

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DE REFRATARIEDADE PLAQUETÁRIA E SUPORTE
TRANSFUSIONAL EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS ALOGÊNICO**

JULIANA PIRES MARAFON FRANZ

Porto Alegre, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DE REFRAATARIEDADE PLAQUETÁRIA E SUPORTE
TRANSFUSIONAL EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS ALOGÊNICO**

JULIANA PIRES MARAFON FRANZ

Orientador: Prof. Dr Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber

Co-Orientador: Prof. Dr Leo Sekine

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre, 2021

CIP - Catalogação na Publicação

Franz, Juliana Pires Marafon
ESTUDO DE REFRATARIEDADE PLAQUETÁRIA E SUPORTE
TRANSFUSIONAL EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE
DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS ALOGÊNICO / Juliana
Pires Marafon Franz. -- 2021.

96 f.

Orientador: Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber.

Coorientador: Leo Sekine.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2021.

1. Refratariedade plaquetária. 2. Trombocitopenia.
3. Aloimunização. 4. Intensidade de fluorescência. 5.
Transplante de células-tronco hematopoéticas. I.
Faulhaber, Gustavo Adolpho Moreira, orient. II.
Sekine, Leo, coorient. III. Título.

JULIANA PIRES MARAFON FRANZ

**ESTUDO DE REFRATARIEDADE PLAQUETÁRIA E SUPORTE
TRANSFUSIONAL EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS ALOGÊNICO**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber (Orientador)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Leo Sekine (Co-orientador)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Cláudia Caceres Astigarraga
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Dayenne Helena Catelli
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Dra. Anelise Bergmann Araújo
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Porto Alegre, 17/12/2021

Para Alice Marafon Franz, por ser a minha maior conquista,
a minha maior superação e prova de amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber, pela orientação, apoio e incentivo na realização desta pesquisa e, principalmente, por acreditar no meu potencial profissional, acadêmico e científico.

Ao Professor Dr. Leo Sekine, pela disponibilidade, auxílio na realização da análise estatística, interpretação dos resultados e revisão criteriosa dos artigos.

Ao Professor Dr. Luiz Fernando Jobim, Jacqueline Cardone, Ana Arend, Beatriz Gil, Iara Fagundes e Joice Merzoni pela indispensável colaboração e apoio na execução dos testes laboratoriais.

A Denise Marafon, por todas as contribuições que enriqueceram este trabalho.

A Daniela Speransa, Laís Garcia, Samantha Brum, Ebellins Calvache pelo auxílio na coleta de dados e descrição dos resultados.

A toda equipe do Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio e participação na execução deste projeto desafiador e, ao mesmo tempo, imensamente gratificante.

A toda equipe da Unidade de Terapia Transfusional pela dedicação, comprometimento e empenho excepcional em proporcionar aos pacientes o melhor suporte transfusional possível que estiver ao nosso alcance.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela excelência nas atividades de ensino e pesquisa, e a Coordenação do programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, pela oportunidade concedida.

A minha família, pelo amor incondicional, apoio e incentivo na minha formação pessoal, profissional e acadêmica.

Aos pacientes, pela confiança e aprendizado constante, que servem de inspiração diária para o meu trabalho e realização do meu propósito de vida.

“Não é o crítico que importa; nem aquele que aponta onde foi que o homem tropeçou ou como o autor das façanhas poderia ter feito melhor. O crédito pertence ao homem que está por inteiro na arena da vida, cujo rosto está manchado de poeira, suor e sangue; que luta bravamente; que erra, que decepciona, porque não há esforço sem erros ou decepções; mas que, na verdade, se empenha em seus feitos; que conhece o entusiasmo, as grandes paixões; que se entrega a uma causa digna; que, na melhor das hipóteses, conhece no final o triunfo da grande conquista e que, na pior, se fracassar, ao menos fracassa ousando grandemente.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

Base teórica e Objetivos: A presença de anticorpos contra antígenos HLA Classe I pode levar à refratariedade plaquetária (RP), tornando o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico (TCTH) ainda mais desafiador. O objetivo deste estudo foi identificar os pacientes com maior risco de RP imunomediada (RPI) no pré-transplante e avaliar o impacto das transfusões de plaquetas com prova cruzada nos resultados clínicos e laboratoriais do TCTH alogênico.

Materiais e Métodos: Foi realizado um estudo coorte prospectivo dos pacientes submetidos ao TCTH alogênico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período entre 2018 e 2021. A reatividade contra painel de anticorpos (PRA) e a intensidade média de fluorescência (MFI) foram usados para avaliar a sensibilização HLA e a significância da potência dos anticorpos, respectivamente. Também realizamos o cálculo corrigido do incremento plaquetário de 24 horas (CCI-24h) para avaliar a eficácia das transfusões de plaquetas.

Resultados: Um total de 83 pacientes (50 homens, 33 mulheres) foram incluídos neste estudo. Antes do transplante, 29 (34,9%) pacientes apresentavam aloanticorpos contra antígenos plaquetários e 15 (18,0%) pacientes foram identificados como RPI. Destes, oito pacientes receberam 132 transfusões com prova cruzada de plaquetas. A mediana do CCI-24h e as taxas de transfusão bem-sucedida (considerando CCI ≥ 4500) foram 3176 e 44,7%, respectivamente. O desempenho diagnóstico do MFI máximo, para identificação de pacientes com RP no período pré e 30 dias pós-transplante, mostrou uma AUC de 0,875 (IC de 95%: 0,710 - 1,00; $p=0,023$) e AUC=0,733 (IC 95%: 0,539 - 0,927; $p=0,043$), respectivamente. Além disso, encontramos uma associação entre o MFI máximo basal (mediana 7383) e a persistência de anticorpos anti-HLA 30 dias pós-TCTH, $p=0,018$.

Conclusão: A identificação precoce de pacientes aloimunizados com alto risco de RPI antes do TCTH alogênico, por meio da análise do PRA e MFI, pode levar a um melhor manejo do paciente refratário à transfusão de plaquetas no período pós-transplante.

Palavras-chave: refratariedade plaquetária, trombocitopenia, aloimunização, intensidade de fluorescência, transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico.

ABSTRACT

Background and Objectives: The presence of antibodies against HLA Class I can lead to platelet refractoriness (PR), making the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) even more challenging. The aim of this study was to identify patients with a higher risk for immune-mediated PR pre-transplant and assess the impact of cross-matched platelets (PLTs) transfusions on clinical and laboratory outcomes in the allo-HSCT.

Materials and Methods: We performed a prospective cohort study among consecutive patients who underwent allogeneic HSCT at Hospital de Clínicas de Porto Alegre between 2018 and 2021. Panel reactive antibody (PRA) and mean fluorescence intensity (MFI) were used for assessing HLA sensitization and the significance of antibody strengths, respectively. We also calculated the 24-hour corrected count increments (24h-CCI) to evaluate the effectiveness of PLTs transfusions.

Results: A total of 83 patients (50 males, 33 females) were enrolled in this study. Before transplant, 29 (34.9%) patients had platelet-reactive alloantibodies and, 15 (18.0%) patients were identified as IPR. Of them, eight patients received 132 PLTs cross-matched transfusions. The median 24h-CCI and the rates of successful transfusion (considering CCI \geq 4500) was 3176 and 44.7%, respectively. Diagnostic performance of the maximum MFI, for identification of patients PR in the pre- and post-transplant (at day 30) period, showed an AUC of 0.875 (IC 95%: 0.710 - 1.00; $p=0.023$) and AUC=0.733 (IC 95%: 0.539 - 0.927; $p=0.043$), respectively. In addition, we found an association between baseline maximum MFI (median 7383) and persistence of anti-HLA antibodies 30 days post-HSCT, $p=0.018$.

Conclusion: An early identification of alloimmunized patients at high risk of PR before allo-HSCT, through PRA and MFI analysis, can lead to improved management to patient refractory to platelet transfusion post-transplantation.

Keywords: Platelet refractoriness, alloimmunization, thrombocytopenia, fluorescence intensity, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégias para localizar e selecionar as informações	15
Figura 2. Estrutura das glicoproteínas plaquetárias	17
Figura 3. Gráfico mostrando o número de alelos nomeados por ano de 1987 até o final de dezembro de 2020	23
Figura 4. Protocolos de condicionamento	32

LISTA DE FIGURA DO ARTIGO 1

Figure 1. Study protocol for patients undergoing allogeneic HSCT.....	67
Figure 2. ROC Curve evaluating diagnostic performance of baseline MFI and platelet refractoriness	68
Figure 3. Distribution of maximum MFI levels and persistence of anti-HLA antibodies	69

LISTA DE FIGURA DO ARTIGO 2

Figure 1. Dose of CD34+ and platelet and neutrophil engraftment days	86
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Causas de refratariedade plaquetária.....	19
Tabela 2. Indicações para transplante de células-tronco hematopoiéticas	31

LISTA DE TABELA DO ARTIGO 1

Table 1. Baseline patient	63
Table 2. Transplant characteristics	64
Table 3. Different anti-HLA Class I antibodies frequency in 29 patients before HSCT.....	65
Table 4. Clinical and laboratorial features of patients with immune and non-immune platelet refractoriness who received platelet cross-matching transfusion.....	66

LISTA DE TABELA DO ARTIGO 2

Table 1. Data of patients and transplant characteristic.....	83
Table 2. Support transfusion of red blood cell and platelet according to pre- and post-transplant period and transfusion independence days.....	87
Table 3. Platelet and red blood cell transfusion independence associated with the clinical factors of the patient and the characteristics of the transplant	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGH: antiglobulina humana

Allo-HSCT: *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*

ATG: globulina antitímocitos

AUC: *area under the curve*

BM: *bone marrow*

CCI: cálculo corrigido do incremento plaquetário

CDC: citotoxicidade dependente de complemento

CIA: contagem do incremento absoluto

CIVD: coagulação intravascular disseminada

CREG: grupos de antígenos com reatividade cruzada (do inglês, *cross reactive groups*)

DSA: anticorpos específicos contra o doador (do inglês, *donor specific antibody*)

DECH: doença do enxerto contra hospedeiro

DIC: *disseminated intravascular coagulation*

DNA: ácido desoxirribonucleico

DSA: *donor-specific antibody*

FC-PIFT: teste de imunofluorescência de plaquetas realizado por citometria de fluxo (do inglês, *flow cytometry platelet immunofluorescence test*)

FCPCM (or FCXM): *flow cytometry platelet cross-matching*

FITC: fluorocromos fluoresceína

GPs: glicoproteínas

GVHD: *graft-versus-host disease*

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HLA: antígenos do sistema leucocitário humano (do inglês, *human leucocyte antigens*)

HPA: antígenos do sistema plaquetário humano (do inglês, *human platelet antigens*)

IgG: imunoglobulina de classe G

IgM: imunoglobulina de classe M

MAIPA: teste de plaquetas através de imobilização de anticorpos monoclonais (do inglês, *monoclonal antibody immobilization of platelets assay*)

MAT: microangiopatia trombótica

MAC: *myeloablative conditioning*

MFI: intensidade média de fluorescência (do inglês, *mean fluorescence intensity*)

NMA: *non-myeloablative*

NT: *not tested*

NA: *not applied*

PBSC: *peripheral blood stem cells*

PLTs: plaquetas

PC: prova cruzada

PCR: reação em cadeia da polimerase

PCR-SSP: amplificação por reação de cadeia da polimerase utilizando primers de sequência alelo específica (do inglês, *polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide probes*)

PCR-RFLP: amplificação por reação da cadeia da polimerase com análise de fragmentos por enzimas de restrição (do inglês, *polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism*)

PIFT: *platelet immunofluorescence test*

PPR: porcentagem de recuperação das plaquetas (do inglês, *percentage of platelet recovery*)

PR: *platelet refractoriness*

PRA: *panel reactive antibody*

RBC: *red blood cell concentrate*

RIC: *reduced intensity conditioning*

RP: refratariedade plaquetária

RPI: refratariedade plaquetária imune

RPNI: refratariedade plaquetária não imune

RPI+NI: refratariedade plaquetária imune e não imune

SNPs: polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês, *single nucleotide polymorphisms*)

SPRCA: aderência de hemácias em fase sólida (do inglês, *solid-phase red-cell adherence*)

TCTH: transplante de células tronco hematopoéticas

UCB: *umbilical cord blood*

VOD: doença veno-oclusiva (do inglês, *veno-occlusive disease*)

WHO: *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Estratégias de Busca	15
2.2 Antígenos plaquetários	16
2.3 Refratariedade plaquetária.....	18
2.4 Características das plaquetas e eficácia transfusional	19
2.5 Identificação de anticorpos anti-HLA e anti-HPA.....	21
2.6 Sistema HLA	23
2.7 Aloimunização HLA.....	25
2.8 Suporte transfusional na refratariedade plaquetária	27
2.9 Transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico	30
3 MARCO CONCEITUAL	35
4 JUSTIFICATIVA	36
5 OBJETIVOS	37
5.1 Geral	37
5.2 Específicos.....	37
6 REFERÊNCIAS	38
7 ARTIGOS	46
7.1 ARTIGO 1	46
7.2 ARTIGO 2	70
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
9 PERSPECTIVAS FUTURAS	90
10 ANEXOS	91
10.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Adultos	91
10.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Responsáveis	93
10.3 Submitted Manuscript – Artigo 1	95

1 INTRODUÇÃO

A refratariedade plaquetária (RP) é definida como o incremento plaquetário inadequado após a transfusão de plaquetas, em pelo menos duas ocasiões, com plaquetas ABO compatíveis, idealmente coletadas a menos de 48h (1). A RP pode afetar 7 a 34% dos pacientes com doenças hematológicas e está relacionada ao aumento da permanência hospitalar, aumento dos custos da internação, diminuição da sobrevida do paciente e aumento de sangramentos, incluindo os fatais (2).

A aloimunização HLA é causa imune mais comum de RP e pode estar associada a gestação, transfusão ou transplante prévio. Estudos demonstraram que 14 a 26% dos pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico apresentam anticorpos anti-HLA (3,4). Estes anticorpos podem causar a RP, dificultar o suporte transfusional e comprometer o prognóstico do transplante. Para que o manejo do paciente refratário seja mais efetivo e seguro, é fundamental o conhecimento da etiologia da RP, especialmente na presença de causas imunes, visando a otimização dos recursos envolvidos na escolha do produto plaquetário compatível e na redução dos riscos de sangramentos fatais.

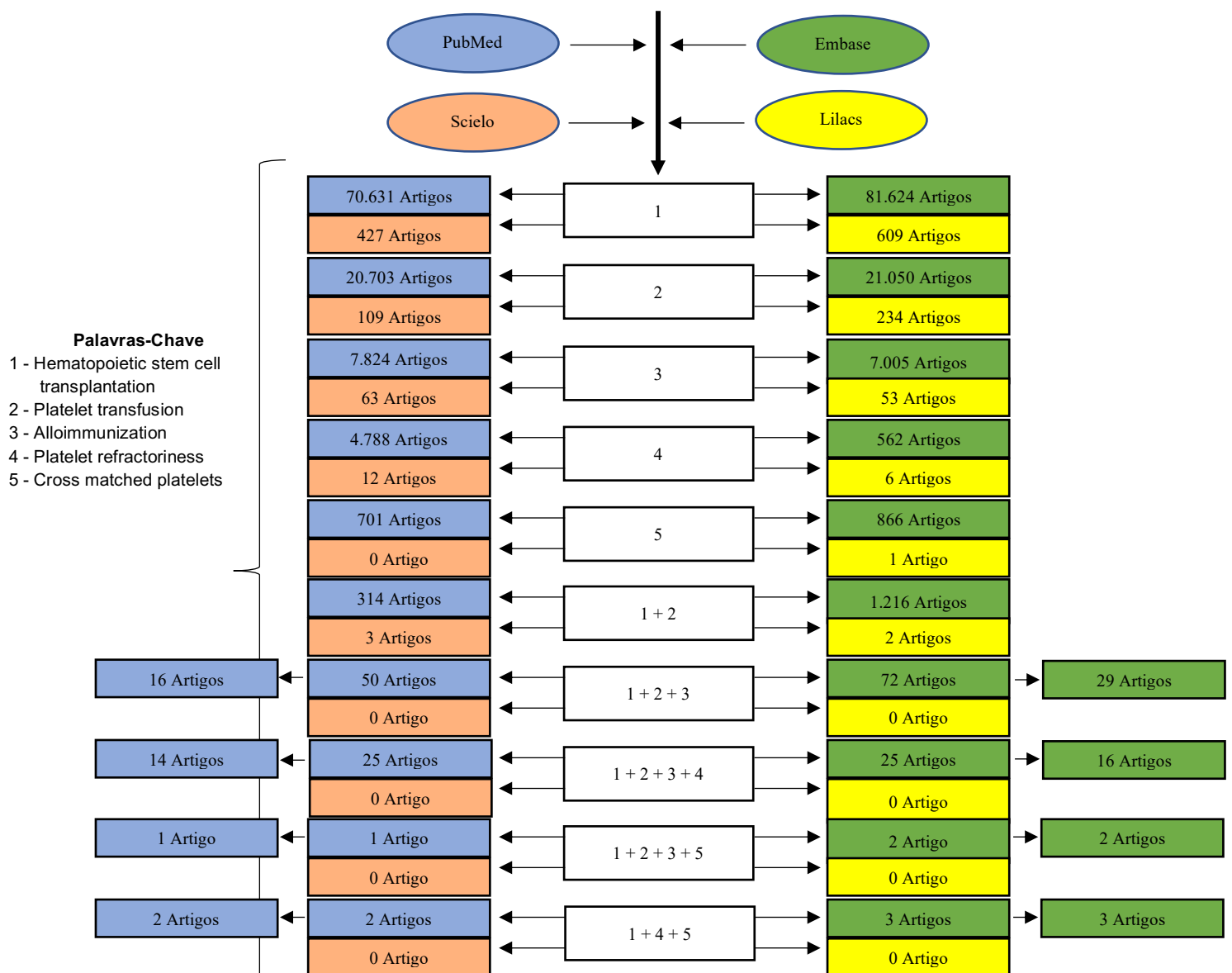
A transfusão de plaquetas com prova cruzada proporciona um maior incremento plaquetário em pacientes com RP imunomediada, mas o benefício nos receptores de TCTH alogênico, com diversos e complexos fatores não imunes associados, ainda não está bem esclarecida. O presente trabalho avaliou a taxa de aloimunização HLA e RP em paciente submetidos ao TCTH alogênico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), através de uma coorte prospectiva, no período de janeiro de 2018 a julho de 2021. Os pacientes aloimunizados com RP ou alto risco para RP identificados no pré-transplante foram selecionados para receber transfusão com plaquetas compatíveis. Foi avaliado o impacto e a efetividade dessas transfusões nos desfechos clínicos e laboratoriais durante e após o TCTH.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias de Busca

A estratégia de busca envolveu as bases de dados PubMed, EMBASE, SciELO e Lilacs, da origem até novembro de 2021. Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados ao transplante de células tronco-hematopoiéticas, aloimunização, anticorpos antiplaquetários e refratariedade plaquetária. Foram realizadas buscas através das palavras chaves: “*Hematopoietic stem cell transplantation*”, “*Platelet transfusion*”, “*Alloimmunization*”, “*Platelet refractoriness*” e “*Cross matched platelets*” e suas combinações, apresentadas na Figura 1.

Figura 1. Estratégias para localizar e selecionar as informações



2.2 Antígenos plaquetários

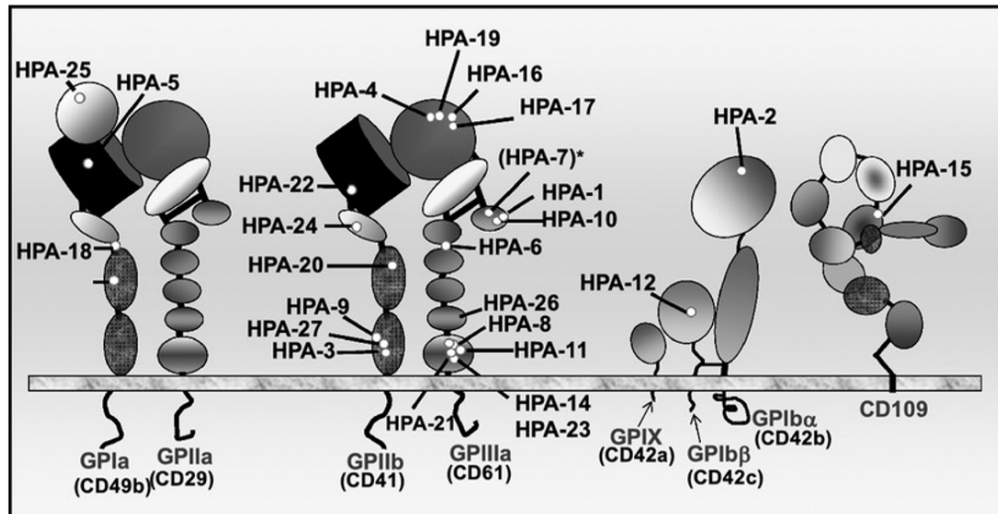
As plaquetas expressam uma variedade de marcadores antigênicos na sua superfície. Alguns destes antígenos são compartilhados com outras células, como o ABO e HLA (antígeno leucocitário humano), enquanto outros são essencialmente específicos das plaquetas, como o HPA (antígeno plaquetário humano). Estes antígenos são frequentemente referidos como “específico de plaquetas”, mas alguns deles são encontrados em outras células (especialmente leucócitos e células endoteliais), embora a importância clínica principal parece estar relacionada a sua presença nas plaquetas (5).

A maior parte dos antígenos ABO presente nas plaquetas é transportada em sacarídeos ligados às glicoproteínas (GPs) da membrana plaquetária. Os títulos de anticorpos A e B pode variar entre os indivíduos, com 5 a 10% dos indivíduos O expressando títulos extremamente altos de A₁ ou B nas suas plaquetas. Em alguns casos, altos títulos de anticorpos A,B imunoglobulina G (IgG) no sangue de receptores do grupo O são reativos com a transfusão de plaquetas com grande quantidade de antígenos A ou B, resultando em refratariedade plaquetária (RP) (6). A incompatibilidade ABO pode resultar em 20% de redução no incremento plaquetário pós-transfusão (7).

As GPs presentes na membrana plaquetária são expressas de diferentes formas devido ao polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) nos genes que as codificam. As alterações de aminoácidos resultantes destes SNPs induzem alterações na estrutura glicoproteica formando antígenos que podem produzir anticorpos através da exposição à gravidez ou transfusão de plaquetas. Atualmente, 35 HPAs são expressos em 6 diferentes GPs de membrana plaquetária: GPIIb, GPIIIa, GPIb α , GPIb β , GPIa e CD109. Doze antígenos são agrupados em 6 grupos bialélicos (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5 e HPA-15) (5).

A nomenclatura HPA atual pode ser acessada através do site: <https://www.versiti.org/medical-professionals/precision-medicine-expertise/platelet-antigen-database/hpa-gene-database> (8).

Figura 2. Estruturas das glicoproteínas plaquetárias



Fonte: Curtis & McFarland. Vox Sanguinis (2014, p.98) (9).

O HLA associado as plaquetas é a principal fonte de HLA Classe I no sangue total. A maioria do HLA Classe I nas plaquetas é expresso como proteínas de membrana, enquanto quantidades menores podem ser absorvidas pelo plasma circulante. Os antígenos locus A e B são representadas significativamente, mas parece haver uma expressão plaquetária mínima de HLA-C (6).

Estima-se que 20 a 60% dos pacientes hematológicos que transfundem cronicamente sejam aloimunizados contra antígenos HLA (2), e 8 a 22% apresentam anticorpos anti-HPA, frequentemente em combinação com anticorpos HLA, mas também podendo ocorrer isoladamente (7). Estudos também avaliaram a aloimunização em pacientes adultos e pediátricos submetidos ao TCTH alogênico e relataram uma taxa de 26,2% e 13,8%, respectivamente (4,10).

A aloimunização é uma das principais complicações associadas a transfusão de plaquetas, no entanto, a maioria dos pacientes que tem anticorpos anti-HLA não desenvolve a RP. No estudo TRAP, 45% dos pacientes que receberam plaquetas sem desleucocitação adquiriram anticorpos anti-HLA, mas somente 13% desenvolveram RP. Os resultados deste estudo demonstraram que a RP pode afetar mais de 15% dos pacientes que transfundem cronicamente e esta proporção pode diminuir para 5% ou menos nos pacientes que recebem hemocomponentes leucorreduzidos (1).

2.3 Refratariedade plaquetária

A RP é definida como o incremento plaquetário inadequado após a transfusão de plaquetas, em pelo menos duas ocasiões, preferencialmente consecutivas, com plaquetas frescas (≤ 48 horas) e ABO compatíveis (1).

A eficácia da transfusão é mais frequentemente avaliada usando o incremento pós-transfusão, a porcentagem de recuperação plaquetária e/ou o cálculo corrigido do incremento plaquetário (CCI). Um aumento na contagem de plaquetas de 30%, até 1 hora após a transfusão, ou maior que 20% em 20 a 24 horas, é considerado uma transfusão bem-sucedida (11).

O estudo TRAP definiu RP como CCI-1h (contagem pós-transfusional de 1 hora - colhida entre 15 minutos e 1 hora após o término da transfusão) menor que 5000 plaquetas por mL ou CCI-24h (contagem pós-transfusional de 24 horas - colhida entre 18 e 24 horas após o término da transfusão) menor que 2500 plaquetas por mL (12). O CCI é determinado usando a seguinte fórmula: $CCI = [\text{contagem de plaquetas pós-transfusão } (10^9/L) - \text{contagem de plaquetas pré-transfusão } (10^9/L)] \times [(\text{área de superfície corporal } (m^2) / \text{dose de plaquetas transfundidas } (10^{11}))]$ (1).

O CCI em 1 hora reflete a recuperação circulatória imediata das plaquetas transfundidas, enquanto o CCI em 18-24 horas é afetado pela recuperação inicial e sobrevivência subsequente (taxa de consumo) das plaquetas transfundidas (13).

O incremento da plaqueta pós-transfusão (PI) é o cálculo mais simples (contagem de plaquetas pós-transfusão - contagem de plaquetas pré-transfusão) e utilizado na rotina, devido à falta de dados disponíveis para o número real de plaquetas infundidas ou da área da superfície corporal do paciente. Um PI superior a $10^9/L$ em 1h ou 24h é considerado uma transfusão bem-sucedida, e se não alcançado, é um bom indicador para suspeitar de refratariedade (7,14).

As causas de RP são divididas em duas categorias: não imunes e imunes. Os fatores não imunes são as principais causas (60% - 80%) e incluem febre, infecção, hiperesplenismo, coagulação intravascular disseminada (CIVD), sangramento e medicamentos (15,16). Os fatores imunes mediados são os anticorpos ABO, anti-HLA

Classe I (principalmente HLA-A e HLA-B) e anti-HPA, e ocorrem em 10% a 25% de todos os casos de RP (15).

Tabela 1. Causas de refratariedade plaquetária

Não imune

Infecção/ sepse
 Antibióticos
 Coagulação intravascular disseminada
 Febre
 Esplenomegalia
 Doença venoclusiva hepática (VOD)
 Doença do enxerto contra hospedeiro (DECH)
 Medicações (vancomicina, anfotericina B, heparina)

Imune

Anticorpos HLA
 Auto e aloanticorpos plaquetários
 Anticorpos ABO
 Anticorpos plaquetários dependente de drogas
 Complexos imunes

Fonte: Am J Clin Pathol 2019;151:353-363 (11)

A RP está associada a uma série de desfechos adversos, incluindo permanência hospitalar prolongada, aumento do risco de sangramento, diminuição da sobrevida, bem como maiores custos hospitalares de internação (7,17–19). Apesar da relevância clínica, a RP é frequentemente subdiagnosticada mesmo em pacientes hematológicos devido à complexidade do processo e da necessidade de colaboração entre profissionais de diferentes áreas (20).

2.4 Características das plaquetas e eficácia transfusional

As características das plaquetas, como dose, fonte (aférese *versus* pool), compatibilidade ABO e tempo de armazenamento, podem afetar o incremento plaquetário pós-transfusão, mas não está esclarecido se esses fatores afetam a eficácia da transfusão plaquetária no sangramento crítico (21).

As plaquetas de aférese são coletadas de um único doador usando equipamentos automatizados. Esses produtos contêm $\geq 3,0 \times 10^{11}$ plaquetas (média $3,5-4,0 \times 10^{11}$) por unidade em aproximadamente 100-500 mL de plasma. O anticoagulante usado é ácido citrato dextrose (ACD). As plaquetas derivadas do sangue total contêm $\geq 5,5 \times 10^{10}$ plaquetas por bolsa (unidade) em 40-70 mL de plasma. O anticoagulante é o mesmo usado para a coleta de sangue total, geralmente citrato fosfato dextrose (CPD) ou citrato fosfato 2 dextrose (CP2D). Esses produtos são frequentemente referidos como plaquetas aleatórias ou randômicas. Quatro a seis unidades são frequentemente agrupadas no pool para fazer uma dose de adulto, que pode ser estimada multiplicando o número de unidades randômicas pelo número mínimo necessário de plaquetas ($\geq 5,5 \times 10^{10}$), em cada unidade de plaqueta derivada de sangue total (22).

O estudo prospectivo PLADO demonstrou que os incrementos de plaquetas e CCI são geralmente maiores em plaquetas de aférese, ABO-idênticas e armazenadas por 3 dias. Os dados indicam que uma contagem de plaquetas de 5000/ μL ou mais é suficiente para manter a integridade endotelial. Neste estudo, foram avaliados 1272 pacientes oncohematológicos que receberam 6031 transfusões de plaquetas profiláticas, e a conclusão foi que, as transfusões de plaquetas com incompatibilidade ABO estavam associadas a incrementos mais baixos comparado as transfusões ABO idênticas, mas não mostraram uma diferença estatisticamente significativa entre as transfusões de plaquetas com incompatibilidade ABO menor e ABO idênticas (21).

Outra consideração importante em relação às transfusões com plaquetas ABO incompatíveis (ABO menor ou maior) é a formação de complexos imunes que podem aumentar a alorreatividade no receptor. Estudos demonstraram que a transfusão de plaquetas e plasma ABO incompatíveis está associada com aumento de sangramento, sepse, lesão pulmonar, doença venoclusiva e mortalidade. Uma possível explicação para este fenômeno é que os imunocomplexos *in vivo* se ligam às plaquetas (tanto as transfundidas quanto as do receptor) por meio de seus receptores Fc (fragmento cristalizável) e C1q e, posteriormente, as plaquetas revestidas por estas imunoglobulinas são fagocitadas pelos monócitos. Também foi demonstrado que

esses complexos imunes interferem na formação de plaquetas e coágulos *in vitro* e estimulam a liberação de citocinas inflamatórias (23).

O tempo de armazenamento das plaquetas é outro fator que tem sido associado à eficácia da transfusão de plaquetas. O estudo TRAP analisou os incrementos plaquetários e mostrou que as plaquetas armazenadas por menos de 48 horas estavam associadas a incrementos significativamente maiores (1900/ μ L a mais) e intervalos mais longos entre as transfusões. O CCI diminui progressivamente com o tempo de armazenamento superior a 3 dias (21).

As razões pelas quais as respostas às plaquetas não podem ser facilmente previstas incluem os fatores específicos da doença, febre ou infecções que levam ao consumo de plaquetas, além do envolvimento do sistema imunológico, em particular, nos pacientes previamente aloimunizados contra antígenos HLA (24).

Pelo menos 3 mecanismos diferentes de patogenicidade do anticorpo podem ser considerados na destruição das plaquetas na presença de anticorpos HLA: opsonização das plaquetas para atração de fagócitos, fixação do complemento nas superfícies das plaquetas e ligação cruzada entre as plaquetas revestidas pelo anticorpo e as células *natural killer* (NK), levando à citotoxicidade celular dependente de anticorpos. A ativação das plaquetas associada ao armazenamento e à transfusão também pode levar à ativação de componentes adicionais do complemento e à formação de um complexo de ataque a membrana, resultando em morte plaquetária e baixo incremento plaquetário após a transfusão (24).

2.5 Identificação de anticorpos anti-HLA e anti-HPA

A detecção e identificação dos anticorpos HLA tem se tornado simples com a evolução dos ensaios de imunofluorescência de linfócito e citotoxicidade dependente de complemento (CDC), através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e técnicas de citometria de fluxo. As técnicas mais sensíveis, por citometria de fluxo ou plataforma Luminex, usam microesferas revestidas com HLA para identificar especificamente as IgGs ligadas às microesferas (13). A especificidade do anticorpo anti-HLA e o valor da intensidade média de fluorescência (MFI) são definidos pela combinação de dois

sinais de laser (vermelho e verde). A aquisição dos dados é realizada no citômetro de fluxo Luminex e o MFI da reação deve ser ≥ 1000 . Além da especificidade e intensidade de fluorescência do anticorpo detectado, é possível obter resultados da reatividade contra o painel HLA Classe I (25).

Para a detecção de anticorpos anti-HPA existem várias técnicas que podem ser divididas em ensaios não específicos (onde são utilizadas plaquetas intactas, como por exemplo, teste de imunofluorescência plaquetária, ensaio de adesão de fase sólida) e ensaios específicos (onde são usadas a captura de glicoproteína, ou glicoproteínas purificadas ou antígenos recombinantes, como por exemplo, imobilização específica de anticorpos monoclonais de ensaio de antígeno plaqueta). No método de aderência de hemácias em fase sólida (SPRCA, *solid-phase red-cell adherence*), as plaquetas de diferentes unidades de aférese são depositadas no fundo de uma placa de microtitulação. O soro do paciente é adicionado a cada poço, incubado e lavado antes da adição das hemácias revestidas com AGH (11).

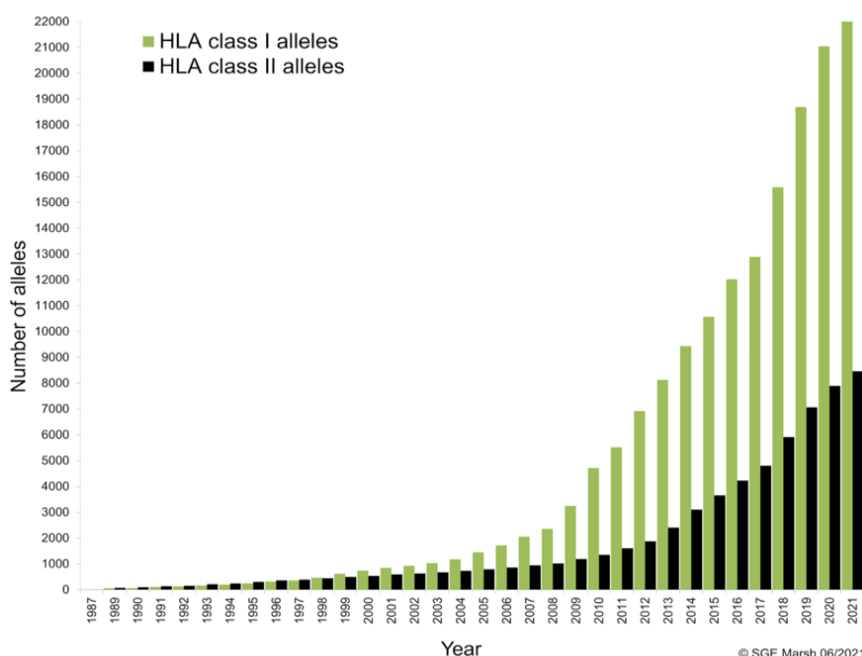
O MAIPA (*monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens*), é um método sensível, baseado na detecção de complexos trimoleculares formados pelo anticorpo monoclonal específico para glicoproteína da plaqueta ou molécula HLA, o anticorpo derivado do paciente e a molécula membrana plaquetária carregando o epítomos respectivos de ambos os anticorpos (14).

A pesquisa de anticorpos anti-HPA também pode ser realizada com o uso do kit Pak-Lx (Immucor inc.). Este teste é um imunoensaio que detecta anticorpos IgG contra HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, GPIV e HLA Classe I. Essa técnica consiste em microesferas revestidas com glicoproteínas HPA, GPIV e HLA que são incubadas com o soro do paciente. Os anticorpos que estão presentes no soro se ligam aos antígenos das microesferas. Em seguida, é acrescentado um anticorpo IgG conjugado com ficoeritrina (PE) e, após nova incubação, a mistura é diluída e os dados são inseridos no Luminex. A intensidade do sinal de cada microesfera é comparada com a intensidade do sinal de três controles negativos para determinar se há presença de anticorpos (25).

2.6 Sistema HLA

O complexo sistema HLA está localizado na região 6p21.3 no braço curto do cromossomo humano 6 e contém mais de 220 genes com funções diversificadas. Atualmente existem 31.675 alelos HLA descritos pela nomenclatura HLA e incluídos no Banco de Dados IPD-IMGT/HLA. A divulgação de novos nomes e sequências de alelos (figura 3) é de suma importância no cenário clínico e podem ser acessados através dos sites <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/> e <http://hla.alleles.org> (26).

Figura 3. Gráfico mostrando o número de alelos nomeados por ano de 1987 até o final de dezembro de 2020



Fonte: Nomenclatura para Fatores do Sistema HLA (26).

A distribuição dos antígenos HLA Classe I varia entre diferentes populações e grupos étnicos (27). Os genes HLA codificam proteínas da superfície celular que apresentam peptídeos estranhos aos receptores de antígeno de linfócitos T para reconhecimento. Os polimorfismos sequenciais nos domínios de ligação dos antígenos das moléculas de HLA determinam o repertório de peptídeos que podem ser apresentados e, por sua vez, influenciam a resposta imune do indivíduo (2).

Estudos de diversidade de frequência de alelos e haplótipos têm sido usados

para fazer inferências sobre as relações populacionais e as forças seletivas que operam para manter altos níveis de diversidade HLA (27).

Torres et al. descreveram os grupos antigênicos e as frequências haplotípicas de HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 nas cinco regiões do Brasil e por grupos de etnias autorreferidas usando os dados do Registro Brasileiro de Doadores de Medula Óssea (REDOME). Atualmente, o REDOME é o 3º maior registro de doadores de MO do mundo e atingiu 5,4 milhões de doadores em setembro de 2021 (28). A enorme extensão do território brasileiro, aliada à grande diversidade genética observada na população brasileira, dificulta o desenvolvimento de um registro que represente todo o pool de prováveis compatibilidades HLA para uma subpopulação específica (29).

A heterozigosidade observada nas Regiões do Brasil, variou de 87,4% a 88,5% para HLA-A, 92,8% a 93,2% para HLA-B e 89% para HLA-DRB1, e para etnias do Brasil variaram de 87,4% a 89,1% para HLA-A, 92,8% a 93,4% para HLA-B e 89% para HLA-DRB1. A heterozigosidade observada para todo o registro foi de 87,9% para HLA-A, 93,1% para HLA-B e 89,2% para HLA-DRB1. Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$) foram encontrados em todas as categorias da população, seja analisada separadamente ou ao considerar todo o registro (29). Esses testes medem o grau em que as frequências genotípicas observadas diferem daquelas esperadas com base nas frequências de alelos para essa população, assumindo que a população é adequadamente grande e experimenta acasalamento aleatório (27).

O HLA-A mais frequente é A*02 (25,9%), seguido de A*24 (10,0%) e A*03 (9,2%). Para o HLA-B, B*35 (11,8%), B*44 (10,8%) e B*15 (9,1%) são os mais frequentes. Os haplótipos mais frequentes no REDOME são: A*01-B*08-DRB1*03 com 2,1%, A*29-B*44-DRB1*07 com 1,4% e A*03-B*07-DRB1*15 com 1,0% (29).

Com base na tipagem genômica e informações de anticorpos específicos do doador, 86% de respostas à transfusão de plaquetas podem ser bem-sucedidas (30). No entanto, o fornecimento de plaquetas compatíveis com quatro antígenos HLA na rotina, nem sempre é viável (31). Considerando que o Brasil possui uma população etnicamente diversa, seria necessário um grande banco de doadores genotipados que é difícil estabelecer mesmo num serviço de hemoterapia de médio ou grande porte (32). Além dos custos associados, a obtenção de plaquetas HLA-compatíveis para

pacientes altamente sensibilizados costuma ser demorada, aumentando o risco de sangramento durante os períodos de trombocitopenia prolongados (33). Nestes casos, a definição precoce das características específicas que identificam os pacientes com maior risco de RP devido à aloimunização HLA pode ajudar a orientar os exames laboratoriais pré-transfusionais e permitir a busca antecipada de um doador compatível (4,34).

2.7 Aloimunização HLA

O PRA (reatividade de anticorpos contra painel de antígenos HLA) é utilizado para avaliar o status imunológico do paciente (34). Este teste pode ser utilizado como uma ferramenta para prever a porcentagem de doadores incompatíveis que um paciente pode ter no pool de doadores falecidos de órgãos sólidos, mas também pode refletir a porcentagem de doadores incompatíveis dentro do pool de doadores de plaquetas com base na frequência do antígeno HLA (35), ou seja, o PRA é uma medida da atividade do anticorpo no soro de um paciente e é expresso como uma porcentagem de doadores reativos em uma população aleatória (36).

Estudos em pacientes pré-transplante ou politransfundidos usando ensaios de citotoxicidade estimou que aproximadamente 80% dos anticorpos são direcionados contra epítomos públicos, e que o restante é específico para somente um antígeno. Durante o curso do tratamento, 15 a 40% dos pacientes ampliam o seu PRA. No entanto, mais da metade dos pacientes parece perder todos os anticorpos HLA sob observação (média de persistência é de 14 semanas) e estima-se que cerca de 70% dos anticorpos desapareçam em 12 meses (13).

Durante o TCTH, até 60% das transfusões são ineficazes (4,10). A eficácia da transfusão geralmente é monitorada pelo CCI, porque é mais fácil de quantificar; porém, este marcador é insuficiente para avaliar o risco de sangramento e idealmente não deve ser usado para monitorar o resultado clínico após a transfusão (28). No entanto, o CCI está associado ao intervalo de tempo até a próxima transfusão e, por este motivo, é considerado de relevância clínica (37).

A RP pós TCTH está associada à mortalidade precoce sem recidiva e, o efeito da plaqueta, pode ser crítico para o prognóstico do paciente (38,39). Por este motivo, a prevenção de aloimunização HLA em receptores de transplante é particularmente importante, porque além de poder causar falha do enxerto, pode dificultar ou atrasar a identificação de doadores de plaquetas compatíveis (40).

A exposição aos antígenos plaquetários durante as transfusões pode contribuir para o desenvolvimento de novos e/ou crescentes títulos de anticorpos HLA no cenário pós-transplante (31). Também pode ocorrer o aparecimento transitório de anticorpos HLA, que é um fenômeno conhecido como evanescência de anticorpos e ocorre devido aos anticorpos de curta duração ou à adsorção de anticorpos pelas plaquetas transfundidas (41).

Embora o tempo médio para a perda de anticorpos seja de 14 semanas, os anticorpos podem persistir por um período mais longo em mulheres, do que em homens, especificamente nas pacientes com gestações prévias (40). A produção aumentada de anticorpos anti-HLA IgG nas mulheres pode ter origem nas células B de memória, em função dos aloanticorpos adquiridos durante a gravidez. Em alguns casos, a produção desses anticorpos pode persistir por muitos anos após a última transfusão. Há relato da persistência de anticorpo HLA por até 8 anos (36).

Em pacientes com anemia aplásica e politransfundidos, as moléculas de HLA podem ser captadas por meio de receptores epítomos específico das células B e, após a digestão intracelular, serem apresentadas como peptídeos para os clones de células T CD4+. Assim, as células B de memória desempenham um papel crucial na manutenção da memória imunológica e são responsáveis pela RP e pelo alto risco de falha de enxertia após o TCTH (36).

O uso do regime de condicionamento de intensidade reduzida (RIC) também pode levar a persistência prolongada de anticorpos HLA e RP pós-transplante, pois permite que os plasmócitos produtores de anticorpos HLA tenham uma chance maior de sobreviver em comparação com regime mieloablativo. A resistência das células plasmáticas em relação às células T do doador, foi observada anteriormente em transplantes ABO incompatíveis e está associado à produção prolongada de

anticorpos anti-A e/ou anti-B no receptor, podendo causar longos períodos de aplasia eritróide pura após o uso de RIC (31).

Também foi observado que a duração do anticorpo HLA pós-transplante está fortemente associada ao nível de intensidade do anticorpo HLA pré-transplante, medido através do MFI e PRA. Isso pode ser parcialmente explicado pela cinética das imunoglobulinas *in vivo* com a meia-vida da IgG variando entre 26 e 36 dias. Este achado tem implicações importantes no manejo transfusional pós-transplante dos pacientes hipersensibilizados, em termos de manutenção do estoque de plaquetas HLA-compatíveis por um período prolongado após o transplante (>100 dias) (31).

Além disso, em pacientes altamente imunizados, existe uma correlação entre os níveis de MFI do DSA e a resposta às transfusões de plaquetas. Estudo recente demonstrou que o nível de MFI superior a 1000, foi considerado um fator de risco independente para uma resposta insuficiente à transfusão de plaquetas. Outros fatores de risco independentes foram infecção no momento da transfusão e a idade dos produtos plaquetários (42). Embora não esteja claramente definido o MFI no qual os anticorpos se tornam clinicamente relevantes, é provável que os anticorpos com MFI >10.000 devam ser evitados ao selecionar unidades de plaquetas HLA compatíveis para o paciente refratário (43).

Uma das principais limitações do transplante alogênico é a ocorrência de anticorpos DSA causando falha de enxertia primária e diminuição da taxa de sobrevida pós-transplante. Pesquisadores identificaram uma alta correlação entre os níveis de DSA com MFI >5000 e a fixação do complemento, avaliada através do ensaio C1q, que atualmente pode ser considerado o principal mecanismo de falha de enxertia induzida pelo DSA em receptores de TCTH alogênico (44).

2.8 Suporte transfusional na refratariedade plaquetária

A abordagem profilática tornou-se uma prática padrão para pacientes com risco de hemorragia clinicamente significativa e trombocitopenia grave. O Guideline da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) recomenda um limiar de $<10 \times 10^9/L$ para transfusão de plaquetas profiláticas em pacientes adultos e pediátricos

submetidos a TCTH alogênicos (33). Porém, não há evidência de que os pacientes aloimunizados se beneficiem de transfusões de plaquetas profiláticas que não produzem incrementos pós-transfusão e, nestes casos, a recomendação é transfundir apenas em eventos hemorrágicos.

Para os pacientes com suspeita de refratariedade devido à aloimunização, existem algumas opções de transfusão que serão determinadas de acordo com a urgência transfusional e o tipo de teste já realizado na amostra do paciente. Existem basicamente três estratégias para o manejo desses pacientes. O primeiro consiste na realização da prova de compatibilidade entre o produto plaquetário e o soro do paciente. A segunda opção é buscar doadores HLA-A e HLA-B compatíveis com o receptor de plaquetas, o que requer acesso a um grande registro de doadores com tipagem HLA disponível. A última estratégia usa a predição da especificidade de anticorpos, ou seja, consiste na detecção e identificação do anticorpo anti-HLA no receptor e, em seguida, busca de doadores que não expressam os antígenos HLA contra os quais o paciente está imunizado. Essa estratégia permite o acesso a um número maior de potenciais doadores e, dessa forma, facilita a localização das plaquetas mais adequadas para a transfusão (36,45).

A prova de compatibilidade de plaquetas pode ser utilizada enquanto se aguarda o resultado da tipagem HLA e da pesquisa de anticorpos HLA. Essa abordagem pode ser usada em pacientes que têm um PRA mais baixo; nestes casos, testando de 10 a 20 unidades de plaquetas possivelmente se encontrará uma unidade compatível. No entanto, em pacientes altamente sensibilizados, é improvável que este método encontre plaquetas compatíveis sem testar um número ainda maior de unidades (11). Estima-se que pacientes com PRA superior a 66% tem uma maior probabilidade de não encontrar nenhuma plaqueta compatível num ensaio de compatibilidade com 25 a 35 unidades de plaquetas por aférese testadas com amostra de cada paciente, sendo necessário providenciar plaquetas HLA compatíveis (46).

Pacientes com RP aloimune, são melhor tratados com transfusões de plaquetas de doadores compatíveis para antígenos HLA-A e HLA-B (33). Mesmo considerando que os antígenos HLA-C sejam expressos nas plaquetas, a imunização contra este antígeno frequentemente é considerada irrelevante no tratamento da RP.

No entanto, alguns autores demonstraram que pode ser interessante considerar a imunização com anti-HLA-C (45,47).

Quando uma correspondência HLA completa não puder ser encontrada, diferentes estratégias são usadas para selecionar doadores HLA parcialmente compatíveis. As especificidades HLA Classe I podem ser agrupadas em grupos de reatividade cruzada (CREG), onde as incompatibilidades com semelhança antigênica resultam em menos aloconhecimento ou ativação imune (32).

Acredita-se que isso seja devido à incapacidade do sistema imunológico do paciente de reconhecer os CREGs como proteínas estranhas. A maioria dos anticorpos HLA são direcionados contra epítomos públicos, que são compartilhados por dois ou mais antígenos; enquanto nos epítomos privados, por apenas um antígeno (48). Por isso, as plaquetas de doadores que possuem a tipagem HLA que pertence ao mesmo grupo CREG do paciente, também apresentam um melhor incremento plaquetário (11,49,50). E, apesar de em alguns casos a seleção de doadores incompatíveis com base nos CREGs possa não produzir incrementos adequados, essa estratégia possibilita um aumento no número de potenciais doadores no mesmo banco de doadores genotipados (32).

A prova cruzada de plaqueta virtual pode ser definida como HLA-A ou B compatível ou a exclusão dos grupos CREGs (51). A efetividade das transfusões de plaquetas HLA-compatíveis selecionadas pela prova virtual, em pacientes com RP pós-transplante, não é inferior às plaquetas selecionadas pela prova cruzada real. A orientação para seleção do doador é primeiro determinar a tipagem HLA e a especificidade do anticorpo HLA do paciente com refratariedade plaquetária; em seguida, determinar os antígenos de reação cruzada e antígenos permissíveis para seleção de doadores HLA-compatíveis, localizando os candidatos na lista de doadores genotipados cadastrados (15).

Estratégias sofisticadas, como software HLAMatchmaker (49,52) e EpVix (53,54), foram desenvolvidas para prever a compatibilidade de plaquetas pela identificação de epítomos imunogênicos em região acessíveis da molécula HLA.

HLAMatchmaker é um programa de computador desenvolvido para determinar a compatibilidade HLA a nível molecular, independentemente da correspondência de antígenos HLA idênticos ou dos grupos CREG, e tem o objetivo de aumentar o pool de doadores cujos produtos podem ser compatíveis para um determinado receptor. Os epítomos imunogênicos são representados por triplets de aminoácidos nas partes expostas (isto é, posições acessíveis por anticorpos) das sequências de proteínas nas cadeias do HLA. O programa considera cada antígeno HLA como uma sequência distinta de triplets polimórficos que podem induzir aloanticorpos específicos. Como os pacientes sensibilizados não produzem aloanticorpos contra triplets presentes em suas próprias moléculas de HLA, o algoritmo avalia a compatibilidade doador-receptor por meio de comparações *intra*locus e *inter*locus e determina quais triplets são diferentes ou compartilhados entre doador e paciente (49). Pesquisadores demonstraram que uso do HLAMatchmaker para selecionar unidades de plaquetas para pacientes trombocitopênicos aloimunizados contra antígenos HLA produziu incrementos plaquetários satisfatórios (55–57).

O sistema EpVix é outro método inovador que tem se mostrado eficaz e rápido na identificação de doadores de plaquetas compatíveis pelo HLA, para pacientes com RP. O software EpHLA / Epvix foi usado com sucesso para selecionar doadores para o transplante renal e posteriormente foi adaptado para permitir a realização da prova cruzada virtual de plaquetas (53,54). Esse sistema é baseado no método de identificação de anticorpos Luminex e utiliza o algoritmo HLAMatchmaker para identificar as incompatibilidades permissíveis para pacientes altamente sensibilizados. A alta sensibilidade, especificidade e acurácia da prova virtual EpVix demonstram a aplicabilidade e eficiência deste software no processo de seleção de doadores. Este método é considerado de baixo custo, fácil e rápido, pode ser usado para o manejo de RP, além de otimizar a seleção de plaquetas de plaquetas (53).

2.9 Transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico

Os pacientes submetidos ao TCTH geralmente demonstram incrementos insatisfatórios nas transfusões de plaquetas devido a uma combinação de causas imunes e não imunes, incluindo aloimunização HLA pré-existente, medicamentos,

infecções virais e sepse (58). Entre as indicações para TCTH encontram-se as doenças hematológicas benignas e malignas, tumores sólidos, doenças autoimunes e neurológicas (tabela 2) (59–61).

Tabela 2. Indicações para transplante de células-tronco hematopoiéticas

Doenças malignas	Leucemia mielóide aguda
	Leucemia linfóide aguda
	Leucemia mielóide crônica
	Síndrome mielodisplásica
	Neoplasias mieloproliferativas
	Linfoma não-Hodgkin
	Doença de Hodgkin
	Mieloma múltiplo
	Leucemia mielóide crônica juvenil
Doenças não malignas	Anemia aplásica
	Hemoglobinúria paroxística noturna
	Anemia de Fanconi
	Anemia Blackfan-Diamond
	Talassemia major
	Anemia falciforme
	Imunodeficiência combinada severa
	Síndrome de Wiskott-Aldrich
	Erros inatos do metabolismo
	Síndromes de neutropenia congênita

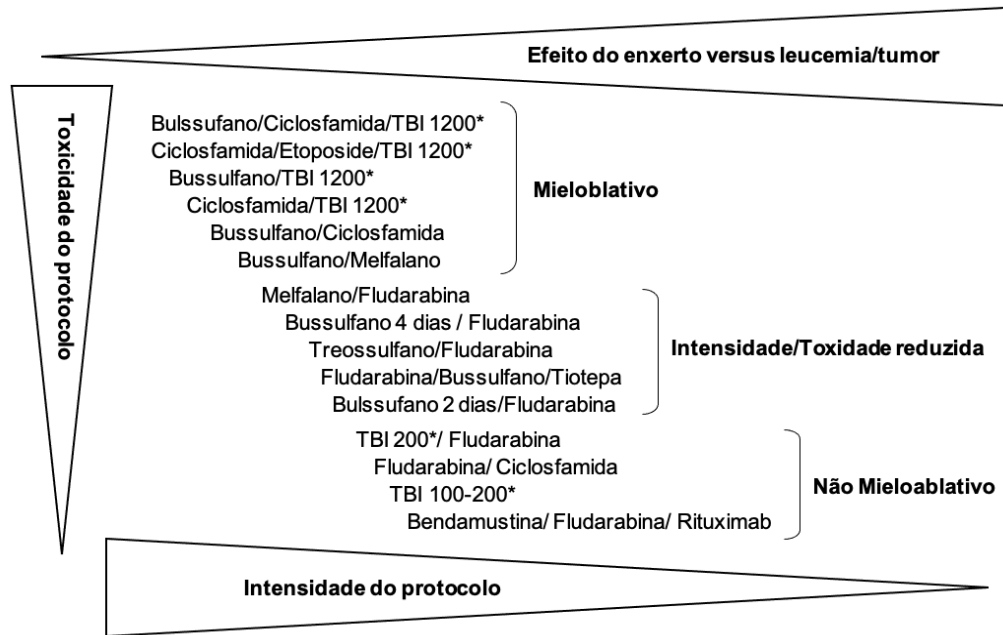
Fonte: Henig and Zuckerman, (2014, p.5) (62).

Atualmente, existem várias formas de realizar o TCTH, utilizando várias opções de condicionamento mieloablativo, não mieloablativo ou de intensidade reduzida (RIC); de fontes de células-tronco medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) e sangue do cordão umbilical (SCU); além de diferentes métodos de profilaxia para DECH. Todas as opções possuem seus próprios riscos e benefícios relacionados à recidiva, mortalidade, DECH e enxertia (63).

O regime de condicionamento tem como objetivo a erradicação do tumor residual (se a indicação do transplante for para doença maligna), e a supressão do sistema imunológico do paciente para evitar a rejeição do enxerto. Os protocolos são

categorizados de acordo com o seu nível de intensidade em: mieloablatoivo (MA), intensidade reduzida (RIC) e não mieloablatoivo (NMA); podem ser realizados com quimioterapia exclusivamente ou associada a radioterapia (Figura 4) (62).

Figura 4. Protocolos de condicionamento



Fonte: Henig and Zuckerman, (2014, p.5) (62).

A enxertia neutrofílica é definida como a primeira data de recuperação da contagem de absoluta de neutrófilos (CAN) $\geq 0,5 \times 10^9/L$ por 3 dias consecutivos e a enxertia plaquetária como a primeira data de contagem de plaquetas $> 20 \times 10^9/L$, mantida por sete dias consecutivos, independente de transfusão (63,64).

No contexto dos protocolos RIC, também é recomendada a confirmação da origem do doador através do quimerismo. Caso o paciente não apresente as contagens definidas previamente, considera-se falha de enxertia primária (CAN $< 0,5 \times 10^9/L$ no dia +28, hemoglobina < 8 g/dL e plaquetas $< 20 \times 10^9/L$) (65).

A falha de enxertia secundária é definida como a diminuição da CAN $< 0,5 \times 10^9/L$ após uma enxertia inicial não relacionada a recaída da doença, infecção ou mielotoxicidade e, no transplante pós RIC, perda do quimerismo do doador $< 5\%$.

O enxerto mal funcionante refere-se a presença de duas ou três citopenias >2 semanas, depois do dia +28, com >95% do quimerismo do doador. A falha de enxertia apresenta um pior prognóstico, decorrente das infecções ou sangramentos, tendo uma sobrevida geral de 3 a 5 anos após seu diagnóstico inferior a 20% (66).

A doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), desenvolve-se quando as células T do doador reconhecem as células do receptor como estranhas. Aproximadamente 30% a 50% dos pacientes desenvolverão DECH aguda e cerca de 15% terão DECH grave (grau III - IV). O objetivo da profilaxia através do uso de imunossupressão é prevenir o desenvolvimento da DECH. O padrão ouro no TCTH MA é a associação de inibidores da calcineurina (ciclosporina/tacrolimus) com metotrexato. No TCTH com RIC, os regimes que têm sido usados são, ciclosporina (ou tacrolimus) em monoterapia ou em combinação com micofenolato de mofetila (MMF), embora o esquema mais frequentemente seja de ciclosporina mais MMF. No TCTH haploidêntico, a profilaxia baseia-se na ciclofosfamida pós-transplante (PT-CY) no dia +3 e +4 seguido por tacrolimus/MMF. O uso de outros medicamentos, como a imunoglobulina antitimócitos (ATG) e o alemtuzumabe, podem ser adicionados na profilaxia dos TCTH não aparentados (67).

Entre as principais complicações associadas ao TCTH alogênico, podemos citar: DECH, infecção pelo citomegalovírus (CMV), microangiopatia trombótica (MAT) e doença venoclusiva hepática (VOD). Os fatores de risco para complicações hemorrágicas graves após o TCTH alogênico são trombocitopenia grave prolongada, DECH aguda grave e MAT (68).

Uma proporção significativa dos pacientes submetidos ao TCTH alogênico apresentam trombocitopenia prolongada, independentemente do quimerismo completo do doador, e podem apresentar um maior risco de complicações letais. A recuperação plaquetária é influenciada pela DECH, tipo de doador, infecções por CMV e número de células infundidas no transplante (39).

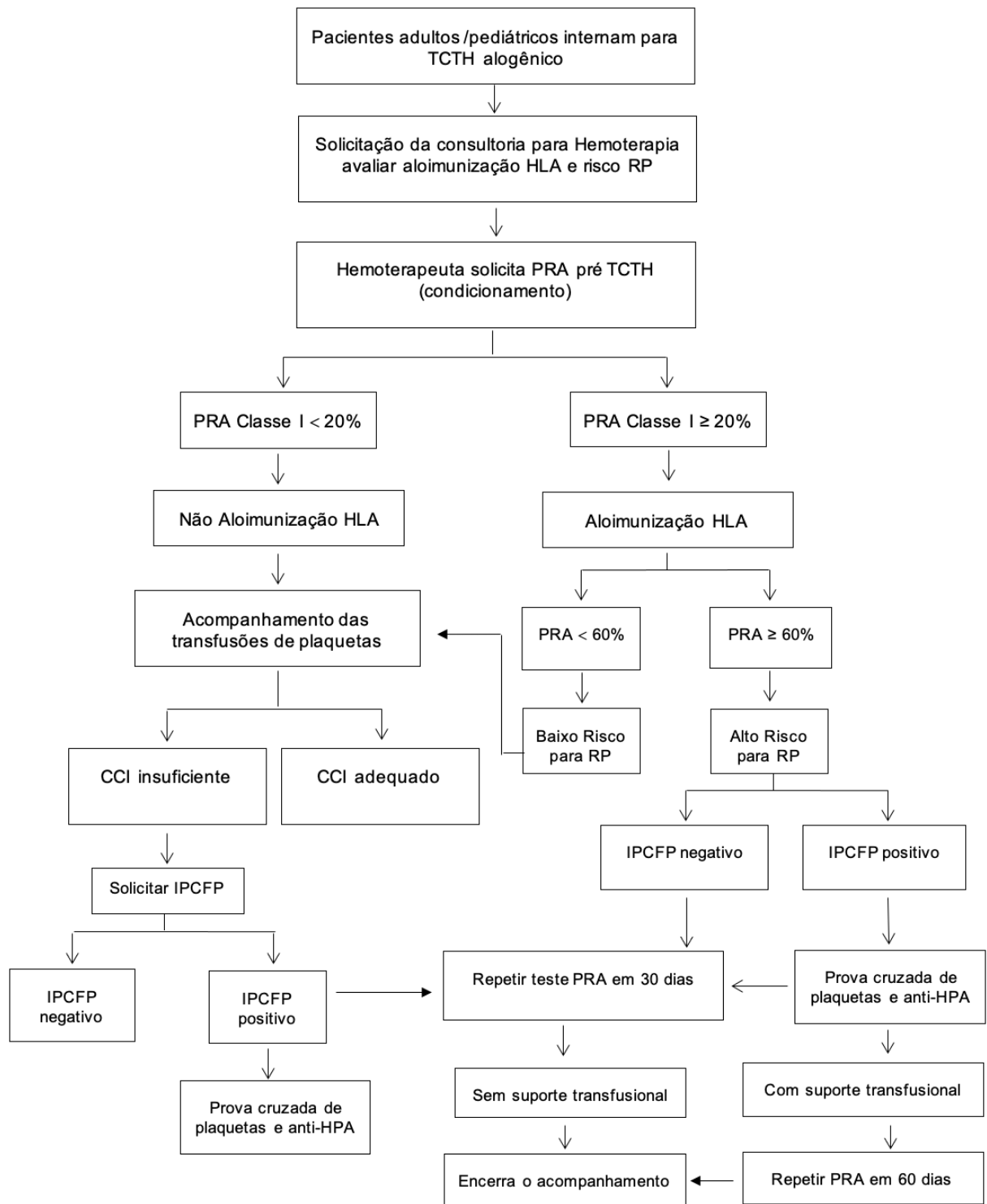
O CMV demonstrou ter uma atividade inibitória no sistema hematopoiético. Essa inibição pode ser direta, via infecção de células mieloides, ou indireta, via infecção de células do estroma. Os pacientes também podem apresentar uma função alterada das linhagens celulares, como neutrófilos e monócitos/macrófagos. Além

disso, o tratamento específico para CMV com ganciclovir ou fosfarnet pode resultar em trombocitopenia (4,39).

O diagnóstico de MAT associada ao transplante é realizado em pacientes com anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, insuficiência renal e níveis elevados de lactato desidrogenase sérica (68,69).

A síndrome de obstrução sinusoidal (SOS), também chamada de doença venoclusiva hepática (VOD), é uma das complicações mais relevantes de origem endotelial que surge logo após o TCTH. Apesar da sua incidência ser relativamente baixa e da maioria dos casos se resolver espontaneamente, os casos que evoluem para falência de múltiplos órgãos apresentam uma mortalidade superior a 80% e representam um dos principais problemas clínicos após TCTH. A trombocitopenia, com um rápido consumo de plaquetas transfundidas, é frequentemente observada em pacientes com SOS, mas esta característica é difícil de avaliar durante a fase pancitopênica após o condicionamento. A incidência é de aproximadamente 10 a 15% após TCTH alogênico, usando regimes de condicionamento MA, e <5% após RIC ou TCTH autólogo. O uso de medidas farmacológicas é recomendado para prevenir SOS. Neste contexto, o uso de heparina de baixo peso molecular, o ácido ursodeoxicólico e o defibrotide devem ser considerados (70).

3 MARCO CONCEITUAL



4 JUSTIFICATIVA

A refratariedade plaquetária (RP) é uma complicação grave relacionada à transfusão de plaquetas e afeta principalmente os pacientes hematológicos em suporte transfusional crônico. A principal causa de RP imune é a presença de anticorpos anti-HLA.

Os pacientes submetidos ao TCTH alogênico geralmente demonstram incrementos insatisfatórios nas transfusões de plaquetas devido a uma combinação de causas imunes e não imunes, incluindo aloimunização HLA pré-existente. A obtenção de plaquetas HLA e/ou HPA compatíveis para pacientes altamente sensibilizados costuma ser demorada, aumentando o risco de sangramentos durante os períodos de trombocitopenia prolongada pós transplante. Nestes casos, a definição precoce de características específicas que identificam os pacientes com maior risco de RP devido à aloimunização HLA pode ajudar a orientar os exames laboratoriais pré-transplante e permitir a busca antecipada de doadores compatíveis, proporcionando um suporte transfusional adequado e seguro para o paciente.

Na literatura, não há dados suficientes sobre os preditores imunológicos para identificação de pacientes com alto risco de RP na presença de fatores não imunes tão complexos que fazem parte do cenário do TCTH. Neste trabalho, foi avaliado a taxa aloimunização HLA pré-TCTH alogênico, a associação entre a presença anticorpos antiplaquetários e a RP, e o impacto das transfusões de plaquetas compatíveis na persistência e desenvolvimento de novos anticorpos anti-HLA no pós-transplante. Também foram avaliados o número de hemocomponentes transfundidos até 100 dias pós TCTH alogênico e o tempo de independência transfusional, para estimativa de demanda transfusional por períodos específicos pós transplante.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Estudar a relação entre a aloimunização HLA e refratariedade plaquetária, durante o processo de compatibilização de plaquetas, e correlacionar estes achados com os desfechos clínicos e laboratoriais no pós-TCTH alogênico.

5.2 Específicos

Determinar a prevalência de anticorpos anti-HLA em pacientes submetidos ao TCTH alogênico através da análise do PRA pré-condicionamento, 30 dias após o transplante e, naqueles que apresentarem aloimunização anti-HLA e RP, 60 dias pós TCTH.

Verificar se aloimunização HLA pré e pós TCTH está associada ao regime de condicionamento, doença de base, número de transfusões, gestações e compatibilidade HLA com o doador.

Verificar se a aloimunização HLA e RP após TCTH estão associadas aos níveis de MFI (intensidade média de fluorescência) e PRA antes do transplante.

Avaliar se a compatibilização de plaquetas através da prova cruzada por citometria de fluxo modifica a duração, persistência e níveis de anticorpos anti-HLA.

Avaliar se a presença de anticorpos anti-HLA pré e/ou pós TCTH influencia a enxertia e a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH).

6 REFERÊNCIAS

1. 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.* 1997;337(26):1861–9.
2. Pavenski K, Freedman J, Semple JW. HLA alloimmunization against platelet transfusions: Pathophysiology, significance, prevention and management. *Tissue Antigens.* 2012;79(4):237–45.
3. Ishida A, Handa M, Wakui M, Okamoto S, Kamakura M, Ikeda Y. Clinical factors influencing posttransfusion platelet increment in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation - a prospective analysis. *Transfusion.* 1998;38(9):839–47.
4. Balduini CL, Salvaneschi L, Klersy C, Noris P, Mazzucco M, Rizzuto F, et al. Factors influencing post-transfusional platelet increment in pediatric patients given hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2001;15(12):1885–91.
5. Stroncek DF, Vassallo RR and. Platelet and Granulocyte Antigens and Antibodies. In: *Technical Manual AABB.* 20th ed. Bethesda, Maryland; 2020. p. 457–78.
6. Vassallo RR and, Curtis BR. Platelet and Granulocyte Antigens and Antibodies. In: Fung MK, Eder AF, Spitalnik SL, Connie M. Westhoff, editors. *Technical Manual AABB.* 19th ed. Bethesda, Maryland; 2017. p. 413–34.
7. Stanworth SJ, Navarrete C, Estcourt L, Marsh J. Platelet refractoriness - practical approaches and ongoing dilemmas in patient management. *Br J Haematol.* 2015;171(3):297–305.
8. Medical Professionals. HPA Gene Database [Internet]. Versiti. 2020 [cited 2021 Sep 19]. Available from: <https://www.versiti.org/medical-professionals/precision-medicine-expertise/platelet-antigen-database/hpa-gene-database>
9. Curtis BR, Mcfarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox Sang.*

- 2014;106(2):93–102.
10. Ishida A, Handa M, Wakui M, Okamoto S, Kamakura M, Ikeda Y. Clinical factors influencing posttransfusion platelet increment in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation-a prospective analysis. *Transfusion*. 1998 Sep;38(9):839–47.
 11. Schmidt AE, Refaai MA, Coppage M. HLA-mediated platelet refractoriness: An ACLPS critical review. *Am J Clin Pathol*. 2019;151(4):353–63.
 12. Rebullà P. A mini-review on platelet refractoriness. *Haematologica*. 2005;90(2):247–53.
 13. Vassallo R, Fung M. Management of the Platelet-Transfusion-Refractory Platelet. In: Sweeney J, Lozano M, editors. *Platelet Transfusion Therapy*. Bethesda, Maryland: AABB Press; 2013. p. 321–58.
 14. Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *Br J Haematol*. 2008;142(3):348–60.
 15. Seike K, Fujii N, Asano N, Ohkuma S, Hirata Y, Fujii K, et al. Efficacy of HLA virtual cross-matched platelet transfusions for platelet transfusion refractoriness in hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion*. 2020;60(3):473–8.
 16. Legler TJ, Fischer I, Dittmann J, Simson G, Lynen R, Humpe A, et al. Frequency and causes of refractoriness in multiply transfused patients. *Ann Hematol*. 1997;74(4).
 17. Toor AA, Choo SY, Little JA. Bleeding risk and platelet transfusion refractoriness in patients with acute myelogenous leukemia who undergo autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000;26(3).
 18. Meehan KR, Matias CO, Rathore SS, Sandler SG, Kallich J, LaBrecque J, et al. Platelet transfusions: Utilization and associated costs in a tertiary care hospital. *Am J Hematol*. 2000;64(4).
 19. Kerkhoffs JLH, Eikenboom JCJ, Van De Watering LMG, Van Wordragen-Vlaswinkel RJ, Wijermans PW, Brand A. The clinical impact of platelet

- refractoriness: Correlation with bleeding and survival. *Transfusion*. 2008;48(9):1959–65.
20. Solves P, Sanz J, Freiria C, Santiago M, Villalba A, Gómez I, et al. Factors influencing platelet transfusion refractoriness in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2018;97(1):161–7.
 21. Triulzi DJ, Assmann SF, Strauss RG, Ness PM, Hess JR, Kaufman RM, et al. The impact of platelet transfusion characteristics on posttransfusion platelet increments and clinical bleeding in patients with hypoproliferative thrombocytopenia. *Blood*. 2012;119(23):5553–62.
 22. American Red Cross. *A Compendium of Transfusion Practice Guidelines*. 4.0. 2021.
 23. Cardillo A, Heal JM, Henrichs K, Masel D, Fountaine T, Liesveld J, et al. Reducing the Need for HLA-Matched Platelet Transfusion. *N Engl J Med*. 2021;384(25):2451–2.
 24. Meinke S, Karlström C, Höglund P. Complement as an Immune Barrier in Platelet Transfusion Refractoriness. *Transfus Med Rev*. 2019 Oct 1;33(4):231–5.
 25. Fagundes IS, Franz JM, Jobim MS, Arend A, Merzoni J, Cardone JM, et al. Diagnosis and treatment of immunological platelet refractoriness by histocompatibility. *Hum Immunol*. 2020;81(5):197–201.
 26. WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. *Nomenclature for Factors of the HLA System* [Internet]. hla.alleles.org. 2019 [cited 2021 Sep 18]. Available from: <http://hla.alleles.org/nomenclature/committee.html>
 27. Mack SJ, Tu B, Lazaro A, Yang R, Lancaster AK, Cao K, et al. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele and haplotype frequencies distinguish Eastern European Americans from the general European American population. *Tissue Antigens*. 2009;73(1):17–32.
 28. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. REDOME - Registro Nacional

- de Doadores Voluntários de Medula Óssea. [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 29]. Available from: <http://redome.inca.gov.br/o-redome/dados/>
29. Torres L, da Silva Bouzas LF, Almada A, de Sobrino Porto LCM, Abdelhay E. Distribution of HLA-A, -B and -DRB1 antigenic groups and haplotypes from the Brazilian bone marrow donor registry (REDOME). *Hum Immunol*. 2017;78(10):602–9.
 30. Karlström C, Linjama T, Edgren G, Lauronen J, Wikman A, Höglund P. HLA-selected platelets for platelet refractory patients with HLA antibodies: a single-center experience. *Transfusion*. 2019;59(3):945–52.
 31. Fasano RM, Mamcarz E, Adams S, Donohue Jerussi T, Sugimoto K, Tian X, et al. Persistence of recipient human leucocyte antigen (HLA) antibodies and production of donor HLA antibodies following reduced intensity allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2014;166(3):425–34.
 32. Bub CB, Torres MA, Moraes ME, Hamerschlak N, Kutner JM. Determination of an unrelated donor pool size for human leukocyte antigen-matched platelets in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;38(1):1–6.
 33. Schiffer CA, Bohlke K, Delaney M, Hume H, Magdalinski AJ, Mccullough JJ, et al. Platelet Transfusion for Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(3):283–99.
 34. Belizaire R, Mack J, Kadauke S, Kim Y, Saidman S, Makar RS. Red blood cell alloantibodies are associated with increased alloimmunization against human leukocyte antigens. *Transfusion*. 2019;59(7):2256–63.
 35. Tumer G, Gniadek T, Baye J, Pena R, Warner P, Fung M, et al. The effect of serum pretreatment regimens for the detection of HLA class I antibodies in platelet-refractory patients. *Transfusion*. 2020;60(3):488–97.
 36. Laundry GJ, Bradley BA, Younie M, Hows JM. Incidence and specificity of HLA in multitransfused patients with acquired anemia. *Transfusion*. 2004;44:814–25.
 37. Saris A, Kreuger AL, ten Brinke A, Kerkhoffs JLH, Middelburg RA, Zwaginga JJ,

- et al. The quality of platelet concentrates related to corrected count increment: linking in vitro to in vivo. *Transfusion*. 2019;59(2):697–706.
38. Christou G, Kekre N, Petrcich W, Tokessy M, Neurath D, Giulivi A, et al. Impact of platelet transfusion on toxicity and mortality after hematopoietic progenitor cell transplantation. *Transfusion*. 2015;55(2):253–8.
 39. Dominietto A, Raiola AM, Van Lint MT, Lamparelli T, Gualandi F, Berisso G, et al. Factors influencing haematological recovery after allogeneic haemopoietic stem cell transplants: Graft-versus-host disease, donor type, cytomegalovirus infections and cell dose. *Br J Haematol*. 2001;112(1):219–27.
 40. Cheok KPL, Chhetri R, Wee LYA, Friel O, Pham A, Salvi A, et al. The burden of immune-mediated refractoriness to platelet transfusions in myelodysplastic syndromes. *Transfusion*. 2020;60(10):2192–8.
 41. Saris A, Kerkhoffs JL, Norris PJ, van Ham SM, ten Brinke A, Brand A, et al. The role of pathogen-reduced platelet transfusions on HLA alloimmunization in hemato-oncological patients. *Transfusion*. 2019;59(2):470–81.
 42. Linjama T, Niittyvuopio R, Tuimala J, Pyörälä M, Rintala H, Rimpiläinen J, et al. Platelet donor selection for HLA-immunised patients; the impact of donor-specific HLA antibody levels. *Transfus Med*. 2017;27(5):375–83.
 43. Juskewitch JE, Norgan AP, De Goey SR, Duellman PM, Wakefield LL, Gandhi MJ, et al. How do I ... manage the platelet transfusion–refractory patient? *Transfusion*. 2017;57(12):2828–35.
 44. Ciurea SO, Al Malki MM, Kongtim P, Zou J, Aung FM, Rondon G, et al. Treatment of allosensitized patients receiving allogeneic transplantation. *Blood Adv*. 2021;5(20):4031–43.
 45. Blandin L, Dougé A, Fayard A, Bay JO, Berlie G, Pereira B, et al. Platelet transfusion refractoriness and anti-HLA immunization. *Transfusion*. 2021;61(6):1700–4.
 46. Wiita AP, Nambiar A. Longitudinal management with crossmatch-compatible

- platelets for refractory patients: Alloimmunization, response to transfusion, and clinical outcomes (CME). *Transfusion*. 2012;52(10):2146–54.
47. Saito S, Ota S, Seshimo H, Yamazaki Y, Nomura S, Ito T, et al. Platelet transfusion refractoriness caused by a mismatch in HLA-C antigens. *Transfusion*. 2002;42(3):302–8.
 48. El-Awar N, Jucaud V, Nguyen A. HLA Epitopes: The Targets of Monoclonal and Alloantibodies Defined. *J Immunol Res*. 2017:1-16.
 49. Nambiar A, Duquesnoy RJ, Adams S, Zhao Y, Oblitas J, Leitman S, et al. HLAMatchmaker-driven analysis of responses to HLA-typed platelet transfusions in alloimmunized thrombocytopenic patients. *Blood*. 2006 Feb 15;107(4):1680–7.
 50. Wade JA, Hurley CK, Takemoto SK, Thompson J, Davies SM, Fuller TC, et al. HLA mismatching within or outside of cross-reactive groups (CREGs) is associated with similar outcomes after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2007;109(9):4064–70.
 51. Pavenski K, Rebullia P, Duquesnoy R, Saw CL, Slichter SJ, Tanael S, et al. Efficacy of HLA-matched platelet transfusions for patients with hypoproliferative thrombocytopenia: A systematic review. Vol. 53, *Transfusion*. 2013.
 52. Duquesnoy RJ, Filip DJ, Rodey GE, Rimm AA, Aster RH. Successful transfusion of platelets “mismatched” for HLA antigens to alloimmunized thrombocytopenic patients. *Am J Hematol*. 1977;2(3):219–26.
 53. Bub CB, Gonçalves AC, Barjas-Castro ML, Sousa LCDM, do Monte SJH, Castro V, et al. The use of a potential novel tool in virtual crossmatching for platelet transfusion in platelet refractoriness. *Vox Sang*. 2016;110(1):70–8.
 54. Sousa LCD da M, Filho HLAS, Von Glehn C de QC, da Silva AS, Neto P de A dos S, de Castro JAF, et al. EpHLA: An innovative and user-friendly software automating the HLAMatchmaker algorithm for antibody analysis. *Transpl Immunol*. 2011;25(4).

55. O'Rafferty C, Rooney G, Hagan R, Woolfson M, O'Donghaile D, Fitzgerald J. HLAMatchmaker is effective for selecting appropriate platelet units for alloimmunised thrombocytopaenic patients who are refractory to random donor platelets. *Transfus Med*. 2017;27(5):369–74.
56. Brooks EG, MacPherson BR, Fung MK. Validation of HLAMatchmaker algorithm in identifying acceptable HLA mismatches for thrombocytopenic patients refractory to platelet transfusions. *Transfusion*. 2008;48(10).
57. Pai SC, Lo SC, Lin Tsai SJ, Chang JS, Lin DT, Lin KS, et al. Epitope-based matching for HLA-alloimmunized platelet refractoriness in patients with hematologic diseases. *Transfusion*. 2010;50(11).
58. Fasano RM, Mamcarz E, Adams S, Donohue Jerussi T, Sugimoto K, Tian X, et al. Persistence of recipient human leucocyte antigen (HLA) antibodies and production of donor HLA antibodies following reduced intensity allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2014;166(3):425–34.
59. Consensus Guidelines for hematopoietic stem cell transplantation from the Brazilian Society for Blood and Marrow Transplantation and Cellular Therapy. *J Bone Marrow Transplant Cell Ther*. 2021;2(1).
60. Alexander T, Greco R, Snowden JA. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Autoimmune Disease. Vol. 72, *Annual Review of Medicine*. 2021. p. 215–28.
61. Das J, Sharrack B, Snowden JA. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation in neurological disorders: current approach and future directions. Vol. 20, *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2020. p. 1299–313.
62. Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic Stem Cell Transplantation—50 Years of Evolution and Future Perspectives. *Rambam Maimonides Med J*. 2014;5(4):e0028.
63. Kim H, Armand P. Clinical Endpoints in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Studies: The Cost of Freedom. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2014;19(6):860–6.

64. Solves P, Sanz J, Freiria C, Santiago M, Villalba A, Gómez I, et al. Factors influencing platelet transfusion refractoriness in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2018 Jan 1;97(1):161–7.
65. Nagler A SA. Conditioning. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M KN, editor. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019.
66. Valcárcel D SA. Graft Failure. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M KN, editor. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019.
67. Michonneau D SG. GVHD Prophylaxis (Immunosuppression). In: Carreras E D, C, Mohty M KN, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019.
68. Labrador J, López-Corral L, Vazquez L, Sánchez-Guijo F, Guerrero C, Sánchez-Barba M, et al. Incidence and risk factors for life-threatening bleeding after allogeneic stem cell transplant. *Br J Haematol*. 2015;169(5):719–25.
69. Ruutu T, Barosi G, Benjamin RJ, Clark RE, George JN, Gratwohl A, et al. Diagnostic criteria for hematopoietic stem cell transplant-associated microangiopathy: Results of a consensus process by an International Working Group. *Haematologica*. 2007;92(1):95–100.
70. Carreras E. How I manage sinusoidal obstruction syndrome after haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. 2015;168(4):481–91.

7 ARTIGOS

7.1 ARTIGO 1

Platelet Refractoriness screening in pre-allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant: Finding the enemy before it is too late

Background and Objectives: The presence of antibodies against HLA Class I can lead to platelet refractoriness (PR), making the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) even more challenging. Objectives: The aim of this study was to identify patients with a higher risk for immune-mediated PR pre-transplant and assess the impact of cross-matched PLTs transfusions on clinical and laboratory outcomes in the allo-HSCT.

Materials and Methods: We performed a prospective cohort study among consecutive patients who underwent allo-HSCT at Hospital de Clínicas de Porto Alegre between 2018 and 2021. Panel reactive antibody (PRA) and mean fluorescence intensity (MFI) were used for assessing HLA sensitization and the significance of antibody strengths, respectively. Patients with PRA Class I $\geq 20\%$ performed the screening test for immune PR (IPR) to receive cross-matched PLTs transfusions. We also calculated the 24-hour corrected count increments (24h-CCI) to evaluate the effectiveness of PLTs transfusions.

Results: A total of 83 patients (50 males, 33 females) were enrolled. Before transplant, 29 (34.9%) patients had platelet-reactive alloantibodies and, 15 (18.0%) patients were identified as IPR. Of them, eight patients received 132 PLTs cross-matched transfusions. The median 24h-CCI and the rates of successful transfusion (considering CCI ≥ 4500) was 3176 and 44.7%, respectively. Diagnostic performance of the baseline maximum MFI, for identification of patients PR in the pre- and post-transplant (at day 30) period, showed an AUC of 0.875 (IC 95%: 0.710 - 1.00; $p=0.023$) and AUC=0.733 (IC 95%: 0.539 - 0.927; $p=0.043$), respectively. In addition, we found an association between baseline maximum MFI (median 7383) and persistence of anti-HLA antibodies 30 days post-HSCT, $p=0.018$.

Conclusion: An early identification of alloimmunized patients at high risk of PR before allo-HSCT, through PRA and MFI analysis, can lead to improved management to patient refractory to platelet transfusion post-transplantation.

Keywords: Platelet refractoriness, alloimmunization, fluorescence intensity, thrombocytopenia, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Highlights

- Platelet refractoriness is associated with increased risk of complications in allogeneic stem cell transplantation.
- One third of the patients in this cohort had pre-transplant platelet alloimmunization through PRA and MFI analysis and there was 18% of patients with IPR
- Routine identification of antibodies against HLA Class I before HSCT is a feasible way for early identification of patients with IPR, saving time, costs and streamline management for platelets refractoriness in this setting.

INTRODUCTION

Platelet refractoriness (PR), a repeated suboptimal response to platelet (PLT) transfusions with lower-than-expected posttransfusion count increments, is a frequent and complex clinical event and remains a therapeutic challenge in the management of patients undergoing hematopoietic stem cell transplant (HSCT). [1]

PR is usually defined as a corrected count increment (CCI) of less than <4500-5000 platelets/ μ l at 10-60 minutes, and/or CCI <2500 at 18-24 hours, after two sequential transfusions of ABO-compatible PLTs, at least one of which had to be stored for no more than 48 hours. [2,3] The CCI formula incorporates information on the estimated blood volume or size of the patient as well as the number of PLTs in the infused product. [2]

The causes of PLT transfusion-refractoriness can be classified into two categories: nonimmune-mediated and immune-mediated. Nonimmune factors are most platelet-refractory cases (80-90%) and include fever, infection, hypersplenism, disseminated intravascular coagulation (DIC), bleeding, and medications. Immune-mediated factors are approximately 20% of cases, and are secondary to ABO, Class I human leukocyte antigen (HLA) (mostly HLA-A and HLA-B), and/or human platelet antigen (HPA) antibodies. [4]

The development of HLA-specific alloantibodies is associated with previous exposure to allogeneic HLA via pregnancy, solid organ transplant or non-leukoreduced blood products. [5] HLA Luminex-based methods can be used to assess HLA sensitized patients and the significance of antibody strengths can be defined through mean fluorescence intensity (MFI). [5,6]

Before HSCT, PR can result from HLA-antibodies induced by repeated transfusions, and after HSCT, many complications may also cause PR, such as infection, bleeding, and thrombotic microangiopathy (TMA). [7] Other factors associated with PR related to transplant are lower CD34+ cell dose infused, a higher number of antibiotics used, and a reduced-intensity conditioning regimen. [8] PR development can impact negatively on HSCT and was associated with a higher rate of 100-day non-relapse mortality and intensive care unit admission, longer post-transplant hospital stay, and an increased number of organs affected by severe toxicity. [9]

Patients who underwent HSCT have reported a low CCI in more than 40% of PLTs transfusions, demonstrating that HSCT is a factor independently associated with PR. Currently, there is no consensus on the best strategy to treat PR nor the mean fluorescence intensity (MFI) threshold for identification of clinically relevant anti-HLA. [8] Furthermore, the outcomes of PLTs transfusions are not always easy to predict in terms of bleeding control or increase in PLT count. [10]

Cross-matched PLTs are known to provide adequate CCIs for alloimmunized PR patients. [11] However, the transfusion effectiveness in allo-HSCT recipients, encompassing several complex nonimmune factors, is not well understood. The aim of this study was to estimate the rate of HLA alloimmunization before HSCT, identify

subjects with a higher risk for or overt immune-mediated PR after transplantation, and evaluate the impact of cross-matched PLTs transfusion on clinical and laboratory outcomes during and after allo-HSCT.

MATERIAL AND METHODS

This was a prospective cohort study enrolling all patients undergoing allo-HSCT at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) between January 2018 and July 2021. Patients were included irrespective of age, sex, underlying disease, donor type, and graft source. Exclusion criteria comprised any procedures that could interfere with anti-HLA antibodies level and formation, such as multiple hematopoietic progenitor cells (HPC) transplantation and the use of a donor-specific anti-HLA antibody (DSA) desensitization protocol. [12]

This study was registered on the Brazilian National Platform for Research Ethics (Plataforma Brasil da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa - CONEP) and approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Ethics Research Committee (CAAE 85047318.5.0000.5327). The study was conducted in accordance with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki.

Data collected and analyzed for each patient comprised age, gender, underlying disease, graft source, HLA typing (Class I), HLA antibody screen for Class I, degree of HLA matching, ABO compatibility, type of donor, conditioning regimen, graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis, neutrophil and PLT engrafting time, use of vancomycin and amphotericin B, World Health Organization (WHO) grade 3 to 4 bleeding episodes [13], and number of transfusions.

Once PR was suspected by the apparent low PLT response or increased need for transfusion, the CCI was calculated, and the flow cytometry platelet cross-matching (FCPCM) was performed. PR was defined as 1-hour CCI <5000 and/or 24-hour CCI <2500 on two consecutive transfusions using ABO-identical fresh PLTs. [2,3] CCIs were calculated using the formula as follows: $CCI = [\text{post-transfusion PLT count } (10^9/L) - \text{pre-transfusion PLT count } (10^9/L)] \times [(\text{body surface area } (m^2)/\text{dose of transfused PLT } (10^{11}))]$. [2]

Other post-HSCT complications, such as infectious events, sepsis, GVHD, disseminated intravascular coagulation (DIC), veno-occlusive disease (VOD), and thrombotic microangiopathy (TMA), were also recorded. We defined nonimmune-mediated causes for PR as an episode of fever ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), bleeding (grade 3 to 4), DIC, infection, TMA, and splenomegaly. Transplant-associated TMA was defined as microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia, renal failure, and high levels of serum lactate dehydrogenase. [14,15]

GVHD was stratified through clinicopathological criteria for the diagnosis and staging of the condition, [16] and VOD was diagnosed according to the Modified Seattle Criteria. Low molecular weight heparin (LMWH) was part of VOD prophylaxis for some patients. [17]

Allo-HSCT was classified by donor type (related, matched unrelated, and haploidentical), as well as by graft source [peripheral blood stem cells (PBSC), bone marrow (BM), or umbilical cord blood (UCB)]. ABO incompatibility if present was classified as major (presence of recipient ABO antibodies to donor ABO antigens), minor (donor ABO antibodies to recipient antigens), or bidirectional (both donor antibodies to recipient antigens and recipient antibodies to donor antigens are present). Infused CD34+ cell dose was stratified as low ($< 2.0 \times 10^6/\text{kg}$), intermediate (between 2.0×10^6 and $6.0 \times 10^6/\text{kg}$), or high ($> 6.0 \times 10^6/\text{kg}$). [18]

Conditioning regimens used were categorized as myeloablative conditioning (MAC) or non-myeloablative (NMA) or reduced-intensity conditioning (RIC) according to consensus guidelines. [19] Routine supportive care consisted of antimicrobial prophylaxis and broad-spectrum antibiotic therapy when needed, following an institutional protocol. [8]

Neutrophil and PLT engraftment were defined as absolute neutrophil count $> 0.5 \times 10^9/\text{L}$ in the first 3 consecutive days and PLT count $> 20 \times 10^9/\text{L}$ in the first 7 of consecutive days without transfusion support, respectively. [20]

Transfusion Support

Our institutional protocol recommends red blood cell concentrate (RBC), if Hb below 6-7g/dL and, PLTs concentrate, if PLTs < 20000 , even without signs of bleeding,

or with the presence of active bleeding, regardless of laboratory values. RBC and PLT for transplant patients are routinely leukoreduced and irradiated to a minimum of 25Gy, and PLT are either apheresis (preferentially) or pooled random donor.

Platelet ABO matching categories were defined as follows: ABO-identical; ABO minor mismatch; and major mismatch. Only ABO-identical transfusions were classified as compatible. Plasma-incompatible transfusions were classified as minor incompatible, while A/B antigen-incompatible transfusions were classified as major incompatibility. Transfusions that were incompatible for both plasma and A/B antigens were classified as bidirectional incompatibility. [21]

All apheresis PLTs from group O donors were tested for high titre anti-A and anti-B antibodies. When an identical blood group was not available, a low anti-A and/or anti-B titer guided apheresis selection. When low agglutinin titer apheresis was also not possible, incompatible plasma was removed before transfusion. [22] Events where more than one PLT transfusion were administered during a single response evaluation period were excluded from the analysis. PLT transfusions in which information was pending were also excluded from the analysis.

Detection of anti-HLA and HPA antibodies

The detection of anti-HLA antibodies (PRA) was performed by solid-phase assay for Class I HLA (LABScreen®, Single Antigen, One Lambda Inc.), according to the manufacturer's instructions. The strengths of antibody specificities were determined with HLA Fusion 4.3 software (One Lambda, Inc). The fluorescent cut-off set was ≥ 1000 . We used a similar methodology to assay anti-HPA antibodies, with a Pak-Lx™ Assay kit (Immucor Inc.). This assay detects antibodies against epitopes on the platelet glycoproteins IIb/IIIa, Ib/IX, Ia/IIa, and IV, and class I HLA. [23] The decision on testing retrospectively for anti-HPA was based on anti-HLA Class I levels, FCPCM, and physician's evaluation. All patients provided written informed consent before performing this test.

HLA alloimmunization was defined as an increase in panel reactive antibody (PRA) score $\geq 20\%$. [24] Patients with PRA Class I $\geq 20\%$ performed the screening test for immune PR (IPR) through the FCPCM. IPR confirmed patients started to receive

transfusion with cross-matched PLTs. Also, if reactivity was detected to at least two random PLTs (out of 14 tested), PR was considered secondary to alloimmunization. [4]

FCPCM was performed by incubating PLTs from donors with serum from refractory patients, followed by the addition of anti-IgG antibodies (Sigma-Aldrich) conjugated to a fluorophore (FITC). Briefly, PLTs were washed and resuspended in buffered saline solution 0.1% (PBS/EDTA) and then incubated with serum for 30 min at 37°C. After a succession of 4 washes in PBS/EDTA, the sample was incubated with anti-IgG marked with FITC for 30 min at room temperature. The cells were washed again before acquisition in the flow cytometer (FACS Canto II). The results obtained in median channel fluorescence (MCF) values were transformed into median channel shift (MCS) values by subtracting the fluorescence value for the patient's serum from the fluorescence value by subtracting the MCF of negative control serum from the MCF of recipient serum. The crossmatch test was considered positive when MCS was ≥ 63 channels. [23]

Donors were typed at low resolution using the SSO method (Labtype-A, B, C, One Lambda Inc.), measured on a flow cytometry platform Luminex, and analyzed with HLA Fusion software (One Lambda Inc.). Genomic DNA from peripheral blood leukocytes was extracted using the Qiagen DNA column method (Qiagen, Inc), followed by a polymerase chain reaction. [23]

Statistical analysis

Continuous variables were presented as mean and standard deviation or median and range (minimum and maximum), according to the assessment of their distribution by the Shapiro-Wilk test. Categorical variables were described as absolute and relative frequency. The difference in the means of independent variables was evaluated using the Student's t-test or the Mann-Whitney U test, ANOVA or Wilcoxon Signed Rank test, according to the distribution of the variable. For the difference between proportions, the Pearson Chi-squared test or Fisher's exact test were used. To evaluate the diagnostic performance of baseline MFI and platelet refractoriness (PR) pre-transplant PR and pos-transplant PR (after 30 days), we constructed a receiver operating characteristic (ROC) curve. A significance level of

0.05 was used for all comparisons. Statistical analysis was performed in IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0 (Armonk, NY: IBM Corp).

RESULTS

We screened 88 patients undergoing allo-HSCT between January 2018 and July 2021. During this period, four patients were excluded from the prospective cohort: two received desensitization protocol for DSA antibodies, and two developed graft failure and needed an additional HPC transplant during the same hospitalization. Furthermore, for one patient, data on outcomes were not available by the time the present analysis was performed and consequently not included in this report.

A total of 83 patients (50 males, 33 females) were enrolled in this study. The median age for the whole population was 14 years (range 0 - 58). Fourteen (16.9%) female patients had anti-HLA antibodies before transplant. There was no association between alloimmunization and previous pregnancies ($p=0.577$). Twenty-five patients (30.1%) had splenomegaly identified on imaging examination or by physical examination in the pre-transplant evaluation. Baseline information from patients and transplant procedures are summarized in **Table 1 and 2**, respectively.

Patients were grouped into five categories based on the underlying disease: acute lymphoid leukemia; acute myeloid leukemia; bone marrow failure syndromes (aplastic anemia, dyskeratosis congenita, and myelodysplastic syndrome); other malignant diseases (chronic myeloid leukemia, myelofibrosis, Hodgkin's lymphoma, and non-Hodgkin's); and other non-malignant diseases (beta thalassemia, Wiskott-Aldrich syndrome, hemophagocytic lymphohistiocytosis syndrome, X-linked adrenoleukodystrophy, Griscelli syndrome type 2, mucopolysaccharidosis, severe combined immunodeficiency syndrome and hereditary porphyria).

The most frequent underlying disease was acute lymphoid leukemia (ALL), followed by acute myeloid leukemia (AML) and bone marrow failure syndromes. Among bone marrow failure patients, approximately 67% were already HLA alloimmunized at the time of hospital admission for transplant, representing more than a third of all patients with reactive PRA at this time point ($p=0.047$), followed by AML

(20.7%). All patients with bone marrow failure had a previous history of 15 or more transfusions.

A higher proportion of patients received NMA/RIC (57.8%) instead of MAC (42.2%) conditioning. There was no association between conditioning regimen and alloimmunization, or with PR at 30 days; $p=0.609$ and $p=1.000$, respectively. Unrelated donors were the major type of donor (44.6%), with a full HLA match found in 60.2% of transplants. There was also no association between the donor HLA compatibility and alloimmunization at 30 days after HPC infusion, $p=0.124$.

The preferred graft source was BM (65.1%), followed by PBSC (31.3%), and UCB (2.4%). Most patients with PR at 30 days ($n=26$, 60.5%) received BM. However, the difference of PR rate between HPC source was not statistically significant ($p=0.493$). The median CD34+ cell dose infused was 4.9 (3.2 - 6.8) $\times 10^6/\text{Kg}$ of recipient weight. In one patient, CD34+ count was not informed.

The analysis for PR was performed in patients who were considered alloimmunized based on a starting HLA Class I PRA score $\geq 20\%$. Of these, 11 (13.2%) patients had a PRA $\geq 20\%$, six (7.2%) PRA $\geq 60\%$ and five (6.0%) PRA $\geq 80\%$ (considered hyperimmunized). The study protocol is illustrated in **Figure 1**.

A total of 16 IRP patients had been also screened for HPA antibodies. One patient had antibody against glycoprotein IIb/IIIa, three had anti-HLA, eight were negative. For technical reasons, it was not possible to analyze the remaining four patients. The specificities of platelet-reactive anti-HLA and anti-HPA alloantibodies were found in 29 (34.9%), including 28 (33.7%) with anti-HLA alloantibodies only, 1 (1.2%) with both anti-HLA and anti-HPA alloantibodies. The frequency of anti-HLA antibodies is showed in **Table 3**.

For 63 patients (75.9%), information on day 30 post-transplant anti-HLA antibody screen was available. Of these, 28 (44.4%) patients maintained a negative screen for anti-HLA Class I antibodies, 21 (33.3%) persisted alloimmunized, 4 (6.4%) showed disappearance of previous anti-HLA antibodies, and 10 (15.9%) who were not alloimmunized before HSCT, developed anti-HLA antibodies. One patient developed antibody against glycoprotein IIb/IIIa. Twenty (31.7%) patients had no information on

day 30 anti-HLA antibody screen, nine of them due to logistical problems in sample collection, seven had already been discharged at day 30 and four died before 30 days of transplantation.

All PLTs transfusions from HSCT admission to HPC infusion were evaluated through the CCI to identify potential PR patients. We observed that 18/83 patients (21.7%) met the criteria for PR before transplant; 15 patients (18.0%) presented immune and non-immune factors, and three patients only non-immune factors. Of the 15 patients with immune and non-immune PR before transplant, nine had PRA \geq 20% and positive FCPCM, and seven patients had PRA $<$ 20% (four of them showed a negative FCPCM; three did not undergo FCPCM and showed an MFI $<$ 3000).

A total of 435 transfusions were performed in 15 patients with immune and non-immune PR and 24h-CCI was able to be calculated in 339 (77.9%) of them. From those nine patients selected by PRA and positive FCPCM, eight effectively underwent PLT cross-matching protocol in two or more transfusions, receiving a total of 132 cross-matched PLT apheresis units and a median 24h-CCI of 3176 (-33420 – 104855). The proportion of successful transfusions considering CCI \geq 4500 was 44.7%. The characteristics of eight patients who underwent PLT cross-matching protocol are summarized in **Table 4**.

Diagnostic performance of the baseline maximum MFI, identified in PRA, in the identification of patients PR, in the pre-transplant period, evaluated through a ROC Curve (**Figure 2**), showed an AUC of 0.875 (IC 95%: 0.710 - 1.00); $p=0.023$. Maximum MFI at baseline also showed a significant discriminative performance when post-transplant PR (at day 30) was considered, with an AUC=0.733 (IC 95%: 0.539 - 0.927); $p=0.043$.

Our results showed an association between baseline maximum MFI and persistence of anti-HLA antibodies 30 days post-HSCT, median MFI for these with antibody persistence 7383 (1581 - 29110) versus 1688 (1360 - 4089) median MFI for those patients whose antibodies have disappeared until 30 days, $p=0.018$ (**Figure 3**).

Analysis of the impact of cross-matched PLT transfusion on the persistence of anti-HLA antibodies, measured by MFI, did not show a statistically significant

difference ($p=0.626$). Median MFI when PLTs were cross-matched was 11378 (3393 - 14174) and, when not performed, was 16144 (8364 - 18792), $p=0.592$. The median of the number of PLTs transfused was 11 (4 - 31) for cross-matched PLTs apheresis units; when not performed, the median 8.5 (6 - 12), $p=0.608$.

When considering the whole sample (83 patients), a total of 1513 PLTs transfusions were performed. The number of PLTs transfusions showed a median of 11 units, ranging from 1 to 119. There was also no association between the number of PLTs transfusions transfused and alloimmunization at 30 days after HPC infusion, $p=0.165$. A total of 2238 blood components transfused showed a median of 15 units, ranging from 0 to 174. There was also no association between the number of total blood components transfused and alloimmunization at 30 days after HPC infusion ($p=0.147$).

The presence of anti-HLA antibodies before HSCT did not influence neutrophil or PLT engraftment, $p=0.694$ e $p=0.609$, respectively; neither did the presence of anti-HLA antibodies after HSCT, $p=0.796$ e $p=0.846$ respectively.

Eighteen (21.7%) patients had bleeding episodes after HSCT, 10 (12%) patients had grade III-IV bleeding, and two (2.4%) patients died because of bleeding. The most frequent bleeding site was genitourinary ($n=10$, 55.6%), followed by gastrointestinal, pulmonary, central nervous system, gynecological, and others. During hospitalization for transplantation, 15 patients died. Sepsis was the cause of death in 13 patients (86.7%), followed by intracranial and genitourinary bleeding.

DISCUSSION

Patients who have undergone an allogeneic HSCT often demonstrate poor increments to PLTs transfusions due to a combination of immune and non-immune causes, including pre-existing HLA alloimmunization, medications, viral infections and sepsis. [25]

The incidence of alloimmunization has been estimated to be 20 - 60% among hematological patients requiring chronic platelet transfusion support [26], and the

reported incidence of PR in hematology/oncology range from 7 and 34%. [7] Authors who evaluated alloimmunization in adult and pediatric patients undergoing HSCT reported a rate of 26.2% and 13.8%, respectively. [27,28]

In this study, we evaluated the alloimmunization status and refractoriness to PLTs transfusions in 83 adult and pediatric patients before performing allo-HSCT and identified 29 patients (34.9%) presenting anti-HLA Class I and 18 (21.7%) patients with established PR. We found an association between the bone marrow failure syndromes and alloimmunization ($p=0.047$).

The type of stem cell source can also influence CCI. There was a higher rate of PR in patients who received UCB as compared to patients who received PBSC. [29] In our analysis, there was no association between the different sources of HPC, $p=0.493$. Nonetheless, consistent with other studies, we observed that patients who underwent UCBT can present delayed platelet PLT engraftment due to the low number of CD34+ cells infused, higher PLT transfusion requirements, and association with PR. [8]

The retrospective evaluation of 491 allo-HSCT recipients concluded that prolonged severe thrombocytopenia (after day +28), acute grade III–IV GVHD and TMA were associated with life-threatening bleeding after allo-HSCT. Of these, 126 allo-HSCT recipients experienced a hemorrhagic event (25.7%), and 46 patients developed a life-threatening bleeding episode (9.4%). Pulmonary and gastrointestinal bleeding were the most common sites for life-threatening bleeding, followed by the central nervous system. [14] In the current study, 18 (21.7%) patients had bleeding episodes after HSCT, 10 (12%) patients had grade III-IV bleeding, and two (2.4%) patients died because of bleeding.

HLA antibody formation is dynamic and depends not only on presensitization but also on ongoing exposure to new HLA antigens. [30] Exposure to PLTs antigens through transfusions may play a contributory role in the development of new and/or increasing titers of HLA antibodies in the post-transplant setting. The persistence of HLA antibodies more than 100 days after HSCT may be related to the use of the RIC regimen that allows the recipient's HLA antibody-producing plasma cells to have a better chance of surviving compared to transplant regimens using myeloablative

conditioning. [25] Our results, did not find an association between the number of PLTs transfused, neither conditioning regimen RIC, and alloimmunization at 30 days, $p=0.608$ and $p=0.609$, respectively.

Authors observed that the duration of HLA-antibody persistence post-transplant was strongly associated with pre-transplant HLA-antibody level of intensity, as measured by MFI and PRA. This finding has important implications for the post-transplant transfusion management of highly HLA allosensitized patients (especially those with MFI >10000) in terms of maintaining an inventory of HLA-matched PLTs for a prolonged time after transplant (>100 days) in those patients who continue to require platelet transfusion support. [25] We found an association between baseline maximum MFI (median 7383) and persistence of anti-HLA antibodies 30 days post-HSCT.

Seike et al. evaluated 16 patients that received a total of 241 PLTs, of which 139 PLTs were cross-matched, and 157 (65.1%) transfusions under situations with non-immune-mediated PR. A 24h-CCI ≥ 4500 was considered a successful transfusion. When patients had non-immune-mediated PR, the median 24h-CCI was 1856 and the successful transfusions occurred only 28.1% for cross-matched PLTs. In the analysis of all transfusions, the median 24h-CCI was 2626 and the transfusion success rate was 38.1% for cross-matched PLT. [7] In our study, we observed a superior response in cross-matched PLTs for PR-associated non-immune factors. A total of 435 PLT transfusions were performed in 15 patients, and the 24h-CCI was calculated at 339 (77.9%) transfusions. Of these, 132 (38.9%) PLTs were cross-matched. The 24h-CCI and the rates of successful transfusion (CCI ≥ 4500) was 3176 and 44.7%, respectively.

PR is a complex challenge for both clinical teams and transfusion medicine services. Immune causes of PLT transfusion refractoriness represent an opportunity to provide truly personalized transfusion services that can resolve bleeding. [31] The proposed practice to early identification of patients who have antibodies against HLA Class I before transplantation, can help save time, costs and streamline management, especially in the provision of PLT products for these patients in the HSCT setting, where the consequence of alloimmunization and PR can be severe with the risk of life-threatening bleeding.

REFERENCES

1. Cohn CS. Platelet transfusion refractoriness: How do I diagnose and manage? *Am Soc Hematol*. 2020 Dec 1;20(1):527–32.
2. 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*. 1997;337(26):1861–9.
3. Rebullà P. A mini-review on platelet refractoriness. *Haematologica*. 2005;90(2):247–53.
4. Juskewitch JE, Norgan AP, De Goey SR, Duellman PM, Wakefield LL, Gandhi MJ, et al. How do I ... manage the platelet transfusion–refractory patient? *Transfusion*. 2017;57(12):2828–35.
5. Belizaire R, Mack J, Kadauke S, Kim Y, Saidman S, Makar RS. Red blood cell alloantibodies are associated with increased alloimmunization against human leukocyte antigens. *Transfusion*. 2019;59(7):2256–63.
6. Linjama T, Niittyvuopio R, Tuimala J, Pyörälä M, Rintala H, Rimpiläinen J, et al. Platelet donor selection for HLA-immunised patients; the impact of donor-specific HLA antibody levels. *Transfus Med*. 2017;27(5):375–83.
7. Seike K, Fujii N, Asano N, Ohkuma S, Hirata Y, Fujii K, et al. Efficacy of HLA virtual cross-matched platelet transfusions for platelet transfusion refractoriness in hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion*. 2020;60(3):473–8.
8. Solves P, Sanz J, Freiria C, Santiago M, Villalba A, Gómez I, et al. Factors influencing platelet transfusion refractoriness in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2018;97(1):161–7.
9. Christou G, Kekre N, Petrcich W, Tokessy M, Neurath D, Giulivi A, et al. Impact of platelet transfusion on toxicity and mortality after hematopoietic progenitor cell transplantation. *Transfusion*. 2015;55(2):253–8.
10. Meinke S, Karlström C, Höglund P. Complement as an Immune Barrier in

- Platelet Transfusion Refractoriness. *Transfus Med Rev.* 2019 Oct 1;33(4):231–5.
11. Wang J, Xia W, Deng J, Xu X, Shao Y, Ding H, et al. Analysis of platelet-reactive alloantibodies and evaluation of cross-match-compatible platelets for the management of patients with transfusion refractoriness. *Transfus Med.* 2018;28(1):40–6.
 12. Ciurea SO, Al Malki MM, Kongtim P, Zou J, Aung FM, Rondon G, et al. Treatment of allosensitized patients receiving allogeneic transplantation. *Blood Adv.* 2021;5(20):4031–43.
 13. Slichter SJ, Kaufman RM, Assmann SF, McCullough J, Triulzi DJ, Strauss RG, et al. Dose of Prophylactic Platelet Transfusions and Prevention of Hemorrhage. *N Engl J Med.* 2010;362(7):600–13.
 14. Labrador J, López-Corral L, Vazquez L, Sánchez-Guijo F, Guerrero C, Sánchez-Barba M, et al. Incidence and risk factors for life-threatening bleeding after allogeneic stem cell transplant. *Br J Haematol.* 2015;169(5):719–25.
 15. Ruutu T, Barosi G, Benjamin RJ, Clark RE, George JN, Gratwohl A, et al. Diagnostic criteria for hematopoietic stem cell transplant-associated microangiopathy: Results of a consensus process by an International Working Group. *Haematologica.* 2007;92(1):95–100.
 16. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease : I . Diagnosis and Staging Working Group Report. 2005;955:945–55.
 17. Carreras E. How I manage sinusoidal obstruction syndrome after haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol.* 2015;168(4):481–91.
 18. Yuan S, Yang D, Nakamura R, Zhuang L, Al Malki MM, Wang S. RBC and platelet transfusion support in the first 30 and 100 days after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion.* 2019;59(11):3371–85.

19. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, et al. Defining the Intensity of Conditioning Regimens : Working Definitions. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(12):1628–33.
20. Kim H, Armand P. Clinical Endpoints in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Studies: The Cost of Freedom. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2014;19(6):860–6.
21. Malvik N, Leon J, Schlueter AJ, Wu C, Knudson CM. ABO-incompatible platelets are associated with increased transfusion reaction rates. *Transfusion.* 2020;60(2):285–93.
22. American Red Cross. A Compendium of Transfusion Practice Guidelines. 4.0. 2021.
23. Fagundes IS, Franz JM, Jobim MS, Arend A, Merzoni J, Cardone JM, et al. Diagnosis and treatment of immunological platelet refractoriness by histocompatibility. *Hum Immunol.* 2020;81(5):197–201.
24. Hess JR, Trachtenberg FL, Assmann SF, Triulzi DJ, Kaufman RM, Strauss RG, et al. Clinical and laboratory correlates of platelet alloimmunization and refractoriness in the PLADO trial. *Vox Sang.* 2016;111(3):281–91.
25. Fasano RM, Mamcarz E, Adams S, Donohue Jerussi T, Sugimoto K, Tian X, et al. Persistence of recipient human leucocyte antigen (HLA) antibodies and production of donor HLA antibodies following reduced intensity allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2014;166(3):425–34.
26. Pavenski K, Freedman J, Semple JW. HLA alloimmunization against platelet transfusions: Pathophysiology, significance, prevention and management. *Tissue Antigens.* 2012;79(4):237–45.
27. Ishida A, Handa M, Wakui M, Okamoto S, Kamakura M, Ikeda Y. Clinical factors influencing posttransfusion platelet increment in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation-a prospective analysis. *Transfusion.* 1998 Sep;38(9):839–47.

28. Balduini CL, Salvaneschi L, Klersy C, Noris P, Mazzucco M, Rizzuto F, et al. Factors influencing post-transfusional platelet increment in pediatric patients given hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2001;15(12):1885–91.
29. Solves P, Sanz J, Freiria C, Santiago M, Villalba A, Gómez I, et al. Factors influencing platelet transfusion refractoriness in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2018 Jan 1;97(1):161–7.
30. Bowen D, Karakantza M. Thrombocytopenia and platelet transfusion in myelodysplastic syndromes. *Transfusion*. 2020;60(10):2164–7.
31. Juskewitch JE, Gandhi MJ, Kreuter JD, Norgan AP. Development and performance characteristics of Platelet Virtual Crossmatch (PLT VXM), a software application for the evaluation and management of platelet transfusion–refractory patients. *Transfusion*. 2020;60(10):2284–93.

Table 1. Baseline patient

Characteristics	Patients (N=83)
Age, median (range)	14 (0-58)
Gender: male, n (%)	50 (60.2)
Previous pregnancies, n (%)	
No	24/33 (72.7)
1	6/33 (18.2)
2	3/33 (9.1)
Splenomegaly, n (%)	25 (30.1)
Diagnosis, n (%)	
Acute lymphoid leukemia	26 (31.3)
Acute myeloid leukemia	17 (20.5)
Bone marrow failure syndromes	15 (18.0)
Other malignant diseases	13 (15.7)
Other non-malignant diseases	12 (14.5)

Table 2. Transplant characteristics

Characteristics	Patients (N=83)
Donor, n (%)	
Related	22 (26.5)
Unrelated	37 (44.6)
Haploidentical	24 (28.9)
ABO blood group compatibility, n (%)	
ABO compatible	44 (53.0)
Minor mismatch	13 (15.7)
Major mismatch	22 (26.5)
Bidirectional	4 (4.8)
Conditioning regimen, n (%)	
Myeloablative	35 (42.2)
Non-myeloablative/reduced intensity	48 (57.8)
Stem cell source, n (%)	
Peripheral blood	26 (31.3)
Bone marrow	54 (65.1)
Umbilical cord	2 (2.4)
Peripheral blood + bone marrow	1 (1.2)
Infused CD34+ x 10 ⁶ /Kg	
Mean (SD)	4.9 (±2.4)
Low <2 x 10 ⁶ /Kg, n (%)	8 (9.8)
Intermediate 2 - 6 x 10 ⁶ /Kg, n (%)	48 (58.5)
High >6 x 10 ⁶ /Kg, n (%)	26 (31.7)
GVHD prophylaxis, n (%)	
CSA	7 (8.4)
(TAC or CSA) + MTX	29 (34.9)
(TAC or CSA) + MMF	10 (12.0)
TAC or CSA + MTX + ATG	13 (15.7)
PTCy and related conditioning regimens	15 (18.1)
Others	9 (10.9)
Engraftment, n (%)	
Neutrophil	77 (92.7)
Platelet	61 (73.5)
Complications after HSCT, n (%)	
Grade III-IV acute GVHD	13 (15.7)
Grade III-IV bleeding	10 (12.0)
Veno-occlusive disease	4 (4.8)
Thrombotic microangiopathy	5 (6.0)

SD, standard deviation; GVHD, graft-versus-host disease; CSA, ciclosporin; TAC, tacrolimus; MTX, methotrexate; MMF, mycophenolate mofetil; ATG, anti-thymocyte globulin; PTCy, post-transplant cyclophosphamide; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation.

Table 3. Different anti-HLA Class I antibodies frequency in 29 patients before HSCT.

-HLA-A	n	Frequência %	-HLA-B	n	Frequência %	-HLA-C	n	Frequência %
A1	4	13,8	B76	10	34,5	Cw5	3	10,3
A11	4	13,8	B45	9	31,0	Cw15	3	10,3
A23	4	13,8	B44	8	27,6	Cw1	2	6,9
A34	4	13,8	B82	7	24,1	Cw17	2	6,9
A66	4	13,8	B56	6	20,7	Cw2	1	3,4
A2	3	10,3	B81	6	20,7	Cw4	1	3,4
A24	3	10,3	B13	5	17,2	Cw6	1	3,4
A29	3	10,3	B41	5	17,2	Cw7	1	3,4
A43	3	10,3	B61	5	17,2	Cw12	1	3,4
A80	3	10,3	B67	5	17,2	Cw18	1	3,4
A3	2	6,9	B7	4	13,8			
A25	2	6,9	B27	4	13,8			
A26	2	6,9	B42	4	13,8			
A32	2	6,9	B48	4	13,8			
A33	2	6,9	B50	4	13,8			
A36	2	6,9	B55	4	13,8			
A68	2	6,9	B57	4	13,8			
A69	2	6,9	B60	4	13,8			
A30	1	3,4	B73	4	13,8			
A31	1	3,4	B8	3	10,3			
A74	1	3,4	B37	3	10,3			
			B49	3	10,3			
			B53	3	10,3			
			B58	3	10,3			
			B63	3	10,3			
			B75	3	10,3			
			B77	3	10,3			
			B35	2	6,9			
			B38	2	6,9			
			B39	2	6,9			
			B46	2	6,9			
			B47	2	6,9			
			B51	2	6,9			
			B52	2	6,9			
			B54	2	6,9			
			B59	2	6,9			
			B62	2	6,9			
			B64	2	6,9			
			B65	2	6,9			
			B71	2	6,9			
			B72	2	6,9			
			B18	1	3,4			
			B78	1	3,4			

HLA, human leukocyte antigen; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation.

Table 4. Clinical and laboratorial features of patients with immune and non-immune platelet refractoriness who received platelet cross-matching transfusion.

Clinical and laboratorial features	Patient							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Age	11	45	46	31	52	30	27	24
Gestation history	No	NA	1	NA	2	NA	1	1
Previous transfusion	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Diagnosis	Beta Thalassemia	Hodgkin's Lymphoma	AA	AA	AML	CML	AA	AA
Splenomegaly	Yes	No	No	Yes	No	No	No	No
Fever	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	No
Infection	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	No	No
Bleeding	No	Yes	Yes	No	No	No	Yes	Yes
Use of medication								
Heparin	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No
Amphotericin	No	No	No	No	No	No	No	No
Vancomycin	Yes	No	No	Yes	Yes	No	No	No
Class I PRA	95	98	81	41	35	19	92	74
Anti-HPA	GIIa-IIIb	No	No	No	No	No	No	No
Baseline maximum MFI	29110	13600	15618	7571	9259	10966	7983	12433

NA, not applicable; AA, aplastic anemia; AML, acute myeloid leukemia; CML, chronic myeloid leukemia.

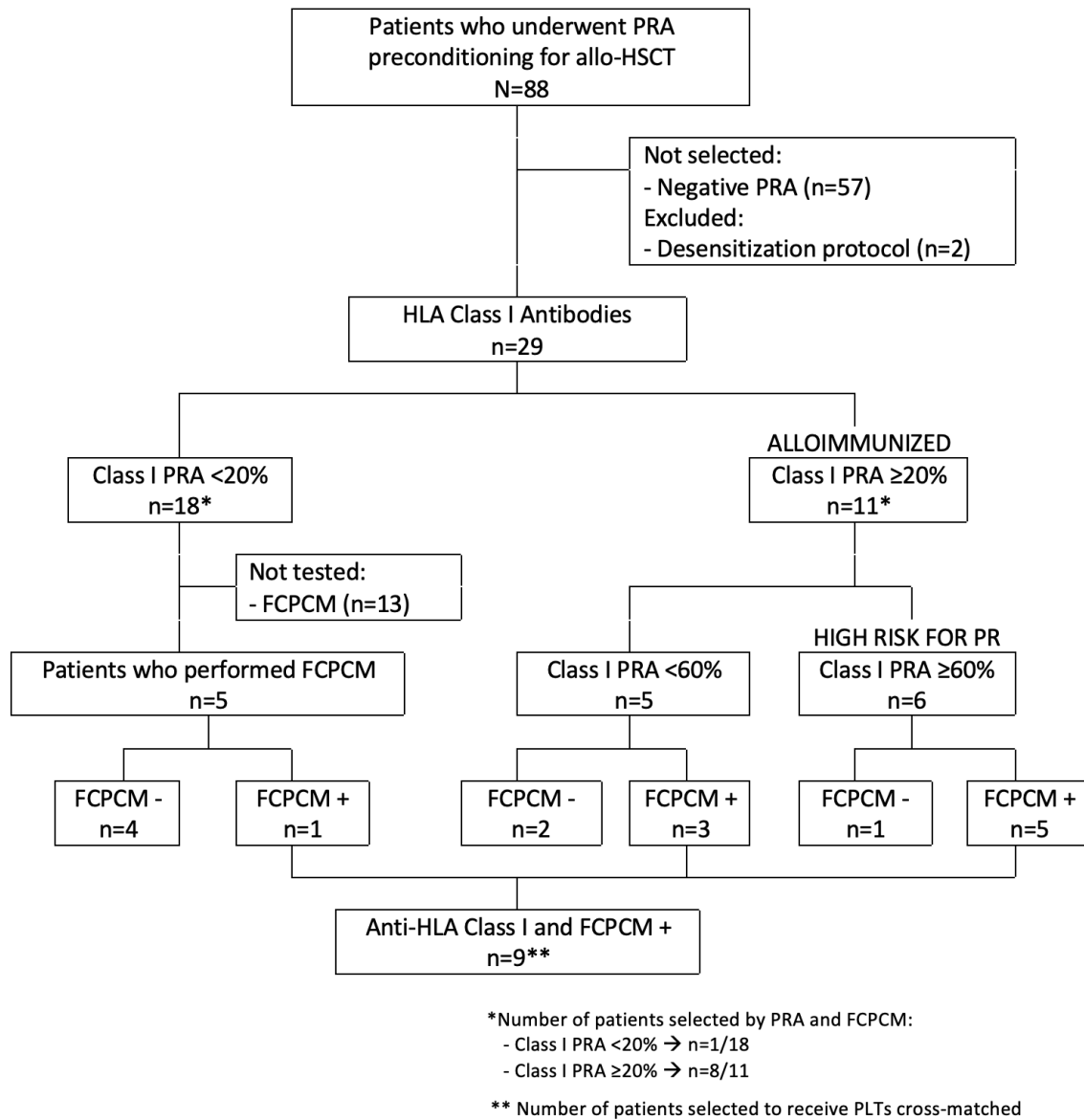


Figure 1. Study protocol for patients undergoing allogeneic HSCT.

Allo-HSCT: allogeneic hematopoietic stem cell transplant; HLA, human leukocyte antigens; PRA, panel reactive antibody; FCPCM, flow cytometry platelet cross-matching; PLTs, platelets.

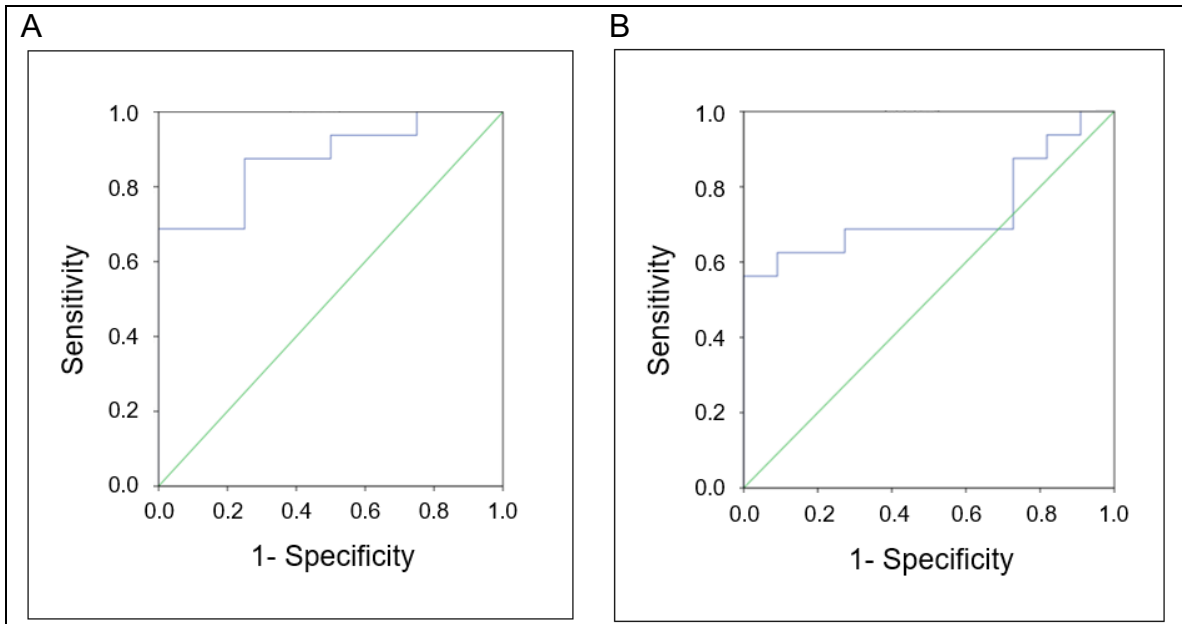


Figure 2. ROC Curve evaluating diagnostic performance of baseline MFI and platelet refractoriness. (a) Pre-transplant PR; (b) Pos-transplant PR.

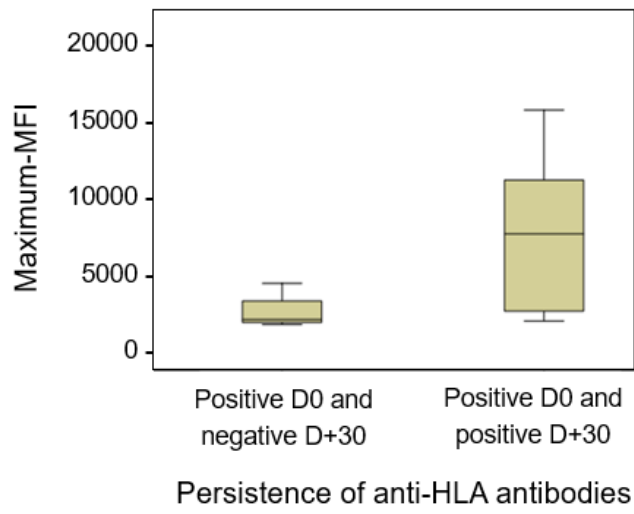


Figure 3. Distribution of maximum MFI levels and persistence of anti-HLA antibodies 30 days post-transplant.

7.2 ARTIGO 2

Predictors of transfusion independence in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Background and Objectives: Patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) usually require substantial transfusion support of red blood cells (RBC) and platelets (PLT). The aim of this study was to identify factors associated with the number of RBC/PLT transfusions and days of transfusion independence during allogeneic HSCT.

Methods: In this prospective study, we evaluated all transfusions of patients undergoing HSCT at Hospital de Clínicas de Porto Alegre between 2018 to 2021. The number of blood components transfused, and days of transfusion independence were computed along with other HSCT variables.

Results: Patient and transplantation specific data from 86 patients who underwent HSCT was analyzed. The percentage of patients that transfused RBC or PLT in the period 0-30 days, 31-60 days, and 61-100 days after HSCT was 97.7%, 46.3% and 36.4%, respectively. The median sum of days of transfusion independence of RBC between 0-30 days, 31-60 days and 61-100 days were 27, 30 and 40, respectively. Regarding PLT, the median sum of days of transfusion independence between 0-30 days, 31-60 days and 61-100 days were 22, 30, 40, respectively. The dose of CD34+ was correlated with early platelet engrafting and patients in remission had a longer timer without transfusion in the 100 days following HSCT.

Conclusion: Results suggest that patient-related factors, and transplantation characteristics may impact on transfusion demand for RBC and PLT in post-HSCT, allowing for the identification of patients who may have a higher possibility of increased transfusion demand. More accurate transfusion estimates might improve management blood components inventory, resulting in a more effective and safer care.

Keywords: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; transfusion; red blood cells; platelet; transfusion independence; transfusion support.

INTRODUCTION

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is often the only ultimate curative treatment for patients with malignant and non-malignant disorders. Nonetheless, this therapy poses great complexity and risk, especially regarding interactions between the HSCT variables and patient individual characteristics[1–3]. According to the World Wide Network of Blood and Marrow Transplantation, HSCT increases 7% per year, currently reaching approximately 90,000 procedures/year [4].

HSCT influence transfusion practice not only at the institution where it is performed, but also in the transfusion services that treat these patients before and after transplantation. Furthermore, even several years after the HSCT, some patients remain immunosuppressed and also may still require blood transfusion [5]. Patients undergoing HSCT require red blood cells (RBC) and platelets (PLT) transfusion support to aid in the management of prolonged cytopenia, bleeding, manifestations of underlying disease or complications of transplantation [2,6–9]. To successfully manage hemorrhagic complications in post-HSCT patients, one should previously identify risk factors associated to increased transfusion support after transplantation. In this way, the blood bank is able to organize a specialized and anticipated care for these patients aiming at a favorable result at the end of the process [6,8].

Notwithstanding the impact of transfusion of blood components in patients undergoing HSCT, evidence regarding transfusion support for these patients is lacking [2,9,10]. The aim of this study was to evaluate the transfusion support of patients undergoing HSCT and to identify the factors that may be associated with an increased transfusion demand for RBC and PLT and factors that may impact transfusion independence.

MATERIAL AND METHODS

This study was registered on the Brazilian National Platform for Research Ethics (Plataforma Brasil da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa - CONEP) and approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Ethics Research Committee (CAAE 85047318.5.0000.5327). The study was conducted in accordance with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki.

Patient inclusion and collection of baseline data

All consecutive patients undergoing allogeneic HSCT at Hospital de Clínicas de Porto Alegre between January of 2018 and July of 2021 were included. Two patients were excluded because they were still hospitalized while final analysis took place. Baseline patient data collected from the registry database at our institution included information from all the inpatient time.

Data collected and analyzed for each patient included: age, gender, underlying disease, remission, graft source, type of donor, HLA compatibility, ABO compatibility, CD34+ dose, amount of total nucleated cells (TNC x 10⁸/kg), conditioning regime, graft-versus-host disease (GVHD), GVHD prophylaxis, grade of GVHD (acute), neutrophil and PLT engraftment time, thrombotic microangiopathy, splenomegaly, number of RBC and PLT transfusion, chimerism and mortality.

Patients were grouped based on the underlying disease: aplastic anemia, myelodysplastic syndrome, leukemias (acute lymphocytic leukemia - ALL, chronic lymphocytic leukemia - CLL, acute myeloid leukemia - AML and chronic myeloid leukemia - CML), lymphoma (Hodgkin and non-Hodgkin diseases, follicular lymphoma, lymphoblastic lymphoma, peripheral T-cell lymphoma), malignant diseases (juvenile myelomonocytic leukemia, mixed phenotype acute leukemia, primary myelofibrosis), non-malignant diseases (beta thalassemia disease, Griscelli syndrome type 2, porphyria hereditary, mucopolysaccharidosis, x-linked adrenoleukodystrophy) and immunodeficiency (hemophagocytic syndrome, Wiskott-Aldrich syndrome, severe combined immunodeficiency).

Collection of transplant data

HSCT was classified by donor type (related, matched unrelated and haploidentical) and stem cell source (peripheral blood stem cells (PBSC), bone marrow (BM) or umbilical cord blood (UCB)). For patients who received two HSCT, the source was variable. ABO incompatibility, if present, was categorized as major incompatibility (receptor's plasma has isohemagglutinins against the donor's erythrocyte), minor (donor's plasma has isohemagglutinins against the recipient's erythrocytes) or bidirectional (both donor and recipient's plasma have isohemagglutinins against each other).

Conditioning regimens used were classified as myeloablative (MA) or non-myeloablative/reduced intensity (NMA/RIC). The choice of conditioning regimen was influenced by patient's underlying disorder, performance status, and comorbidities as well as institutional guidelines. Infused CD34+ cell dose was categorized as low ($\leq 2.0 \times 10^6/\text{kg}$), intermediate $> 2.0 \times 10^6/\text{kg} - < 6.0 \times 10^6/\text{kg}$, or high ($\geq 6.0 \times 10^6/\text{kg}$). Platelet engraftment was defined as the first of seven consecutive days with platelet count $> 20,000/\mu\text{L}$ without transfusion support and neutrophil engraftment was the first of three days with neutrophil count $> 500/\mu\text{L}$. From 30 days after HSCT was regularly evaluated chimerism.

Patients received GVHD prophylaxis according to donor type, classified in matched unrelated, related or haploidentical according with the institutional protocol.

Acute GVHD was considered when diagnosis occurred within the first 100 days after transplantation. Grading of acute GVHD was categorized into grade I and II, III or IV based on established criteria.

Transfusion practice and transfusion independence

Institutional transfusion guideline recommends RBC concentrate if Hb level falls below 6-7g/dL and, PLTs concentrate, if PLT $< 20,000/\mu\text{L}$, even without signs of bleeding, or with the presence of active bleeding, regardless of laboratory values. RBC and PLT transfused were leukoreduced and irradiated to a minimum of 25Gy. All PLT units were, preferentially, collected by apheresis from a single donor.

For patients presenting ABO incompatibility in transplant, the ABO selection of blood components respected the phase pre-, peri-, and post-HSCT. Patients with platelet refractoriness received cross-matched compatible platelets based on panel reactive antibody results. All apheresis PLTs from group O donors were tested for high titer anti-A and anti-B antibodies. When an identical blood group was not available, a low anti-A and/or anti-B titer guided apheresis selection. When low agglutinin titer apheresis was also not possible, incompatible plasma was removed before transfusion [11]. When clinically significant RBC alloantibodies were detected, RBC units with antigen-negative according to the phenotype were recommended.

RBC and/or PLT transfusions were computed according to the period, starting before HSCT between Day -10 and Day -1, followed by Day 0 (day of the graft infusion) until Day 30 after HSCT, Day 31-60 and Day 61 until Day 100 after HSCT. The total RBC and PLT transfusions events in each period were determined considering the number of days transfusion was performed. The transfusion independence (RBC and PLT) was defined as the number of days without transfusion during each period. Number of units transfused was not included at this study.

Statistical analysis

Continuous variables were described as mean and standard deviation or median and interquartile range (or minimum and maximum values) pending on their normal distribution evaluated through Shapiro-Wilk Test. Categorical data were described as absolute and relative frequencies. Differences on the distribution of continuous data among categories were evaluated by Student T test, Mann-Whitney U test, ANOVA or Kruskal-Wallis Signed Rank test, were indicated. Categorical data differences in proportion of events were evaluated through Pearson Chi-square test. Correlations between continuous variables were assessed through Pearson and Spearman Correlation tests. All analyses were performed on IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. (Armonk, NY: IBM Corp).

RESULTS

From 2018 to 2021, a total of 88 patients underwent HSCT at our center. Eventually, 86 patients were enrolled in this study. Two patients were excluded because data outcomes were not available by the time the present analysis was concluded. Patient baseline demographic, clinical data and transplant information are summarized in **Table 1**.

Median age was 14 (range 0-58) years, 59.3% were male patients. Most frequent diagnoses were: ALL (30.2%), AML (19.8%) and aplastic anemia (16.3%), lymphoma (9.3%), immunodeficiency (8.1%), non-malignant disorder (5.8%). Twenty-six (30.2%) patients presented splenomegaly identified on imaging examination or by physical examination in the pre-transplant evaluation, and five (5.8%) had thrombotic microangiopathy. Disease remission was seen in 32 (55.2%) patients. Splenomegaly

was associated with an increase of PLT transfusion in the period of 0-30 days post-HSCT ($p=0.027$). Three patients (3.5%) show RBC alloantibodies and continued to transfuse RBC negative for the corresponding antigen.

A total of 22 (25.6%) patients received graft from matched related donors, 38 (44.2%) matched unrelated donors and 26 (30.2%) haploidentical donors. Bone marrow was the major graft source (66.3%), followed by PBSC (30.2%) and UCB (2.3%). Thirty-seven (43.0%) patients were conditioned with NMA/RIC and 49 (56.9%) with MA regimens.

In 41 (47.7%) cases, ABO incompatibility was present, 23 (26.7%) were major, 14 (16.3%) minor and 4 (4.7%) bidirectional. A higher proportion of patients (58.1%) presented a full HLA match. The median of platelet and neutrophil engraftment days was 19 (range 8-63) and 17 (range 11-27), respectively. The mean of CD34+ and CNT $\times 10^8/\text{kg}$ cell dose infused was $5.0 \times 10^6/\text{kg}$ and $7.1 \times 10^8/\text{kg}$, respectively. In one patient, CD34+ count was not informed. It was found that the dose of CD34+ influenced platelet engraftment (**Figure 1**). Thirty-one (36.0%) patients died, from which six (19.4%) before day 30, four (12.9%) between day 31-60 after HSCT, six (19.3%) between day 61-100 after HSCT and 15 (48.4%) after 100 days of HSCT. Sepsis was the main cause of mortality, followed by genitourinary bleeding.

Transfusion Support

A total of 471 transfusions episodes were performed. The frequency of RBC and PLT transfusions in the 10 days before transplantation was 27.9% and 31.4%, respectively. In the first 30 days after transplant, 93.0% of patients received RBC transfusion and 75.6% received PLT transfusion. The transfusion support of RBC and PLT decreased in the post-transplantation periods more than half, comparing the periods of the first 30 days and 31-60 days after HSCT.

Patients received a mean of $3.2 (\pm 3.3)$ units of RBC in the first 30 days, $1.0 (\pm 1.9)$ unit in 31-60 days and $1.0 (\pm 2.4)$ unit in the 61-100 days after HSCT. The mean of platelets transfused per patient was $10.5 (\pm 8.8)$ units, $3.3 (\pm 6.1)$ units and $3.0 (\pm 7.4)$ units, respectively (**Table 2**).

Sixty-eight (79.1%) patients achieved a complete chimerism. From these, 19 (27.9%) were in the first 30 days after HSCT, 47 (69.1%) between 31-60 days and 2 (3.0%) between 61-100 days after HSCT. In the group with complete chimerism, the mean of RBC and PLT transfusion was 9.7 and 2.8, respectively, while in the group of patients that did not reach chimerism during the follow-up, the mean was 11.9 and 4.4 for RBC and PLT transfusion, respectively.

Transfusion independence

Gender, mortality, complete chimerism and disease in remission were associated with RBC and PLT transfusion and transfusion independence (**Table 3**).

RBC and PLT transfusion independence were analyzed by period. In the first 30 days after HSCT, the mean of RBC transfusion independence was 25.2 (± 5.6) days and 19.9 (± 7.7) days for PLT independence. Between 31-60 days and 61-100 days period the mean of RBC independence was 27.9 (± 5.3) and 36.9 (± 7.6) days, respectively. And the PLT independence was 26.3 (± 7.3) and 35.1 (± 9.9) days, respectively. Results showed that patients who died had a less RBC transfusion independence between 31-60 days and 61-100 days after HSCT and PLT transfusion between 0-30 days and 61-100 days after HSCT.

DISCUSSION

We evaluated the transfusion support in patients undergoing HSCT and described transplant and patient-related characteristics that can impact in an increased transfusion demand and transfusion independence.

Our data showed that disease in remission, male gender, and attainment of complete chimerism influenced transfusion independence in post-HSCT. Studies comparing clinical factors and transfusion independence interval showed additional associations. Viellez et. al [9], evaluating 169 patients identified that male gender, intermediate or advanced disease stage at transplant, use of cord blood stem cells and minor or major ABO incompatibility were predictive factors for increased transfusion demand after HSCT. Our sample had only two patients who received UCB as a source of stem cells and, although not statistically significant, UCB graft patients

apparently needed much more RBC and PLT transfusions within 100 days after transplantation.

Yuan et al. found that female patients were more likely to present PLT transfusion independence than male patients and RBC transfusion independence was similar between gender [7]. Le Viellez et al. found that male gender were associated with increased transfusion demand in the first 30 days after HSCT [9]. In this study, we identified that the male gender was associated with longer intervals without RBC transfusion and higher RBC independence in the first 30 days after HSCT ($p=0.044$). However, there was no association between the time of PLT transfusion independence and gender.

Several studies established that HSCT with ABO incompatibility poses an augmented transfusion demand. Others authors instead reported that patients undergoing HSCT with or without ABO incompatibility have similar transfusion needs [9,12–15]. These different findings may be associated with other variables that impact transfusion support, such as a different conditioning regimen and GVHD prophylaxis, graft source and study sample. This heterogeneity compromises adequate evaluation of the effects of incompatibility ABO in HSCT [12,16,17]. In the present study, we observed that there was no statistically significant difference in the transfusion independence of RBC and PLT when associated with ABO incompatibility in any period evaluated.

Study demonstrated that low doses of CD34+ ($<2.0 \times 10^6/\text{kg}$) were associated with an increased transfusion demand of RBC and PLT and shorter RBC transfusion independence intervals [6]. Another study performed by Yuan et. al [7], also found that low doses of CD34+ were associated with an increase of transfusion requirement, especially in the first 30 days post-HSCT. Our findings confirm that the higher the dose of CD34+, the earlier platelet engraftment takes place ($p=0.012$) and also showed a trend towards an earlier neutrophil engraftment.

The underlying disease can be a confounding factor in the assessment of transfusion support. Therefore, studies frequently restrict patients with certain diagnosis from analysis of transfusion independence [9]. The present study identified the increased transfusions need 10 days before HSCT for both RBC ($p<0.001$) and

PLT ($p < 0.001$) were seen in patients with CML and aplastic anemia, respectively. However, underlying disease did not demonstrate association with RBC and/or PLT transfusion independence in the follow-up period, even though the majority of patients had leukemia as primary disorder (50.0%). In addition, in the post-transplant period, the number of blood component units demanded and transfusion dependence interval should have been greater, although this was not observed in our findings [6].

While underlying disease did not influence transfusion demand during transplantation in this study, other factors directly related to primary diagnosis such as conditioning regimen showed a significant association. Conditioning regimens vary according to diagnosis, graft source and patient-related factors and may change significantly between the transplants centers [2,18]. The NMA/RIC was associated with the need of a higher number of PLT transfusions ($p < 0.001$) during pre-transplant period and demonstrated a trend for a higher number of RBC transfusions also.

Splenomegaly can result in blood and platelet flow redistribution apart from the circulating pool to the splenic pool, leading to thrombocytopenia in patients with this condition. In healthy individuals, one-third of platelets are usually sequestered in the splenic pool [19]. In the present study, we found that patients with splenomegaly needed more platelets transfusions within 0-30 days post-HSCT when compared to patients not presenting the condition ($p = 0.027$).

A study demonstrated that the presence of splenomegaly and use of antiplatelet drugs significantly contributed to platelet transfusion refractoriness. Those factors were also associated with decrease of corrected count increment (CCI), which were additionally associated with other factors such HSCT and fever. Patients who are refractory to platelet transfusions receive a higher number of blood components [20]. In our study, of 26 patients with splenomegaly. Of them, five (19.2%) presented immune refractoriness concomitantly, and 13 (50.0%) non-immune refractoriness (data not shown).

Complete chimerism was achieved in 68 patients within the follow-up period. To maintain engraftment after HSCT, it is important that complete donor hematopoiesis is consolidated [21] and in this context our data show that patients who

presented 100% chimerism in the first 30 days after HSCT presented greater transfusion independence of RBC (median: 27 days, $p=0.022$).

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation donor type may also influence need for transfusions [9]. A study performed in 2021 showed that patients who underwent haploidentical transplant had a lower frequency of PLT transfusion independence. The use of alternative donors instead of matched related donor is always a challenge in HSCT practice. Unfortunately related donors are not always available and the use of haploidentical donors has been increasing in the last few years [22,23]. This alternative source of graft allowed an increase in the number of allogeneic transplants [24].

In a study, graft failure could be observed in 2-15% of patients who underwent HLA matched sibling transplant, unrelated donor or transplant whose graft source was UCB. The authors demonstrated that there was an association of donor-specific HLA antibodies (DSA) with primary graft failure [25]. DSA raises the risk of graft failure as a consequence of genetic disparity between recipient and donor and also may result in higher transfusions needs. However, this difference in transfusion support for both RBC and PLT was not observed in our study when comparing related, unrelated and haploidentical transplant groups in any period analyzed.

GVHD is a serious complication of HSCT, and a cause of late transplant-related mortality [1]. Patients with acute GVHD and intermediary or high risk of disease presented a delay in RBC transfusion independence [26]. Our data did not support a difference between RBC and PLT transfusion independence and type of GVHD prophylaxis regimen adopted, neither with serious (grade III/IV) acute GVHD.

In conclusion, several clinical factors impact on RBC and PLT transfusion independence in patients undergoing allogeneic HSCT. Identification of those factors aid in the anticipation of a more intense transfusion support for some patients. Also, health costs associated with transfusion support may be better estimated in such a scenario, and this may also help institution financial planning. Finally, transfusion demand estimation might optimize the use of blood components and maintain an adequate blood components inventory to meet the transfusion demands of post-HSCT patients.

REFERENCES

1. Kim H, Armand P. Clinical Endpoints in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Studies: The Cost of Freedom. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2014;19(6):860–6.
2. Datta SS, Basu S, Chandy M. An analysis of transfusion support in haematopoietic stem cell transplantation - report from a centre in India. *Transfus Apher Sci.* 2015;53(3):373–7.
3. D'Souza A, Lee S, Zhu X, Pasquini M. Current Use and Trends in Hematopoietic Cell Transplantation in the United States. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2017;23(9):1417–21.
4. Niederwieser D, Baldomero H, Atsuta Y, Aljurf M, Seber A, Greinix HT, et al. One and Half Million Hematopoietic Stem Cell Transplants (HSCT). Dissemination, Trends and Potential to Improve Activity By Telemedicine from the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT). *Blood.* 2019;134(1).
5. Elemetry M, Seghatchian J, Stakiw J, Bosch M, Sabry W, Goubran H. Transfusion challenges in hematology oncology and hematopoietic stem cell transplant – Literature review and local experience. *Transfus Apher Sci.* 2017;56(3):317–21.
6. Griffith LM, VanRaden M, Barrett AJ, Childs RW, Fowler DH, Kang EM, et al. Transfusion support for matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (1993–2010): factors that predict intensity and time to transfusion independence. *Transfusion.* 2019;59(1).
7. Yuan S, Yang D, Nakamura R, Zhuang L, Al Malki MM, Karanes C, et al. Red blood cell and platelet transfusion support in the first 30 and 100 days after allogeneic hematopoietic cell transplant. *Transfusion.* 2020;60(10).
8. Labrador J, López-Corral L, Vazquez L, Sánchez-Guijo F, Guerrero C, Sánchez-Barba M, et al. Incidence and risk factors for life-threatening bleeding after allogeneic stem cell transplant. *Br J Haematol.* 2015;169(5):719–25.

9. Le Viellez A, P'Ng S, Buffery S, Wright M, Cooney J, Cannell P, et al. Red cell and platelet transfusion burden following myeloablative allogeneic haemopoietic stem cell transplantation. *Intern Med J.* 2015;45(12):1286–92.
10. Yuan S, Yang D, Nakamura R, Zhuang L, Al Malki MM, Wang S. RBC and platelet transfusion support in the first 30 and 100 days after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion.* 2019;59(11).
11. American Red Cross. *A Compendium of Transfusion Practice Guidelines.* 4.0. 2021.
12. Solves P, Carpio N, Carretero C, Lorenzo JI, Sanz J, Gómez I, et al. ABO incompatibility does not influence transfusion requirements in patients undergoing single-unit umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2017;52(3):394–9.
13. Dahl D, Hahn A, Koenecke C, Heuft HG, Dammann E, Stadler M, et al. Prolonged isolated red blood cell transfusion requirement after allogeneic blood stem cell transplantation: Identification of patients at risk. *Transfusion.* 2010;50(3):649–55.
14. Watz E, Remberger M, Ringden O, Lundahl J, Ljungman P, Mattsson J, et al. Analysis of donor and recipient ABO incompatibility and antibody-associated complications after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(2):264–71.
15. Goldman J, Liesveld J, Nichols D, Heal J, Blumberg N. ABO incompatibility between donor and recipient and clinical outcomes in allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Res.* 2003 Jun;27(6):489–91.
16. Worel N. ABO-Mismatched Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transfus Med Hemotherapy.* 2016;43(1):3–12.
17. Hefazi M, Litzow M, Hogan W, Gastineau D, Jacob E, Damlaj M, et al. ABO blood group incompatibility as an adverse risk factor for outcomes in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia undergoing HLA-matched peripheral blood hematopoietic cell transplantation after reduced-

- intensity conditioning. *Transfusion*. 2016;56(2):518–27.
18. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, et al. Defining the Intensity of Conditioning Regimens: Working Definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(12):1628–33.
 19. Sigal S, Mitchell O, Feldman D, Diakow M. The pathophysiology of thrombocytopenia in chronic liver disease. *Hepat Med*. 2016 Apr;8:39.
 20. Shastry S, Chaudhary R. Clinical factors influencing corrected count increment. *Transfus Apher Sci*. 2012;47(3).
 21. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant*. 2005;35(2):107–19.
 22. Bailén R, Vicario JL, Solán L, Sánchez-Vadillo I, Herrera P, Calbacho M, et al. Management of Donor-Specific Antibodies in Haploidentical Transplant: Multicenter Experience From the Madrid Group of Hematopoietic Transplant. *Front Immunol*. 2021;12(May):1–10.
 23. Kanakry CG, Fuchs EJ, Luznik L. Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Jan;13(1):10–24.
 24. Gladstone DE, Zachary AA, Fuchs EJ, Luznik L, Kasamon YL, King KE, et al. Partially Mismatched Transplantation and Human Leukocyte Antigen Donor-Specific Antibodies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(4):647–52.
 25. Chang YJ, Zhao XY, Xu LP, Zhang XH, Wang Y, Han W, et al. Donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies were associated with primary graft failure after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation: A prospective study with randomly assigned training and validation sets. *J Hematol Oncol [Internet]*. 2015;8(1):1–10.
 26. Subramanian S, Cohn C, DeFor T, Welbig J, Brunstein C, El Jurdi N, et al. Transfusion burden following reduced intensity allogeneic hematopoietic cell transplantation: Impact of donor type. *Transfusion*. 2021;61(7):2064–74.

Table 1. Data of patients and transplant characteristic

Characteristics	Patients N=86 (%)
Age, median (range)	14 (0-58)
Gender, male	51 (59.3)
Transplant	
Pediatric	51 (59.3)
Adult	35 (40.7)
Primary diagnosis	
Non-malignant diseases	5 (5.8)
Malignant diseases	4 (4.7)
Immunodeficiency	7 (8.1)
Lymphomas	8 (9.3)
Aplastic anemia	14 (16.3)
SMD	2 (2.3)
ALL	26 (30.2)
CLL	1 (1.2)
AML	17 (19.8)
CML	2 (2.3)
Splenomegaly	26 (30.2)
Mortality	31 (36.0)
Thrombotic microangiopathy	5 (5.8)
Chimerism 100%	68 (79.0)
Remission	Patients N=58
Yes	32 (55.2)
Transplant characteristics	Patients N=86 (%)
Year of HSCT	
2017	2 (2.3)
2018	29 (33.7)
2019	23 (26.7)
2020	23 (26.7)
2021	9 (10.5)
Donor	
Related	22 (25.6)
Unrelated	38 (44.2)
Haploidentical	26 (30.2)

Stem cell source	
Peripheral blood	26 (30.2)
Cord blood	2 (2.3)
Bone marrow	57 (66.3)
Peripheral blood + Bone marrow)	1 (1.2)
ABO blood group compatibility	
ABO compatible	45 (52.3)
Minor mismatch	14 (16.3)
Major mismatch	23 (26.7)
Bidirectional	4 (4.7)
Full HLA match	50 (58.1)
Conditioning Regimen Intensity	
MA	49 (57.0)
NMA/RIC	37 (43.0)
Infused CD34+ x 10⁶/Kg	
Mean (SD)	5.0 (2.5)
Low ≤ 2.0 x 10 ⁶ /Kg	7 (8.1)
Intermediate > 2.0 - <6 x 10 ⁶ /Kg	50 (58.2)
High ≥ 6.0 x 10 ⁶ /Kg	29 (33.7)
CNT x 10⁸/kg, mean (SD)	7.1 (4.6)
Acute GVHD	40 (46.5)
Grade GVHD	
I – II	25 (62.5)
III	8 (20.0)
IV	7 (17.5)
Platelet engraftment	
Median (range)	19.0 (8 - 63)
Mean (SD)	21.5 (9.1)
Neutrophil engraftment	
Median (range)	17.5 (11 - 27)
Mean (SD)	18.0 (3.8)
GVHD prophylaxis	
CSA	7 (8.1)
(TAC or CSA) + MTX	30 (34.9)
(TAC or CSA) + MMF	11 (12.8)
TAC or CSA + MTX + ATG	13 (15.1)

PTCy and others	17(19.8)
Others	8 (9.3)

SMD, myelodysplastic syndromes; ALL, acute lymphocytic leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; HLA, Human leukocyte antigen; MA, myeloablative; NMA/RIC, non-myeloablative/ reduced intensity; SD, standard deviation; GVHD, graft-versus-host disease; CSA, ciclosporin; TAC, tacrolimus; MTX, methotrexate; MMF, mycophenolate mofetil; ATG, anti-thymocyte globulin; PTCy, post-transplant cyclophosphamide.

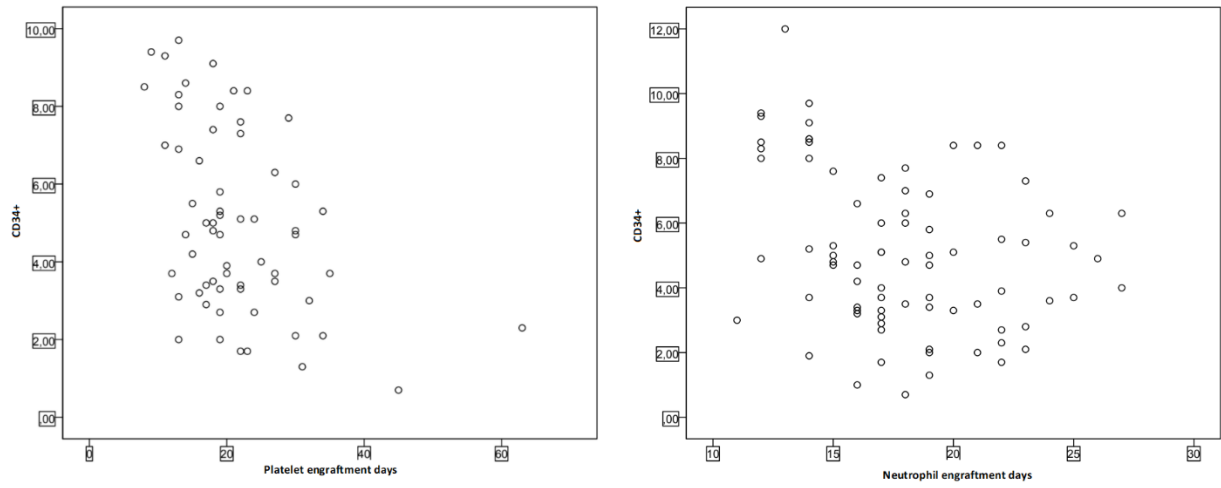


Figure 1. Dose of CD34+ and platelet and neutrophil engraftment days.

Table 2. Support transfusion of red blood cell and platelet according to pre- and post-transplant period and transfusion independence days.

	Days of transplant			
	-10 – -1	0 - 30	31 - 60	61 - 100
	N (%)			
	(n=86)	(n=86)	(n=80)	(n=77)
Any RBC				
Yes	24 (27.9)	20 (23.3)	25 (31.3)	16 (20.8)
Any PLT				
Yes	27 (31.4)	82 (95.4)	34 (42.5)	25 (32.5)
RBC or PLT				
Yes	32 (37.2)	84 (97.7)	37 (46.3)	28 (36.4)
RBC units				
Median (range)	0 (0-7)	2.0 (0-18)	0 (0-8)	0 (0-13)
Mean (SD)	0.6 (1.3)	3.2 (3.3)	1.0 (1.9)	1.0 (2.4)
PLT units				
Median (range)	0 (0-14)	8 (0-38)	0 (0-29)	0 (0-38)
Mean (SD)	1.7 (3.2)	10.5 (8.8)	3.3 (6.1)	3.0 (7.4)
RBC independence				
Mean (SD)	-	25.2 (5.6)	27.9 (5.2)	36.9 (7.6)
PLT independence				
Mean (SD)	-	19.9 (7.6)	26.3 (7.3)	35.1 (9.8)

RBC, red blood cells; PLT, platelets; SD, standard deviation.

Table 3. Platelet and red blood cell transfusion independence associated with the clinical factors of the patient and the characteristics of the transplant.

	Platelet transfusion independence						RBCs transfusion independence					
	median (range)						median (range)					
	Interval. days after transplant						Interval. days after transplant					
	Davs 0 - 30 (n= 86)	<i>p</i> value	Davs 31 - 60 (n= 80)	<i>p</i> value	Davs 61 - 100 (n= 77)	<i>p</i> value	Davs 0 - 30 (n= 86)	<i>p</i> value	Davs 31 - 60 (n= 80)	<i>p</i> value	Davs 61 - 100 (n= 77)	<i>p</i> value
ABO blood group compatibility												
ABO compatible	24.0 (2-30)		30.0 (5-30)		40.0 (3-40)		28.0 (15-30)		30.0 (7-30)		40.0 (5-40)	
Maior	22.0 (0-30)	0.439	30.0 (1-30)	0.217	39.0 (9-40)	0.238	26.0 (8-30)	0.064	29.0 (4-30)	0.127	39.0 (17-40)	0.076
Minor	22.5 (11-29)		26.5 (18-30)		40.0 (5-40)		27.0 (16-30)		29.5 (25-30)		40.0 (7-40)	
Bidirectional	23.0 (2-26)		30.0 (29-30)		-		27.0 (3-28)		-		40.0 (39-40)	
HLA												
No	22.0 (3-30)	0.837	29.0 (4-30)	0.054	40.0 (5-40)	0.621	26.5 (8-30)	0.376	30.0 (6-30)	0.089	40.0 (7-40)	0.282
Yes	23.0 (0-30)		30.0 (1-30)		40.0 (3-40)		27.0 (3-30)		30.0 (4-30)		40.0 (5-40)	
Gender												
Female	22.0 (0-30)	0.609	30.0 (4-30)	0.595	40.0 (5-40)	0.466	26.0 (3-30)	0.044	30.0 (4-30)	0.318	40.0 (7-40)	0.107
Male	23.0 (2-29)		30.0 (1-30)		40.0 (3-40)		28.0 (8-30)		30.0 (7-30)		40.0 (5-40)	
GVHD Prophylaxis												
CSA	24.0 (5-28)		30.0 (25-30)		40.0 (35-40)		28.0 (8-30)		30.0 (29-30)		40.0 (38-40)	
Tacrolimus or CSA+MTX	24.5 (2-30)		30.0 (1-30)		40.0 (6-40)		27.0 (3-30)		30.0 (4-30)		40.0 (6-40)	
Tacrolimus or CSA+MMF	23.0 (8-30)	0.303	30.0 (4-30)	0.325	39.0 (3-40)	0.419	28.0 (16-30)	0.871	30.0 (6-30)	0.058	39.5 (5-40)	0.352
PTCy and others	22.0 (7-28)		29.0 (5-30)		40.0 (5-40)		26.0 (19-30)		28.0 (7-30)		40.0 (7-40)	
Others	12.5 (0-25)		29.5 (26-30)		40.0 (38-40)		25.5 (8-30)		29.0 (29-30)		40.0 (39-40)	
Tacrolimus ou CSA +MTX +ATG	22.0 (11-26)		30.0 (18-30)		40.0 (25-40)		26.0 (24-30)		30.0 (27-30)		40.0 (38-40)	
Mortality												
No	24.0 (3-30)	0.045	30.0 (12-30)	0.063	40 (10-40)	0.001	29 (19-30)	0.075	30 (22-30)	0.012	40 (30-40)	0.001
Yes	22.0 (0-30)		30.0 (1-30)		37 (3-40)		26 (3-30)		29 (4-30)		38 (5-40)	
Chimerism												
No	15.5 (0-30)	0.082	29.5 (4-30)	0.218	40 (3-40)	0.944	22 (3-30)	0.022	30 (6-30)	0.481	40 (5-40)	0.495
Yes	23.5 (3-30)		30.0 (1-30)		40 (5-40)		27 (16-30)		30 (4-30)		40 (6-40)	
Remission												
No	n=58 22.5 (2-30)	0.748	n=54 30.0 (1-30)	0.425	n=50 38.0 (3-40)	0.008	n=58 28.0 (8-30)	0.887	n=54 30.0 (22-30)	0.345	n=50 40.0 (5-40)	0.118
Yes	22.5 (2-29)		30.0 (4-30)		40.0 (6-40)		27.0 (3-30)		30.0 (4-30)		40.0 (6-40)	

HLA, Human leukocyte antigen; GVHD, graft-versus-host disease; CSA, ciclosporin; TAC, tacrolimus; MTX, methotrexate; MMF, mycophenolate mofetil; ATG, anti-thymocyte globulin; PTCy, post-transplant cyclophosphamide.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A refratariedade plaquetária (RP) associada à aloimunização HLA é um desafio tanto para as equipes clínicas como para os serviços de hemoterapia. A avaliação da eficácia transfusional, medida através do cálculo corrigido do incremento plaquetário (CCI), tem relevância clínica por estar associada aos intervalos das transfusões, mas, na maioria das vezes, não é capaz de prever o aumento da contagem plaquetária, nem o risco de sangramento.

Neste contexto, pacientes aloimunizados submetidos ao TCTH alogênico representam um desafio ainda maior, devido a complexidade dos fatores imunes e não imunes associados, além das complicações relacionadas ao próprio procedimento. Especialmente nestes casos, uma contagem plaquetária baixa pode levar a sangramentos fatais, aumento da mortalidade ou falha de enxertia.

Neste estudo, foi possível avaliar a associação entre intensidade média de fluorescência (MFI) de anticorpos anti-HLA e a RP pré e pós transplante, além da associação entre o MFI e a persistência e desenvolvimento de novos anticorpos anti-HLA 30 dias após a infusão de células progenitoras hematopoiéticas. O conhecimento antecipado de fatores imunológicos que possam prever um maior risco de RP, pode auxiliar na organização e disponibilidade de produtos plaquetários adequados para o suporte transfusional no período de trombocitopenia prolongada após o transplante e, dessa forma, contribuir para desfechos clínicos melhores associados a este procedimento que, por si só, já apresenta uma alta mortalidade.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

A aloimunização devido à transfusão plaquetas pode comprometer o sucesso de terapias curativas, como o TCTH. A alta variabilidade do HLA continua sendo um grande obstáculo para a aplicação de produtos alogênicos em terapias celulares. Pesquisadores estão desenvolvendo estratégias para diminuir a imunogenicidade das células e tecidos e para melhorar a sua sobrevivência após o transplante alogênico, na ausência de imunossupressão. No futuro, o uso de plaquetas silenciadas da sua expressão HLA poderá ser uma alternativa potencial de transfusão universal eficaz para pacientes com RP mediada por anticorpos HLA Classe I.

Enquanto estas tecnologias não estão disponíveis para todos os pacientes, a identificação dos anticorpos específicos e clinicamente significativos contra os antígenos HLA pode auxiliar na realização de uma medicina transfusional personalizada, possibilitando melhores respostas tanto nas transfusões, como nos transplantes. Dessa forma, podemos atuar nos fatores modificadores já conhecidos e nos preditores de alto risco para RP que, se identificados precocemente, poderão direcionar o suporte transfusional e melhorar o prognóstico destes pacientes.

10 ANEXOS

10.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Adultos

CAAE 85047318.5.0000.5327

Título do Projeto: Estudo de refratariedade plaquetária em pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa porque você tem indicação de realizar transfusões de plaquetas e apresentou incompatibilidade na prova cruzada de plaquetas. Esta incompatibilidade pode ser causada pela presença de anticorpos (substâncias produzidas pelo próprio corpo) contra as plaquetas. O exame que identifica anticorpos contra o sistema HLA já é realizado na rotina assistencial. O objetivo desta pesquisa é realizar um teste laboratorial adicional para identificar a presença de anticorpos específicos contra as plaquetas (anti-HPA), que podem prejudicar a resposta à transfusão. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: coleta de sangue (8mL), através do acesso central, e a revisão do seu prontuário médico (dados clínicos e exames). Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são inerentes a coleta de sangue, caso seja feita no acesso periférico, podendo haver dor no local da punção e manchas roxas. O(a) Sr(a) poderá ser incluído em um banco de dados contendo os registros dos receptores de plaquetas envolvidos no estudo que será utilizado para análises estatísticas.

Esta pesquisa poderá não trazer benefícios direto ao receptor de plaquetas participante do estudo neste momento, mas poderá beneficiar outros potenciais receptores de plaquetas futuramente. Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal. Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Prof. Dr Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber, pelo telefone 33598152, com a pesquisadora Dra Juliana Pires Marafon Franz, pelo telefone 33597652 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

10.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Responsáveis

CAAE 85047318.5.0000.5327

Título do Projeto: Estudo de refratariedade plaquetária em pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico

A pessoa pela qual você é responsável está sendo convidado a participar desta pesquisa porque ela tem indicação de realizar transfusões de plaquetas e apresentou incompatibilidade na prova cruzada de plaquetas. Esta incompatibilidade pode ser causada pela presença de anticorpos (substâncias produzidas pelo próprio corpo) contra as plaquetas. O exame que identifica anticorpos contra o sistema HLA já é realizado na rotina assistencial. O objetivo desta pesquisa é realizar um teste laboratorial adicional para identificar a presença de anticorpos específicos contra as plaquetas (anti-HPA), que podem prejudicar a resposta à transfusão. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos na participação desta pessoa são os seguintes: coleta de sangue (8mL), através do acesso central, e a revisão do prontuário médico (dados clínicos e exames). Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são inerentes a coleta de sangue, caso seja feita no acesso periférico, podendo haver dor no local da punção e manchas roxas. Esta pessoa poderá ser incluída em um banco de dados contendo os registros dos receptores de plaquetas envolvidos no estudo que será utilizado para análises estatísticas.

Esta pesquisa poderá não trazer benefícios direto ao receptor de plaquetas participante do estudo neste momento, mas poderá beneficiar outros potenciais receptores de plaquetas futuramente. Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal. Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Prof. Dr Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber, pelo telefone 33598152, com a pesquisadora Dra Juliana Pires Marafon Franz, pelo telefone 33597652 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura (*se aplicável*)

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

10.3 Submitted Manuscript – Artigo 1

The screenshot displays the Author Dashboard for the journal Vox Sanguinis (ISBT). The page title is "Submitted Manuscripts". On the left, a sidebar menu includes "Submitted Manuscripts" (1), "Manuscripts I Have Co-Authored" (1), "Start New Submission", "Legacy Instructions", "5 Most Recent E-mails", and "Before You Submit". The main content area features a table with the following data:

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADM. Davie, Maria	VOX-21-0366	Platelet Refractoriness screening in pre-allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. Finding the enemy before it is too late	29-Nov-2021	29-Nov-2021
<ul style="list-style-type: none"> Awaiting Admin Processing 		View Submission Cover Letter		
Contact Journal				