

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS  
MÉDICAS

**QUANTIFICAÇÃO DE SUBPOPLAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM DOADORES DE  
REPETIÇÃO DE PLAQUETAFÉRESE**

**LUCIANA DO NASCIMENTO VARGAS**

**Porto Alegre**

**2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS  
MÉDICAS

**QUANTIFICAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM DOADORES DE  
REPETIÇÃO DE PLAQUETAFÉRESE**

**LUCIANA DO NASCIMENTO VARGAS**

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Adolpho Moreira  
Faulhaber

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

**Porto Alegre  
2016**

CIP - Catalogação na Publicação

Vargas, Luciana do Nascimento  
Quantificação de subpopulações linfocitárias em  
doadores de repetição de plaquetaférese / Luciana do  
Nascimento Vargas. -- 2016.  
57 f.

Orientador: Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2016.

1. doadores de plaquetaférese. 2. subpopulação  
linfocitária. I. Faulhaber, Gustavo Adolpho Moreira,  
orient. II. Título.

*BANCA EXAMINADORA*

Dr. Dario Eduardo de Lima Brum

Profª Drª Denise Cantarelli Machado

Prof. Dr. Rafael Mendonça da Silva Chakr

Prof. Dr. Odirlei André Monticielo

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos doadores de sangue, que nos doam além de componentes, seu tempo para este ato altruísta e de grande impacto na saúde de muitos pacientes.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Prof. Gustavo Faulhauber pela confiança, dedicação e ensinamentos essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

À Ana Alegretti por sempre estar presente, auxiliando e exigindo o meu melhor, sempre com o cuidado de passar muito do seu conhecimento e exemplo.

Ao Leo Sekine, que além de ser um exemplo de profissional, sempre esteve disponível para sanar minhas dúvidas, trazer ideias e críticas construtivas ao trabalho, me auxiliando a crescer como profissional e pesquisadora.

À Maria Cecília, assistente social do Serviço de Hemoterapia, que deu todo o suporte e auxílio necessário para que eu pudesse selecionar os doadores de forma adequada.

À toda equipe da Unidade de Diagnóstico Personalizado por todo o apoio técnico/científico e disponibilidade, em especial à Fabiane Pedrazzani e Mariela Farias que foram indispensáveis para o desenvolvimento desse trabalho.

À equipe da Aférese do Serviço de Hemoterapia, que se comprometeu com muito profissionalismo em me auxiliar.

À Laís Garcia, pela grande parceria e apoio incondicional no desenvolvimento do trabalho, além da grande amizade e carinho.

Ao meu marido Marcilio Toledo, pela compreensão, pelo companheirismo, incentivo e equilíbrio que foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram e incentivaram para que eu desse o melhor de mim.

*“Sem a curiosidade que me move,  
que me inquieta, que me insere  
na busca, não aprendo nem  
ensino”*

*(Paulo Freire)*

## RESUMO

**Introdução:** A doação de plaquetas por aférese é um método de coleta que vem aumentando em relevância. Sabe-se que esta técnica apresenta inúmeras vantagens em comparação à doação de sangue total. Observamos que há uma preocupação na qualidade dos hemocomponentes enviados ao paciente, no entanto, não se observam muitas pesquisas em busca do cuidado com o doador. Órgãos como o Food and Drug Administration (FDA) já publicaram normas mais restritivas em relação à doação de plaquetas por aférese, pois pesquisas apontaram uma diminuição de algumas células e proteínas do sistema imunológico em doadores de repetição.

**Objetivos:** Analisar doadores de plaquetas de repetição quanto a parâmetros hematimétricos e quantificação de subpopulações linfocitárias comparando-os com um grupo controle composto por doadores de sangue total que não doam há no mínimo um ano ou doando pela primeira vez e, ainda avaliar se a frequência de doações, o tempo de procedimento e o número de plaquetas doadas influenciam na contagem de leucócitos totais e nas subpopulações de linfócitos.

**Metodologia:** Foram analisados 88 indivíduos em um estudo caso-controle, sendo que o grupo controle (CO) incluído foi de doadores de sangue total que haviam doado pela primeira vez ou haviam doado sangue total há mais de um ano. Os casos (CA) incluídos foram os doadores de repetição de plaquetaférese (quatro ou mais doações no último ano). O pareamento foi feito por sexo e idade. As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo EDTA e analisadas em até 6 horas por citometria de fluxo, através da utilização de anticorpos monoclonais anti-CD3, CD4, CD8, HLADR, CD19 e CD56.

**Resultados:** Foram avaliados 44 pares de doadores (caso vs controle). Destes, 81,8% eram homens, a média de idade dos grupos foi de  $46 \pm 13$  anos nos casos e  $47 \pm 11$  nos controles. Comparando os dois grupos, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na média de quantificação de leucócitos absolutos CA=  $6476,6/\mu\text{L}$  vs CO=  $7115,4/\mu\text{L}$  ( $p=0,017$ ), na média de linfócitos absolutos CA=  $1862,6/\mu\text{L}$  vs CO=  $2239,2/\mu\text{L}$  ( $p=0,007$ ) e nos marcadores: CD3+/CD8+ (absoluto) CA=  $437/\mu\text{L}$  vs CO=  $597/\mu\text{L}$  ( $p=0,01$ ), CD3+/CD4+(%) CA=  $47,3/\mu\text{L}$  vs CO=  $42,77/\mu\text{L}$  ( $p=0,007$ ).

**Conclusões:** Neste estudo foi possível observar que há uma diminuição em algumas células linfoides dos doadores de repetição em relação aos doadores convencionais, no entanto essa diferença não tem relevância clínica, demonstrando que os intervalos de doações que estes doadores estão sendo submetidos é adequado. A contagem de plaquetas dos doadores de repetição se mantiveram no decorrer do ano, este dado nos auxilia para mantermos um banco de dados de doadores de repetição com uma quantificação de plaquetas adequada, podendo ser convocado sem risco de ser bloqueado por contagem inferior ao preconizado.

**Palavras-Chaves:** apheresis, blood platelet, blood donation, lymphocyte immunophenotyping, flow cytometry.

## ABSTRACT

**Introduction:** The donation of platelets by apheresis as a collection method has lately grown in relevance. This technique presents several advantages when compared to total blood donation. We understand there is a concern about the quality of the hemocomponents that are administered to the patients; however, there are not many researches concerned with caring for the donor. Entities such as the Food and Drug Administration (FDA) have published more restricting regulations regarding the donation of platelets by apheresis, since researches indicate a decrease in some cells and proteins present in the immunological systems of repeat donors.

**Objectives:** To analyze repeat donors of platelets with regards to hematimetric parameters and quantification of lymphocyte sub-populations by comparing them with a control group consisting of total blood donors that have not donated blood for the past year at least or that are donating for the first time. Additionally, to evaluate if the frequency of donations, the duration of the procedure, and the donated platelet counts influence in the total leukocyte counts and in the sub-populations of lymphocytes.

**Methodology:** We analyzed 88 individuals in a control case study. The control group (CG) consisted of total blood donors in their first donation or that had donated for the last time more than a year before. The cases (CA) included were the repeat donors by platelet apheresis (four or more donations in the past year). We matched the individuals by gender and age. Peripheral blood samples were collected in tubes containing EDTA and analyzed up until 6 hours later by flow cytometry, through monoclonal antibodies anti-CD3, CD4, CD8, HLADR, CD19, and CD56.

**Results:** 44 pairs of donor were evaluated (case vs control). Among them, 81.8% were men, the average age of the groups was 46 ( $\pm 13$ ) years in the cases and 47 ( $\pm 11$ ) in the controls. When comparing the two groups, we observed a statistically significant difference ( $p < 0,05$ ) in the average of the quantification of absolute leukocytes CA= 6476.6/ $\mu\text{L}$  vs CG=7115.4/ $\mu\text{L}$  ( $p=0.017$ ), in the average of absolute lymphocytes CA= 1862.6/ $\mu\text{L}$  vs CG= 2239.2/ $\mu\text{L}$  ( $p=0.007$ ), and in the markers: CD3+/CD8+ (absolute) CA= 437/ $\mu\text{L}$  vs CG= 597/ $\mu\text{L}$  ( $p=0,01$ ), CD3+/CD4+(%) 47.3/ $\mu\text{L}$  vs CG= 42.77/ $\mu\text{L}$  ( $p=0.007$ ).

**Conclusions:** We were able to note in this study that there is a significant decrease

in some lymphoid cells of repeat donors when compared to conventional donors. This difference, however, is not clinically relevant, which demonstrates that the donation intervals to which the donors are subject are appropriate. Platelet numbers of repeat donors remained the same throughout the year. This piece of data helps us keep a database of repeat donors with an adequate platelet number. These donors can be called for without risking of their being blocked in the screening for a number lower than the recommended.

**Key-words:** apheresis, blood platelet, blood donation, lymphocyte immunophenotyping, flow cytometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia para localização e selecionar as informações .....	19
Figura 2. Separação dos hemocomponentes por aférese .....	25
Figura 3. Parâmetros morfológicos relativos à dispersão da luz.....	27
Figura 4. Subpopulações de acordo com FSC/SSC .....	28
Figura 5. Seleção de <i>gate</i> das células CD45 positivas .....	29
Figura 6. Localização da proteína transmembrana CD3.....	30
Figura 7. Transdução de sinais da molécula CD3 após ligação do TCR ao peptídeo antigênico .....	31
Figura 8. Vias de processamento e apresentação de antígenos.....	32
Figura 9. Representação esquemática do complexo co-receptor das células B.....	33
Figura 1. Esquema marco teórico.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Riscos Associados à Transfusão de Plaquetas nos Estados Unidos.....	21
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos
BCR	Receptor de célula B
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
EDQM	<i>European Directorate for The Quality of Medicines and HealthCare</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	<i>Forward scatter</i>
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
VHC	Hepatite C vírus
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HLA-Is	Antígeno leucocitário humano I solúvel
HPA	Antígeno plaquetário humano
IP	Inativação de patógenos
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
NHSBT	<i>National Health Service Blood and Transplant</i>
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PQF	Plaquetas por aférese ou plaquetaférese
RE	Retículo endoplasmático
SaBTO	<i>Safety of Blood, Tissues and Organs</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
ST	Sangue total
TAP	Transportador associado ao processamento do antígeno
TCPH	Transplante de células progenitoras hematopoiéticas
TCR	Receptor de célula T
TNK	<i>T natural killer</i>
TRALI	<i>Transfusion Related Acute lung Injury</i>
vCJD	Variante da doença de Creutzfeldt-Jakob

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Estratégias para Localização e Selecionar as Informações.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2. Transfusão de Plaquetas.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3. Aférese.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4. Plaquetaférese.....</b>	<b>22</b>
2.4.1. Legislações em Aférese.....	23
<b>2.5. A Importância de um Doador de Repetição.....</b>	<b>24</b>
<b>2.6. Imunossupressão na Doação de Plaquetaférese – Possível Mecanismo ...</b>	<b>25</b>
<b>2.7. Imunofenotipagem.....</b>	<b>26</b>
2.7.1. Análise de Subpopulações Linfocitárias.....	28
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>34</b>
<b>4. JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>35</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1. Objetivo Primário.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2. Objetivos Secundários.....</b>	<b>36</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>7. ARTIGO.....</b>	<b>42</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>53</b>
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>54</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A doação de plaquetas por aférese é um método de coleta que apresenta vantagens em comparação a doação de sangue total. Em relação ao tipo de obtenção do concentrado de plaquetas, se compararmos com a doação de sangue total, a coleta por aférese não precisa ser processada para ser obtida, pois o próprio equipamento seleciona o hemocomponente de interesse, devolvendo os outros componentes ao doador e com isso possibilitando que seja coletada uma maior concentração de plaquetas.

Os pacientes se expõem a menos doadores para que possa receber uma concentração de plaquetas adequada, tendo em vista que para obtermos a mesma concentração de uma coleta simples de plaquetaférese de um único doador, teremos que coletar e processar até seis unidades de sangue total coletados de doadores diferentes. O seja, é possível reduzir em até seis vezes a exposição do receptor a diferentes doadores.

Apesar de o Brasil estar aumentando a qualidade dos hemocomponentes enviados para pacientes que necessitam de transfusão, não se observa o mesmo cuidado com o doador, não sendo observado artigos que aborem esse assunto. Órgãos internacionais como o *Food and Drug Administration* (FDA) já publicaram normas mais restritivas em relação a doação de plaquetas por aférese, pois algumas pesquisas apontaram problemas em relação ao sistema imunológico e quantidade de plaquetas em doadores de repetição de plaquetaférese.

Após revisão de literatura, podemos observar que poucos trabalhos foram realizados para analisar os efeitos das doações de repetição sobre o sistema imune e plaquetário destes indivíduos, sendo que, estes trabalhos foram gradativamente diminuindo conforme as restrições foram aumentando por parte do FDA. O último

trabalho encontrado foi publicado em 2006, um ano após as últimas restrições publicadas. No Brasil não encontramos nenhum trabalho que abordasse este assunto.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Estratégias para Localização e Selecionar as Informações**

Esta revisão da literatura está focada na importância da coleta de plaquetas pelo equipamento de aférese e, principalmente, na relevância de investigarmos se nossos doadores estão sendo bem assistidos, no que tange a regularidade de doações, tendo em vista que há literaturas científicas que apontam para alterações no sistema imune e plaquetário dos indivíduos que doam com maior regularidade. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS e SciELO, PubMed, no período de 1980 a 2016. Foram realizadas buscas através dos termos “apheresis”, “blood platelet”, “blood donation”, “T-lymphocyte subset”, “B-lymphocyte subset”, “Killer cells, natural”, “flow cytometry” e suas combinações.

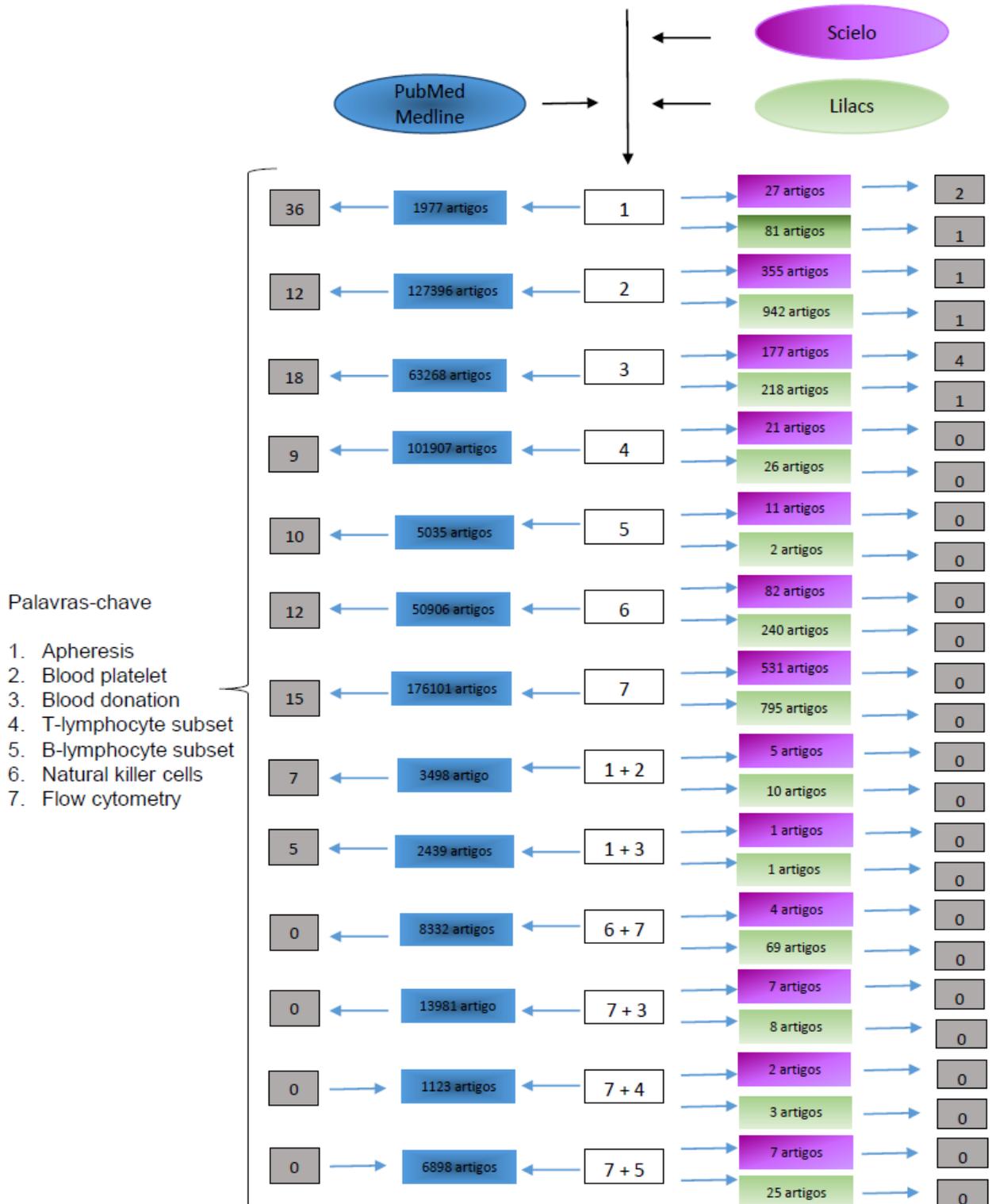


Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. Este é o resultado da busca da combinação das palavras-chave. Fonte: elaborado pela Autora (2016).

## 2.2. Transfusão de Plaquetas

As plaquetas representam uma parte crucial da homeostase de organismos vivos, contribuindo de forma importante para a manutenção da integridade vascular. São capazes de responder rapidamente a uma lesão, sendo assim, pacientes com baixos níveis de plaquetas circulantes estão em risco aumentado de hemorragia<sup>1</sup>. A existência de plaquetas e a sua possível contribuição para a hemostasia foi descrita na década de 1870, mas foi apenas em 1910 que foi possível observar que a transfusão de plaquetas poderia reverter o risco de sangramento em pacientes trombocitopênicos<sup>1</sup>.

Atualmente, uma grande proporção de plaquetas são transfundidas profilaticamente para reduzir o risco de hemorragia espontânea em pacientes que estão trombocitopênicos após terapia citotóxica ou transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH)<sup>2,3</sup>. Ao contrário de outros componentes do sangue, plaquetas devem ser armazenadas à temperatura ambiente, o que limita o tempo de armazenamento para apenas 5 dias por causa do risco de crescimento bacteriano durante o armazenamento. Este tempo curto dificulta a manutenção do estoque e o controle para evitar o desperdício deste componente<sup>4</sup>.

Transfusão de plaquetas está associada a vários riscos para o receptor (Tabela 1), incluindo reações alérgica e febril não hemolítica<sup>5</sup>. Sepses causada por uma unidade de plaquetas contaminada por bactérias representa a mais frequente complicação infecciosa se comparado com qualquer outro produto sanguíneo<sup>6</sup>.

Tabela 1: Riscos associados à transfusão de plaquetas nos Estados Unidos

Evento Adverso	Risco aproximado por transfusão de plaquetas
Reação Febril	1/14
Reação Alérgica	1/50
Sepse Bacteriana	1/75.500
TRALI	1/138.000
Infecção por HBV	1/2.652.580
Infecção por HCV	1/3.315.729
Infecção por HIV	0 a 1/1.461.888

TRALI = *Transfusion Related Acute Lung Injury*; VHB = vírus da hepatite B; VHC = vírus da hepatite C; HIV = *human immunodeficiency vírus* (adaptado)<sup>5</sup>

As plaquetas expressam antígenos que podem influenciar na sobrevivência e na contagem das plaquetas pós-transfusão; estes incluem o sistema ABO, o antígeno leucocitário humano (HLA) da Classe I (A e B) e o antígeno plaquetário humano (HPA), que são responsáveis por causar refratariedade plaquetária<sup>7</sup>. Embora maioria dos casos de refratariedade tenha sido atribuída a fatores não imunológicos, causas imunes envolvendo aloimunização contra HLA e HPA após a exposição através de transfusão, gravidez ou transplante, também estão envolvidas<sup>8</sup>.

Em qualquer situação em que a transfusão de plaquetas está sendo considerada, estes riscos devem ser ponderados com os potenciais benefícios clínicos.

### 2.3. Aférese

Aférese é um termo utilizado para designar um procedimento automatizado de coleta de componentes do sangue. É derivado da palavra grega *aphairios*, que significa "tirar". A técnica de centrifugação foi desenvolvida no século 19 e início do século 20. Na década de 70, várias tecnologias foram desenvolvidas para a separação dos componentes do sangue de doadores e pacientes<sup>9</sup>.

Assim, a aférese representa um progresso considerável na automação e padronização de produtos do sangue, permitindo a coleta, separação e leucorredução do hemocomponente concomitantemente<sup>10</sup>. E, as vantagens desta técnica são: a padronização, a redução de etapas de preparação, o controle da unidade coletada e a redução do risco transfusional (doador único).

#### **2.4. Plaquetaférese**

A coleta de plaquetas por aférese ou plaquetaférese (PQF) é usada para obter plaquetas de doadores voluntários, de reposição, ou de doadores com fenótipos específicos do HLA e do HPA<sup>9,11</sup>. Este procedimento destina-se a recolher um grande número de plaquetas a partir de um único indivíduo, proporcionando assim uma maior quantidade de plaquetas quando comparada à doação de sangue total (convencional) e diminuindo, conseqüentemente, a exposição dos pacientes a múltiplos doadores<sup>9,12</sup>.

O uso de equipamentos de aférese para coleta de hemocomponentes tem aumentado rapidamente nos últimos anos e o avanço tecnológico nestes equipamentos melhorou a produtividade e a qualidade da coleta de plaquetas por aférese<sup>13</sup>.

Uma coleta simples de plaquetaférese equivale a  $3,0 \times 10^{11}$  de plaquetas por unidade<sup>14</sup>, isso representa entre 4 a 6 unidades de concentrado de plaquetas obtidas de sangue total (ST)<sup>5</sup>, em uma coleta dupla a contagem de plaquetas deve ser igual ou superior a  $6,0 \times 10^{11}$ .<sup>14</sup>

Nos Estados Unidos, o uso de plaquetas por aférese tem aumentado ao longo dos últimos 25 anos. Em 2009, estimava-se que 86% das doses terapêuticas de plaquetas transfundidas nos Estados Unidos eram de PQF<sup>15</sup>, e no último relatório publicado em 2013 pelo Department of Health and Human Services - USA, houve um aumento de 11,9% nas transfusões deste hemocomponente<sup>16</sup>. Na Alemanha, Vamvakas E.C. e Hitzler W.E., publicaram em 2013 um artigo que analisou um modelo matemático que apresentou um aumento no risco de transmissão de vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite B (HBV), se comparado transfusão de Pool de plaquetas de quatro doadores (buffy-

coat) com uma doação de aférese. Esse risco, segundo o estudo, seria proporcionalmente o mesmo de transmissão de HIV 1 e HCV antes da triagem por RNA ser implantada. Por estes motivos, eles sugerem que se faça uma transição para utilização de 100% de plaquetas por aférese <sup>17</sup>.

No ano de 2013, foi publicado pela *European Directorate for The Quality of Medicines and HealthCare* (EDQM) o Relatório “*The collection, testing and use of blood and blood components in Europe*”, que apontou uma tendência dos países em aumentarem as plaquetas por aféreses. Cerca de 31% dos países aumentaram em mais de 50% esta produção <sup>18</sup>. Uma das possíveis causas desse aumento foram as discussões sobre segurança do sangue em relação a variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), criando programas para aumentar a utilização de plaquetas por aférese a fim de reduzir a exposição dos pacientes<sup>18</sup>.

No ano seguinte, observou-se uma forte tendência à diminuição de coletas de plaquetas por aférese devido ao aumento do uso da inativação de patógenos (IP), com conseqüente diminuição dos riscos aos vírus emergentes, e da utilização de solução aditiva, fazendo com que a validade das plaquetas passe de cinco para sete dias, facilitando a manutenção do estoque. O *Advisory Committee on the Safety of Blood, Tissues and Organs* (SaBTO) publicou um relatório demonstrando uma tendência a diminuição do uso de aférese (em 80%) com a implantação da utilização da tecnologia de IP<sup>19</sup>. Este ano no Simpósio Europeu para otimizar a utilização dos fatores de coagulação e plaquetas a *National Health Service Blood and Transplant* (NHSBT) lançou um planejamento de oferta e demanda de hemocomponentes, aonde eles pretendem reduzir em 40% as doações de aférese e após revisão, reduzir 60%, se valendo da IP e do uso de solução aditiva que aumenta a validade das plaquetas para sete dias<sup>20</sup>. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprovou em março desse ano a utilização de IP, no entanto a solução aditiva ainda não obteve aprovação deste órgão.

#### **2.4.1. Legislações em Aférese**

No Brasil, a legislação estabelece alguns parâmetros para doação de aférese, como uma contagem inicial mínima de  $150 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$  e o intervalo mínimo entre duas plaquetaféreses de um doador sendo de 48 (quarenta e oito) horas,

podendo um mesmo doador realizar doações, no máximo, 4 (quatro) vezes por mês e 24 (vinte e quatro) vezes por ano<sup>21,14</sup>. No entanto, não se observa uma determinação específica sobre a quantidade de plaquetas coletadas durante o procedimento.

Em 1988, o FDA publicou o “Guideline for Industry and FDA Review Staff Collection of Platelets by Automated Methods” onde a frequência de doações de PQF não deveria ultrapassar 24 vezes em um ano, pois a magnitude de potenciais riscos, como a perda de leucócitos ainda não estava clara<sup>22</sup>.

Em 2005, um dos itens que foi abordado neste documento é que o intervalo de doações deve ser proporcional ao número final de plaquetas coletadas. Então, se o doador fizer uma coleta dupla ( $6,0 \times 10^{11}$ /unidade) deve haver um intervalo mínimo de 7 (sete) dias, ou se for tripla ( $9,0 \times 10^{11}$ /unidade) 14 (quatorze) dias seria o intervalo mínimo para doar novamente<sup>23</sup>.

## **2.5. A Importância de um Doador de Repetição**

Os avanços técnico-científicos da área médica, somados ao conseqüente envelhecimento da população vêm aumentando naturalmente a demanda de transfusões de sangue e, conseqüentemente, a preocupação pela escassez de doadores<sup>24,25</sup>. Nos últimos anos houve uma forte tendência em se distribuir material explicativo aos candidatos a doação, apresentando o que seria a doação voluntária e de repetição, quais as implicações para o paciente durante o ato transfusional e por que é necessário que o doador esteja em condições ideais de saúde para doar o seu sangue.<sup>26</sup>

No Brasil, apenas 1,9% da população brasileira é doadora de sangue<sup>26</sup>, sendo que o índice adequado de coleta é de 3%<sup>27</sup>. Diante desses dados é fundamental para serviços de hemoterapia fidelizar seus doadores para manter o estoque, além de ser possível acompanhar o estado de saúde do doador<sup>28</sup>. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), na Declaração de Melbourne, a disponibilidade de sangue seguro é possível através de doação voluntária, regular e não remunerada<sup>29</sup>.

## 2.6. Imunossupressão na Doação de Plaquetaférese – Possível Mecanismo

Durante a doação de plaquetaférese o que ocorre é que por centrifugação os hemocomponentes vão sendo divididos e separados conforme figura 1:

Separação dos hemocomponentes por aférese

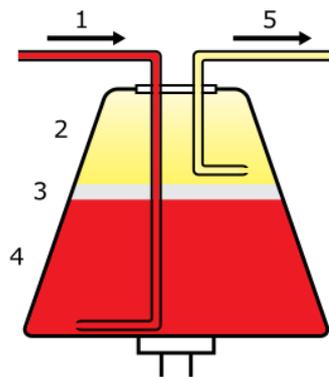


Figura 2. O sangue total entra na centrífuga (1) e separa o plasma (2), os leucócitos (3), e os eritrócitos (4). Componentes vão subindo pela força da centrifugação (5) e um sensor identifica onde inicia e termina a camada de plaquetas (imagem adaptada)<sup>30</sup>.

Logo após a centrifugação (aférese de fluxo intermitente), ou concomitantemente (aférese de fluxo contínuo) as frações do sangue que não serão coletadas são reinfundidas no doador.

A camada onde se encontra a maior concentração de plaquetas chama-se camada leucoplaquetária<sup>31</sup>, ou seja, além das plaquetas uma parte dos leucócitos do doador também são separados durante a centrifugação para serem retirados e não são mais reinfundidos. Aproximadamente 30 por cento dos linfócitos circulantes totais, são removidos durante cada procedimento de plaquetaférese<sup>32</sup>.

Os critérios restritivos para doação de PQF foram discutidos por Strauss R.G, e a preocupação era de que, sem levar em consideração o número de plaquetas coletadas, poderia ocorrer imunossupressão resultante da perda de leucócitos, sobretudo os linfócitos (que se encontram nas camadas mais externas do buffy coat e mais contíguos às plaquetas), durante o procedimento<sup>33</sup>.

Outro mecanismo possível é a já relatada imunomodulação por HLA-I solúvel (HLA-Is), onde durante a centrifugação, moléculas de HLA-Is são adsorvidas pelos polímeros de plástico do Kit de aférese<sup>34</sup>. Os linfócitos T do doador que passam por essas moléculas durante o procedimento podem se ligar e se ativar<sup>35,36</sup>; após uma quantidade adequada de células T ativadas começa a ocorrer uma cascata de processos até a morte celular induzida pela ativação<sup>35,37</sup>.

Entre os anos de 1981 e 1994 observaram-se trabalhos que relatavam uma diminuição das células e proteínas do sistema imune nos doadores de repetição de aférese<sup>38-40</sup>. Senhauser D.A e col. relataram em seu estudo que encontraram diferenças significativas nos doadores de aférese quando comparados com seus controles, como uma média 23 (vinte e três) por cento menor na contagem absoluta de linfócitos ( $p < 0,01$ ), média de contagem de células T 25 (vinte e cinco) por cento menor ( $p < 0,01$ ) e a média de células B 46 (quarenta e seis) por cento menor ( $p < 0,001$ ). Além disso, foi encontrado uma média 27 (vinte e sete) por cento menor de gamaglobulina ( $p < 0,01$ ), e níveis de IgG 14 (quatorze) por cento menor ( $p < 0,05$ ) nos doadores de aférese, quando comparado com o grupo controle<sup>40</sup>.

Após a implementação da orientação do FDA em 1988 observou-se uma diminuição nos estudos que examinavam as alterações de quantificação de leucócitos em doadores de PQF. Tendo em vista que em 2005 aumentaram as restrições, foi encontrado um artigo publicado em 2006, onde Katz L. e col. acompanharam doadores de PQF simples e não encontraram diferença clinicamente significativas nas contagens de leucócitos, sustentando que, esse aumento na restrição exigiria um aumento de 20% na base de doadores para recuperar os hemocomponentes que deixaram de ser coletados e que essas restrições não seriam necessárias<sup>41</sup> e em 2015 Ghio M. e col. relataram uma imunomodulação de curta duração mediada por HLA-Is em doadores de plaquetas e plasma<sup>42</sup>.

## **2.7. Imunofenotipagem**

Técnicas de imunofenotipagem, como a citometria de fluxo revelam informações relevantes ao diagnóstico. Nos últimos 10 anos houveram muitos avanços nesta técnica, tanto de instrumentação quanto de disponibilidade de uma ampla gama de anticorpos e fluorocromos, melhorando a capacidade de identificar

diferentes populações de células normais e reconhecer fenótipos aberrantes, mesmo quando presentes em uma pequena porção das células analisadas<sup>43</sup>.

A citometria de fluxo mede certas propriedades das partículas, tais como tamanho e complexidade, usando a luz. Quando se coloca um tubo com amostra no citômetro, o material vai até o local de injeção de amostra numa corrente separada e pressurizada. Chega na câmara inferior do fluxo a uma pressão ligeiramente mais elevada em relação ao fluido. A câmara tem uma forma cônica que cria uma focalização hidrodinâmica, aonde as partículas da amostra numa corrente estável para cima, para prevenir a formação de pequenas bolhas. Dentro a célula de fluxo, os feixes de laser interceptam a amostra, uma partícula de cada vez. Quando uma célula ou partícula passa através de um raio laser focado, a luz espalhada e/ou emitida é captada por lentes de captação frontal e lateral. A dispersão frontal (*forward scatter* – FSC) é proporcional ao tamanho da célula, enquanto a dispersão lateral (*side scatter* – SSC) é usada para diferenciar populações celulares com base em sua granularidade intracelular (Figura 2)<sup>44</sup>.

#### Parâmetros morfológicos relativos à dispersão da luz

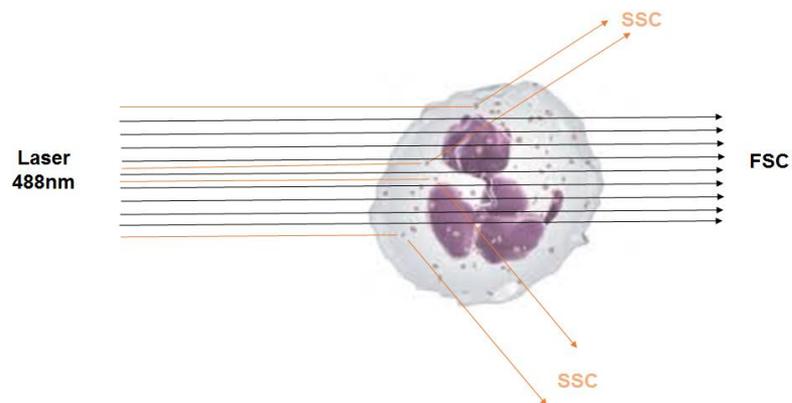


Figura 3. Os citômetros de fluxo têm um número de detectores diferentes que medem a alteração no feixe de luz à medida que a célula passa. Diferentes características da célula podem ser detectadas com base em determinados parâmetros. A dispersão frontal (FSC) é detectada como alterações à luz que passa relativamente diretamente através da célula (linhas pretas). O grau de dispersão para a frente é proporcional à área ou tamanho da superfície da célula. A dispersão lateral (SSC) é detectada como luz que se desvia significativamente da passagem reta através da célula (linhas laranjadas). As cores diferentes do laser na figura é para melhor visualização, o feixe não possui duas cores. Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Cada vez que uma célula passa através da célula de fluxo, mede-se o grau de dispersão para frente e para a dispersão lateral e é traçado um ponto, representando a dispersão lateral contra a dispersão frontal.

Usando suas características FSC/SSC, uma população de células pode ser dividida em subpopulações (Figura 3)

#### Subpopulações de acordo com FSC/SSC

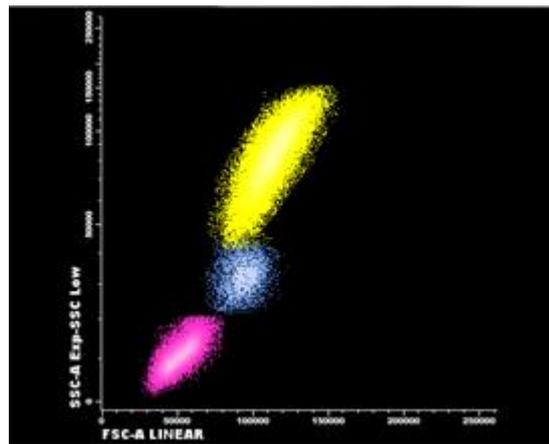


Figura 4. Células rosas: linfócitos – células pequenas ( *low FSC* ) e com poucos grânulos ( *low SSC* ); células azuis: monócitos – células grandes ( *high FSC* ) e com poucos grânulos ( *low SSC* ); células amarelas: neutrófilos – células grandes ( *high FSC* ) e com muitos grânulos ( *high SSC* ). Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Os fluorocromos utilizados em citometria, são essencialmente compostos fluorescentes que emitem radiação após a excitação. Por exemplo, quando o isotiocianato de fluoresceína (FITC) é excitado pela luz de um comprimento de onda de 495 nm (luz azul), emite luz a um comprimento de onda de 519 nm (luz verde)<sup>44</sup>.

Os corantes fluorescentes podem ser conjugados com anticorpos monoclonais que se ligam a proteínas características de certos tipos de células. Isto permite que as células sejam marcadas fluorescentemente de acordo com as proteínas nas suas superfícies<sup>44</sup>.

#### 2.7.1. Análise de Subpopulações Linfocitárias

No sangue periférico humano é possível identificar mais de cem tipos de subpopulações de linfócitos com funcionalidades distintas e, cada um desses tipos de células, sem dúvida, tem um papel único na organização e eficácia da resposta do

sistema imunológico<sup>45</sup>. O início e término de uma resposta imune, seja celular ou humoral, dependem da interação celular entre os subgrupos da série de linfócitos e macrófagos. Um equilíbrio entre células T auxiliares e T supressoras determina a proteção do hospedeiro contra a invasão de tecidos não próprio, infecção e neoplasia<sup>46</sup>.

O *cluster of differentiation* (CD) são moléculas celulares que são reconhecidas pelos anticorpos monoclonais e que permitem a identificação de propriedades bioquímicas de cada molécula e sua distribuição celular.

A população de leucócitos é caracterizada, principalmente, pela presença de CD45, que é utilizado para diferenciar a população de linfócitos das populações de granulócitos e monócitos. Este marcador refere-se a uma proteína transmembrana tirosina fosfatase que participa e regula importantes processos celulares, como ciclo mitótico, transformação oncogênica, crescimento e diferenciação celular<sup>47</sup>.

Na análise de imunofenotipagem, após selecionar o *gate* com as células positivas para CD45 (Figura 4)<sup>48</sup> é possível separar as demais subpopulações, utilizando-se outros marcadores.

#### Seleção de *gate* das células CD45 positivas

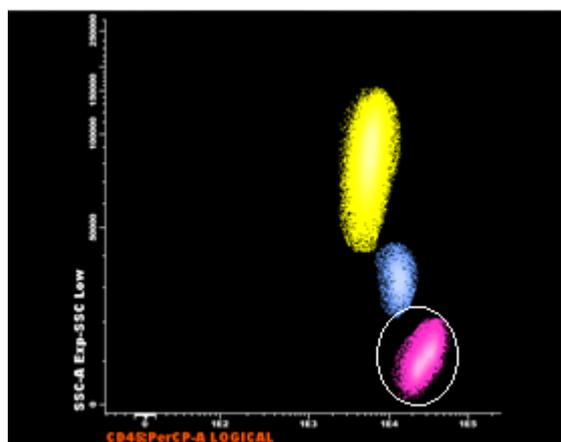


Figura 5. Exemplo de como foram selecionadas as células CD45 positivas, que apresentam pouca granulocidade e grande intensidade de fluorescência para CD45. Fonte: elaborado pela autora, 2016

O CD3 determina linhagem específica de linfócitos T, é uma proteína transmembrana que interage com o receptor de célula T (TCR - *T cell receptor*) (Figura 5)<sup>49</sup>.

#### Localização da proteína transmembrana CD3

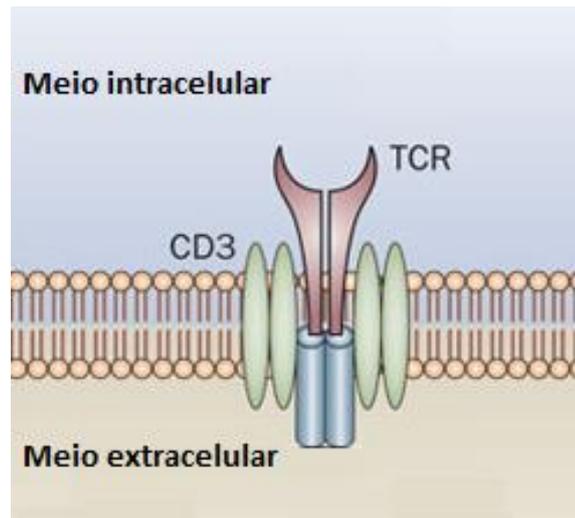


Figura 6. Proteína CD3 e sua localização na membrana celular (adaptado)<sup>50</sup>.

Após a ligação do TCR ao peptídeo antigênico, o CD3 transmite sinais ao interior da célula, sendo considerada uma molécula acessória, responsável por um dos sinais de ativação das células T (Figura 6)<sup>49,51</sup>.

## Transdução de sinais da molécula CD3 após ligação do TCR ao peptídeo antigênico

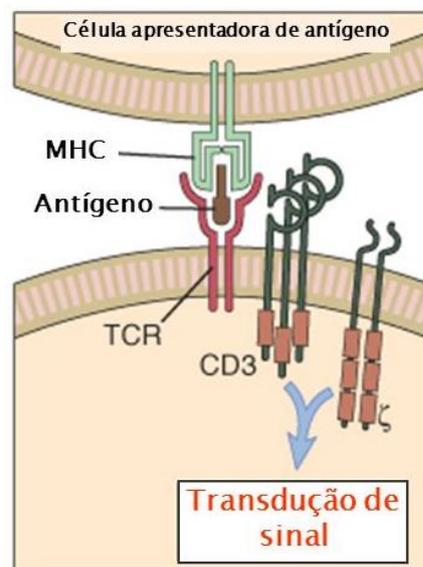


Figura 7. Onde MHC=Complexo maior de histocompatibilidade; TCR=Receptor de célula T. Apesar de ser necessário que mais de um TCR se ligue ao MHC, apenas um é mostrado para simplificar o esquema, aonde as proteínas CD3 liga-se de modo não covalente às cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR para iniciar a transdução de sinais (adaptado)<sup>51</sup>.

As células CD3 positivas (CD3+) ainda podem se dividir entre CD4 positivas (CD4+) que são as células T auxiliares, CD8 positivas (CD8+) células T citotóxicas, duplas positivas (CD4+CD8+) e duplas negativas (CD4-CD8-).<sup>51,52</sup>.

O CD4 e o CD8 são moléculas correceptoras que se ligam ao MHC juntamente com o TCR, a CD4 reconhece a molécula do MHC de classe II e a CD8 reconhece a molécula de classe I<sup>52,49</sup>. As moléculas do MHC de classe I são responsáveis por apresentar antígenos proteicos presentes no citoplasma da célula, por sua vez, os antígenos proteicos que estão no meio extracelular, são englobados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), confinados em visículas citoplasmáticas, transformados em peptídeos e apresentados pelas moléculas do MHC de classe II (Figura 7)<sup>52,49,51</sup>.

### Vias de processamento e apresentação de antígenos.

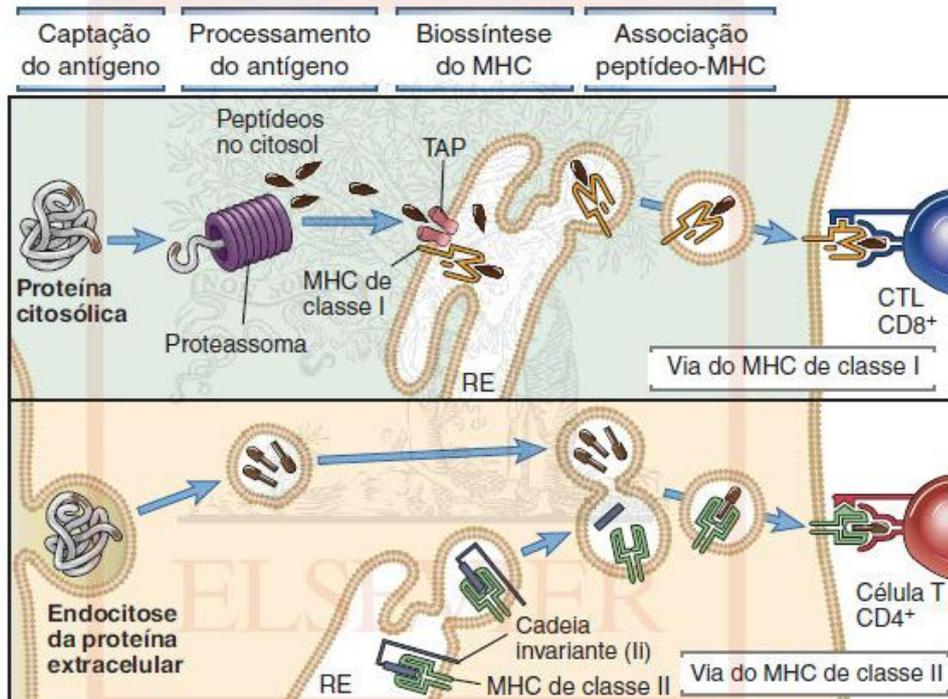


Figura 8. Onde RE= Retículo endoplasmático; TAP=Transportador associado ao processamento do antígeno. Resumo da vias de processamento e apresentação de antígenos: Na via do MHC de classe I (painel superior), os antígenos proteicos do citosol são processados por proteossomas, e os peptídeos são processados até o RE, onde se ligam a moléculas MHC de classe I. Na via do MHC de classe II (painel inferior), os antígenos proteicos extracelulares sofrem endocitose em vesículas, onde os antígenos são processados, e os peptídeos ligam-se a moléculas do MHC de classe II.

O HLA-DR é um isotipo do MHC de classe II, é um dos responsáveis pela *up regulation* (regulação positiva) dos leucócitos, em conjunto com o CD3 são os marcadores de células T ativadas<sup>52,53</sup>.

As células T *natural killer* (TNK) são assim denominadas por apresentarem marcadores de células NK quanto de células T<sup>54</sup>. Estas células reconhecem antígenos apresentados pela molécula CD1 e estão envolvidas no reconhecimento de patógenos, imunidade tumoral e de doença autoimune, além de um forte potencial imunomodulador<sup>54,55</sup>.

O CD 56 é uma proteína de superfície celular, utilizado como marcador tanto de TNK quanto de *natural killer* (NK), esta última sendo diferenciada por não apresentar o CD3<sup>56</sup>. As células NK são linfócitos efetores do sistema imune inato que controlam vários tipos de tumores e infecções por limitar a sua propagação e

subsequente dano tecidual<sup>57</sup>. Além disso, também células reguladoras envolvidas em interações com células dendríticas, macrófagos, células T e células endoteliais<sup>58</sup>.

As células B fazem parte da imunidade humoral, sua principal função é a produção de anticorpos policlonais responsáveis por bloquear infecções e eliminar os microorganismos extracelulares. Seu principal marcador é o CD19<sup>59</sup>. O complexo CD19, CD81 e CD21 forma, juntamente com CD225, o complexo co-receptor das células B, sendo que o CD19 é uma molécula transmembrana e sua parte intracelular possui múltiplos resíduos de tirosina-quinase, para realização da sinalização, diminuindo assim o limiar para ativação dependente receptor de célula B (BCR - *B cell receptor*)<sup>60,61,62</sup> (Figura 8).

Representação esquemática do complexo co-receptor das células B

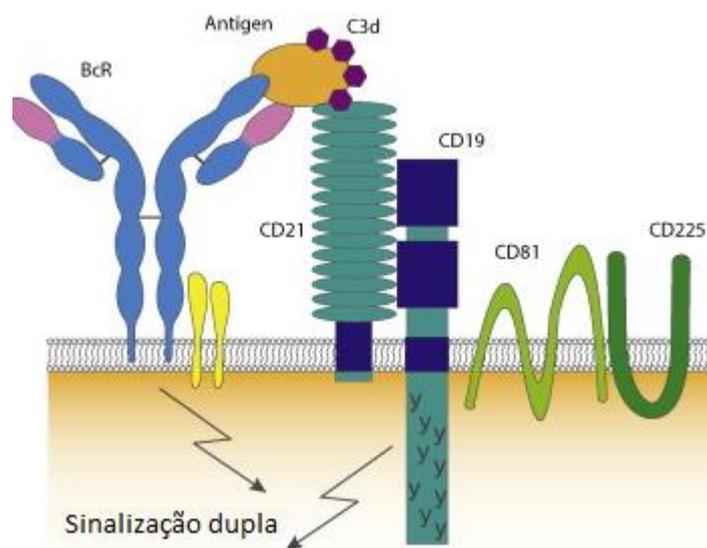


Figura 9. Representação esquemática do complexo co-receptor de célula B, aonde o CD21 é capaz de se ligar ao antígeno através do BCR, fazendo com que o CD19 faça a sinalização de ativação em conjunto com o BC. Fonte: adaptado<sup>62</sup>.

### 3. MARCO TEÓRICO

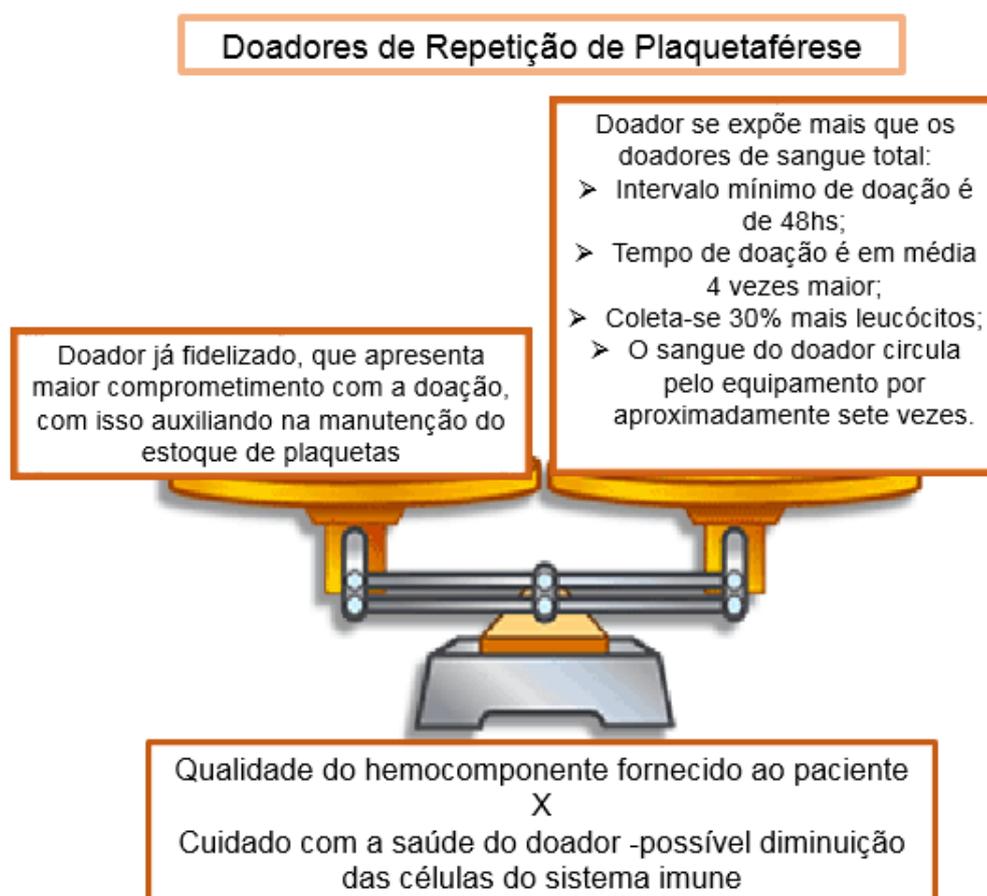


Figura 10. Esquema marco teórico. Fonte: elaborado pela autora (2016).

#### 4. JUSTIFICATIVAS

Desde 2005 o FDA sugere que o intervalo de doações de PQF seja proporcional ao número de plaquetas doadas, tendo em vista que alguns trabalhos observaram uma redução na contagem de leucócitos e de plaquetas destes doadores. No Brasil, nossa legislação não contempla este item, o que pode estar expondo esta população desnecessariamente.

A plaqueta é um hemocomponente de grande relevância no tratamento de inúmeras doenças, ter um número adequado de doadores de repetição, junto a um controle adequado do estoque auxilia a dar suporte a estes tratamentos. No entanto, para podermos contar com esses doadores e não causarmos danos à sua saúde, precisamos avaliar se a frequência de doações a que os submetemos está adequada.

Este trabalho visa quantificar os linfócitos e suas subpopulações para verificar se existe efetivamente uma redução absoluta e relativa de sua contagem nos doadores de aférese de repetição e se esta redução é significativa, além de verificar se a contagem de plaquetas também diminui. Com isso, poderemos delimitar intervalos mais seguros de doação de plaquetas por aférese.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo Primário**

Avaliar se a frequência de doação de plaquetaférese influencia no sistema imune dos doadores.

### **5.2. Objetivos Secundários**

- Analisar doadores de plaquetas de repetição quanto a parâmetros hematimétricos e quantificação de subpopulações linfocitárias comparando-os com um grupo controle composto por doadores de sangue total que não doam há no mínimo um ano ou que doaram pela primeira vez;
- Avaliar se a frequência de doações, o tempo total de coleta, o volume processado e o volume coletado influenciam na contagem de leucócitos totais e nas subpopulações de linfócitos através da quantificação de CD3, CD4, CD8, HLADR, CD19 e CD56;
- Avaliar se a contagem de plaquetas se mantém nos doadores de repetição e comparar essas contagens entre eles;

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

1. Blajchman M a. Platelet transfusions: an historical perspective. *Hematol / Educ Progr Am Soc Hematol*. 2008:197.
2. Estcourt L, Stanworth S, Doree C, et al. Prophylactic platelet transfusion for prevention of bleeding in patients with haematological disorders after chemotherapy and stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;5(5):CD004269.
3. Melrose J, Perroy R, Careas S. The 2011 National blood collection and utilization survey report. *Statew Agric L Use Baseline 2015*. 2015;1.
4. Fuller AK, Ugluk KM, Braine HG, King KE. A comprehensive program to minimize platelet outdating. *Transfusion*. 2011;51(7):1469-1476.
5. Kaufman RM, Djulbegovic B, Gernsheimer T, et al. Platelet transfusion: A clinical practice guideline from the AABB. *Ann Intern Med*. 2015;162(3):205-213.
6. Stramer SL. Current risks of transfusion-transmitted agents: A review. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(5):702-707.
7. Pavenski K, Freedman J, Semple JW. HLA alloimmunization against platelet transfusions: Pathophysiology, significance, prevention and management. *Tissue Antigens*. 2012;79(4):237-245.
8. Forest SK, Hod EA. Management of the Platelet Refractory Patient. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016;30(3):665-677.
9. Roback, John D.; Grossman, BrendaJ.; Harris, Teresa; Hillyer CD. Technical Manual of the American Assoc of Blood Banks. In: Roback JD, ed. *Technical Manual of the American Assoc of Blood Banks*. Vol 17th ed. ; 2011:227-238.
10. Burgstaler EA. *Apheresis: Principles and Practice - AABB*. Vol (B.D, McLeod; Price, T.H.; H.J. D,3rd ed.; 2010.
11. Jia Y, Li W, Liu N, et al. Prevalence of platelet-specific antibodies and efficacy of crossmatch-compatible platelet transfusions in refractory patients. *Transfus Med*. 2014;24(6):406-410.
12. Thiele T, Alt-Mayer T, Greinacher A, Bux J. Implications of a switch to a 100% apheresis platelet supply for patients and for blood donors: a risk benefit analysis. *Vox Sang*. 2016:1-7.

13. Burgstaler EA. Blood component collection by apheresis. *J Clin Apher.* 2006;21(2):142-151.
14. Ministério da Saúde (BR). *Portaria nº 158, de 04 de Fevereiro de 2016.* Vol 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Brasília - DF; 2016. Publicado no Diário Oficial da União em 05 de fevereiro de 2016 (nº 25, Seção 1, pág. 37)
15. Department of Health and Human Services. *National Blood Collection and Utilization Survey Report.* Washington, DC: DHHS, 2011; 2009. <http://www.aabb.org/research/hemovigilance/nbcus/Documents/09-nbcus-report.pdf>.
16. Department of Health and Human Services. *National Blood Collection and Utilization Survey Report.* Washington, DC: DHHS, 2013; 2013. <http://www.aabb.org/research/hemovigilance/nbcus/Pages/default.aspx>.
17. Vamvakas EC, Hitzler WE. Consistency and proportionality in policy decision-making in blood safety: The case for an all-apheresis platelet supply in Germany. *Clin Lab.* 2013;59(1-2):1-22.
18. Van Hoesen L, Janssen M, Rautmann G. *The Collection, Testing and Use of Blood and Blood Components in Europe.* 2014. Disponível em: [https://www.edqm.eu/sites/default/files/the\\_collection\\_testing\\_and\\_use\\_of\\_blood\\_and\\_blood\\_components\\_in\\_europe\\_2013.pdf](https://www.edqm.eu/sites/default/files/the_collection_testing_and_use_of_blood_and_blood_components_in_europe_2013.pdf)
19. McCULLOUGH J. *Pathogen Inactivation of Platelets.* Report of the SBTO working group. Vol 8. 2014. Disponível em: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/324354/SaBTO\\_platelets\\_report.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/324354/SaBTO_platelets_report.pdf)
20. Schramm W. EUROPEAN SYMPOSIUM IV . Wildbad Kreuth Initiative - Optimal use of clotting factors and platelets UNIVERSITY HOSPITAL LMU MUNICH KLINIKUM DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN -. 2016.
21. Ministério da Saúde (BR) Resolução da Diretoria Colegiada - *RDC nº 34.* Brasília - DF: Publicada no Diário Oficial da União, dia 16 de junho de 2014.
22. FDA D of B and BP. *Guideline for Industry and FDA Review Staff Collection of Platelets by Automated Methods.* Bethesda; 1988.
23. FDA C for BE and R. *Guidance for Industry and FDA Review Staff: Collection of Platelets by Automated Methods.* Rockville; 2005.
24. Brener S, Caiaffa WT, Proietti F a. Fatores associados à aptidão clínica para a doação de sangue – determinantes demográficos e socioeconômicos. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008;30(2):108-113.
25. Zeiler T, Lander-Kox J, Alt T. Blood donation by elderly repeat blood donors. *Transfus Med Hemotherapy.* 2014;41(4):242-250.

26. Ministério da Saúde (BR). *Manual de Orientações Para Promoção Da Doação Voluntária de Sangue.*; 2015. Disponível em: <http://www.portalsaudenoar.com.br/wp-content/uploads/2015/06/manual-doacao.pdf>.
27. Cristina Â, Luzo M. What are the characteristics of repeat blood donors? *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(5):345-349.
28. Giacomini L, Filho WDL. Estratégias para fidelização de doadores de sangue voluntarios e habituais. *ACTA Paul Enferm.* 2010;23(1):65-72.
29. WHO and International Federation of Red Cross and Red Crescent Societies. *Towards 100% Voluntary Non-Renumerated Donation of Blood and Blood Compnents.* Melbourne; 2009.
30. Apheresis: Facts, Discussion Forum, and Encyclopedia Article. <http://www.absoluteastronomy.com/topics/Apheresis>.
31. Serinolli MI, Novaretti MCZ, Dorlhiac-Lacer PE, Chamone DAF. Estudo do método da extração da camada leucoplaquetária na produção de hemocomponentes: avaliação laboratorial. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2004;26(3):167-176.
32. Matsui Y, Martin-Alosco S, Doenges E, et al. Effects of frequent and sustained plateletapheresis on peripheral blood mononuclear cell populations and lymphocyte functions of normal volunteer donors. *Transfusion.* 1985;26(5):446-452.
33. Strauss RG. Effects on donors of repeated leukocyte losses during plateletapheresis. *J Clin Apher.* 1994;9(2):130-134.
34. Davenport MP, Smith KJ, Barouch D, et al. HLA class I binding motifs derived from random peptide libraries differ at the COOH terminus from those of eluted peptides. *J Exp Med.* 1997;185(2):367-371.
35. Contini P, Ghio M, Merlo A, et al. Apoptosis of antigen-specific T lymphocytes upon the engagement of CD8 by soluble HLA class I molecules is Fas ligand/Fas mediated: evidence for the involvement of p56lck, calcium calmodulin kinase II, and Calcium-independent protein kinase C signaling pa. *J Immunol.* 2005;7244-7254.
36. Allard M, Oger R, Benlalam H, et al. Soluble HLA-I/peptide monomers mediate antigen-specific CD8 T cell activation through passive peptide exchange with cell-bound HLA-I molecules. *J Immunol.* 2014;192(11):5090-5097.
37. Puppo F, Contini P, Ghio M, et al. Soluble human MHC class I molecules induce soluble Fas ligand secretion and trigger apoptosis in activated CD8(+) Fas (CD95)(+) T lymphocytes. *Int Immunol.* 2000;12(2):195-203.
38. Prior CR, Coghlan PJ, Hall JM, et al. In vitro study of immunologic changes in long-term cytapheresis donors. *J Clin Apher.* 1991;6(2):69-76.

39. Braine HG, Effenbein GJ, Mellits ED. Peripheral blood lymphocyte numbers, lymphocyte proliferative responses in vitro, and serum immunoglobulins in regular hemapheresis donors. *J Clin Apher.* 1985;2(3):213-218.
40. Senhauser DA, Westphal RG, Bohman JE, et al. Immune system changes in cytapheresis donors. *Transfusion.* 1982;22(4):302-304.
41. Katz L, Palmer K, McDonnell E, et al. Frequent plateletpheresis does not clinically significantly decrease platelet counts in donors. *Transfusion.* 2007;47(9):1601-1606.
42. Ghio M, Contini P, Ansaldi F, et al. Immunomodulation due to plasma or plasma-platelet apheresis donation: Events occurring during donation procedures. *J Clin Apher.* 2015;30(4):204-211.
43. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 2008;111(8):3941-3967.
44. Sales MM, Vasconcelos D de M. *Citometria de Fluxo - Aplicações No Laboratório Clínico E de Pesquisa.* Vol 1ª Edição. São Paulo; 2013.
45. De Rosa SC, Brenchley JM, Roederer M. Beyond six colors: a new era in flow cytometry. *Nat Med.* 2003;9(1):112-117.
46. Marks C. Immunobiological determinants in organ transplantation. *Ann R Coll Surg Engl.* 1983;65(3):139-144.
47. Zikherman J, Weiss A. Alternative Splicing of CD45: The Tip of the Iceberg. *Immunity.* 2008;29(6):839-841.
48. Degheidy H, Bauer S, Marti G, Wang L. Flow Cytometer Performance Characterization , Standardization and Calibration against CD4 on T Lymphocytes Enables Quantification of Biomarker Expressions for Immunological Applications. 2014;(July):756-768.
49. Division H, Sciences H, Hst T, Course MI, Pillai S. An overview of the immune system. *Cellular and molecular immunology.* 2008:47-56.
50. Crispín JC, Kyttaris VC, Terhorst C, Tsokos GC. T cells as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(6):317-325.
51. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Básica.* Vol 3rd ed. Elsevier; Rio de Janeiro; 2009.
52. Abbas AK, Lichtman AH, Pilai S. *Imunologia Celular E Molecular.* Vol 7ª ed.Elsevier; Rio de Janeiro; 2011.
53. Shatnyeva OM, Hansen HP, Reiners KS, et al. DNA damage response and evasion from immunosurveillance in CLL: New options for NK cell-based immunotherapies. *Front Genet.* 2015;5(FEB):1-7.

54. Pasiarski M, Grywalska E, Kosmaczewska A, et al. Assessment of peripheral blood and bone marrow T , NK , NKT and dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Postep Hig Med Dosw.* 2015;69:1435-1442.
55. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The Biology of NKT Cells. *Annu Rev Immunol.* 2007;25(1):297-336.
56. Caligiuri M a. Human natural killer cells. *Bone.* 2008;112(3):461-469.
57. Vivier E. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008;9(5):503-510.
58. Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, et al. Effector and regulatory events during natural killer?dendritic cell interactions. *Immunol Rev.* 2006;214(1):219-228.
59. Rühle PF, Fietkau R, Gaipf US, Frey B. Development of a modular assay for detailed immunophenotyping of peripheral human whole blood samples by multicolor flow cytometry. *Int J Mol Sci.* 2016;17(8).
60. Van Zelm MC, Smet J, Adams B, et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J Clin Invest.* 2010;120(4):1265-1274.
61. Sato S, Miller AS, Howard MC, Tedder TF. Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81/Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19. *J Immunol.* 1997;159(7):3278-3287.
62. Wentink MWJ, Lambeck AJA, van Zelm MC, et al. CD21 and CD19 deficiency: Two defects in the same complex leading to different disease modalities. *Clin Immunol.* 2015;161(2):120-127.

## 7. ARTIGO

### Quantification of lymphocyte subpopulations in repeat platelet apheresis

#### donors: control case study

##### Abstract

**Introduction:** The donation of platelets by apheresis as a collection method has lately grown in relevance. This technique presents several advantages when compared to total blood donation. We understand there is a concern about the quality of the hemocomponents that are administered to the patients; however, there are not many researches concerned with caring for the donor. Entities such as the Food and Drug Administration (FDA) have published more restricting regulations regarding the donation of platelets by apheresis, since researches indicate a decrease in some cells and proteins present in the immunological systems of repeat donors.

**Objectives:** To analyze repeat donors of platelets with regards to hematimetric parameters and quantification of lymphocyte sub-populations by comparing them with a control group consisting of total blood donors that have not donated blood for the past year at least or that are donating for the first time. Additionally, to evaluate if the frequency of donations, the duration of the procedure, and the donated platelet counts influence in the total leukocyte counts and in the sub-populations of lymphocytes.

**Methodology:** We analyzed 88 individuals in a control case study. The control group (CG) consisted of total blood donors in their first donation or that had donated for the last time more than a year before. The cases (CA) included were the repeat donors by platelet apheresis (four or more donations in the past year). We matched the individuals by gender and age. Peripheral blood samples were collected in tubes containing EDTA and analyzed up until 6 hours later by flow cytometry, through monoclonal antibodies anti-CD3, CD4, CD8, HLADR, CD19, and CD56.

**Results:** 88 pairs of donor were evaluated (case vs control). Among them, 81.8% were men, the average age of the groups was 46 ( $\pm 13$ ) years in the cases and 47 ( $\pm 11$ ) in the controls. When comparing the two groups, we observed a statistically significant difference ( $p < 0,05$ ) in the average of the quantification of absolute leukocytes CA= 6476.6/ $\mu\text{L}$  vs CG=7115.4/ $\mu\text{L}$  ( $p=0.017$ ), in the average of absolute lymphocytes CA= 1862.6/ $\mu\text{L}$  vs CG= 2239.2/ $\mu\text{L}$  ( $p=0.007$ ), and in the markers: CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (absolute) CA= 437/ $\mu\text{L}$  vs CG= 597/ $\mu\text{L}$  ( $p=0,01$ ), CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>(%) CA= 47.3/ $\mu\text{L}$  vs CG= 42.77/ $\mu\text{L}$  ( $p=0.007$ ).

**Conclusions:** We were able to note in this study that there is a significant decrease in some lymphoid cells of repeat donors when compared to conventional donors. This difference, however, is not clinically relevant, which demonstrates that the donation intervals to which the donors are subject are appropriate. Platelet numbers of repeat donors remained the same throughout the year. This piece of data helps us keep a database of repeat donors with an adequate platelet number. These donors can be called for without risking of their being blocked in the screening for a number lower than the recommended.

## Introduction

The collection of platelets by apheresis or plateletpheresis is used to obtain platelets from voluntary donors, for replenishment, or from donors with specific human leukocyte antigen phenotypes (HLA) and specific human platelet antigen (HPA) phenotypes<sup>1,2</sup>. The procedure collects a great number of platelets from one single individual, thus offering a greater amount of platelets when compared to total blood donation and, consequently, reducing the exposure of the patients to multiple donors<sup>1,3</sup>. A simple plateletpheresis collection equals  $3.0 \times 10^{11}$  platelets per unit<sup>4</sup>. This represents 4 to 6 units of platelet concentrate obtained from blood donation<sup>5</sup>. In a double collection, the number of platelets should be equal to or larger than  $6.0 \times 10^{11}$ <sup>4</sup>.

According to the World Health Organization (WHO), in the Melbourne Declaration, the availability of safe blood is made possible by voluntary, regular and non-compensated blood donation<sup>6</sup>. Technical and scientific advances in the medical field, as well as the resulting aging of the population have increased the need for blood transfusions, and, therefore, the shortage of donors<sup>7,8</sup>. A database of loyal repeat donors helps to maintain the stocks of our hemotherapy service. However, the layer with the largest concentration of platelets is the leuko-platelet layer<sup>9</sup>, i. e., besides the platelets some of the donor leukocytes are also separated during the spinning the be collected and are not reinfused in the donor. Approximately 30 per cent of the total circulating lymphocytes are removed during each plateletpheresis procedure<sup>10</sup>. Immunomodulation of short duration mediated by HLA-Is in platelet and plasma donor was also reported<sup>11</sup>.

Between the decades of 1980 and 1990 and beginning of the 2000's, studies reporting a decrease in immune cells and proteins in repeat apheresis donors started to appear<sup>10,12,13,14</sup>. In Brazil, regulations determine a few parameters for apheresis donation, such as a minimum initial count of  $150 \times 10^3$  platelets/ $\mu$ L and a minimum interval of 48 (forty-eight) hours between two plateletpheresis in one donor, with the possibility of the same donor donate, at most, 4 (four) times a month and 24 (twenty-four) times a year<sup>4,15</sup>.

This study intends to quantify lymphocyte sub-populations in repeat plateletpheresis donors in our service to verify if the donation frequency of our donors is appropriate to prevent harm to their health.

## **Materials and Methods**

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### *Selection and Collection of Samples*

During 2016, we analyzed 88 individuals in a control case study. The control group (n=44) consisted of total blood donors in their first donation or that had donated for the last time more than a year before. The cases (n=44) included were the repeat donors by platelet apheresis (four or more donations in the past year) that donated with the intermittent flow equipment Haemonetics MCS-PLUS (Boston, Massachusetts, USA). We matched the individuals by gender and age.

### *Sample Preparation*

The volume of the sample to be processed was adjusted in order to obtain a final concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml. After pipetting the samples, both tubes were incubated at room temperature in the dark for 30 minutes. After the appropriate time, we added 2 mL of FACSLYSE (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and incubated the samples for 10 more minutes at room temperature in the dark to lyse the erythrocytes. The sample was centrifuged (5 minutes at 540g) and the supernatant was discarded by inversion. 2 mL of PBS (phosphate buffered saline) were added and the sample was briefly placed in a vortex to achieve homogenization. Later, the sample was centrifuged once more (5 minutes, 540g). After discarding the supernatant by inversion, the pellet was re-suspended with 250  $\mu$ L of PBS and a brief run through the vortex.

Tabela 1: Used markers and fluorescence

	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tubo1	CD19	CD3	CD45			HLADR
Tubo2	CD3	CD8	CD45	CD56	CD4	

FITC= Fluorescein isothiocyanate; PE= Phycoerythrin; PerCP=Peridinin-chlorophyll-protein PE-Cy7= combining R-PE and a cyanine dye; APC= Allophycocyanin

The volume of the sample to be processed was adjusted in order to obtain a final concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml. After pipetting the samples, both tubes were incubated at room temperature in the dark for 30 minutes. After the appropriate time, we added 2mL of FACSLYSE (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and incubated the samples for 10 more minutes at room temperature in the dark to lyse the erythrocytes. The sample was centrifuged (5 minutes at 540g) and the supernatant was discarded by inversion 2 mL of PBS (phosphate buffered saline) were added and the sample was briefly placed in a vortex to achieve homogenization. Later, the sample was centrifuged once more (5 minutes, 540g). After discarding the supernatant by inversion, the pellet was re-suspended with 250  $\mu$ L of PBS and a brief run through the vortex.

#### *Data Acquisition*

The samples were acquired with a flow cytometer FACScanto II (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) using the BD FACSDiva software (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). The calibration of the device was performed before data acquisition based on previously established protocols, and, when processing the samples, a total of 100.000 events were acquired, in order to achieve a detection sensibility of 0,01%.

#### *Data Analysis*

The obtained data were analyzed using the analysis software Infinicyt, version 1.7 (Santa Marta de Tormes, Salamanca, Spain). Both for the analysis of tube 1 and of tube 2, first all the CD45<sup>+</sup> cells that presented low granulation and great fluorescence were selected, in order to make the exclusive analysis of lymphocytes

possible. T lymphocytes were identified by means of the expression of auxiliary CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T, cytotoxic CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T, natural killer CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>T(TNK), and activated CD3<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>. To identify natural killer (NK) cells, we searched for a negative expression of CD3 and positive for CD56 and the cells were identified by a negative expression of CD3 and a positive expression of CD19.

### *Statistical analysis*

The normal distribution of the primary endpoint variables was assessed using the Shapiro-Wilk test. The differences between the groups (case and control) were analyzed through a T-test for matched samples and Wilcoxon test for asymmetrically distributed samples. The data are presented as average values, including confidence intervals of 95% (CR) or median, with an interquartile interval of 25 and 75 percentiles. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analysis were performed using the SPSS (version 20, IBM Corp., Armonk, NY).

## **Results**

Table 2 describes demographic and typing ABO/RhD data for the case group and control groups.

Table 2 Demographic and typing characteristics of the matched groups

Parameter	Case (n=44)	Control (n=44)	P
Males - n (%)	36(81.8)	36 (81.8)	
Age – Mean* (years)	46 (13)	47 (11)	0.338
ABO Group			
A - n (%)	13(29.5)	23 (52.3)	0.13
B - n (%)	3 (6.8)	3(6.8)	
AB - n (%)	4 (9.1)	1(2.3)	
O - n (%)	24(54.5)	17(38.6)	
RhD Group			
D positive - n (%)	41 (93.2)	33(75)	0.04
D negative n - (%)	3(6.8)	11(25)	

\* Results are reported as means  $\pm$  standard deviation (SD)

There was no significant difference of age between the two groups. The most frequent ABO type (n=88) was O (n=41-46%), followed closely by A (n=36-41%).

We observed a significant difference in the markers and parameters presented in Table 3. Besides ABO typing and the number of donations per year, we assessed data such as number of cycles of the equipment, processed volume, collected volume, initial and final platelet counts of the donor, as well as platelet count of the bag. None of these data presented any statistical significance.

Table 3. Comparison of means (percentages and absolute counts) with significant statistical differences or trends.

Parameter	Global data (n=88)			6 or less donations/year (n=48)			7 or more donations/year (n=40)		
	Case	Control	P	Case	Control	P	Case	Control	P
Abs Leukocytes*	6476.6 (1312.1)	7115.4 (1012.9)	<b>0.01</b>	6420.4 (1237.2)	7215.4 (1041.3)	<b>0.03</b>	6543.9 (1426.4)	6995.5 (990.9)	0.24
Abs Lymphocytes*	1862.6 (733.8)	2239.2 (477.2)	<b>0.007</b>	2117.3 (586.2)	2260.6 (498.1)	0.42	1557 (788.9)	2213.45 (462.5)	<b>0.002</b>
Abs CD3*	1415.7 (480.5)	1625.2 (464.6)	0.08	1498.3 (444.6)	1635.8 (519.2)	0.39	1316.5 (514.2)	1612.5 (402.4)	0.10
CD3/CD4%*	47.3 (8.2)	42.77 (6.8)	<b>0.007</b>	46.2 (8.9)	42.2 (5.7)	0.053	48.70 (7.5)	43.45 (8.1)	0.06
CD3/CD8%*	23.9 (8.9)	27.5 (8.5)	0.07	25.6 (9.7)	28.7 (9.0)	0.28	21.85 (7.6)	26.05 (7.9)	0.13
Abs CD3/CD8†	437 (274.5-586.0)	597 (402.75-747.5)	<b>0.01</b>	528.5 (357-649.2)	651.0 (452.5-870.2)	0.13	322.5 (270-478.25)	563.50(375.7-732.25)	<b>0.02</b>

\* Results are reported as means  $\pm$  standard deviation (SD)

† Variable reported as median (interquartile range).

## Discussion

In 2005, the Food and Drug Administration (FDA) published in the Guideline for Industry and FDA Review Staff Collection of Platelets by Automated Methods that the donation interval should be proportional to the final number of collected platelets<sup>16</sup>. Thus, if the donor has a double collection ( $6,0 \times 10^{11}$ /unit), there should be a minimum interval of 7 (seven) days, or, if it is a triple collection ( $9,0 \times 10^{11}$ /unit) the minimum interval for a new donation should be of 14 (fourteen) days<sup>16</sup>. The increase in restrictions shows a greater concern for the health of donors. However, despite the fact that previous guidelines pointed to a clinically significant decrease in the immune system cells of repeat plateletpheresis donors, this was not observed in our work.

We observed a decrease in the amount of leukocytes (absolute), lymphocytes (absolute), auxiliary T cells (%) and cytotoxic cells (absolute). Our data show that the decrease in immune cells does not depend exclusively on the number of donated platelets and our statistics suggest that this endpoint is multifactorial. In any case, the decrease in cells is not clinically relevant<sup>17</sup>, which corroborates the data of Katz L. *et. al.*<sup>18</sup>, which demonstrate that we are not exposing our repeat donors to risk. Besides, the initial platelet count was stable in all of the donors, having no influence in the final platelet count. This data will help us create a list of donors with higher platelet counts so as to take greater advantage of the collection. In our service, the apheresis equipment is programmed to keep the donors from leaving with a platelet count under  $100 \times 10^3$  platelets/ $\mu$ L. This limit probably helps reduce donor exposure.

The platelets collected by apheresis is a greatly relevant hemocomponent in the treatment of several diseases. Having an adequate number of repeat donors, along with an adequate stock control helps support these treatments.

Our results demonstrate that there is no risk in maintaining a group of loyal donors and in actively pursuing their donation more times a year to help us maintain our stocks. We suggest a cohort study with repeat donors with a greater control of the intervals between donations and the quantification of sub-populations in all of the collections.

## References

1. Roback, John D.; Grossman, Brenda J.; Harris, Teresa; Hillyer CD. Technical Manual of the American Assoc of Blood Banks. In: Roback JD, ed. *Technical Manual of the American Assoc of Blood Banks*. Vol 17th ed. ; 2011:227-238.
2. Jia Y, Li W, Liu N, et al. Prevalence of platelet-specific antibodies and efficacy of crossmatch-compatible platelet transfusions in refractory patients. *Transfus Med*. 2014;24(6):406-410.
3. Thiele T, Alt-Mayer T, Greinacher A, Bux J. Implications of a switch to a 100% apheresis platelet supply for patients and for blood donors: a risk benefit analysis. *Vox Sang*. 2016:1-7.
4. Ministério da Saúde (BR). *Portaria nº 158, de 04 de Fevereiro de 2016*. Vol 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Brasília - DF; 2016. Publicado no Diário Oficial da União em 05 de fevereiro de 2016 (nº 25, Seção 1, pág. 37).
5. Kaufman RM, Djulbegovic B, Gernsheimer T, et al. Platelet transfusion: A clinical practice guideline from the AABB. *Ann Intern Med*. 2015; 162 (3): 205-213.
6. WHO and International Federation of Red Cross and Red Crescent Societies. *Towards 100% Voluntary Non-Renumerated Donation of Blood and Blood Components*. Melbourne; 2009.
7. Brener S, Caiaffa WT, Proietti F a. Fatores associados à aptidão clínica para a doação de sangue – determinantes demográficos e socioeconômicos. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(2):108-113.
8. Zeiler T, Lander-Kox J, Alt T. Blood donation by elderly repeat blood donors. *Transfus Med Hemotherapy*. 2014;41(4):242-250.
9. Serinolli MI, Novaretti MCZ, Dorlhiac-Lacer PE, Chamone DAF. Estudo do método da extração da camada leucoplaquetária na produção de hemocomponentes: avaliação laboratorial. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2004;26(3):167-176.
10. Matsui Y, Martin-Alosco S, Doenges E, et al. Effects of frequent and sustained plateletapheresis on peripheral blood mononuclear cell populations and lymphocyte functions of normal volunteer donors. *Transfusion*. 1985;26(5):446-452.

11. Ghio M, Contini P, Ansaldi F, et al. Immunomodulation due to plasma or plasma–platelet apheresis donation: Events occurring during donation procedures. *J Clin Apher.* 2015;30(4):204-211.
12. Strauss RG. Effects on donors of repeated leukocyte losses during plateletpheresis. *J Clin Apher.* 1994;9(2):130-134.
13. Prior CR, Coghlan PJ, Hall JM, Jacobs P. In vitro study of immunologic changes in long-term cytopheresis donors. *J Clin Apher.* 1991;6(2):69-76.
14. Braine HG, Effenbein GJ, Mellits ED. Peripheral blood lymphocyte numbers, lymphocyte proliferative responses in vitro, and serum immunoglobulins in regular hemapheresis donors. *J Clin Apher.* 1985;2(3):213-218.
15. Ministério da Saúde (BR) Resolução da Diretoria Colegiada - *RDC n° 34.* Brasília - DF:Publicada no Diário Oficial da União, dia 16 de junho de 2014.
16. FDA C for BE and R. *Guidance for Industry and FDA Review Staff: Collection of Platelets by Automated Methods.* Rockville; 2005.
17. Moraes-Pinto MI. Valores de referência de linfócitos/mm<sup>3</sup> em população brasileira saudável. *Immunodefíc Disord.* 2006;3:1-4.
18. Katz L, Palmer K, McDonnell E, Kabat A. Frequent plateletpheresis does not clinically significantly decrease platelet counts in donors. *Transfusion.* 2007;47(9):1601-1606.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Manter um estoque de hemocomponentes adequado é um dos desafios que todos os serviços de hemoterapia enfrentam, principalmente com o envelhecimento da população é a diminuição do número de doadores de sangue.

Com este trabalho foi possível observar que a frequência de doações que o Hospital de Clínicas de Porto Alegre expõe seus doadores de repetição de aférese não influencia negativamente na contagem das células do sistema imune representadas pelos marcadores utilizados. Poderemos manter nossa política de busca ativa, sabendo ainda, que o número de plaquetas dos doadores se mantém linear, o que também irá auxiliar em nosso banco de dados, tendo em vista que a nossa portaria exige um mínimo de 150.000 plq/mm<sup>3</sup> para que a doação ocorra<sup>14</sup>.

## **9. PERSPECTIVAS FUTURAS**

A realização de um estudo de coorte, onde fosse possível acompanhar o doador desde a sua primeira doação e incluir intervalos menores entre uma doação e outra auxiliaria para que pudéssemos observar se este intervalo mais reduzido influenciaria em algum marcador. Além disso poderia ser solicitado ao mesmo que se mantenha doando no mínimo por sete doações, que foi aonde conseguimos observar que a redução de algumas linhagens celulares ocorre.

O incentivo à doação deve ser constante e trabalhos que visem a segurança do doador podem auxiliar na montagem de estratégias de captação efetivas e seguras.

**STROBE**

<b>Ítem</b>	<b>N°</b>	<b>Recomendação</b>	<b>Pag</b>
Título e Resumo	1	Indique o desenho do estudo no título ou no resumo, com termo comumente utilizado	Capa
		Disponibilize no resumo um sumário informativo e equilibrado do que foi feito e do que foi encontrado	7
Introdução			
Contexto/Justificativa	2	Detalhe o referencial teórico e as razões para executar a pesquisa.	17;34
Objetivos	3	Descreva os objetivos específicos, incluindo quaisquer hipóteses pré-existentes	34
Métodos			
Desenho do estudo	4	Apresente, no início do artigo, os elementos-chave relativos ao desenho do estudo.	41

Contexto (setting)	5	Descreva o contexto, locais e datas relevantes, incluindo os períodos de recrutamento, exposição, acompanhamento (follow-up) e coleta de dados	44
Participantes	6	Estudos de Caso-Control: Apresente os critério-diagnóstico para identificação dos casos e os métodos de seleção dos critérios de elegibilidade, as fontes e os controles. Descreva a justificativa para a eleição dos casos e controles	44
Variáveis	7	Defina claramente todos os desfechos, exposições, preditores, confundidores em potencial e modificadores de efeito. Quando necessário, apresente os critérios diagnósticos.	46

Fontes de dados/ Mensuração	8	Para cada variável de interesse, forneça a fonte dos dados e os detalhes dos métodos utilizados na avaliação (mensuração). Quando existir mais de um grupo, descreva a comparabilidade dos métodos de avaliação.	46
Viés	9	Especifique todas as medidas adotadas para evitar potenciais fontes de viés.	44;46
Tamanho do estudo	10	Explique como se determinou o tamanho amostral.	44
Variáveis quantitativas	11	Explique como foram tratadas as variáveis quantitativas na análise. Se aplicável, descreva as categorizações que foram adotadas e por que.	46

Métodos estatísticos	12	Descreva todos os métodos estatísticos, incluindo aqueles usados para controle de confundimento. Descreva todos os métodos utilizados para examinar subgrupos e interações. Explique como foram tratados os dados faltantes ("missing data"). Estudos de Caso-Controlle: Se aplicável, explique como o pareamento dos casos e controles foi tratado.	46
----------------------	----	--	----