

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

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ANCORADAS AO
GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL (GPI) E ATIVAÇÃO NEUTROFÍLICA EM
DOADORES DE PLAQUETAFÉRESE DE REPETIÇÃO**

LAÍS OLIVEIRA GARCIA

PORTO ALEGRE

2016

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

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ANCORADAS AO
GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL (GPI) E ATIVAÇÃO NEUTROFÍLICA EM
DOADORES DE PLAQUETAFÉRESE DE REPETIÇÃO**

LAÍS OLIVEIRA GARCIA

**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

Garcia, Laís Oliveira

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ANCORADAS AO GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL (GPI) E ATIVAÇÃO NEUTROFÍLICA EM DOADORES DE PLAQUETAFÉRESE DE REPETIÇÃO / Laís Oliveira Garcia. -- 2016.
52 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. plaquetaférese. 2. doação de repetição. 3. HPN. 4. ativação neutrofílica. 5. glicosilfosfatidilinositol. I. Faulhaber, Gustavo Adolpho Moreira , orient. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Professora Doutora Denise Cantarelli Machado

Professor Doutor Rafael Mendonca Da Silva Chakr

Professor Doutor Rodrigo Binkowski de Andrade

Professor Doutor Odirlei Andre Monticielo

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber pela sua orientação, dedicação, pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação.

A Dra. Ana Paula Alegretti pela sua disponibilidade, exigência e dedicação.

Ao Leo Sekine pela disposição em debater assuntos pertinentes ao trabalho e auxílio estatístico.

A Fabiane Spagnol Pedrazzani e Mariela Granero Farias pelos ensinamentos, paciência e empenho.

A toda equipe da Unidade de Diagnóstico Personalizado pelo apoio e parceria.

A toda equipe do Serviço de Hemoterapia pelo apoio em diversas etapas do trabalho.

A minha colega e amiga Luciana do Nascimento Vargas pela excelente parceria no decorrer de todo o trabalho, amizade, carinho e compreensão.

Aos meus pais e sogros pela compreensão, carinho e força.

A minha irmã Laura Oliveira Garcia, pelo carinho, incentivo e apoio.

Ao meu noivo Mauricio Sprenger Bassuino pelo incondicional companheirismo, amor, carinho, apoio e compreensão em todos os momentos.

RESUMO

A coleta de hemocomponentes por equipamentos de aférese tem aumentado muito nos últimos anos, sendo considerado um avanço na medicina transfusional, pois possibilita a retirada de um ou mais componentes de um doador único resultando em um hemocomponente padronizado e de alta qualidade. No entanto, os intervalos entre as doações de plaquetaférese em geral são curtos, podendo haver perda de células a cada doação e potencial desregulação do sistema hematopoiético. Pode ocorrer ainda um possível efeito patogênico após passagem das células pelo equipamento de aférese e ativação neutrofílica. Diante disso, há a preocupação se isso acarretaria riscos à saúde do doador em longo prazo. Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a perda da expressão de proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), presença de clone HPN (hemoglobinúria paroxística noturna) e ativação de neutrófilos em doadores de plaquetaférese de repetição. Métodos: Estudo de caso controle, sendo 44 amostras de doadores de plaquetaférese de repetição e 44 doadores de sangue total controle. Foram coletadas amostras de sangue periférico, marcadas com os anticorpos monoclonais CD157, CD45, CD64, CD10 e FLAER (do inglês, *Fluorescent Aerolysin*, aerolisina fluorescente) e analisadas por citometria de fluxo. Para análise de ativação de neutrófilos, foram analisadas 17 amostras de doadores de plaquetaférese de repetição e 17 amostras de doadores de sangue total marcadas com CD64. Conclusão: Não foram encontradas alterações significativas na expressão das proteínas ancoradas ao GPI e na expressão de CD64 entre os doadores de plaquetaférese de repetição e os controles. Sugere-se que a doação de plaquetaférese de repetição não altera a expressão de proteínas ancoradas ao GPI, não gera clone HPN tampouco altera a expressão de CD64. Palavras-chave: plaquetaférese, GPI, HPN, ativação de neutrófilos.

ABSTRACT

The collection of hemocomponents through apheresis equipment has increased much in recent years, which is considered an advance in transfusion medicine because it enables the withdrawal of one or more components from a single donor, resulting in a standardized and high-quality hemocomponent. Nonetheless, the intervals between the plateletpheresis donations are generally short, which can cause loss of cells in each donation and potential dysregulation of the hematopoietic system. What can also happen is a possible pathogenic effect after the transit of the cells through the apheresis equipment and neutrophilic activation. In light of this situation, there is the concern about whether that brings risks to the donor's health, in the long term. Objective: the objective of this study was to evaluate the loss in the expression of some glycosylphosphatidylinositol-anchored (GPI-anchored) proteins, the presence of PNH clone and neutrophils activation in repeated plateletpheresis donors. Methods: Case-control study using 44 samples of donors of repeated plateletpheresis and 44 samples of donors of whole-blood donors as controls. Peripheral blood samples were collected into tubes containing EDTA, marked with CD157, CD45, CD64, CD10 and FLAER monoclonal antibodies, and analyzed by flow cytometry. For the analysis of neutrophil activation, 17 samples of repeated plateletpheresis donors and 17 samples of whole-blood donors, both marked with CD64 were analyzed. Conclusion: No alteration in the expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and in the CD64 expression was found. It is suggested that repeated plateletpheresis donation does not alter the expression of GPI-anchored proteins, does not generate PNH clone and neither alters the expression of CD64.

Key words: plateletpheresis, GPI, PNH, neutrophil activation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo	15
Figura 2- Separação de hemocomponentes por centrifugação	18
Figura 3- Molécula GPI que mantém diversas proteínas aderidas à membrana plasmática	23
Figura 4- Proteínas de superfície ancoradas com GPI em células hematopoiéticas	24
Figura 5- Esquema marco teórico	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Exemplos de proteínas ancoradas ao GPI, sua função e principal distribuição celular

25

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AABB: *American Association of Blood Bank*- Associação Americana de Banco de Sangue

AChE: *acetylcholinesterase*, acetilcolinesterase

ADP-RT: *mono ADP-ribosyl transferase*, ADP-ribosiltransferase mono

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CD: *Cluster of differentiation*

DAF: *decay accelerating factor*, Fator de aceleração do decaimento

DNA: *deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico

EDN: *eosinophil-derived neurotoxin*, neurotoxina derivada de eosinófilos

Fas: receptor de morte

FC: Fração cristalizável de imunoglobulina

Fc γ : Fração cristalizável de imunoglobulina G

Fc γ RI: Receptor do Fc γ I ,também denominado CD64

Fc γ RII: Receptor do Fc γ II, também denominado CD32

Fc γ RIII: Receptor do Fc γ III, também denominado CD16

FDA: *Food and Drug Administration*

FLAER: *Fluorescent Aerolysin*, aerolisina fluorescente

GPI: glicosilfosfatidilinositol

Hb: hemoglobina

Hct: hematócrito

HLA: *Human leukocyte antigen*, antígeno leucocitário humano

HPN: Hemoglobinúria Paroxística Noturna

IFN- γ : *Interferon gamma*, interferon gama

IgG: imunoglobulina G

IL-2: *Interleukin-2*, interleucina-2

ILT: *immunoglobulin-like transcript*, transcrito semelhante à imunoglobulina

IPIG: *International PNH Interest Group*

LAP: *leukocyte alkaline phosphatase*, fosfatase alcalina leucocitária

MIRL: *membrane inhibitor of reactive lysis*, inibidor de membrana da lise reativa

NET: *neutrophil extracellular traps*, redes extracelulares dos neutrófilos

NK: *Natural Killer*

Nº: número

PIG-A: *phosphatidyl inositol glycan - class A*, PIG-A, fosfatidilinositol glicano - classe A

PrPc: *prion protein*, proteína príon

sHLA-I: *soluble human leucocyte antigen class I*, antígeno leucocitário humano solúvel de classe I

SMD: síndrome mielodisplásica

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor Alpha*, fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	14
PLAQUETAFÉRESE	16
EFEITOS ADVERSOS DA DOAÇÃO DE PLAQUETAFÉRESE.....	17
EQUIPAMENTOS DE AFÉRESE.....	17
RISCO DE IMUNOSSUPRESSÃO E DOAÇÃO DE PLAQUETAFÉRESE DE REPETIÇÃO	19
ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS	19
RECEPTORES FCY	21
EXPRESSÃO DE CD64.....	21
PLAQUETAFÉRESE E ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS	21
PROTEÍNAS ANCORADAS AO GPI.....	22
HPN (HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA)	26
INSUFICIÊNCIA DA MEDULA ÓSSEA	27
CLASSIFICAÇÃO DE HPN	28
CONDIÇÕES ASSOCIADAS COM PRESENÇA DE CLONE HPN	28
DIAGNÓSTICO POR IMUNOFENOTIPAGEM.....	29
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. MARCO TEÓRICO.....	32
5. OBJETIVOS	34
5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO.....	34
5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	34
6. REFERÊNCIAS	35
7. ARTIGO.....	41
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	51

1. INTRODUÇÃO

A doação de plaquetas por aférese ou plaquetaférese consiste na coleta de um grande número de plaquetas obtidas de um único doador resultando em um produto padronizado e de alta qualidade. Nos últimos anos, o uso de plaquetas coletadas por aférese tem crescido consideravelmente.

Dentre as diversas vantagens sobre a transfusão de plaquetas randômicas se destacam a diminuição da exposição a múltiplos doadores e sua utilidade em pacientes que apresentam refratariedade plaquetária.

Apesar da doação de plaquetaférese ser um procedimento seguro para o doador, há uma preocupação em relação aos efeitos adversos de longo prazo. Um dos fatores que contribuem para essa preocupação é o fato de que a doação de plaquetas pode ocorrer com uma frequência maior do que a doação de sangue total, com um intervalo mínimo de 48 horas entre as doações de plaquetaférese. Além disso, estudos demonstraram que na doação de plaquetaférese é perdida uma quantidade de leucócitos. Dessa forma, a preocupação é que, em longo prazo, haja uma perda significativa de células sanguíneas do doador, podendo ocasionar um quadro de possíveis alterações imunológicas.

Diante dessa perda de leucócitos, o doador de plaquetaférese de repetição pode estar mais propenso a mutações adquiridas que levam a distúrbios como hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) devido à hiperestimulação da medula óssea na tentativa de compensar essa perda celular. Logo, é importante avaliar se estes doadores apresentam potencial clone HPN. Considerando o possível efeito patogênico da passagem das células pelo circuito dos equipamentos de aférese, que por efeito mecânico, adsorção ou *downregulation* pode ocasionar a perda de proteínas da membrana celular, é relevante avaliar se as células demonstram ausência ou diminuição de proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Além disso, há outra questão importante, muito pouco estudada, que se trata da ativação dos neutrófilos pós-processo de plaquetaférese, o que pode ocasionar alterações funcionais nos neutrófilos dos doadores.

Até o momento, as questões de segurança relacionadas aos doadores de plaquetaférese são mais direcionadas aos efeitos adversos de curto prazo, no entanto, as possíveis consequências em longo prazo podem ir muito mais além do

que é demonstrado atualmente. Estas possíveis consequências podem ser decorrentes dos efeitos metabólicos cumulativos da doação de plaquetaférese de repetição.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura está focada na importância da transfusão de plaquetaférese, garantir intervalos de doação seguros para o doador, visando a integridade do sistema imune do doador de repetição. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS (<http://lilacs.bvsalud.org>), SciELO (<http://www.scielo.org>) e PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), no período de 1996 a 2016. Foram realizadas buscas através dos termos “*plateletpheresis*”, “*paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*”, “*glycosylphosphatidylinositol anchors*”, “*neutrophil activation*”, “*Fc gamma receptors*”, “*CD64 antigens*”, “*bone marrow failure syndromes*” e suas combinações apresentadas na Figura 1.

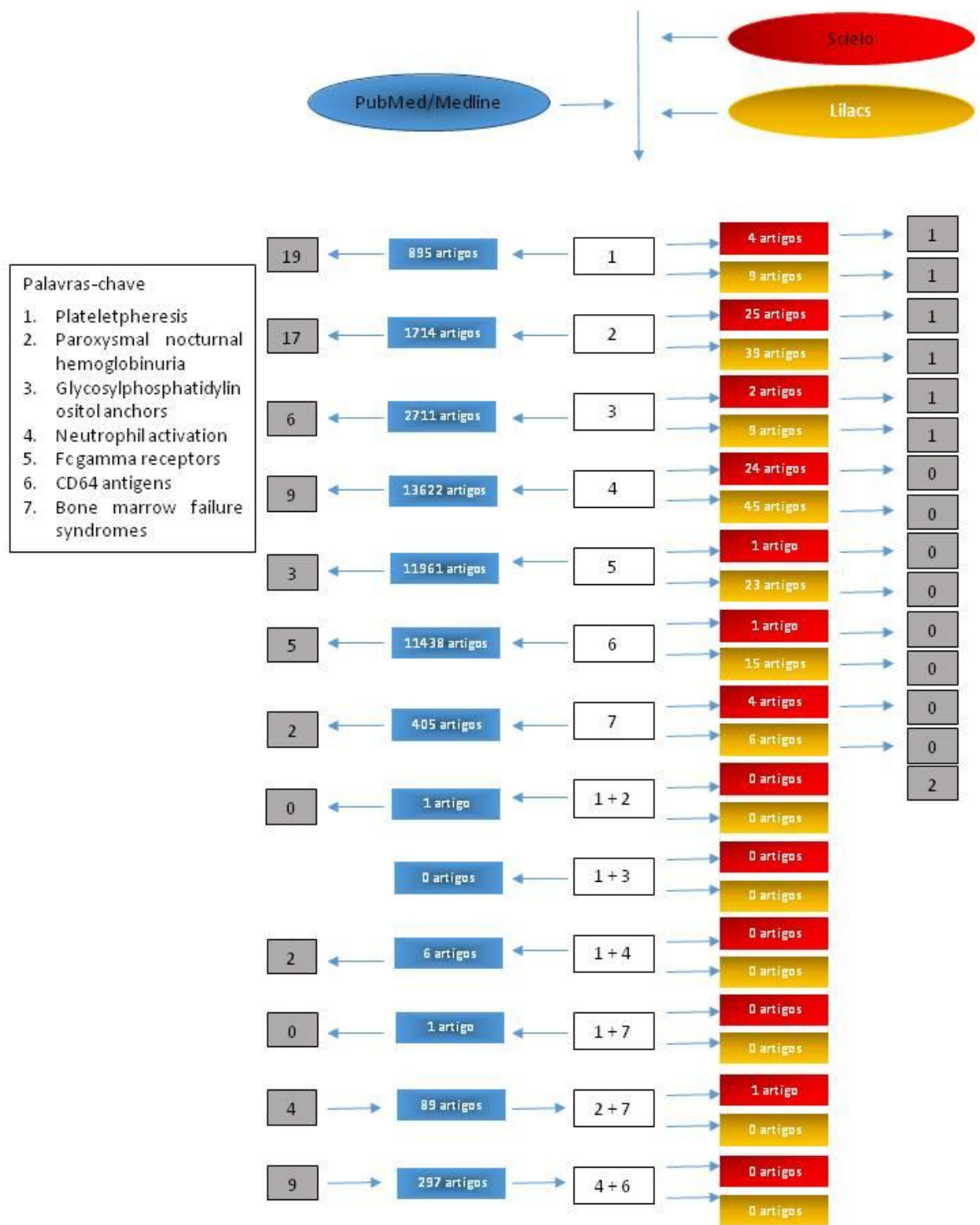


Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. Caixas em cinza indicam os artigos que foram incluídos na revisão de acordo com os critérios de inclusão. Este é o resultado da busca da combinação das palavras-chave. Fonte: Elaborado pela Autora (2016)

PLAQUETAFÉRESE

Por volta da década de 50, as transfusões de plaquetas se mostravam efetivas na redução da mortalidade por hemorragia em pacientes com leucemia e, desde então, sua utilização vem crescendo e aperfeiçoamentos, tanto na coleta, quanto no armazenamento, eficácia e segurança vêm sendo realizados¹.

Nos últimos anos, o número de pacientes recebendo transfusão de plaquetas tem aumentado e conforme estimativa da *American Association of Blood Banks (AABB)*, mais de 70% das transfusões são profiláticas².

Na prática clínica, o uso de plaquetas é frequente nos casos de prevenção e tratamento de hemorragias em pacientes trombocitopênicos ou com disfunção plaquetária, pacientes com doenças hematológicas^{1,3} e pacientes submetidos a quimioterapia⁴.

Os componentes plaquetários podem ser obtidos por doação de sangue total (*buffy-coat* ou plasma rico em plaquetas³) ou doação de aférese¹.

Aférese é uma palavra grega que significa “separar” ou “remover”, que consiste em coletar sangue total e separá-lo, sendo este procedimento utilizado para coletar um ou mais componentes específicos do sangue, como plaquetas, plasma e células-tronco⁷. A coleta de hemocomponentes através de equipamentos de aférese tem aumentado muito nos últimos anos⁵ e é considerado um avanço na medicina transfusional⁶, pois possibilita a retirada de um ou mais componentes de um único doador, resultando em um hemocomponente padronizado e de alta qualidade^{6,7} com boa pureza e volumes consistentes^{5,8}.

As novas tecnologias disponíveis e o aumento das indicações médicas e cirúrgicas para transfusão de plaquetas têm aumentado o uso de plaquetaférese⁹, sendo um dos hemocomponentes altamente exigidos na transfusão de sangue⁸.

A utilização de plaquetas por aférese apresenta diversas vantagens em relação à utilização de um *pool* de plaquetas randômicas: menor risco de contaminação bacteriana, de transmissão de doenças infecciosas¹⁰ e de aloimunização, devido a menor exposição à doadores e padronização do procedimento¹. Também é de grande utilidade nos casos de refratariedade plaquetária, onde os pacientes necessitam de plaquetas HLA (do inglês, *Human leukocyte antigen*, antígeno leucocitário humano) compatíveis¹¹.

Entretanto a doação de plaquetaférese pode ter algumas desvantagens como: alto custo, disponibilidade de doadores¹² e alguns pequenos riscos e problemas associados ao procedimento, como circulação extracorporal, ativação de plaquetas, toxicidade ao citrato, hipocalcemia, imunodeficiência por perda de células³, ativação de neutrófilos¹³, entre outros.

A doação de um único doador de plaquetaférese é suficiente para, no mínimo, uma dose terapêutica, enquanto que para se obter um *pool* para transfusão em adultos equivalente a uma dose terapêutica, são necessárias de 4-6 plaquetas randômicas provenientes de coleta de sangue total^{3,10,9}.

Conforme a AABB¹⁴ e Portaria nº 158 de 4 de fevereiro de 2016¹⁵, uma unidade de plaquetas por aférese deve conter, no mínimo, 3×10^{11} plaquetas e o intervalo entre as doações de plaquetaférese deve ser de, no mínimo, 2 dias, não podendo exceder duas doações por semana, tampouco, mais de 24 doações por ano.

EFEITOS ADVERSOS DA DOAÇÃO DE PLAQUETAFÉRESE

A doação de plaquetaférese pode ocasionar, assim como a doação de sangue total, reações gerais como fraqueza, sudorese, palidez, náusea e desmaio durante ou após a doação³.

Os efeitos adversos dos procedimentos de doação de aférese são bem descritos na literatura, sendo mais comuns àqueles relacionados à utilização de citrato durante a coleta, porém são facilmente contornados¹².

Diversos efeitos adversos em curto prazo envolvidos no processo de plaquetaférese são estudados, entretanto os dados de efeitos adversos em longo prazo são muito mais complexos⁸ e pouco explorados.

EQUIPAMENTOS DE AFÉRESE

Atualmente, existem diversos equipamentos de aférese, nos quais o princípio de separação dos hemocomponentes é o mesmo. No entanto, o que os diferenciam é o tipo de fluxo, que pode ser contínuo ou intermitente e a tecnologia utilizada por cada equipamento, gerando um produto de melhor ou pior qualidade, podendo interferir nos efeitos adversos do doador¹⁶.

A técnica de coleta por aférese refere-se à retirada de sangue total, o qual é centrifugado/filtrado e os seus componentes são separados conforme densidade, peso e tamanho. Os elementos mais densos, eritrócitos, ficam no fundo, seguidos dos leucócitos e plaquetas e por fim, o plasma (Figura 1). Então, posterior à separação, remove-se o hemocomponente de interesse e os demais retornam ao doador^{5,17}.

Conforme demonstrado na figura 2, acima da camada de eritrócitos, está a camada leucoplaquetária, na qual encontram-se plaquetas e leucócitos. A separação destes grupos celulares nesta camada é muito discreta, onde os mais densos ficam no fundo (granulócitos), seguidos dos monócitos, linfócitos e plaquetas¹⁷.

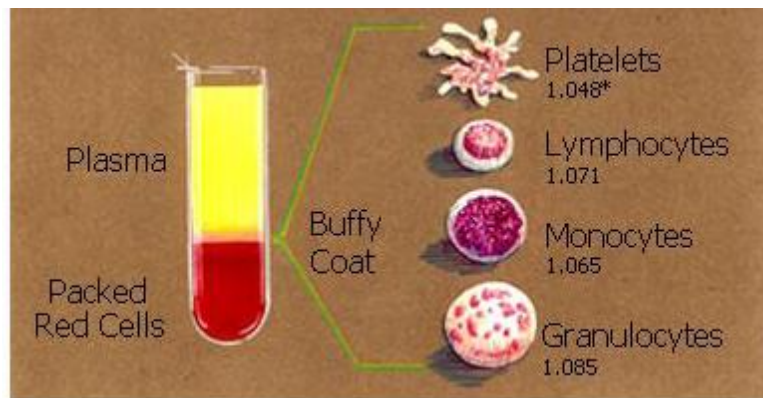


Figura 2. Separação de hemocomponentes por centrifugação¹⁷.

Embora os separadores de células automatizados para coleta de plaquetaférese utilizados atualmente causem perdas significativamente menores de células vermelhas quando comparados a equipamentos mais antigos¹⁸, estudos mostram que ainda há diminuição importante dos índices de hematócrito (Hct) e hemoglobina (Hb) após doação de plaquetaférese^{18,19,11}. Podem ser decorrentes da perda de volume no *kit* de aférese, técnica aplicada e hemólise mecânica ocasionada pelas bombas de pressão do equipamento, sendo que ainda não deve ser desconsiderado o tipo de separador utilizado¹⁸.

RISCO DE IMUNOSSUPRESSÃO E DOAÇÃO DE PLAQUETAFÉRESE DE REPETIÇÃO

Em meados de 1970 e 1980, a preocupação em relação à perda de células era devido aos equipamentos de coleta de plaquetaférese da época, dos quais, as unidades de aférese continham grande quantidade de leucócitos. Atualmente, com o avanço tecnológico, os equipamentos de plaquetaférese tem se aperfeiçoado e as unidades de plaquetas apresentam contaminação mínima de células²⁰.

A cada coleta de plaquetaférese, é perdida uma quantidade de leucócitos, que varia de 3×10^9 e 1×10^{10} células²¹. Considerando a taxa diária de produção celular, a perda de células na doação de plaquetas pode ser irrelevante para o sistema hematopoiético, portanto a soma das perdas decorrentes de cada doação pode equivaler a anos de produção de células sanguíneas no estado estacionário do indivíduo. Teoricamente, a doação de sangue total e plaquetaférese em longo prazo influencia na renovação das células-tronco, porém são escassos os estudos avaliando se a estimulação repetitiva do sistema hematopoiético pode afetar o *turnover* das células-tronco hematopoiéticas²².

Devido à problemática da imunossupressão resultante dessa perda de leucócitos, o *Food and Drug Administration* (FDA), em 2005, publicou diretrizes para intervalos mínimos de doação relacionados às doses de plaquetas coletadas; quanto maior a dose coletada, maior o intervalo entre as doações^{21,23}.

No entanto, a legislação brasileira não diferencia doadores de plaquetas de doses simples e doadores de doses múltiplas (dupla ou tripla). Ambos podem doar até 24 vezes ao ano, não excedendo 2 doações semanais e com intervalo mínimo de 48 horas entre cada doação^{24,15}, podendo assim, aumentar o risco de efeito adverso no doador.

Na literatura, não há consenso quanto aos efeitos causados nos doadores de plaquetaférese de repetição²⁰. Além disso, os estudos são escassos e muitos deles, utilizando equipamentos de aférese antigos.

ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos representam a primeira e principal linha de defesa contra invasão de patógenos²⁵ e são os leucócitos mais abundantes do sangue^{26,27}. Em

condições normais, os neutrófilos permanecem em estado de repouso, evitando danos aos tecidos²⁶.

Após maturação, os neutrófilos migram da medula óssea para a circulação sanguínea e quando ocorre uma lesão, presença de patógenos e/ou infecção, o hospedeiro ou produtos secretados pelo patógeno produzem sinais químicos inflamatórios, desencadeando uma sequência de respostas no organismo²⁸.

Então, ao serem expostos a antígenos bacterianos e mediadores endógenos, os neutrófilos se ativam e passam a atuar no processo de resposta inflamatória aguda²⁶. Logo após a entrada nos sítios de infecção, os neutrófilos se ativam, liberando proteínas dos grânulos, ativando a capacidade fagocítica e produção de armadilhas visando a destruição do patógeno²⁶. No entanto, é válido observar que a ativação dos neutrófilos nem sempre é benéfica para o hospedeiro, podendo causar dano tecidual indesejável no indivíduo^{26,29,27}.

Os neutrófilos maduros migram para os locais de infecção extravascular seguindo um fluxo mediado pela interação entre os receptores presentes nos neutrófilos e a superfície do endotélio. Primeiramente, o endotélio, estimulado por citocinas, expressa duas moléculas de adesão chamadas de E-selectina e P-selectina que se ligam fracamente aos carboidratos de superfície do neutrófilo. As fracas ligações se fazem e desfazem sucessivamente, ocasionando o rolamento dos leucócitos através do endotélio. Os leucócitos expressam as integrinas (moléculas de adesão) que permitem aos neutrófilos interagir com as moléculas de adesão do endotélio e se aderir firmemente ao endotélio^{26,28}. Logo, o leucócito realiza o processo de diapedese através das células endoteliais e começa a transmigrar em direção aos locais de infecção, onde a ativação completa dos neutrófilos leva a fagocitose e morte do patógeno devido aos mecanismos de produção de espécies reativas de oxigênio, desgranulação e NET (do inglês *neutrophil extracellular traps*, armadilhas extracelulares dos neutrófilos)²⁶.

A trombose e inflamação estão diretamente associados em processos fisiopatológicos que envolvem ativação de plaquetas e leucócitos^{4,30}. Após ativado, o neutrófilo libera espécies reativas de oxigênio e proteases, que possuem influência em plaquetas e células endoteliais, podendo alterar o equilíbrio hemostático para um estado pré-trombótico⁴.

RECEPTORES FC γ

Os receptores Fc gama são glicoproteínas expressas na superfície dos leucócitos e de outras células aos quais à porção Fc das imunoglobulinas IgG se ligam^{31,32} e induzem a diversas respostas imunológicas como defesa do organismo contra agentes estranhos³³.

Os receptores Fc γ fazem ligação da resposta imune adaptativa com as células efetoras do sistema imune inato (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células NK (*Natural Killer*) e mastócitos)^{31,32}, estimulando a fagocitose e a citotoxicidade celular dependente de anticorpo³⁴ e recrutamento de células inflamatórias³³.

Os receptores Fc γ são geralmente divididos em três principais classes que diferem em estrutura, função e população celular: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), and Fc γ RIII (CD16)³⁵.

EXPRESSÃO DE CD64

O Fc γ RI (CD64) é um receptor de IgG de alta afinidade ao qual se liga a IgG monomérica, sendo expresso principalmente por monócitos e macrófagos, e também por muitas células progenitoras mielóides³⁵.

A expressão do CD64 nos neutrófilos de indivíduos saudáveis é muito baixa^{36,37}, no entanto, ela é armazenada no fluido intracelular e pode ser ativada por estímulos exógenos ou endógenos³⁸, levando a um aumento da expressão após a ativação dos neutrófilos^{36,37,39}, sendo considerado um marcador de ativação de neutrófilos³⁴. Esse aumento da expressão ocorre devido a estimulação exercida pelas citocinas inflamatórias sobre os neutrófilos³². Uma vez que o estímulo de ativação desaparece, a expressão de CD64 retorna ao seu nível basal⁴⁰.

PLAQUETAFÉRESE E ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

A exposição do sangue com superfícies artificiais e forças externas, como a centrifugação, em dispositivos com circulação extracorpórea, como ocorre nos

procedimentos de aférese, pode levar à ativação de componentes do sistema imune, como sistema do complemento, neutrófilos e também de plaquetas^{4,8}.

Estudos recentes têm demonstrado o efeito imunomodulador induzido pelo procedimento de aférese. Conforme os neutrófilos e linfócitos vão rolando pelo circuito de aférese e durante a centrifugação, o sHLA-I (do inglês, *soluble human leucocyte antigen class I*, antígeno leucocitário humano solúvel-classe I) é adsorvida do plasma e se liga aos polímeros sintéticos do plástico da bolsa de coleta^{41,42,43}.

Os polímeros sintéticos utilizados na fabricação dos circuitos de aférese tem demonstrado adsorverem altas quantidades de proteínas, incluindo as de maior peso molecular, como a imunoglobulina IgG e as moléculas de sHLA-I, que tem peso molecular e estrutura semelhantes às IgG⁴⁴.

Assim, durante a doação de plaquetas, os neutrófilos podem ser ativados devido ao rolamento pelo circuito durante o procedimento e serem ligados através das suas moléculas ILT (do inglês, *immunoglobulin-like transcript*, transcrito semelhante à imunoglobulina) às moléculas sHLA-I adsorvidas aos polímeros, tornando-se sensível aos efeitos da imunomodulação por sHLA-I^{41,42,43}.

Essa ativação dos neutrófilos decorrente da ligação com o plástico da bolsa de coleta durante o procedimento de plaquetaférese é transitória, pois as células do doador são saudáveis⁴⁴, entretanto não se sabe se em longo prazo essa repetida ativação dos neutrófilos dos doadores de repetição de plaquetaférese não trará danos ao sistema imune do doador.

Os neutrófilos são importantes mediadores de processos inflamatórios e a ativação artificial destes, pode comprometer sua função *in vivo*. Entretanto, esse mecanismo de ativação de neutrófilos decorrente do processo de plaquetaférese é muito pouco estudado, além de existirem diversas variáveis entre os equipamentos de aférese e poucos dados fazendo comparações entre elas¹³.

PROTEÍNAS ANCORADAS AO GPI

O glicosilfosfatidilinositol (GPI) é um glicolipídio complexo que ancora algumas glicoproteínas de superfície à membrana celular por meio de uma ligação covalente ao terminal C das proteínas, sendo imprescindível para o funcionamento adequado de células eucarióticas^{45,46} (Figura 3).

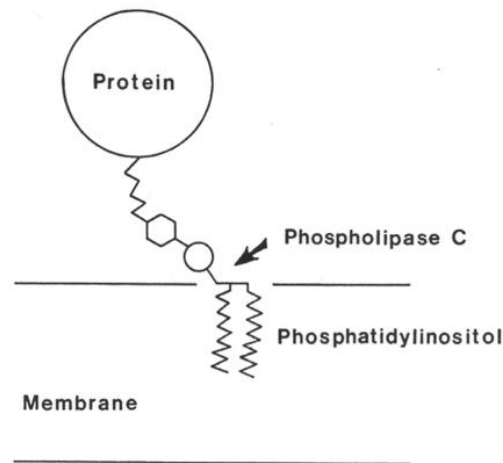


Figura 3. Molécula GPI que mantém diversas proteínas aderidas à membrana plasmática⁸³.

As proteínas ligadas ao GPI desempenham diversas funções como antígenos de superfície celular, receptores de sinalização, moléculas de migração⁴⁷, enzimas, moléculas de adesão, proteínas reguladoras do complemento e outras proteínas importantes imunologicamente⁴⁸.

É sabido que as proteínas ancoradas ao GPI relacionadas com hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) atuam na insuficiência da medula óssea^{49,50}, porém esse mecanismo ainda não é bem claro^{50,51}. Portanto, além dos casos suspeitos de HPN, a expressão de proteínas ancoradas ao GPI deveria ser avaliada em casos de síndrome de falência de medula óssea⁵⁰.

A deficiência de proteínas ancoradas ao GPI sem HPN clínico foi relatada em indivíduos normais, sob terapia imunossupressora ou em outras doenças hematológicas⁵⁰.

Atualmente, são conhecidas, no mínimo, 27 diferentes proteínas ligadas ao GPI⁵², as quais estão descritas na figura 4. Abaixo, segue tabela com algumas proteínas ancoradas ao GPI com suas respectivas funções e principal distribuição celular (Tabela 1).

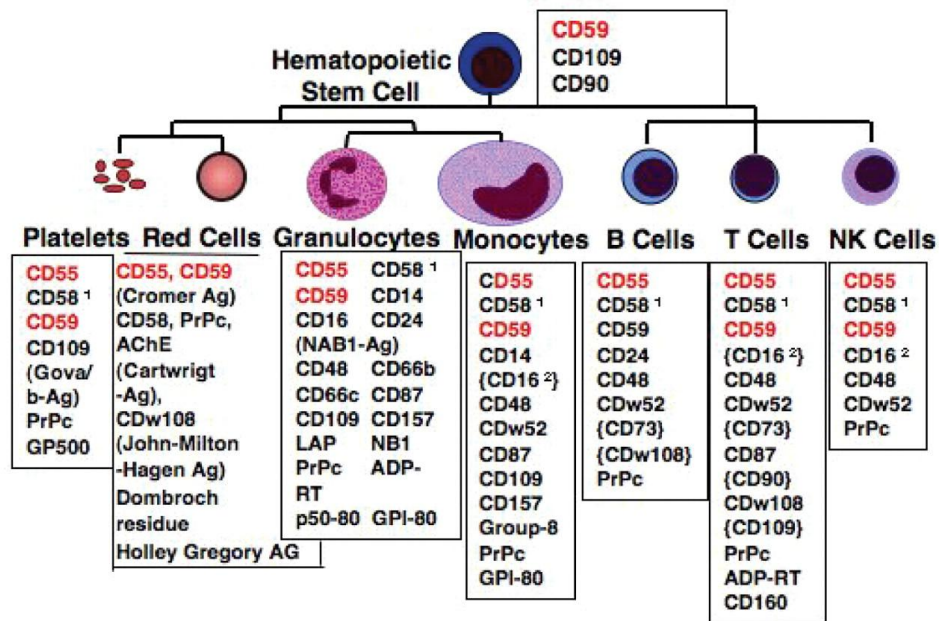


Figura 4. Proteínas de superfície ancoradas com GPI em células hematopoiéticas. Antígenos de grupos sanguíneos estão em {}. Expressão após ativação ou apenas em um subgrupo de células está em (). Abreviaturas: PrPc, proteína príon; AChE, acetilcolinesterase; LAP, fosfatase alcalina leucocitária; EDN, neurotoxina derivada de eosinófilos; ADP-RT, ADP-ribosiltransferase mono⁵².

Tabela 1. Exemplos de proteínas ancoradas ao GPI, sua função e principal distribuição celular. Fonte: adaptado pela autora (2016).

Marcador	Função	Principal expressão celular
CD14	Receptor de endotoxina ⁵³	Monócitos, macrófagos, granulócitos ⁵³
CD16b (FcyRIIIB)	Transdução de sinal; recrutamento de neutrófilos mediada por imunocomplexos ³⁹	Neutrófilos ³⁹
CD24	Adesão celular ⁵⁴	Granulócitos e linfócitos B ⁵²
CD55	DAF (do inglês decay accelerating factor, Fator de queda aceleração); Limita a formação das convertases C3 (regulação do complemento) ⁵⁵	Eritrócitos, granulócitos, monócitos ⁵⁵ , plaquetas e linfócitos ⁵²
CD58	Adesão celular, liga C2 às células T ⁵⁶	Plaquetas, granulócitos, monócitos e linfócitos ⁵²
CD59	MIRL (do inglês, membrane inhibitor of reactive lysis, inibidor de membrana da lise reativa); inibe a formação do complexo de ataque à membrana do complemento ⁵⁵	Eritrócitos, granulócitos ⁵⁵ , plaquetas, monócitos e linfócitos ⁵²
CD90	Adesão celular ⁵⁷	Células-tronco, fibroblastos, neurônios e células endoteliais ativadas ⁵⁷
CD109	Desconhecida ⁵⁸	Células-tronco hematopoiéticas (algumas), plaquetas ativadas e linfócitos T ⁵⁸
CD157	Desempenha um papel no crescimento de células pré-B ⁵⁹ . Atua como ectoenzima e receptor ⁶⁰ ; adesão e migração de neutrófilos ⁶⁰	Neutrófilos e monócitos normais ⁵⁹

HPN (HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA)

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma doença rara e adquirida de células-tronco hematopoiéticas^{55,59}. Clinicamente é caracterizada por hematopoiese anormal, hemólise intravascular e propensão à trombose^{46,49,59}.

A doença é desencadeada pela expansão clonal de células-tronco hematopoiéticas que apresentam uma mutação somática no gene PIG-A (do inglês, *phosphatidylinositol glycan - class A*, PIG-A, fosfatidilinositol glicano - classe A), localizado no cromossomo X^{52,59,61}, que codifica a enzima N-acetilglicosamina transferase, responsável pela síntese da âncora GPI^{62,63}. Decorrente da alteração genética no gene PIG-A e consequente incapacidade de produzir uma enzima funcional, há uma deficiência na síntese da molécula GPI que causa ausência total ou parcial das proteínas ancoradas à molécula GPI^{64,62}. Todas as linhagens celulares e seus progenitores são acometidos, porém, linhagens linfoides geralmente tem menor extensão⁵².

Ainda, a hematopoiese é caracterizada por um *turnover* contínuo impulsionado pela replicação de células-tronco hematopoiéticas. Cada vez que as células-tronco hematopoiéticas se replicam há um risco pequeno, mas finito de adquirir mutações no DNA, que podem levar a desordens genéticas adquiridas como HPN⁶⁵.

São descritos vários tipos de mutações como deleções, inserções e mutações pontuais ao longo de toda região codificadora do gene PIG-A⁶⁶. Há questionamentos se o clone HPN surge de uma deficiência primária de células normais ou se é decorrente de uma vantagem de crescimento das células progenitoras mutadas⁶¹.

A hipótese mais aceita é de que, após a mutação no gene PIG-A, as células HPN tenham uma vantagem de crescimento, dependente do ambiente da medula óssea. Assim, a expansão das células HPN se deve ao fato de as células T autorreativas dirigidas contra as proteínas ancoradas ao GPI atacarem as células-tronco hematopoiéticas normais, poupando as células HPN e levando à expansão clonal destas células mutadas^{61,67,68}.

No entanto, em 2000, um estudo realizado nos Estados Unidos, verificou que não há vantagem de crescimento das células HPN em relação às células normais e que além disso, as células normais tem um defeito de crescimento⁶⁹. Esse defeito pode estar atribuído a maior susceptibilidade à apoptose decorrente do aumento da

expressão do receptor Fas nestas células não mutadas^{69,68}. A conclusão do estudo é de que, além da mutação no gene PIG-A, é preciso que as células normais tenham uma lesão concomitante para que as células HPN se expandam⁶⁹.

Acredita-se que as mutações no gene PIG-A são necessárias, mas insuficientes para desencadear HPN⁴⁶. Logo, a fisiopatologia do HPN consiste em dois mecanismos centrais; insuficiência da medula óssea/ambiente medular desfavorável, hipoplásico e presença de células com diminuição ou ausência de proteínas ancoradas ao GPI^{52,61}.

INSUFICIÊNCIA DA MEDULA ÓSSEA

A medula óssea é um tecido funcional que pode ser insuficiente em diversas condições como doenças infecciosas, doenças malignas hematológicas e não hematológicas, deficiências nutricionais, entre outros⁷⁰.

Ainda, a insuficiência da medula óssea está presente em todos pacientes com HPN, mesmo que suas contagens celulares no sangue periférico sejam normais⁵².

Uma pequena população de células com deficiência de proteínas ancoradas ao GPI pode estar presente em pacientes com falência da medula óssea e não apresentam sinal clínico e laboratorial de hemólise⁷¹.

O grau de falência da medula óssea pode variar desde apenas uma redução do número de células-tronco até um quadro como anemia aplástica severa⁵². As causas da insuficiência da medula óssea relacionadas ao HPN são pouco conhecidas^{52,55}, porém muito provavelmente, são multifatoriais⁵².

É sabido que as citocinas tem papel no condicionamento da medula óssea e no crescimento das células-tronco. Foi visto que na anemia aplástica, doença relacionada com HPN, houve uma expressão aumentada de TNF- α (do inglês, *Tumor Necrosis Factor Alpha*, fator de necrose tumoral alfa), IFN- γ (do inglês, *interferon gamma*, interferon gama) e IL-2 (do inglês, *Interleukin-2*, interleucina-2), desencadeando dano na medula óssea⁶¹. Ainda, é relatado que a exposição crônica a essas citocinas, pode ser prejudicial a medula óssea⁷⁰.

Estudo realizado na Itália, 2004, relatou que o clone HPN é mais resistente aos efeitos inibitórios de IFN- γ e TNF- α , sugerindo que as células HPN podem ter uma vantagem de crescimento em um microambiente desfavorável⁶¹.

Tem sido sugeridas diferentes hipóteses para tentar explicar a fisiopatologia da falha na medula óssea mediante o clone de HPN: deficiências intrínsecas de células-tronco ou um dano extrínseco imunomediado e um ambiente medular desfavorável⁶¹.

CLASSIFICAÇÃO DE HPN

O *International PNH* (do inglês, *Paroxysmal nocturnal hemoglobinúria*, hemoglobinúria paroxística noturna) *Interest Group* (IPIG), que realiza estudos sobre HPN, classificou a doença em três subgrupos: “HPN clássico”, que são os pacientes que apresentam evidência clínica de hemólise intravascular, grande clone HPN, porém sem evidências de anormalidade na medula óssea. Os pacientes que apresentam evidência clínica e laboratorial de hemólise, que têm ou tiveram história de anormalidade da medula óssea são incluídos no subgrupo “HPN no contexto de distúrbio da medula óssea”. E por fim, os pacientes que não apresentam evidência clínica e laboratorial de hemólise, porém apresentam pequenas populações de células deficientes de proteínas do GPI, como nos casos de síndrome mielodisplásica (SMD) e anemia aplástica são classificados como “HPN subclínica”, sendo associada com a síndrome de falência da medula óssea^{49,72}.

CONDIÇÕES ASSOCIADAS COM PRESENÇA DE CLONE HPN

A presença de clone HPN tem sido frequentemente detectadas em pacientes com anemia aplástica adquirida⁵¹, indicando uma ligação fisiopatológica destas duas desordens^{46,64}. O sequenciamento de DNA de células HPN de pacientes com anemia aplástica revela mutações clonais no gene PIG-A, sendo que muitos pacientes apresentam expansão do clone HPN e desenvolvem HPN clínica⁴⁶. Há uma possível explicação para a relação entre HPN e anemia aplástica que propõe que as células-tronco hematopoiéticas adquirem mutações no gene PIG-A de forma aleatória e espontaneamente. Como na anemia aplástica, ocorre um ataque imunológico, o qual atinge as células-tronco hematopoiéticas normais e poupa as células HPN, podendo causar expansão clonal destas células mutadas^{46,64}.

Células deficientes em proteínas ancoradas ao GPI tem sido também detectadas em pacientes com SMD^{46,73,74}. A maioria dos estudos concorda que o

clone HPN é mais detectados em pacientes com SMD que apresentam falha na medula óssea, logo, apresentam melhor prognóstico, pois a progressão para leucemia aguda é pouco frequente^{75,73}. E ainda, mutações no gene *PIG-A* podem ser detectadas em indivíduos saudáveis⁴⁶. Estudo feito nos Estados Unidos, em 2005, encontrou mutações policlonais no gene *PIG-A* em células formadoras de colônia de progenitores hematopoiéticos, sem envolvimento de linfócitos, de indivíduos saudáveis. Em contrapartida, os pacientes com HPN apresentaram mutações clonais envolvendo todas as linhagens celulares⁶⁴. Com base nisso, sugere-se que as mutações no gene *PIG-A* ocorridas em indivíduos saudáveis não sejam a nível de célula-tronco hematopoiética, apenas à nível de células progenitoras diferenciadas, as quais não tem capacidade de auto renovação, portanto as mutações não se propagam^{64,55}.

DIAGNÓSTICO POR IMUNOFENOTIPAGEM

Tradicionalmente o diagnóstico de HPN era estabelecido pelo teste de *Ham* e teste da sacarose, os quais eram baseados na sensibilidade aumentada dos eritrócitos à hemólise mediada pelo complemento^{76,77}. Entretanto estes testes não eram sensíveis o bastante para detectar pequeno clone HPN e ainda tinham a interferência de transfusões sanguíneas⁷⁶.

Atualmente, a citometria de fluxo é o padrão ouro para avaliar a expressão de proteínas ancoradas ao GPI para o diagnóstico de HPN, possibilitando identificar com sensibilidade e especificidade pequenas populações de células com deficiência nas proteínas ancoradas ao GPI em diversas linhagens celulares^{78,50,74}.

Apesar de a citometria de fluxo ser o padrão ouro para diagnóstico de HPN, não há consenso em relação aos padrões ou exigências, tampouco para os marcadores utilizados para determinar o diagnóstico da doença^{50,74}. Por haver diversos anticorpos monoclonais direcionados a diferentes proteínas ancoradas ao GPI, os laboratórios não tem uma padronização na seleção dos anticorpos utilizados para detecção de clone HPN⁵⁵.

Devido a necessidade de se padronizar o diagnóstico para HPN, a *Clinical Cytometry Society*, na sua reunião anual, no ano de 2008, decidiu estabelecer alguns consensos para os testes de HPN baseados na literatura e na prática dos autores presentes. Foi definido que a sensibilidade dos ensaios de rotina seria de

1%, útil nos casos de HPN clássica, HPN subclínica e anemia aplástica. Os ensaios de alta sensibilidade são aqueles capazes de detectar clone tão pequeno quanto 0,01%, sendo ensaios mais difíceis e que exigem precauções especiais⁵⁵.

Para o diagnóstico definitivo de HPN é recomendada a utilização de, no mínimo, 2 marcadores de proteínas de GPI de linhagens diferentes para excluir possibilidade de deficiência hereditária isolada de uma única proteína ancorada ao GPI^{49,74,79} e também para detectar clone HPN abaixo de 0,1%⁵⁹.

Os pacientes com HPN apresentam células normais e células HPN e a percentagem de células mielóides com deficiência das proteínas ancoradas ao GPI é indicativo do tamanho do clone HPN⁵².

Os eritrócitos HPN tem uma meia-vida reduzida devido a sua maior sensibilidade à ação do complemento, portanto, a percentagem de eritrócitos HPN não corresponde ao tamanho do clone HPN na medula óssea. A análise dos eritrócitos HPN tem utilidade para determinar o grau de deficiência das proteínas ancoradas ao GPI⁵².

O grau de deficiência das proteínas ancoradas ao GPI se divide em 3 tipos: células HPN tipo I, que expressam as proteínas normalmente; células HPN tipo II, que apresentam uma expressão reduzida das proteínas e células HPN do tipo III, que são células com ausência de todas as proteínas ancoradas ao GPI⁵².

Devido ao fato de que o tempo de vida dos granulócitos com HPN é normal, é possível avaliar com mais precisão o tamanho do clone HPN, o que torna a análise da expressão de proteínas do GPI em granulócitos muito relevante⁴⁹. A análise de linfócitos não é um bom parâmetro devido a sua meia-vida longa e a expressão variável de muitas proteínas ancoradas ao GPI destas células⁵⁵.

Ao contrário dos anticorpos monoclonais, que se ligam a uma única proteína ancorada ao GPI, o FLAER (do inglês, *Fluorescent Aerolysin*, aerolisina fluorescente) se liga seletivamente, com bastante afinidade na porção glicana do GPI podendo detectar uma variedade de proteínas ancoradas ao GPI^{74,79}.

O FLAER é proveniente da bactéria *Aeromonas hydrophila*, sendo secretado como uma pró-toxina inativa, proaerolisina, que se converte na forma ativa através da remoção de um peptídeo C terminal, gerando a aerolisina, que se liga às estruturas da superfície celular, oligomeriza e forma canais de membrana que resultam na lise celular^{80,81}. Ao contrário da aerolisina, a proaerolisina se liga aos

receptores, mas devido a incapacidade de oligomerizar, não forma canais de membrana⁸¹.

Como as células HPN são deficientes em proteínas ancoradas ao GPI, elas se tornam resistentes à toxina^{46,81}. É de grande utilidade para avaliar expressão de proteínas do GPI em leucócitos⁴⁹, permitindo com evidência, a discriminação clara entre células normais e alteradas⁷⁴ e tem a vantagem de não sofrer interferência do grau de maturação das células⁵⁵.

Como o FLAER detecta a âncora GPI, ele permite avaliar qualquer linhagem celular, com exceção dos eritrócitos, porque eles não possuem as proteases necessárias para processar a proaerolisina^{80,82} ou porque os eritrócitos normais tem grande quantidade de glicoforina, uma proteína que se liga fracamente a aerolisina^{79,82}.

A utilização de apenas o reagente FLAER já é de grande utilidade para diagnóstico de HPN e sua combinação com anticorpos monoclonais direcionados às proteínas ancoradas ao GPI proporciona ainda mais confiabilidade na detecção de clone HPN subclínico^{72,80}.

Apesar de o FLAER comprovadamente auxiliar no diagnóstico de HPN, discriminando evidentemente as células normais e células HPN, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ainda não registrou o reagente para uso no Brasil⁷⁴.

3. JUSTIFICATIVA

Pelo fato de os equipamentos automatizados de plaquetaférese reterem uma quantidade de leucócitos por doação, há uma preocupação quanto à imunidade do doador de repetição devido às perdas de leucócitos e suas possíveis consequências em longo prazo. O FDA preocupou-se com esta questão da imunossupressão e publicou diretrizes, afirmando que quanto maior a quantidade de plaquetas doadas, maior o tempo de intervalo entre as doações. No entanto, a legislação brasileira limita o número de doações por ano para 24, independente da dose de plaquetas doadas, o que pode expor mais ainda o doador a efeitos adversos em longo prazo.

Os efeitos da plaquetaférese de repetição sobre os leucócitos são pouco conhecidos. O potencial de geração de clone HPN, a perda de proteínas de

ancoragem e ativação neutrofílica decorrentes desse procedimento em doadores de repetição não foram previamente avaliados.

Até o momento, as questões de segurança relacionadas aos doadores de plaquetaférese são mais direcionadas aos efeitos adversos de curto prazo, no entanto, as possíveis consequências em longo prazo podem ir muito mais além do que é demonstrado atualmente. Estas possíveis consequências em longo prazo podem ser decorrentes dos efeitos metabólicos cumulativos da doação de plaquetaférese de repetição.

Com base nisso, torna-se importante o desenvolvimento do presente estudo, onde, por meio dele, será possível avaliar se os estímulos repetitivos, no caso de doadores de repetição de plaquetaférese poderia ter algum impacto em longo prazo sobre a resposta fisiológica dos neutrófilos relacionado a sua ativação e desenvolvimento de células com diminuição ou ausência de proteínas GPI.

Ainda, o grande aumento da demanda de transfusão de plaquetas por aférese requer um número maior de doadores disponíveis e garantir a segurança e integridade da saúde do doador é fundamental neste processo.

4. MARCO TEÓRICO

Espera-se avaliar possíveis efeitos do processo de doação de plaquetaférese de doadores de repetição, como ativação de neutrófilos e perda ou diminuição de proteínas ancoradas ao GPI de monócitos e neutrófilos e potencial clone HPN.

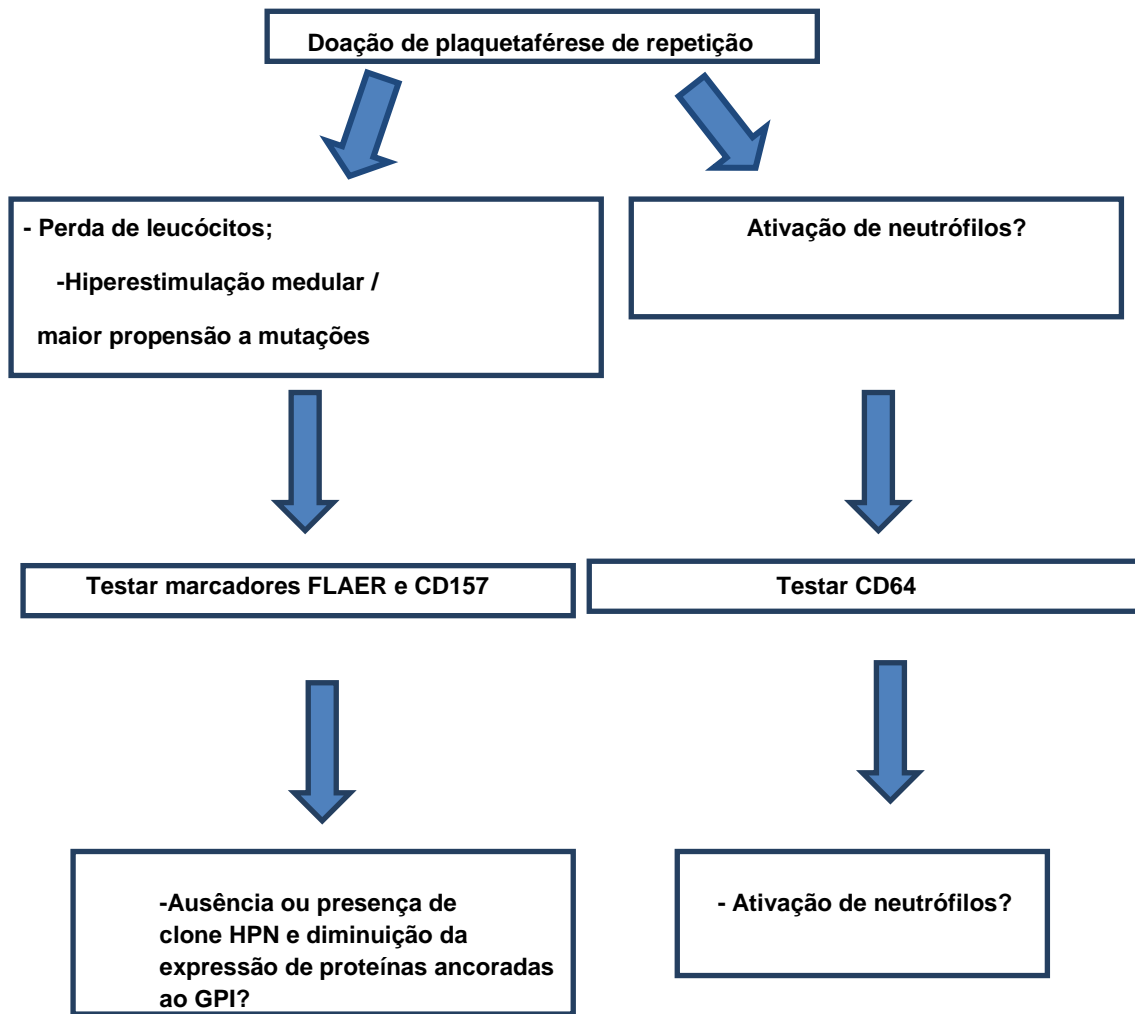


Figura 5. Esquema marco teórico. Fonte: adaptado pela autora (2016).

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar possíveis efeitos do processo de doação de plaquetaférese nos neutrófilos e monócitos de doadores de plaquetaférese de repetição.

5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Comparar quantidade de células com alteração de expressão de proteínas ancoradas ao GPI e fenótipo HPN entre doadores de plaquetaférese de repetição e grupo controle (doadores de sangue total de primeira vez ou que não doam sangue a, no mínimo, um ano) pareados quanto à sexo e idade;

- Verificar se há relação entre número de doações de plaquetaférese, dose simples, dupla ou tripla, tempo de permanência no equipamento de coleta de aférese, número de ciclos e células com fenótipo HPN;

- Verificar se há ativação dos granulócitos decorrente da plaquetaférese comparando os doadores de plaquetaférese de repetição e grupo controle.

6. REFERÊNCIAS

1. Holbro A, Infanti L, Sigle J, Buser A. Platelet transfusion: basic aspects. *Swiss Med Wkly*. 2013;143(December):1-10.
2. Kumar A, Mhaskar R, Grossman BJ, et al. Platelet transfusion: A systematic review of the clinical evidence. *Transfusion*. 2015;55(5):1116-1127.
3. Schrezenmeier H, Seifried E. Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: Which product type should be preferred? *Vox Sang*. 2010;99(1):1-15.
4. Bilgin AU, Karadogan I, Yilmaz FG, Undar L. Double dose plateletpheresis by continuous and intermittent flow devices increases platelet-neutrophil complex formation in healthy donors without noticeable neutrophil activation. *Transfus Apher Sci*. 2007;36(1):31-37.
5. Burgstaler EA. Blood component collection by apheresis. *J Clin Apher*. 2006;21(2):142-151.
6. Mane VB, Jagtap PE, Nagane NS, Dhonde SP, Belwalkar GJ, Mane VP. The significance of evaluation of haematocrit in plateletpheresis donors. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(4):BC06-BC07.
7. Keklik M, Eser B, Kaynar L, et al. Comparison of Plateletpheresis on the Fenwal Amicus, Fresenius COM.TEC, and Trima Accel Cell Separators. *J Clin Apher*. 2015;30(3):171-175.
8. Chen Y, Lin Y, Lin H, et al. Regular plateletpheresis increased basal concentrations of soluble P-selectin in healthy donors: Possible involvement of endothelial cell activation? *Clin Chim Acta*. 2016;458:18-22.
9. Barbosa MH, Da Silva KFN, Coelho DQ, Tavares JL, Da Cruz LF, Kanda MH. Risk factors associated with the occurrence of adverse events in plateletpheresis donation. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2014;36(3):191-195.
10. 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.
11. Suresh B, Arun R, Yashovardhan A. Changes in pre-and post-donation haematological parameters in plateletpheresis donors. *Journal*. 2014.
12. Waxman DA. Volunteer donor apheresis. *Ther Apher*. 2002;6(1):77-81.
13. Western KH, Videm V. Donor neutrophil function after plateletpheresis. *Transfusion*. 2000;40:1414-1418.
14. Smith JW. Blood component collection by apheresis. In: Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD, editors. AABB technical manual. United States: AABB; 17th ed; 2011: 227-238.
15. Brasil. Portaria nº 158, de 04 de fevereiro de 2016. Redefine o regulamento

- técnico de procedimentos hemoterápicos. *Diário Oficial da União*, 05 de fevereiro de 2016., Seção I.
16. Chaudhary R, Das SS, Khetan D, Ojha S, Verma S. Comparative study of automated plateletpheresis using five different apheresis systems in a tertiary care hospital. *Transfus Apher Sci.* 2009;40(2):99-103.
 17. Schwartz, Joseph; Padmanabhan A. Apheresis : Basic Principles, Practical Considerations and Clinical Applications. In: Review Session, ASFA Annual meeting. Scottsdale, Arizona, June 2011.
 18. Das SS, Chaudhary R, Verma SK, Ojha S, Khetan D. Pre- and post- donation haematological values in healthy donors undergoing plateletpheresis with five different systems. *Blood Transfus.* 2009;7(3):188-192.
 19. Beyan C, Çetin T, Kaptan K, Nevruz O. Effect of plateletpheresis on complete blood count values using three different cell separator systems in healthy donors. *Transfus Apher Sci.* 2003;29(1):45-47.
 20. Strauss RG. Risks of clinically significant thrombocytopenia and/or lymphocytopenia in donors after multiple plateletpheresis collections. *Transfusion.* 2008;48(7):1274-1278.
 21. Richa E, Krueger P, Burgstaler EA, Bryant SC, Winters JL. The effect of double- and triple-apheresis platelet product donation on apheresis donor platelet and white blood cell counts. *Transfusion.* 2008;48(7):1325-1332.
 22. Scheduling S, Ersöz I, Hartmann U, Bartolovic K, Balabanov S. Peripheral blood cell telomere length measurements indicate that hematopoietic stem cell turnover is not significantly increased in whole blood and apheresis PLT donors. *Transfusion.* 2003;43(August):1089-1095.
 23. Guidance for industry and FDA review staff: Collection of platelets by automated methods. Bethesda (MD): Food and Drug Administration (Center for Biologics Evaluation and Research); 2005.
 24. Brasil. Resolução RDC nº 75, de 02 de maio de 2016. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 34, de 11 de junho de 2014, que dispõe sobre as Boas Práticas no Ciclo do Sangue. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
 25. Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol.* 2010;10(11):1325-1334.
 26. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181-218.
 27. Lacy P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2006;2(3):98-108.
 28. Kennedy AD, Deleo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res.* 2009;43(1-3):25-61.
 29. Alvarez-Larrán A, Toll T, Rives S, Estella J. Assessment of neutrophil

- activation in whole blood by flow cytometry. *Clin Lab Haematol.* 2005;27(1):41-46.
30. Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18. *Blood.* 1996;88(11):4183-4194.
 31. Bosques CJ, Manning AM. Fc-gamma receptors: Attractive targets for autoimmune drug discovery searching for intelligent therapeutic designs. *Autoimmun Rev.* 2016.
 32. Hogarth PM, Pietersz GA. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(4):311-331.
 33. Caaveiro JMM, Kiyoshi M, Tsumoto K. Structural analysis of Fc/FcγR complexes: a blueprint for antibody design. *Immunol Rev.* 2015;268(1):201-221.
 34. Qureshi SS, Lewis SM, Gant VA, Treacher D, Davis BH, Brown KA. Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Clin Exp Immunol.* 2001;125(2):258-265.
 35. Lilius E-M, Nuutila J. Bacterial Infections, DNA Virus Infections, and RNA Virus Infections Manifest Differently in Neutrophil Receptor Expression. *Sci World J.* 2012;2012:1-7.
 36. Dimoula A, Pradier O, Kassengera Z, Dalcomune D, Turkan H, Vincent JL. Serial determinations of neutrophil CD64 expression for the diagnosis and monitoring of sepsis in critically ill patients. *Clin Infect Dis.* 2014;58(6):820-829.
 37. van der Meer W, Pickkers P, Scott CS, van der Hoeven JG, Gunnewiek JK. Hematological indices, inflammatory markers and neutrophil CD64 expression: comparative trends during experimental human endotoxemia. *J Endotoxin Res.* 2007;13(2):94-100.
 38. Farias MG, de Lucena NP, Bó SD, de Castro SM. Neutrophil CD64 expression as an important diagnostic marker of infection and sepsis in hospital patients. *J Immunol Methods.* 2014;414:65-68.
 39. Fernandes MJG, Rollet-Labelle E, Paré G, et al. CD16b associates with high-density, detergent-resistant membranes in human neutrophils. *Biochem J.* 2006;393(Pt 1):351-359.
 40. Hoffmann JJML. Neutrophil CD64 as a sepsis biomarker. *Biochem medica.* 2011;21(3):282-290.
 41. Ghio M, Contini P, Ansaldi F, et al. A possible role of soluble HLA-I molecule in the immunomodulatory effects of therapeutic apheresis. *Blood Transfus.* 2014;12:167-169.
 42. Ghio M, Contini P, Ansaldi F, et al. Donor neutrophil activation and transforming growth factor-β1 modulation induced by donor apheresis

- procedures. *Blood Transfus.* 2014;12(4):615-617.
43. Ghio M, Bertolotto M, Ottonello L, Contini P, Ubezio G, Tripodi G. Transient inhibition of neutrophil migration following plasma or plasma-platelet apheresis donation procedures. *Blood Transfus.* 2015;13(4):682-683.
 44. Ghio M, Contini P, Ansaldi F, et al. Immunomodulation Due to Plasma or Plasma–PlateletApheresis Donation: Events Occurring During Dona tion Procedures. *J Clin Apher.* 2015;30:201-211.
 45. Tsai YH, Liu X, Seeberger PH. Chemical biology of glycosylphosphatidylinositol anchors. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51(46):11438-11456.
 46. Brodsky RA. New insights into paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* January 2006:24-28, 516.
 47. Zurzolo C, Simons K. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: Membrane organization and transport. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2016;1858(4):632-639.
 48. Kinoshita T, Fujita M, Maeda Y. Biosynthesis, Remodelling and Functions of Mammalian GPI-anchored Proteins: Recent Progress. *J Biochem.* 2008;144(3):287-294.
 49. Parker C, Omine M, Richards S, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2005;106(12):3699-3709.
 50. Höchsmann B, Rojewski M, Schrezenmeier H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): Higher sensitivity and validity in diagnosis and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes. *Ann Hematol.* 2011;90(8):887-899.
 51. Wang H, Chuhjo T, Yasue S, Omine M, Nakao S. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria – type cells in bone marrow failure syndrome. 2002;100(12):3897-3902.
 52. Bessler M, Hiken J. The pathophysiology of disease in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008:104-110.
 53. Jersmann HP. Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. *Immunol Cell Biol.* 2005;83(5):462-467.
 54. Huang L, Lv W, Zhao X. CD24 as a Molecular Marker in Ovarian Cancer: A Literature Review. *Cancer Transl Med.* 2016;2(1):29.
 55. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78(4):211-230.
 56. Lee R V., Braylan RC, Rimsza LM. CD58 expression decreases as nonmalignant B cells mature in bone marrow and is frequently overexpressed in adult and pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2005;123(1):119-124.

57. Kisselbach L, Merges M, Bossie A, Boyd A. CD90 expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology*. 2009;59(1):31-44.
58. Lin M, Sutherland DR, Horsfall W, et al. Cell surface antigen CD109 is a novel member of the alpha(2) macroglobulin/C3, C4, C5 family of thioester-containing proteins. *Blood*. 2002;99(5):1683-1691.
59. Marinov I, Illingworth AJ, Benko M, Sutherland DR. Performance characteristics of a non-fluorescent aerolysin-based paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) assay for simultaneous evaluation of PNH neutrophils and PNH monocytes by flow cytometry, following published PNH guidelines. *Cytom Part B Clin Cytom*. 2016;94(1):31-36.
60. Funaro A, Ortolan E, Ferranti B, et al. CD157 is an important mediator of neutrophil adhesion and migration. *Blood*. 2004;104(13):4269-4278.
61. Haase R. Increased resistance of PIG-A- bone marrow progenitors to tumor necrosis factor α and interferon γ : possible implications for the in vivo dominance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones. *Haematologica*. 2004;89(1):651-656.
62. Correia RP, Bento LC, Bortolucci ACA, et al. Technical advances in flow cytometry-based diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Einstein (São Paulo)*. 2016;14(3):366-373.
63. Luzzatto L. Recent advances in the pathogenesis and treatment of juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2011;152(6):677-687.
64. Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood*. 2005;105(10):3848-3854.
65. Traulsen A, Pacheco JM, Dingli D. On the origin of multiple mutant clones in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Stem Cells*. 2007;25(12):3081-3084.
66. Okamoto M, Shichishima T, Noji H, et al. High frequency of several PIG-A mutations in patients with aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Nat Publ Gr All*. 2006;20(4):627-634.
67. Karadimitris A, Luzzatto L. The cellular pathogenesis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Leukemia*. 2001;15(8):1148-1152.
68. Savage WJ, Barber JP, Mukhina GL, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein Deficiency Confers Resistance to Apoptosis in PNH. *Exp Hematol*. 2009;37(1):42-51.
69. Chen R, Nagarajan S, Prince GM, et al. Impaired growth and elevated Fas receptor expression in PIGA+ stem cells primary paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 2000;106(5):689-696.
70. Risitano AM, Maciejewski JP, Selleri C, Rotoli B. Function and malfunction of hematopoietic stem cells in primary bone marrow failure syndromes. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2007;2(1):39-52.

71. Wang SA, Pozdnyakova O, Jorgensen JL, et al. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. *Haematologica*. 2009;94(1):29-37.
72. Richards SJ, Hill A, Hillmen P. Recent Advances in the Diagnosis , Monitoring , and Management of Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2007;298:291-298.
73. Young NS. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndromes: Clonal expansion of PIG-A-mutant hematopoietic cells in bone marrow failure. *Haematologica*. 2009;94(1):3-7.
74. Rocha JMC, Silva ML, Souza MEDL, Murao M, Araújo SSDS, Santos SME. Detection of PNH cells by flow cytometry, using multiparameter analysis. *J Bras Patol e Med Lab*. 2014;50(2):105-114.
75. Calado RT. Immunologic aspects of hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Semin Oncol*. 2011;38(5):667-672.
76. Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol*. 2004;126(1):133-138.
77. Gupta R, Pandey P, Choudhry R, et al. A prospective comparison of four techniques for diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Lab Hematol*. 2007;29(2):119-126.
78. Latour RP De, Mary JY, Salanoubat C, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*. 2008;112(8):3099-3106.
79. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol*. 2000;114(3):459-466.
80. Madkaikar M, Gupta M, Jijina F, Ghosh K. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. *Eur J Haematol*. 2009;83(6):503-511.
81. Brodsky RA, Mukhina GL, Nelson KL, Lawrence TS, Jones RJ, Buckley JT. Resistance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to the glycosylphosphatidylinositol-binding toxin aerolysin. *Blood*. 1999;93(5):1749-1756.
82. Sutherland DR, Kuek N, Davidson J, et al. Diagnosing PNH with FLAER and Multiparameter Flow Cytometry. *Cytom B Clin Cytom*. 2007;72(3):167-177.
83. Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an historical overview. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:93-103.

7. ARTIGO

ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED PROTEINS IN REPEATED PLATELETPHERESIS DONORS

Laís Oliveira Garcia¹, Luciana do Nascimento Vargas¹, Ana Paula Alegretti², Mauricio Sprenger Bassuino³, Mariela Granero Farias², Fabiane Spagnol Pedrazzani², Leo Sekine⁴, Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber⁵

¹ Unidade de Terapia Transfusional, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

² Unidade de Diagnóstico Personalizado, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

³ Centro Universitário Da Serra Gaúcha, Caxias do Sul, RS, Brasil

⁴ Serviço de Hemoterapia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

⁵ Serviço de Medicina Interna, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

Mailing address: R. Ramiro Barcelos, 2350, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. CEP: 90420-010. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Telefone: (51) 3359-7652. E-mail: logarcia@hcpa.edu.br

Address reprint requests to: Laís Oliveira Garcia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, R. Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: logarcia@hcpa.edu.br

Support source: This study received financial support from the Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE, Research Incentive Fund) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Conflict of interest: All other authors have disclosed no conflict of interest.

Abstract: Background: The collection of hemocomponents through apheresis equipment has increased much in recent years, which is considered an advance in transfusion medicine because it enables the withdrawal of one or more components from a single donor, resulting in a standardized and high-quality hemocomponent. Nonetheless, the intervals between the plateletpheresis donations are generally short, which can cause loss of cells in each donation and potential dysregulation of the hematopoietic system. What can also happen is a possible pathogenic effect

after the transit of the cells through the apheresis equipment. In light of this situation, there is the concern about whether that brings risks to the donor's health, in the long term. Thus, the objective of this study was to evaluate the reduction or the absence of expression of some glycosylphosphatidylinositol-anchored (GPI-anchored) proteins and the presence of PNH clone in repeated plateletpheresis donors. Study design and methods: Case-control study using 44 samples of donors of repeated plateletpheresis and 44 samples of donors of whole-blood donors as controls. Peripheral blood samples were collected into tubes containing EDTA, marked with CD157, CD45, CD64, CD10 and FLAER monoclonal antibodies, and analyzed by flow cytometry. Results: No alteration in the expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins was found. Conclusion: It is suggested that repeated plateletpheresis donation does not alter the expression of GPI-anchored proteins and, likewise, does not generate PNH clone. Key words: plateletpheresis, GPI, PNH, flow cytometry.

INTRODUCTION

The usage of platelets for transfusional purposes has been increasing and improvements have been made in its withdrawal as well as in its storage, efficacy and safety.¹ The new available technologies and the increase in medical and surgical indications for platelets transfusion have increased the use of plateletpheresis², since it is one of the hemocomponents highly required in blood transfusion.³

The obtaining of hemocomponents through apheresis equipment has increased much in the last years⁴ and it is considered an advance in transfusional medicine⁵ because it enables the withdrawal of one or more components from a single donor, resulting in a standardized and high-quality hemocomponent,^{5,6} with good purity and consistent volumes.^{4,3}

Nonetheless, the literature shows some disadvantages such as: donors availability,⁷ some small risks and problems associated to the procedure¹ such as extracorporeal circulation, platelet activation, citrate toxicity, hypocalcemia, exposure to strange substances with risk of allergic reaction, immunodeficiency due to the loss of cells⁸, neutrophil activation⁹.

Several adverse effects in the short-term from the plateletpheresis process are studied; data on the adverse effects in the long term, however, are far more complex³ and poorly explored.

The Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) is an acquired disease¹⁰ triggered by the clonal expansion of hematopoietic stem-cells that presents a somatic mutation in the PIG-A gene, which is in the X chromosome¹¹ and codifies the N-acetylglucosamine transferase enzyme, which is responsible for the synthesis of the GPI-anchor.^{12,13} Due to this genetic alteration in the PIG-A gene and to the consequent incapacity of producing a functional enzyme, there is a deficiency in the GPI molecule's synthesis, which causes a total or partial absence of GPI-anchored proteins.¹²

The proteins which are linked to the GPI perform several functions, like cell-surface antigens, signaling receptors, migration molecules, enzymes, adhesion molecules, complement-regulator proteins.^{14,15}

In theory, the whole-blood donation and plateletpheresis in the long-term influences the stem-cells turnover; however, there are only few studies assessing if the repetitive stimulation of the hematopoietic system can affect the turnover of hematopoietic cells.¹⁶

One should not ignore the possible physiopathogenic effect of the cells' transition through the apheresis equipment, which, by a mechanic effect, adsorption or downregulation can occasion the loss of proteins of the cell membrane.

The aim of this study was to analyze if the repeated plateletpheresis donors present an alteration of the expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and the presence of PNH clone.

MATERIALS AND METHODS

STUDY DESIGN, DONOR POPULATION AND DATA COLLECTION

Case-control study with 44 repeated plateletpheresis donors and 44 whole-blood donors as controls, who fulfilled all the whole-blood and platelets donation criteria according to the Portaria nº 158.¹⁷ It was considered as a repeated plateletpheresis donor the individuals that donated at least 4 times in the previous year and whose last donations were 30 days or less prior to the study. For the control

group, whole-blood donors with no previous history of whole-blood donation or plateletpheresis or that had donated more than one year before the study were matched by age and sex with the repeated plateletpheresis donors. The plateletpheresis collection was performed in the COBE Spectra and Haemonetics MCS+ equipment.

Data of the donors (sex, age, ethnicity, ABO/RhD type, number of donations in the previous year, last donation, number of cycles and collection length) were obtained through the software of the Hemotherapeutic Service (Serviço de Hemoterapia) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). It was also confirmed if the whole-blood donors had not donated whole-blood or platelet in a different place. The protocol was approved by the Committee for Ethics in Research (Comitê de Ética em Pesquisa).

SAMPLES

Aliquots of 1 mL were obtained from all the donors included in the study and were placed in an EDTA tube prior to any manipulation of the sample by the haemotherapy service. The aliquots were stored in room temperature and sent to the HCPA's Personalized Diagnosis Unit (Unidade de Diagnóstico Personalizado), in no more than 6 hours, for the performance of the tests.

FLOW CYTOMETRY

The peripheral blood samples were analyzed by flow cytometry using the FACSCanto II (Becton Dickinson, San Diego, CA), marked with these monoclonal antibodies: anti-CD157-PE (SY11B5), CD45-PerCP (MEM-28), CD64-PE-Cy7 (10.1), CD10-APC-Cy7 (MEM-78) (Exbio, Praga, Czech Republic) e FLAER-Alexa 488 (FL1S, liquid) (Cedarlane, Ontario, Canada).

For the leucocytes analysis, 100 μ L of whole-blood were added to the FLAER and monoclonal antibodies, incubated for 20 minutes at room temperature and protected from the light. After this incubation time, 2 mL of FACSLYSE (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) were used for erythrocytes lysis, and it was incubated for 10 minutes at room temperature, protected from the light. Finally, the

samples were centrifuged, washed once and resuspended with phosphate buffered saline (PBS).

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS

Event acquisition was made by the flow cytometer FACSCanto II (Becton Dickinson, San Diego, CA) using the FACSDiva software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and the analysis, by the Infinicyt software (Cytognos, Salamanca, Spain). The number of events acquired was 300.000 for leucocytes.

Neutrophils were selected through the expression of CD45 positive, CD64 weak or negative, CD10 positive and through the side scatter (SSC) and forward scatter (FSC), which analyze cell's granularity and size, respectively.

Monocytes were identified through CD45 positive, CD64 strong, CD10 negative and through the SSC and FSC parameters.

Definition of PNH clone and PNH-phenotype cells was characterized by the absence or decrease of CD157 and FLAER expression in monocytes and neutrophils, given that detection's sensitivity was of 0,01% (1 in every 10.000 analyzed cells).

STATISTICS

Quantitative outcomes were analyzed according to the sample's distribution: normal, T-test for paired samples and Wilcoxon Test for asymmetric samples. Data was presented as mean values with confidence intervals of 95% (CI) or median, with interquartile intervals 25 and 75. The SPSS computer program (version 20.0) was used for data processing and analysis.

RESULTS

Cases and controls were paired according to sex and age, where 36 (81,8%) were male and 8 (18,2%) were female in each group. When age was considered, the mean of cases was of $46,55 \pm 13,27$ years and the mean of controls was of $47,68 \pm 11,31$ years (Table 1).

Table 1. Demographic data: cases and controls

Variable	Case	Control	P
Gender			
Male	36 (81,8%)	36 (81,8%)	
Age (years)	46,55 ± 13,27	47,68 ± 11,31	
Ethnicity	39 (88,6%)	40 (90,9%)	0,27
White	0 (0%)	2 (4,5%)	
Black	5 (11,4%)	2 (4,5%)	
Others			
Blood group ABO			
A	13 (29,5%)	23 (52,3%)	
B	3 (6,8%)	3 (6,8%)	0,13
AB	4 (9,1%)	1 (2,3%)	
O	24 (54,4%)	17 (38,6%)	
RhD			
Positive	41 (93,2%)	33 (75%)	0,04
Negative	3 (6,8%)	11 (25%)	
Donation media (last year)	6,67	Não se aplica	

The groups were compared concerning the analysis of the expression of GPI-anchored proteins; it was observed, though, that both the 44 repetition plateletpheresis donors as well as the 44 whole-blood control donors did not present either PNH clone neither cells with PNH phenotypes (rare) (Figure 1).

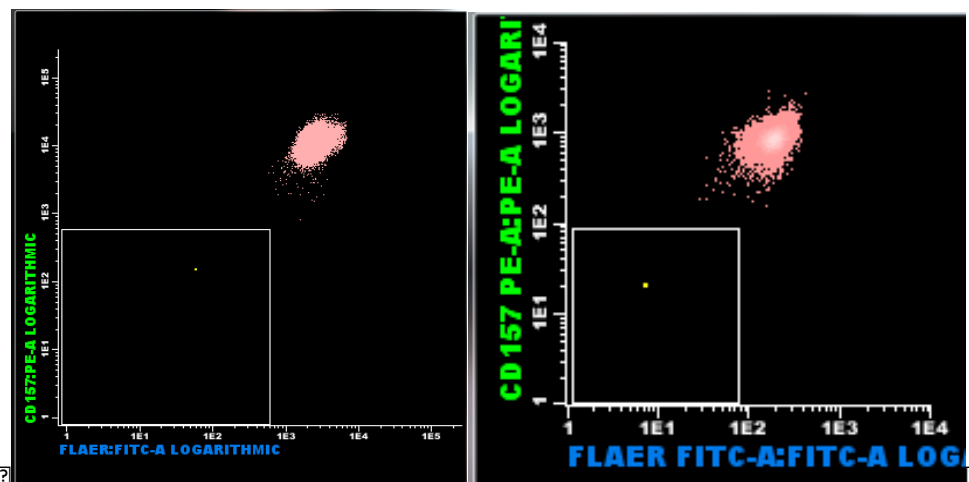


Figure 1. Analysis of FLAER x CD157 in neutrophils (image on the left) and monocytes (image on the right).

DISCUSSION

Due to the fact that in every plateletpheresis a great amount of leucocytes is lost, which varies from 3×10^9 e 10×10^9 cells¹⁸, it is asked if there can be an immunosuppression resulting from this cellular loss. Considering that there is a daily rate of leucocyte production, the loss of cells in platelet donation can be irrelevant for the hematopoietic system, thus the sum of losses resulting from each donation can be equivalent to years of production of blood cells.¹⁶

As well as it is suggested that there can be a thrombopoietic exhaustion related to repetitive plateletpheresis donation,^{18,19} in a context of reduction of the medullar capacity of compensating cell counts in the blood stream and recovering from the stress caused by the platelet donation,¹⁹ the same can happen with the other cells of the hematopoietic system.

Hematopoiesis is characterized by a continuous turnover triggered by the replication of hematopoietic stem-cells. Every time that the hematopoietic cells replicate there is a small risk of acquiring DNA mutations which can lead to genetic disorders such as PNH.²⁰ In a context in which the bone marrow tries to compensate cell loss during each plateletpheresis, there can be a hyper stimulation of it, increasing the chances of acquiring mutations.

In 2003, a study in Germany approached the hypothesis that, if the repetitive stimulation of the hematopoietic system induced by the plateletpheresis and whole-blood could affect the hematopoietic stem-cells' turnover. The data showed that there is no alteration in the turnover of hematopoietic stem-cells of repetitive plateletpheresis and whole-blood donors when compared to controles.¹⁶ Nevertheless, there are no data to compare, since studies that address this question as well as addressing damage to repetitive donors are scarce.

The first equipment of plateletpheresis to be used were held responsible, partially, for the decrease of hematocrit and hemoglobin of donors due to the pressure of the circuit's bombs which, by a mechanical effect, cause red blood cells' hemolysis.²¹ And yet, it is known that the plastic used in the plateletpheresis circuit adsorbs high amounts of proteins, including the ones of higher molecular weight, such as the IgG immunoglobulin²². So, the present study evaluated the absence or decrease of GPI-anchored proteins in repeated plateletpheresis donors, and it is the first one with this intention.

In order to detect small PNH populations, a high-sensitivity (0,01%) method was employed together with the FLAER, which connects to the GPI anchor with high affinity, clearly identifying PNH cells from the normal ones, helping the PNH diagnosis much. Of all the repeated plateletpheresis donors evaluated, no one presented absence or decrease of GPI-anchored proteins. A limiting factor of the study can be the fact that the donor which has donated by plateletpheresis at least 4 times in the past year; however, it was not evaluated how long he or she had been a repeated plateletpheresis donor.

According to the data in this work, it is suggested that the procedure of repetitive plateletpheresis donation does not alter the expression of GPI-anchored proteins and does not generate PNH clone, thus being a safe procedure for the donor in this aspect.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the Personalized Diagnosis Unit (Unidade de Diagnóstico Personalizado), which helped and contributed to the accomplishment and interpretation of the performed tests.

REFERENCES

1. Holbro A, Infanti L, Sigle J, et al. Platelet transfusion: basic aspects. *Swiss Med Wkly*. 2013;143(December):1-10.
2. Barbosa MH, Da Silva KFN, Coelho DQ, et al. Risk factors associated with the occurrence of adverse events in plateletpheresis donation. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2014;36(3):191-195.
3. Chen Y, Lin Y, Lin H, et al. Regular plateletpheresis increased basal concentrations of soluble P-selectin in healthy donors: Possible involvement of endothelial cell activation? *Clin Chim Acta*. 2016;458:18-22.
4. Burgstaler EA. Blood component collection by apheresis. *J Clin Apher*. 2006;21(2):142-151.
5. Mane VB, Jagtap PE, Nagane NS, et al. The significance of evaluation of haematocrit in plateletpheresis donors. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(4):BC06-7.
6. Keklik M, Eser B, Kaynar L, et al. Comparison of Plateletpheresis on the Fenwal Amicus, Fresenius COM.TEC, and Trima Accel Cell Separators. *J Clin Apher*. 2015;30(3):171-175.
7. Waxman DA. Volunteer donor apheresis. *Ther Apher*. 2002;6(1):77-81.
8. Schrezenmeier H, Seifried E. Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: Which product type should be preferred? *Vox Sang*. 2010;99(1):1-15.
9. Western KH, Videm V. Donor neutrophil function after plateletpheresis.

- Transfusion*. 2000;40:1414-1418.
10. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(4):211-230.
 11. Bessler M, Hiken J. The pathophysiology of disease in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. January 2008:104-110.
 12. Correia RP, Bento LC, Bortolucci ACA, et al. Technical advances in flow cytometry-based diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Einstein (São Paulo)*. 2016;14(3):366-373.
 13. Luzzatto L. Recent advances in the pathogenesis and treatment of juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2011;152(6):677-687.
 14. Zurzolo C, Simons K. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: Membrane organization and transport. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2016;1858(4):632-639.
 15. Kinoshita T, Fujita M, Maeda Y. Biosynthesis, Remodelling and Functions of Mammalian GPI-anchored Proteins: Recent Progress. *J Biochem*. 2008;144(3):287-294.
 16. Scheduling S, Ersöz I, Hartmann U, et al. Peripheral blood cell telomere length measurements indicate that hematopoietic stem cell turnover is not significantly increased in whole blood and apheresis PLT donors. *Transfusion*. 2003;43(August):1089-1095.
 17. Brasil. Portaria n o 158, de 04 de fevereiro de 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Diário Oficial da União, 05 de fevereiro de 2016., Seção I.
 18. Richa E, Krueger P, Burgstaler EA, et al. The effect of double- and triple-apheresis platelet product donation on apheresis donor platelet and white blood cell counts. *Transfusion*. 2008;48(7):1325-1332.
 19. Strauss RG. Risks of clinically significant thrombocytopenia and/or lymphocytopenia in donors after multiple plateletpheresis collections. *Transfusion*. 2008;48(7):1274-1278.
 20. Traulsen A, Pacheco JM, Dingli D. On the origin of multiple mutant clones in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Stem Cells*. 2007;25(12):3081-3084.
 21. Das SS, Chaudhary R, Verma SK, et al. Pre- and post- donation haematological values in healthy donors undergoing plateletpheresis with five different systems. *Blood Transfus*. 2009;7(3):188-192.
 22. Ghio M, Contini P, Ansaldi F, et al. Immunomodulation Due to Plasma or Plasma-PlateletApheresis Donation: Events Occurring During Donation Procedures. *J Clin Apher*. 2015;30:201-211.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho apresentado foi o primeiro estudo delineado com o intuito de avaliar a ausência ou diminuição das proteínas ancoradas ao GPI e potencial clone HPN em doadores de plaquetaférese de repetição. Com o propósito de detectar pequenas populações HPN, foi utilizado método de alta sensibilidade (0,01%) juntamente com o FLAER, que se liga com alta afinidade na âncora GPI, claramente identificando células HPN de células normais, auxiliando bastante no diagnóstico de HPN.

De todos os doadores de plaquetaférese de repetição avaliados, nenhum apresentou ausência ou diminuição de expressão de proteínas ancoradas ao GPI. Logo, sugere-se que o procedimento de doação de plaquetaférese de repetição não altera a expressão de proteínas ancoradas ao GPI nem gera clone HPN, sendo considerado um procedimento seguro para o doador neste aspecto. Cabe ressaltar que poderia ser realizado um estudo de corte, avaliando o doador no primeiro momento em que ele inicia as doações de plaquetaférese e acompanhá-lo ao longo dos anos com intuito de verificar se o mesmo já possuía clone HPN antes de ser doador de repetição e se vai adquirir ao longo dos anos, decorrente do processo de doação. Um fator limitante do estudo pode ser o fato de que foi incluído o doador que tenha doado plaquetaférese no mínimo quatro vezes no último ano, entretanto não foi avaliado há quanto tempo ele é doador de plaquetaférese de repetição.

De acordo com a literatura, os neutrófilos são ativados na doação de plaquetaférese por estarem expostos a um circuito extracorporeal e pela adsorção de proteínas pelo plástico da bolsa. Com isso, este estudo teve o intuito de verificar se a expressão basal do CD64, que é considerado um marcador de ativação neutrofílica, se mantém aumentada nos doadores de plaquetaférese de repetição, no sentido de avaliar os efeitos metabólicos cumulativos da doação de plaquetaférese de repetição. No entanto, foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os doadores de plaquetaférese de repetição e os doadores de sangue total controle. Os dados sugerem que o basal de CD64 não se altera devido à exposição do doador à doação de plaquetaférese de repetição.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Mesmo com a existência de diretrizes que protejam a saúde do doador de plaquetaférese, a preocupação maior é relacionada aos efeitos adversos a curto prazo. No entanto, é interessante analisar os efeitos cumulativos em longo prazo decorrentes da doação de plaquetaférese de repetição. Com a crescente demanda transfusional de plaquetas, especialmente de plaquetaférese, é necessário um número cada vez maior de doadores disponíveis e garantir a segurança e integridade da saúde do doador é fundamental neste processo.

STROBE

Ítem	Nº	Recomendação	Pag
Título e Resumo	1	Indique o desenho do estudo no título ou no resumo, com termo comumente utilizado	4
		Disponibilize no resumo um sumário informativo e equilibrado do que foi feito e do que foi encontrado	4
Introdução			
Contexto/Justificativa	2	Detalhe o referencial teórico e as razões para executar a pesquisa.	13-31
Objetivos	3	Descreva os objetivos específicos, incluindo quaisquer hipóteses pré-existentes	32-33
Métodos			
Desenho do estudo	4	Apresente, no início do artigo, os elementos-chave relativos ao desenho do estudo.	40-41
Contexto (setting)	5	Descreva o contexto, locais e datas relevantes, incluindo os períodos de recrutamento, exposição, acompanhamento (follow-up) e coleta de dados	NA
Participantes	6	Estudos de Caso-Controle: 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	42-43

Variáveis	7	Defina claramente todos os desfechos, exposições, preditores, confundidores em potencial e modificadores de efeito. Quando necessário, apresente os critérios diagnósticos.	43-44
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.	43-44
Viés	9	Especifique todas as medidas adotadas para evitar potenciais fontes de viés.	NA
Tamanho do estudo	10	Explique como se determinou o tamanho amostral.	NA
Variáveis quantitativas	11	Explique como foram tratadas as variáveis quantitativas na análise. Se aplicável, descreva as categorizações que foram adotadas e por que.	NA
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-Controle: Se aplicável, explique como o pareamento dos casos e controles foi tratado.	44