, alertando, entretanto, que nem todas as combinações de filtros e containeres para estocagem de plaquetas mostraram-se adequados. Por fim, recomendaram a validação em cada banco de sangue antes de implantação dessa sistemática na rotina de processamento de hemocomponentes.

Estudo similar publicado por Krailadsiri et al<sup>185</sup> mostrou que os conjuntos de CP-ECLP preparados a partir de uma combinação de três filtros e bolsas para o armazenamento de plaquetas, apesar de serem

equivalentes no primeiro dia, diferiram significativamente durante a estocagem em termos de ativação ou microvesiculação das plaquetas.

Por fim, acreditamos que a utilização do método da ECLP em nosso meio é vantajosa sob o ponto de vista qualitativo, pois os hemocomponentes obtidos apresentam menor quantidade de leucócitos e plasma, resultando em benefícios clínicos para os pacientes que necessitam de transfusão. Conforme demonstrou-se neste estudo, o método da ECLP com a utilização de bolas quádruplas e a produção de CP a partir de uma unidade de CLP, é de implantação viável, é de fácil padronização, permitindo boa reprodutibilidade, bem como melhor aproveitamento de plasma e plaquetas.

## 7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste trabalho, podemos concluir que:

1. O método da extração da camada leucoplaquetária permite a obtenção de componentes com menor quantidade de leucócitos quando comparado aos componentes obtidos pelo método do plasma rico em plaquetas. As unidades de concentrado de hemácias com o método da ECLP têm quantidade de leucócitos na ordem de  $10^8$ , enquanto que com o método do PRP a quantidade de leucócitos foi maior, na ordem de  $10^9$ . Observamos também que as unidades de concentrado de plaquetas obtidas pelo método da ECLP têm menor quantidade de leucócitos residuais, da ordem de  $10^6$ . Os CP-PRP têm quantidade de leucócitos residuais na ordem de  $10^7$ . Assim, demonstramos que a utilização do método da ECLP determina percentuais de depleção de leucócitos significativamente maior que o método do PRP, tanto para o concentrado de hemácias como para o concentrado de plaquetas.

2. Quando analisamos as características dos concentrados de hemácias, concluímos que o hematócrito do CH-ECLP é menor, aproximadamente 60%, e no CH-PRP, ao redor de 70%. A camada leucoplaquetária possui grande quantidade de hemoglobina por unidade (10 g por unidade), o que explica a menor recuperação de hemoglobina com o método da ECLP, assim como unidades de CH com menor quantidade total de hemoglobina (64 g no CH-PRP e 54 g no CH-ECLP).

3. A quantidade de plaquetas obtidas no CP-PRP, no CP-ECLP de uma unidade de CLP e no CP-ECLP de um conjunto de CLP não foi diferente, com média de aproximadamente  $7,0 \times 10^{10}$  plaquetas por unidade, apesar de o volume das unidades de CP ter sido diferente. Qualitativamente, as unidades de CP-PRP e CP-ECLP obtidas de uma unidade de CLP foram superiores às de CP-ECLP obtidas de um conjunto de 4 CLP. No primeiro dia de armazenamento, o efeito "swirling" e o pH das unidades de CP-ECLP obtidas de 4 CLP foram significativamente menores que os encontrados nos outros dois tipos de CP.

4. O método da ECLP permite melhor aproveitamento da quantidade de plasma existente nas unidades de sangue total.



Aproximadamente 40 ml de plasma são retirados a mais. Isto é possível não só pela maior força g por minuto utilizada, como também pelo emprego da solução aditiva de SAGM com o método da ECLP.

5. Concluímos ser viável em nosso meio a operacionalização do método da extração da camada leucoplaquetária com a utilização de bolsas quádruplas e a obtenção de concentrados de plaquetas a partir de uma unidade de camada leucoplaquetária. Nesse estudo, esse método foi validado demonstrando-se que os resultados alcançados são consistentes e reprodutíveis. Entre março de 1998 e maio de 1999, empregou-se na rotina da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo o método da ECLP com o uso de bolsas quádruplas. Foram coletados 11.533 bolsas de sangue total, sendo produzidas 11.533 unidades de CH, 11.533 unidades de CP e 11.533 unidades de plasma. Somente 0,1% das unidades de CP foi descartada devido à formação de agregados, quantidade significativamente menor que a proporção de unidades descartadas no mesmo período com o método do PRP (16,6%).

6. A incidência de reações transfusionais com a utilização de concentrado de hemácias obtido pelo PRP (8,0%) é significativamente maior quando comparada à utilização de concentrado de hemácias obtido

pelo método da extração da camada leucoplaquetária (2,4%). O risco relativo calculado pelo "odds ratio" foi de 3,46 vezes. Em números absolutos, a incidência de reações transfusionais após a utilização de concentrados de plaquetas obtidos pelo método da ECLP é menor (11,8%) quando comparada às unidades de concentrado de plaquetas obtidas pelo método do PRP(16,7%).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BRAND, A. ; VAN DE WATERING, L.M.G.; CLAAS, F.H.J. Clinical significance of leukoreduction of blood components. **Vox Sang**, v.78 (suppl 2), p.227-9, 2000.
- 2 BLAJCHMAN, M.A . The case for universal WCLP reduction. **The Compendium 2000- A selection of short topic presentations from the Technical /Clinical and Scientific Tracks. American Association of Blood Banks Press. Washington, 2000, 433-6pp.**
- 3 DZIK, S.; AUBUCHON, J.; JEFFRIES, L.; KLEINMAN, S. ; MANNO, C.; MURPHY, M.F.; POPOVOSKY, M.A. ; SAYERS, M.; SILBERSTEIN, L.E. Leukocyte reduction of blood components. Public policy and new technology. **Transf Med Rev**, v.14, p.34-52, 2000.
- 4 BRITTINGHAM, T.; CHAPLIN JR., H. Febrile transfusion reactions caused by sensitivity to donor leukocytes and platelets, **J.A M.A.**, v.165, p. 19, 1957.
- 5 CHAPLIN JR, H.; BRITTINGHAM, T.E.; CASSELI, M. Methods for preparation of suspensions of Buffy-Coat-Poor red Blood cells for transfusion. **Am J of Clin Pathol**, v.31, p.373-83, 1959.
- 6 MERYMAN, H.T.;HORNBLLOWER, M. Preparation of cells depleted of leukocytes. Review and evaluation. **Transfusion**, v.26, p.101-6, 1986.
- 7 MERYMAN, H.T.; HORNBLLOWER, M. Red cell recovery and leukocyte depletion following washing of frozen-thawed red cells. **Transfusion**, v.13, p. 194-9, 1973.
- 8 GRAY, E.; BAXTER, A. ; LABERGE, A. ; ROCK, G. Preparation of leukocyte-poor blood: a comparison of IBM 2991 washing and Hugges freezer thawing. **Vox Sang**, v.40, p.323-8, 1981.
- 9 POLESKY, H.F. The Emily Cooley Lecture: **Leukocyte poor blood, a study in the evolution of component therapy.** In: Seminar on Blood Components. American Association of Blood Banks,1977;53pp.
- 10 ROCK, G. ; BAXTER, A. ; GRAY, E. Leukocyte-depleted blood: a comparison of available preparations. **Can Med Assoc J.** v.130, p.1566-1568, 1984.

- 
- 11 SNYDER, E.L.; BOOKBINDER, M. Role of microaggregate blood filtration in clinical medicine. **Transfusion**;v.23, p.460-70, 1983.
  - 12 OSBORN, J.J.; SWANK, R.L.; HILL, J.D.; AGUILAR, M.J.; GERBODE, F. Clinical use of a Dacron wool filter during perfusion of open-heart surgery. **J Thorac Cardiovasc Surg** v.60, p.575-81, 1970.
  - 13 SWANK, R.L.; PORTER, G.A. Disappearance of micro-emboli transfused into patients during cardiopulmonary bypass. **Transfusion**, v.3, p.192-7, 1963.
  - 14 COLLINS, J.A ; JAMES, P.M.;BREDENBERG, C.E.; ANDERSON, R.W.; HEISTERKAMP, C.A ; SIMMONS, R.L. The relationship between transfusion and hypoxemia in combat casualties. **Ann Surg**, v.188, p.513-20, 1978.
  - 15 BREDENBERG, C.E. Does a relationship exist between massive blood transfusion and the adult respiratory distress syndrome? If so, what are the best preventive measures? **Vox Sang**, v.32, p.311-3,1977.
  - 16 SNYDER, E.L.; UNDERWOOD, O .S.; SPIVACK, M.; DEANGELIS, L.; HABERMANN, E.T. An in vivo evaluation of microaggregated blood filtration during total hip replacement. **Ann Surg**, v.190, p.75-9, 1979.
  - 17 SNYDER, E.L.; HEZZEY, A .; BARASH, P.G.; PALERMO, G. Microaggregate blood filtration in patients with compromised pulmonary function. **Transfusion**, v.22, p.21-5, 1982.
  - 18 WENZ, B. Microaggregate blood filtration and the febrile transfusion reaction: A comparative study. **Transfusion**, v. 23, p.95-8,1983.
  - 19 PARRAVICINI, A .; REBULLA, P.; APUZZO, J.; WENZ, B.; SIRCHIA, G. The preparation of leukocyte-poor red cells for transfusion by a simple cost-effective technique. **Transfusion**, v.24, p.508-9, 1984.
  - 20 GREENWALT, T.J.; GAJEWSKI, M.; MCKENNA, J.L. A new method for preparing buffy-coat poor blood. **Transfusion**, v. 2, p. 221-9, 1962.
  - 21 DIEPENHORST, P.; SPROKHOLT, R.; PRINS, H.K. Removal of leukocytes from whole blood and erythrocyte suspensions by filtration through cotton wool I. filtration technique. **Vox Sang**, v.23, p.308-20, 1972.

- 
- 22 ENGELFRIET, D.P.; DIEPENHORST, P.; VAN DER GIESEN, M. Removal of leukocytes from whole blood and erythrocyte suspensions by filtration through cotton wool. IV Immunization studies in rabbits. **Vox Sang**, v.28, p.81-9, 1975.
- 23 REESINK, H.K.; VELDMAN, H.; HENRICHS, H. J.; PRINS, H.K.; LOOS, J. A. Removal of leukocytes from blood by fibre filtration. A comparison study on the performance of two commercially available filters. **Vox Sang**, v.42, p.281-8, 1982.
- 24 SIRCHIA, G. ; PARRAVICINI, A. ; REBULLA, P. Effectiveness of red blood cells filtered through cotton wool to prevent leukocyte production in multitransfused patients. **Vox Sang**, v. 42, p.190-7, 1982.
- 25 BRUIL, A. ; BEUGELING, T.; FEIJEN, J.; VAN AKEN, W.G. The mechanisms of leukocyte removal by filtration. **Transf Med Rev**, v.9 (2), p.45-66, 1995.
- 26 PIETERZ, R.N.I.; STENEKER, I.; REESINK, H.W.; DEKKER, W. J.; AL, E.J.; HUISMAN, J.G.; BIEWENGA, J. Comparison of five different filters for the removal of leukocytes from red cell concentrates. **Vox Sang** , v.62, p.76-81, 1992.
- 27 DZIK, W.H. Leukoreduced blood components: Laboratory and clinical aspects. In: Rossi EC, Simon TL, Moss GS, Gould AS eds. **Principles of transfusion medicine**. Baltimore, MD; Williams & Wilkins, 1996, pp.353-73.
- 28 THE TRIAL TO REDUCE ALLOIMMUNIZATION TO PLATELETS STUDY GROUP. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. **N Engl J Med** , v. 337, p.1861-9, 1997.
- 29 HILLYER, C.D.; EMMENS, R.K.; ZAGO-NOVARETTI, M.C.; BERKMAN, E.M. Methods for the reduction of transfusion-transmitted cytomegalobirus infection: filtration versus the use of seronegative donors. **Transfusion** v.39, 232-8, 1993.
- 30 **STANDARDS FOR BLOOD BANKS AND TRANSFUSION SERVICES**. AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. XX ed. Bethesda, Maryland. 2000, 118, pp.

- 
- 31 GUIDE TO THE PREPARATION ,USE AND QUALITY ASSURANCE OF BLOOD COMPONENTS. 4<sup>th</sup> ed. Strasburg, Council of Europe Publishing, 1998, 215pp.
- 32 POPOVSKY, M.A. Quality of blood components filtered before storage and at the bedside: Implications for transfusion practice. **Transfusion**, v.36, p.470-4, 1996.
- 33 AUBUCHON, J. P. Evaluation of a new prestorage leukoreduction filter for red blood cell units. **Vox Sang** ,v.72, p.101-6, 1997.
- 34 AYE, M.T.; PALMER, D.S.; GIULIVI, A . ;HASHEMI, S. Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage. **Transfusion**, v.35(2), p.117-24, 1995.
- 35 GUIDELINE ON GENERAL PRINCIPLES OF PROCESS VALIDATION. Center for Drugs and Biologics and Center for Devices and Radiological Health, Division of Manufacturing and Components Quality (HFN-320). Rockville, MD. Food and Drug Administration, 1995,pp.17-61-17-72.
- 36 HEDDLE, N.M.; KLAMA, L.; GRIFFITH, L.; ROBERTS, R.; SHUKLA, S.; KELTON, J.G. A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusion. **Transfusion**, v.33, p.794-7, 1993.
- 37 HEDDLE, N.M.; KLAMA, L.; MEYER, R.; WALKER, I.; BOSHOKOV, L.; ROBERTS, R.; CHAMBERS, S.; PODLOSKY, L.; O'HOSKI, P.; LEVINE, M. A randomized control trial comparing plasma removal with white cell reduction to prevent reactions to platelets. **Transfusion**, v.39, p.231-8, 1999.
- 38 HEDDLE, N.M.; MEYER, R.; SHER, G. A randomized control trial comparing plasma removal to two types of pre storage leukoreduction to prevent reactions to platelets. **Transfusion**, v.39(suppl), p.96S, 1999.
- 39 WILL, R.G.; IRONSIDE, J.W.; ZEIDLER, M.; COUSENS, S.N.; ESTIBIERO, K. ; ALPEROVITCH, A . ; POSER, S.; POCCHIARI, M., HOFFMAN, A . ; SMITH, P.G. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the U.K. **Lancet** , v.347, p.921-5, 1996.

- 
- 40 HETLAND, G.; SOLHEIM, B.G. Quality of platelet concentrates (letter). **Transfusion**, v.38, p.799-800, 1998.
- 41 ANDREU, G.; DEWAILLY, J.; LEBERRE, C.; QUARRE, M.C.; BIDET, M. L.; TARDIVEL, R.; DEVERS, L.; LAM, Y.; SOREAU, E.; BOCCACCIO, E. Prevention of HLA alloimmunization with leukocyte-poor packed red cells and platelet concentrates obtained by filtration. **Blood**, v.72, p.964-9, 1988.
- 42 VAMVAKAS, E.C. The case against universal leukoreduction. **The compendium 2000**. AABB press. Bethesda, Maryland. 2000, p.437-41.
- 43 BUDKA, H. Prions and Transfusion Medicine. **Vox Sang**, v.78 (suppl 2), p.231-8, 2000.
- 44 MENITOVE, J.E.; MCELLIGOTT, M.C.; ASTER, R.H. Febrile transfusion reaction: What component should be given next? **Vox Sang**, v.42, p.318-21, 1982.
- 45 PRINS, H.K.; DE BRUIJN, J.C.; HENRICHS, H.P.; LOOS, J.A. Prevention of Microaggregate formation by removal of "buffy-coats". **Vox Sang**;v.39, p.48-51, 1980.
- 46 PIETERSZ, R.N.; REESINK, H.W.; DEKKER, W.J.; FIJEN, F.J. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats. I. special inserts for centrifuge cups. **Vox Sang**, v.53, p.203-7, 1987.
- 47 HOGMAN, C.F.; AKERBLUM, O.; HEDLUND, K.; ROSEN, I.; WIKLUND, L. Red cell suspensions in SAGM medium. Further experience in vivo survival of red cells, clinical usefulness and plasma-saving effects. **Vox Sang**, v.45(suppl 3), p.217-3, 1983.
- 48 HOGMAN, C.F.; ERIKSON, L.; HEDLUND, K.; WALLVIK, J. The Bottom and Top system: A new technique for blood component preparation and storage. **Vox Sang**, v.55, p.211-7, 1988.
- 49 PIETERZ, R.N.I.; LOOS, J. A. ; REESINK, H.W. Platelet concentrates stored in plasma for 72 hours at 22°C prepared from buffy coats of cytrate-phosphate-dextrose blood collected in a quadruple bag saline-adenine-glucose-mannitol system. **Vox Sang**, v.49, p.81-5, 1985.
- 50 SWEENEY, J.D.; HOLME, S.; HEATON, A. Quality of platelet concentrates. **Immunol Invest**, v.24, p.353-70, 1995.



- 
- 51 HEDDLE, N.M.; KELTON, J.G. Febrile nonhemolytic reactions. In: Popovsky MA, ed. **Transfusion reactions**. Bethesda, MD. AABB Press, 1996, pp.45-80.
- 52 CONTRERAS, M. Final Statement from the consensus conference on platelet transfusion. **Transfusion**, v.38, p.796-7, 1998.
- 53 MULLER-STEINHARDT, M.; SCHLENKE, P.; WAGNER, T.; KLUTER, H. Transfusion of platelet concentrates from pool of buffy-coats: Comparison of bedside vs. prestorage leukofiltration. **Transfusion Med**, v.10 (1), p.59-65,2000.
- 54 SCHMIDT, P.J. John Elliott and the evolution of American Blood Banking, 1934 to 1954. **Transfusion**, v.40, p.608-12, 2000.
- 55 BLUNDELL, J. Successful case of transfusion. **Lancet**, v. 9, p.413-32, 1828.
- 56 HUSTIN, A .S. Principe d' une nouvelle méthode de transfusion muqueuse. **J Méd Brux**, v.2, p.436, 1914.
- 57 LEWINSHON, R. A new and greatly simplified method of blood transfusion. A preliminary report. **Med Rev(NY)**, New York, v.21, p.3747, 1915.
- 58 ROBERTSON, L. B.; WATSON, C.G. Further observations on results of blood transfusion in war surgery. **Ann Surg, London**, v.67, p.1-13, 1918.
- 59 ROUS, P.; TURNER, J.R. The preservation of living red blood cells in vitro. I Methods of preservation. **J Exp Med, New York**, v.21, p.219-38, 1916.
- 60 ROUS,P.;TURNER, J.R. The preservation of living red blood cells in vitro. II The preservation of Kept cells. **J Exp Med, New York**, v.21, p.239-48, 1916.
- 61 ROBERTSON, O.H. A method of citrate blood transfusion. **Br med J**, London, v.1, p.477-9, 1918.
- 62 HESS, J.R.; SCHMIDT, P.J. The first blood Banker: Oswald Hope Robertson. **Transfusion** , v.40, p.110-3, 2000.

- 
- 63 BIBB, L.M.;NIMMAGADDA, U.; MASTRIANNO, L. Principles of Blood Transfusion.In: **Blood Conservation in the surgical patient.** Salem M.R (eds).Williams & Wilkins, 1996, p.1-44.
- 64 ROCK, G; SEGHATCHIAN, M.J. **Quality Assurance In Transfusion Medicine.** CRC Press. Inc. Volume II, 1992 , p.78.
- 65 OBERMAN, H.A. Appropriate use of plasma and plasma derivatives. In: Summers SH, Agranenko GA eds. **Transfusion therapy: guidelines for practice,** Arlington, VA. American Association of Blood Banks.1990.
- 66 STRUMIA, M. The development of plasma preparations for transfusions. *Ann Intern Med.* v.80, p.80, 1941.
- 67 ELLIOT, J.; TATUM, W.L.; NESSET, N. Use of plasma as a substitute for whole blood. *N C Med J,* North Carolina, v. 1, p 283-9, 1940.
- 68 SCHMIDT, P.J. Charles Drew, a legend in our time. *Transfusion,* v.37, p.234-6, 1997.
- 69 STARR, D. **Blood an epic history of medicine and commerce;** First Quill edition published 2000, 784pp.
- 70 COHN, E.J. Characterization of protein functions of human plasma. *J Clin Invest,* New York, v.22, p.283-9, 1944.
- 71 DURAN-JORDA, F. The Barcelona blood transfusion service. *Lancet,* London, v.1, p.773-5,1939.
- 72 FANTUS, B. Therapeutics: the therapy of Cook Count Hospital. *JAMA* v.109, p.128, 1937.
- 73 FANTUS, B.; SHIRMER, E.H. Blood preservation technic. *JAMA* v.111, p.317, 1938.
- 74 DIAMOND, L.K: History of blood banking in the United States. *JAMA* v.193: p.140, 1965.
- 75 SOLOMON, J. M. A History of Transfusion Medicine. In: Ross, Allan S. **Administrative Manual.** Arlington: American Association of Blood Banks,1990, p.1-8.

- 
- 76 LOUIT, J.F.; MOLLISON, P.L. Advantages of a disodium-citrate-glucose mixture as a blood preservative. **Br Med J**, London, v.2, p.744-5, 1943.
- 77 GIBSON, J.G.H.; SACK, T.; BUCKLEY JR, E. The preservation of whole ACD blood, collected, stored and transfused in plastic equipment. **Surg Gynecol Obst**, Chicago, v.95, p.113-9, 1952.
- 78 KREUGER, A ; AKERBLUM, O; HOGMAN, C.F. A clinical evaluation of citrate-phosphate-dextrose-adenine b. **Vox Sang**, v.29, p.81-9, 1975.
- 79 MOORE, G.L.; PECK, C.C.; SOHMER, P.R.; ZUCK, T.F. Some properties of blood stored in anticoagulant CPDA-1 solution. A brief summary. **Transfusion**, v.21, p.135-7, 1981.
- 80 O'NEILL, E. M.; ROWLEY, J.; HANSSON-WICHER, M.; McCARTER, S.; RAGNO, G.; VALERI, C.R. Effect of 24-hour whole-blood storage on plasma clotting factors. **Transfusion**, v.39, p.488-91, 1999.
- 81 VENGELEN-TYLER, V. **Technical Manual**. American Association of blood banks. 13 th edition. Bethesda, Maryland, 1999, 798pp.
- 82 GUIDE TO THE PREPARATION, USE AND QUALITY ASSURANCE OF BLOOD COMPONENTS. 5th edition, Council of Europe Publishing, 2000, 188pp.
- 83 DUMONT, L.J.; DZIK, W.H.; REBULLA, P.; BRANDWEIN, H. AND THE MEMBERS OF THE BEST WORKING PARTY OF THE ISBT. Practical guidelines for process validation and process control of white cell-reduced blood components: report of the biomedical excellence for safer transfusion (BEST) working party of the international society of blood transfusion (ISBT) **Transfusion**, v.36, p.11-20, 1996.
- 84 BRASIL. Portaria n. 121 de 24 de novembro de 1995, publicada no Diário Oficial da União de 30 de novembro de 1995.
- 85 REESINK, H.W. Quality assurance of blood components prepared in the transfusion centers/ blood banks. **Vox Sang**, v.67, p.99-111, 1994.
- 86 SWEENEY, J. Quality Assurance and Standards for Red Cells and Platelets. **Vox Sang**, v. 74 (Suppl 2):201-205, 1998

- 
- 87 MURPHY, S.; HEATON, W.A. ; REBULLA, P. Platelet production in the Old World and the New, **Transfusion**, v.36, p.751-4, 1996.
- 88 MOURAD, N. A simple method for obtaining platelet concentrates free of aggregates. **Transfusion**, v.8, p.48, 1968.
- 89 HEATON, W.M.; REBULLA, P.; PAPPALETTERA, D.; DZIK, W.H. A Comparative Analysis of Different methods for Routine Blood Component preparation, **Transfus Med Rev**, v.11, p. 116-29, 1997.
- 90 SCHNED, A. R.; SILVER, H. The Use of Microaggregate Filtration in Prevention of Febrile Transfusion Reactions: **Transfusion** ;v. 21, p. 675-81, 1985.
- 91 PERKINS, H.A. ; PAYNE, R.; FERGUSON, J.; WOOD, M. Non hemolytic febrile transfusion reactions. Quantitative effects of blood components with emphasis on isoantigenic incompatibility of leucocytes. **Vox Sang**, v.11, p.578-600, 1966
- 92 HÖGMAN, C.F.; HEDLUND, K.; AKERBLUM, O.; VENGE, P. Red blood cell preservation in protein-poor media. I. Leukocyte enzymes as a cause of hemolysis. **Transfusion** ,v.18, p.233-41,1978.
- 93 LIEDEN, G.; HILDEN, J.O. Febrile Transfusion Reactions Reduced by Use of Buffy-Coat-Poor Erythrocyte Concentrates. **Vox Sang** ,v. 43, p.263-5, 1982.
- 94 HÖGMAN, C.; JOHANSSON, A. A simple method for the preparation of microaggregate-poor whole blood. **Vox Sang** v.40 p.286-8, 1981.
- 95 HÖGMAN, C.F.; BERSÉUS, O.; ERIKSSON, L.; GULLIKSSON, H.; CLP-derived Platelet Concentrates: Swedish Experience, **Transfusion Science**, v. 18, p. 3-13, 1997.
- 96 CLEGHORN, T.E. Platelet collection at Edgware. In: Lister TA, Malpas JS, eds. **Platelet transfusion**. Lancaster, PA: M.T.P. Press, p.21-8, 1980.
- 97 PIETERZ, R.N.I.; REESINK, H.W.; DEKKER, W.J. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats. II. lack of effect on storage of different plastics. **Vox Sang** v.53, p.208-13,1987.

- 
- 98 PIETERZ, R.N.I.; DE KORTE, D.; REESINK, H.W. ; REESINK, H.W.; van den ENDE, A. ; DEKKER, W.J.; ROOS, D. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats. III Effect of leukocyte contamination on storage conditions. **Vox Sang**, v.55, p.14-20, 1988.
- 99 ROCK, G.; SWENSON, S.D.; ADAMS, G.A. Platelet storage in plasma-free medium. **Transfusion** v. 25, p.551-6, 1985.
- 100 GULLIKSSON, H.; KARLMAN, G.; SEGERLIND, A. ; GULLBRING, B. Preservation of red blood cells: content of microaggregates and Di-2-Ethylhexylphthalate (DEHP) in red blood cells stored in saline-adenine-glucose-mannitol (SAGM) Medium. **Vox Sang**. v.50, p.16-20, 1986.
- 101 MISTEREK, J.; MÜLLER, K.; BUX, J.; MUELLER-ECKHARDT. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats by a new type of quadruple bag. **Blut**, v.60, p.28-30, 1990.
- 102 MROWIEC, Z.R.; OLEKSOWICZ, L.; ZUCKERMAN, D.; DE LEON-FERNANDEZ, M.; KHORSHIDI, M.; DUTCHER, J.P.; PUSZKIN, E.G. Buffy coat platelets stored in apyrase, aprotinin and ascorbic acid in a suspended bag: combined strategies for reducing platelet activation during storage. **Transfusion**; v.36, p.5-10, 1996.
- 103 ERIKSSON, L.; HOGMAN, C. Platelet concentrates in an additive solution prepared from conjunctoed buffy coats. **Vox Sang**, v.59, p.140-5, 1990.
- 104 KEEGAN, T.; HEATON, A ; HOLME, S.; OWENS, M.; NELSON, E.; CARMEN, R. Paired comparison of platelet concentrates prepared from platelet-rich plasma and buffy coats using a new technique with <sup>111</sup>In and <sup>51</sup>Cr. **Transfusion**, v. 32, p.113-20, 1992.
- 105 PIETERSZ, R.N.I.; DEKKER, W.J.A.; REESINK, H.W.: Comparison of a Conventional Quadruple-Bag System with a TAB System for Blood processing, **Vox Sang** v.59, p.205-8, 1990.
- 106 PIETERSZ, R.N.I.; KORTE, D.; REESINK, H.W.; DEKKER, W.J.A.; VAN DEN ENDE, A.; LOOS, J.A.: Storage of Whole Blood for up to 24 Hours at Ambient Temperature prior to Component Preparation: **Vox Sang** v.56, p.145-50, 1989.

- 
- 107 HEATON, W. The quality of red blood cells. **Immunol Invest** v.24, p.371-90, 1995.
- 108 BERTOLINI, F.; REBULLA, P.; PORRETI, L.; MURPHY, S. Platelet quality after 15-day storage of platelet concentrates prepared from buffy-coats and stored in a glucose-free crystalloid medium: **Transfusion** v.32, p. 9-16, 1992.
- 109 FIJNHEER, R.; PIETERSZ, R.N.I.; KORTE, D.; GOUWEROK, C.W.N.; DEKKER, W.J.A.; REESINK, H.W.; ROOS, D. Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of the platelet-rich plasma and the buffy coat methods. **Transfusion** v.30, p.634-8, 1990.
- 110 JÄREMO, P.; SHABA, A.; KUTTI, J. Some storage characteristics of buffy coats used for preparation of platelet concentrates. **Ann Hematol** v.65, p.269-73, 1992.
- 111 BOOMGAARD, M.N.; JOUSTRA-DJIKHUIS, A.M.; GOUWEROK, C.W.N.; STENEKER, I.; REESINK, H.W.; LOOS, J.A.; PIETERZ, R.N.I.; DE KORTE, D. In vitro evaluation of platelet concentrates, prepared from conjuncted buffy coats stored for 8 days after filtration. **Transfusion** v.34, p.311-6, 1994.
- 112 LEDENT, E.; WASTESON, A.; BERLIN, G. Growth factor release during preparation and storage of platelet concentrates. **Vox Sang** v.68, p.205-9, 1995.
- 113 HÖGMAN, C.F. New trends in the preparation and storage of platelets. **Transfusion** v.32; p.3-6, 1992.
- 114 KRETSCHMER, V.; BIERMANN E.; LOH, H. Separation of platelet concentrates PC from buffy-coat (CLP) using bottom and top drainage system. **Transf Sci**, v.11, p.363-6, 1990.
- 115 BOERI, N.; SALEUN, S.; PELISSIER, E.; SALEUN, J.P.; AIACH M.; RENDU, F. Influence of a 12-hour, 22° C holding period for buffy coats on the preparation of platelet concentrates stored in plasma. **Transfusion**, v.34, p.881-6, 1994.
- 116 KLÜTER, H.; SCHLENKE, P.; MÜLLER-STEINHARDT, M.; PAULSEN, M.; KIRCHNER, H. Impact of buffy-coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation. **Transfusion**, v.37 p. 362-7, 1997.

- 
- 117 HOLME, S.; MOROFF, G.; WHITLEY, P.; HALLINEN, D.; HEATON, A. Properties of platelet concentrates prepared after extensive whole blood holding time. **Transfusion** v.26, p.689-92, 1989.
- 118 BODE, A .P. Platelet activation may explain the storage lesion in platelet concentrates. **Blood cells** v.16, p.109-25;discussion 125-6, 1990.
- 119 WIDLDT-EGGEN, J.; SCHRIJVER, J. G.; BOUTER-VALK, H.J.; FIJINHER, R.; BINS, M.; van PROOIJEN, H.C. Improvement of platelet storage conditions by using new polyolefin containers. **Transfusion**, v.37, p.476-81, 1997
- 120 ENGELFRIET, C.P.; REESINK, H.W. The Official Requirements for Platelet Concentrates: **Vox Sang** v.75, p.308-17, 1998.
- 121 REBULLA, P.; SMACHIA, C.; GREPPI, N.; PORRETI, L.; LOPA, R.; CERNUSCHI, M.; SIRCHIA, G. The "cherry buffy-coat syndrome", a cause of decreased platelet yield in platelet concentrates obtained from buffy-coats. **Vox Sang**. v.80, p.57-60, 2001.
- 122 WILDT-EGGEN, J.; SCHRIJVER, J.G.; KUIPER-KRAMER, J.; BINS M. Differences in Residual White Blood Cell Subset Counts in Buffy-Coat-Depleted Red Cell Concentrates prepared with Bottom and Top or Quadruple-bag Systems; **Vox Sang** v.77, p. 97-102, 1999.
- 123 PIETERZ, R.N.I.; VAN DER MEER, P. F.; TENEKER, I.; HINLOOPEN, B.; DEKKER, W.J.A ; VAN ZABNTEM, A .P.; REESINK, H.W. Preparation of leukodepleted platelet concentrates from conjunctoed buffy coats: pre-storage filtration with autostop TMCLP. **Vox Sang** v.76, p.231-6,1999.
- 124 REVERBERI, R.; FERRARI, L.; GENNARI, M.; MENINI, C. Prevention of non-hemolytic transfusion reactions with leucocyte-poor blood : A prospective study. **Haematologica**; v.74, p.283-8, 1989.
- 125 BUBEL, S.; WILHEM, D.; ENTELMANN, M.; KIRCHNER, H.; KLUTER, H. Chemokines in stored platelets concentrates. **Transfusion** v.36 p.445-9, 1996.
- 126 KLÜTER, H.; MÜLLER-STEINHARDT, DANZER, S.; WILHEM ,D.; KIRCHNER, H. Cytokines in platelet concentrates prepared from pool of buffy coats. **Vox Sang**, v.69 p.38-43, 1995.

- 
- 127 MUYLLE, L.; PEETERMANS, M.E. Effect of prestorage leukocyte removal on the cytokine levels in stored platelet concentrates. **Vox Sang**, v.66, p.14-7, 1994.
- 128 MUYLLE, L.; WOUTERS, E.; PEETERMANS, M.E. Febrile reactions to platelet transfusion: the effect of increased interleukin 6 levels in concentrates prepared by the platelet rich plasma method. **Transfusion**, v.36, p.886-90, 1996.
- 129 FLEGEL, W.A.; WIESNETH, M.; STAMPE, D.; KOERNER, K. Low cytokine contamination in buffy coat derived platelet concentrates without filtration. **Transfusion**; v.35, p.917-20, 1995.
- 130 OKSANEN, K.; EBELING, F.; KELOMÄKI, R.; ELONEN, E.; SAHLSTEDT, L.; VOLIN, L.; MYLLYLÄ, G. Adverse Reactions to Platelet transfusions Are Reduced by Use of Platelet Concentrates Derived from Buffy Coat: **Vox Sang** v.67, p.356-61, 1994.
- 131 DZIECZOWSKI, J.S.; BARRETT, B.B.; NESTER, D.; CAMPBELL, J.; COOK, J.; SUGRUE, M.; ANDERSEN, J. W.; ANDERSON, K. C. Characterization of reactions after exclusive transfusion of white cell-reduced cellular blood components. **Transfusion**, v.35, p.20-5, 1995.
- 132 GOODNOUGH, L.T.; RIDDELL IV, J.; LAZARUS, H.; CHAFEL, T.L.; PRINCE, G.; HENDRIX, D.; YOMOTOVIAN, R. Prevalence of platelet transfusion reactions before and after implementation of leukocyte-depleted platelet concentrates by filtration. **Vox Sang**, v.65, p.103-7, 1993.
- 133 CLAAS, F.H.J.; SMEENK, R.J.T.; SMIDT, R.; VAN STEENBURGGE, G.J.; EERNISSE, J.G. Alloimmunization against the MHC antigens after platelet transfusion is due to contaminating leukocytes in the platelets suspension. **Exp Hematol**, v.9, p.84, 1981.
- 134 MENITOVE, J.E.; SNYDER, E.L. Platelet transfusion practice: time for renewed consensus. **Transfusion** v.38, p.707-9, 1998.
- 135 BRAND, A.; CLASS, F.H.J.; FALKENBURG, J.H.F.; VAN ROOD, J.J.; BERNISSE, J.G. Blood component therapy in bone marrow transplantation. **Semin Hematol**, v.21 p.141, 1984.



- 
- 136 SAARINEN, B.U.M.; KEKOMÄKI, R.; SIIMES, M.A. ; MYLLYLÄ, G. Effective Prophylaxis Against Platelet Refractoriness in Multitransfused patients by Use of Leukocyte-Free Blood Components. **Blood**, v.75, p. 512-7,1990.
- 137 OKSANEN, K.; KEKOMÄKI, R.; RUUTU, T.; KOSKIMIES, S.; MYLLYLÄ, G. Prevention of alloimmunization in patients with acute leukemia by use of white cell-reduced blood components- a randomized trial. **Transfusion**, v.31, p.588-94, 1991.
- 138 OKSANEN, K.; ELONEM, E. for the Finnish Leukemia Group: Impact of leucocyte-depleted blood components on the haematological recovery and prognosis of patients with acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol**,v.84, p.639-47, 1993.
- 139 PERKINS, H.A. Is white cell reduction cost-effective ? **Transfusion**, v.33, p.626-8, 1993.
- 140 HOGMAN, C.F.;GONG, J.; ERIKSSON, L. White cells protect donor blood against bacterial contamination. **Transfusion** v.31, p.620-6, 1991.
- 141 GOLDMAN, M.; BLAJCHMAN, MORRIS, A. Bacterial Contamination, In: Popovsky MA,ed. **Transfusion Reactions**, Bethesda,MD: AABB Press,1996.
- 142 INNERHOFER, J.P.; WALLCZEK, C.; LUZ, G.; HOBISCH-HAGEN ,P.; BENZER, A ; STOCKL, B.; HESSENBERGER, G.; NUSSBAUMER, W.; SCHOBERSBERGER, W. Transfusion of buffy coat depleted blood component and risk of postoperative infection in orthopedic patients. **Transfusion**, v.39, p.625-32, 1999.
- 143 POPOVSKY, M.A . Cost-effectiveness of white cell-reduction filters in treatment of adult acute myelogenous leukemia (letter), **Transfusion**, v.34, p.359, 1994.
- 144 BALDUCCI, L.; BENSON, K.; LYMAN, G.H.; SANDERSON, R.; FIELDS, K.; BALLESTER, O.F.; ELFENBEIN, G.L. Cost effectiveness of white cell-reduction filters in treatment of adult acute myelogenous leukemia, **Transfusion**, v.33, p.665-70, 1993.

- 
- 145 HEDDLE, N.M.; KLAMA, L.; SINGER J.; RICHARDS, C.; FEDAK, P.; WALKER, I.; KELTON, J.G. The role of plasma from platelet concentrates in transfusion reactions. **N Engl J Med**, v.331, p.625-8, 1994.
- 146 VAMVAKAS, E.C.; PINEDA ALVARO, A. Allergic and Anaphylactoid Reactions, In: Popovsky MA, ed. **Transfusion Reactions**, Bethesda, MD; AABB Press, 1996.
- 147 POPOVSKY, M. A, Transfusion-Related Acute Lung Injury (TRALI), In: Popovsky. M. A, ed, **Transfusion Reactions**, Bethesda, MD: AABB Press, 1996.
- 148 VAN AKEN, W.G. Does perioperative blood transfusion promote tumor growth? **Transfus Med Rev**, v.3, p.243-52, 1989.
- 149 FRANCIS, D.M. Relationship between blood transfusion and tumour behaviour. **Br J Surg**, v.78, p.1420-8, 1991.
- 150 VAMVAKAS, E.C. Perioperative blood transfusion and cancer recurrence:meta-analysis for explanation. **Transfusion**, v. 35 p.760-8, 1995.
- 151 HOUBIERS, J.G.; VAN DE VELDE, C.J.; VAN DE WATERING, L.M.; HERMANS, J.; SCHREUDER, S.; BIJNEN, A. B; PAHPLATZ, P.; SCHATTEKERK, M.E.; WOBES, T.; DE VRIES, J.E.; KLEMENTSCHITSCH, P.; VAN DE MAAS, A .H.; BRAND, A. Transfusion of red cells is associated with increased incidence of bacterial infection after colorectal surgery: a prospective study. **Transfusion**, v.37, p.126-34, 1997.
- 152 JENSEN, L.S.; KISSMEYER-NIELSEN, P.; WOLFF, B.; QVIST, N. Randomized comparison of leukocyte-depleted versus buffy-coat-poor blood transfusion and complications after colorectal surgery. **Lancet**, v.348, p.841-5.
- 153 BORDIN, J.O; CHIBA, A .K.; CARVALHO, K.I.L. ;TAKATA, E.T.; FALCAO, R.P.; GARCIA, A .B.; BORDIN, I.A .; MACIEL, M.M.; ANDREONI, S.; KERBAUY, J. The effect of unmodified or prestorage white cell-reduced allogeneic red cell transfusions on the immune responsiveness of orthopedic surgery patients. **Transfusion**, v.39, p.718-23, 1999.

- 
- 154 INNERHOFER, J.P.; TILZ, G.; FUCHS, D.; LUZ, G.; HOBISCH-HAGEN, P.; SCHBERSBERGER, W.; NUSSBAUMER, W.; LOCHS, A. IRSCHICK, I. Immunologic changes after transfusion of autologous or alogeneic buffy coat poor versus WCLP reduced blood transfusions in patients undergoing arthroplasty. II Activation of T cells, macrophages and cell-mediated lympholysis. **Transfusion**, v.40, p.821-7, 2000.
- 155 BLAJCHMAN, M.A. Transfusion-associated immunomodulation and universal white cell reduction: are we putting the cart before the horse? **Transfusion**, v.39, p.665-70, 1999.
- 156 BERTOLINI, F.; MURPHY, S. A Multicenter inspection of swirling phenomenon in platelet concentrates prepared in routine practice. **Transfusion**, v.36, p.128-32, 1996.
- 157 ROCK, G.L.; SEGATCHIAN, M.J. **Quality Assurance In Transfusion Medicine** .CRC Press. Inc. Volume II. Cap.3. pg 52., 1992
- 158 BERTOLINI, F.; MURPHY, S.A. Multicenter evaluation of reproducibility of swirling in platelet concentrates. **Transfusion**, v.34, p.796-801, 1994.
- 159 BERTOLINI, F.; AGAZZI, A; PECCATORI, F.; MARTINELLI, G. ; SANDRI, M.T. The absence of swirling in platelet concentrates is highly predictive of poor posttransfusion platelet count increments increased risk of a transfusion reaction. **Transfusion**, v.40, 121-2, 2000.
- 160 ROSNER, B. - **Fundamentals of Biostatistics**, PWS Publishers, Massachusetts, 2nd Edition, 1986, pags 246-251, 442-480.
- 161 ROSNER, B. - **Fundamentals of Biostatistics**, PWS Publishers, Massachusetts, 2nd Edition, 1986, pags 288-293, 467-472
- 162 ROSNER, B. - **Fundamentals of Biostatistics**, PWS Publishers, Massachusetts, 2nd Edition, 1986, pags 326-332, 339-342.
- 163 WILDT-EGGEN, J.; BINS, M.; VAN PROOIJEN, H.C. Evaluation of storage conditions of platelets concentrates prepared from pooled buffy coats. **Vox Sang**, v.70, p.11-5, 1996.

- 
- 164 HURTADO, C.; BONANAND, S.; SOLER, M.F.; MIRABET, V.; BLASCO, I.; PLANELLES, M.F.; DE MIGUEL, A. Quality analysis of blood components obtained by automated buffy-coat layer removal with a top & bottom system (Optipress® II). **Haematologica**, v.85, p.390-5, 2000.
- 165 GREENWALT, T.J.; SOSTOK, C.Z.; DUMASWALA, U.J. In red blood preservation. I. Effect of the other formed elements. **Vox Sang**, v.58, p.85-9, 1990.
- 166 KOERNER, K.; SAHMEN, P.; ZIMMERMANN, B.; CARDOSO, M.; KUBANEK, B. In vitro Platelet function during storage in three different additive solutions. **Vox Sang**, v.67, p.154-9, 1994.
- 167 KLUTER, H.; DORGES, I.; MAASS, E.; WAGNER, T.; BARTELS, H.; KIRSCHNER, H. In vivo evaluation of random donor platelet concentrates from pooled buffy coats. **Ann Hematol**, v.73, p.85-9, 1996.
- 168 ANDERSON, N.A; GRAY, S.; COPPLESTONE, J.A ; CHAN, D.C., HAMON, M. PRENTICE, A .G.; JHONSON. S.N.; PHILIPS, M.; WAEG, G.; VAN. OAKHILL, A; ABEYASEKERA, S.; PAMPHILON, D.H. A prospective randomized study of three types of platelet concentrates in patients with haematological malignancy: corrected plated count increments and frequency of non haemolytic febrile transfusion reactions. **Transf. Med**, v.6, p.33-9, 1996..<sup>a</sup>
- 169 ERIKSSON, L.; SHANWELL, A; GULLISKON, H.; HOGMAN, C.L.; SVENSSON, L. A ; KRISTENSEN, J.; BERG, B. Platelet concentrates in an additive solution prepared from pooled buffy coats. **Vox Sang**, v.64, p.133-8, 1993.
- 170 ERIKSSON, L.; KRISTENSEN, J.; OLSSON, K.; BRING, J.; HOGMAN, C.F. Evaluation of platelet function using the in vitro bleeding time and corrected count increment of transfused platelets. **Vox Sang**, v.70, p.69-75, 1996.
- 171 JOUSTRA-DIJKHUIS, A . M.; BOOMGAARD, M.N.; PIETERSZ, RN.I.; STENEKER, I.; DE KORTE, D.; LOOS, J.A; REESINK, H. W. Effect of filtration on subsequently stored platelet concentrates. **Vox Sang**, v.67, p.22-7, 1994.

- 
- 172 ULHMAN, E.J.; ISGRIGGS, E.; WALHERMFECTHEL, M.; GOODNOUGH, L.T. Prestorage universal WBC reduction of RBC unit does not affect the incidence of transfusion reactions. **Transfusion**, v.41, p.997-1000,2001.
- 173 RICCARDI, D.; RASPOLINI, E.; REBULLA, P.; PAPPALETTERA, M.; MARANGONI, F.; GREPPI, N.; SIRCHIA, G. Relationship of the time of storage and transfusion reactions to platelet concentrates from buffy coats. **Transfusion**, v.37, p.528-30, 1997.
- 174 PATTERSON, B.J.; FREEDMAN, J.; BLANCHETTE, V.; SHER, G.; PINKERTON, P.; HANNACH, B.; MEHARCHAND, J.; LAU, W.; BOYCE, N.; PINCHEFSKY, E.; TASEV, T.; PICHEFSKY, J.; POON, S.; SHULMAN, L.; MACK, P.; THOMAS, K.; BLANCHETTE, N.; GREESNPAN, D.; PANZARELLA, T. Effect of premedication guidelines and leukoreduction on the rate of febrile nohaemolytic platelet transfusion reactions. **Transfus Med**, v.10, p.199-206, 2000.
- 175 BJLACHMAN M.A ; BORDIN, J.O . Mechanisms of transfusion-associated immunosuppression. **Curr Opin Hematol**, v.1. p. 457-61, 1994.
- 176 BORDIN, J.A ; BARDOSSY, L.; BLAJCHMAN M. A . Growth enhancement of established tumors by alogeneic blood transfusion in experimental animals and its amelioration by leukodepletion: the importance of the timing of the leukodepletion. **Blood**, v.84, p.334-8, 1994.
- 177 MUYLLE, L.; JOOS, M.; WOUTERS, E.; DE BOCK, R DE.; PEETERMANS, M.E. Increased tumor necrosis factor alfa (TNF alfa), interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNFalfa and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. **Transfusion**, v.33, p.195-9, 1993.
- 178 KILKSON, H.J.; HOLME, S.; MURPHY, S. Platelet metabolism during storage of platelet concentrates. **Blood**, v.64, p.406-14, 1984.
- 179 FIJNHEER, R.; PIETERSZ, R.N.I.; DE KORTE, D.; ROOS, D. Monitoring of platelet morphology during storage of platelet concentrates. **Transfusion**, v.29, p.36- 40, 1989.

- 
- 180 FIJHNHEER, R.; VELDMAN, H.A ; VAN DEN EERWEGHT, A .J.M.;  
GOUWEROK, C.W.N.; HOMBURG, C.H.E.; BOOMGAARD, M.N.;  
DE KORTE, D.; ROOS, D. In vitro Evaluation of buffy-coat derived  
platelet concentrates stored in a synthetic medium. **Vox Sang**,  
v.60, p.16-22, 1991.
- 181 GOTTSCHALL, J.L.; JHONSON, V.L.; RZAD, L.; ANDERSON, A .L.;  
ASTER, R.H. Importance of white blood cells in platelet storage.  
**Vox Sang**, v.47, p.101-7, 1984.
- 182 YOMOTOVIAN, R.; GERNSHEIMER, T.; ASSMAN, S.F.;  
MOHANDAS, K.; LEE, T-H.; KALISH, L.A .; BUSCH, M.P. WBC  
reduction in RBC concentrates by prestorage filtration: multicenter  
experience. **Transfusion** v.41, p.1030-36,2001.
- 183 MASSE, M. Universal leukoreduction of cellular and plasma  
components: process control and performance of the  
leukoreduction process. **Transfus Clin Biol**, v.8, p.297-302, 2001.
- 184 VAN DER MEER, P.; PIETERZ, R.; REESINK,H. Leukoreduced  
platelet concentrates in additive solution: na evaluation of filters  
and storage containers. **Vox Sang**, v.81, p.102-7, 2001.
- 185 KARILADSIRI, P.; SEGATCHIAN, J.; WILLIAMSON, M.; Platelet  
storage lesion of WBO-reduced, pooled, buffy coat-derived platelet  
concentrates prepared in three in-process filter/storage bag  
combinations. **Transfusion**, v.41, p.243-50, 2001.