

Angelina Maria Saraiva Vieira da Silva

**IDENTIFICAÇÃO DE REFRAATARIEDADE PLAQUETÁRIA
EM RECÉM-NASCIDOS**

Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Ciências Saúde do Norte,
Para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas

Orientador da Tese: Professora Doutora Ana Paula Guimarães Mota

Coorientador: Mestre Maria Eduarda Fernandes Valente

Outubro de 2013

Resumo

A trombocitopenia neonatal aloimune (TNAI) é a causa mais comum de trombocitopenia isolada no recém-nascido saudável, com uma incidência que varia entre 1:2000 a 1:3000 nados vivos, devendo-se à destruição das plaquetas fetais/neonatais induzida por aloanticorpos plaquetários maternos dirigidos contra antigénios plaquetários fetais herdados do pai, ocorrendo, no entanto, na primeira gravidez, em mais de 50% dos casos¹.

O tratamento desta identidade clínica passa na maior parte dos casos pelo recurso à transfusão de componentes sanguíneos plaquetários, o controlo da eficácia do procedimento transfusional fica restrito à avaliação do médico assistente, e na grande maioria dos recém-nascidos observa-se que desenvolvem refratariedade plaquetária.

Em termos laboratoriais, o controlo de transfusão de plaquetas é feito pelo cálculo do incremento corrigido da contagem (ICC) ou da percentagem de recuperação plaquetária pós-transfusão (RPP), prática raramente observada nos serviços de Imunohemoterapia.

Para o cálculo do ICC e RPP utilizam-se as seguintes fórmulas:

$$\text{ICC} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pós-transfusão} - \text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pré-transfusão}) \times 10^{11} \times \text{SC (m}^2\text{)}}{\text{N}^\circ \text{ Plaquetas} \times 10^{11}}$$

$$\text{RPP (\%)} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pós-transfusão} - \text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pré-transfusão}) \times 10^{11} \times \text{VS (mL)}}{\text{N}^\circ \text{ Plaquetas} \times 10^{11}}$$

Quando o incremento é insatisfatório, o recém-nascido é denominado como “refratário” à transfusão de plaquetas.

De forma geral, a refratariedade é definida de acordo com os valores do incremento corrigido com 10-60 minutos e com 18-24 horas após a transfusão e devem ser iguais ou inferiores a 5.000 e 2500 plaqueta/ μL , respetivamente. Os valores que indicam refratariedade apresentam percentagem de RPP menor que 20% até uma hora ou menor que 10% com 16 horas. Enquanto a contagem de plaquetas uma hora após a transfusão avalia, principalmente, a

resposta imediata à transfusão, a contagem com 24 horas monitoriza a sobrevivência das plaquetas.²

A definição do limiar de refratariedade à transfusão de plaquetas com base no ICC e no RPP é muito útil, desde que os resultados sejam bem interpretados. No contexto clínico, é considerado importante o aumento maior ou igual a 20% no ICC (5×10^9 plaquetas/L com uma hora e $2,4 \times 10^9$ plaquetas/L com 24 horas) e no intervalo até próxima transfusão ($\geq 8,4$ horas).²

Se o ICC (com colheita após uma hora da transfusão) for inferior a $5000/\mu\text{L}$ no mínimo após dois eventos transfusionais, considera-se que a transfusão foi ineficaz e o paciente apresenta refratariedade plaquetária de causa imune e, se estamos na presença de aloanticorpos plaquetários, sendo considerado de importância clínica e o causador de ineficácia à transfusão de plaquetas.

Se o ICC (com colheita após uma hora de transfusão) for superior ou igual a $5.000/\mu\text{L}$ considera-se a transfusão eficaz e o paciente sem refratariedade plaquetária de causa imune, independente da presença ou não de anticorpos. Se o anticorpo estiver presente, não manifestou importância clínica para a transfusão.

Palavras-chave: Transfusão de Plaquetas; Refratariedade Plaquetária; Aloimunização HLA; Aloimunização HPA; Rendimento Plaquetário; Trombocitopenia Neonatal Aloimune

Abstract

The neonatal alloimmune thrombocytopenia (TNAI) is the most common cause of isolated thrombocytopenia in healthy newborn with an incidence ranging from 1:2000 to 1:3000 live births, as a result of the destruction of fetal / neonatal platelets induced by maternal platelet alloantibodies directed against fetal platelet antigens inherited from the father, occurring, however, in the first pregnancy, in more than 50% of the cases ¹.

The efficient monitoring of the transfusional procedure is totally evaluated by the physician.

The vast majority of newborns develop platelet refractoriness.

In terms of laboratory control regarding platelet transfusion this is done by calculating the corrected count increment (CCI) or the percentage of post-transfusion platelet recovery (RPP), rarely observed in practice Immunohemotherapy services.

The following formulas are used to calculate the ICC and RPP:

$$\text{ICC} = \frac{(\text{N}^{\circ} \text{ Post-Transfusion Platelet} - \text{N}^{\circ} \text{ Pré-Transfusion-Platelet}) \times 10^{11} \times \text{BS (m}^2\text{)}}{\text{N}^{\circ} \text{ Platelets} \times 10^{11}}$$

$$\text{RPP (\%)} = \frac{(\text{N}^{\circ} \text{ Post-transfusion Platelets} - \text{N}^{\circ} \text{ Pré-Transfusion Platelets}) \times 10^{11} \times \text{BV(mL)}}{\text{N}^{\circ} \text{ Platelets} \times 10^{11}}$$

When the increment is unsatisfactory, the newborn is referred to as "refractory" to the platelet transfusion.

In general, the refractory is defined according to the increment values and corrected with 10-60 minutes and with 18-24 hours after transfusion and should be less than or equal to 5,000 and 2,500 platelets / uL, respectively. The values that indicate refractoriness have a RPP refractory percentage of less than 20% up to an hour or less than 10% in 16 hours. While platelet counts one

hour after transfusion evaluates the immediate response to transfusion, the platelet count after 24 hours monitors platelet survival².

The definition of the refractoriness threshold in platelet transfusion is based on the ICC and the RPP is very useful, since the results are well interpreted. In a clinical context a greater than or equal to 20% ICC increase (5×10^9 platelets / L one hour and 2.4×10^9 platelets / L at 24 hours) is considered important and in the interval until the next transfusion (≥ 84 hours)².

If the ICC (sample taken one hour after transfusion) is less than 5000/ μ L at least after transfusional procedures, it was considered that the transfusion was ineffective and the patient presents with platelet refractoriness due to an immune cause and in the presence of platelet alloantibody, it was considered to have clinical importance and the cause of inefficient platelet transfusion.

If the ICC (sample collected an hour after the transfusion) is greater than or equal to 5.000/ μ L it was considered an effective transfusion and the patient without platelet immune refractoriness, regardless of the presence or absence of antibodies. If the antibody is present, it was not considered to present clinical transfusional importance.

Keywords: Platelet Transfusion; Platelet Refractoriness; HLA alloimmunization; HPA Alloimmunization; Platelet Yield The neonatal alloimmune thrombocytopenia;

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Jorge Proença, coordenador do Mestrado de Análises Clínicas.

À Professora Doutora Roxana Moreira que me recebeu de braços abertos em momentos difíceis, e que nestes anos de convívio, se mostrou uma pessoa amiga e generosa.

À Professora Doutora Ana Paula Mota, orientadora desta tese, que pacientemente entendeu os meus silêncios e paragens na execução deste trabalho por problemas pessoais e que sempre me incentivou a continuar e nunca desistir. Obrigada pelo incentivo e críticas positivas que acrescentaram vontade de continuar.

À Dra. Eduarda Valente coorientadora desta tese, que se mostrou sempre disponível ajudando-me na escolha do tema, na elaboração e na análise estatística deste estudo de forma ativa.

À Dra. Maria Lourdes Lima, chefe do serviço de Imunohemoterapia da Maternidade Júlio Dinis-CHP, pela ajuda inquestionável na recolha dos dados dos processos dos pacientes e respetivas mães, um agradecimento especial pelas horas infindáveis passadas no serviço de arquivo da Maternidade de Júlio Dinis- CHP.

À Sra. D. Paula Ulisses, funcionária do serviço de arquivo que tão gentilmente e sempre disponível pesquisou e disponibilizou os processos dos pacientes para consulta dos dados para a elaboração deste estudo.

Ao Serviço de Imunohemoterapia da Maternidade de Júlio Dinis-CHP.

A todas as minhas colegas de trabalho pela infinita paciência que tiveram comigo nos meus piores momentos, e que me perdoem todas as minhas ausências forçadas que sei bem o quanto as sobrecarregou a nível profissional e pessoal.

Ao meu marido Carlos, que esteve sempre ao meu lado, que me apoiou com muito amor e me deu força para continuar, especialmente nos momentos mais difíceis desta tese.

Aos amores da minha vida, Samuel, Ruben, Rafael e Renato, meus queridos filhos que compreenderam sempre os meus momentos de tensão e de muitas ausências nas suas vidas durante a realização deste trabalho.

À Rute, Adolfo, Sandra, Sérgio e Inês por todo o apoio nos momentos difíceis da minha vida, pelo silêncio ou pelo sorriso conforme o momento.

Aos meus queridos pais a quem devo tudo o que sou, e pela ajuda e disponibilidade que têm sempre para me oferecer.

A ti meu anjo da guarda, por estares sempre presente, pela força, amor e proteção sempre que necessito.

Índice

1.Introdução	1
1.1 Transusão de Plaquetas	5
1.2 Resposta à transfusão de Plaquetas	6
1.3 Aloimunização Plaquetária.....	10
1.3.1 Aloimunização HLA.....	11
1.3.2 Aloimunização HPA.....	14
1.3.3 Trombocitopenia Fetal.....	19
1.3.4 Trombocitopenia Neonatal aloimune.....	19
2.Objectivo	29
2.1Objetivos específicos.....	30
3. Material e Métodos	31
3.1 Caracterização da amostra.....	32
4.Resultados	37
5.Discussão	48
5.1 A Refratariedade Plaquetária e a Qualidade do Concentrado de plaquetas.....	49
5.2 A Refratariedade Plaquetária e o Doente.....	50
5.3 O Doente e a sua Condição Clínica.....	50
5.4 O Tratamento da Refratariedade Plaquetária.....	51
6.Conclusão	55
7.Bibliografia	58

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema gráfico mostrando a recuperação na contagem plaquetária em pacientes transfundidos com uma dose padrão de plaquetas.

Figura 2: Mapa da região HLA (banda 6p21.3 do cromossoma6).

Figura 3: Representação do complexo glicoproteico GIIb/IIIa

Figura 4: Algoritmo diagnóstico para investigação do RN (recém nascido) pré-termo com trombocitopenia

Figura 5: Algoritmo diagnóstico para investigação do RN termo com trombocitopenia

Lista de Tabelas

Tabela 1: sistemas antigénicos plaquetários (*HPA*) e seus respetivos antigénios

Tabela 2: Frequência dos antigénios plaquetários (*HPA*) em diferentes populações

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Episódios transfusionais por sexo

Gráfico 2: Frequência de diagnósticos dos recém-nascidos

Gráfico 3: Peso médio dos recém-nascidos

Gráfico 4: Irradiação de produtos plaquetários

Gráfico 5: Histograma do valor da hemoglobina pré-transfusão

Gráfico 6: Histograma do valor do número de plaquetas pré-transfusão

Gráfico 7: Histograma do valor da hemoglobina pós-transfusão

Gráfico 8: Histograma do valor do número de plaquetas pós-transfusão

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
µL	Microlitro (10^{-6} litros)
AA	Aminoácido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ASF	Amostra de Sangue Fetal
BC	“Buffy Coat”
CD	“ <i>Cluster of Differentiation</i> ”
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
cm	Centímetro
CP	Concentrado de Plaquetas
dL	Decilitro
EDTA	“Etylenediaminetetraacetic acid”
GP	Glicoproteína
Hb	Hemoglobina
HLA	“Human Leukocyte Antigens”
HPA	“Human Platelet Antigens”
ICC	Incremento Corrigido da Contagem
IGIV	Imunoglobulina Intravenosa
IgG	Imunoglobulina G
ISBT	“International Society of Blood Transfusion”
Kg	Quilograma
L	Litro
MAIPA	“Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen”
nn	Nucleotídeo
NEC	Enterocolite Necrosante
PCR	“Polimerase Chain Reaction”
PLT	Plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
RPP	Recuperação plaquetária pós-transusão
RN	Recém-nascido
SC	Superfície corporal
TNAI	Trombocitopenia neonatal aloimune
VS	Volume sanguíneo

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

Nas unidades que prestam cuidados intermédios ou intensivos a recém-nascidos, a trombocitopenia, é uma das complicações mais frequentes atingindo 22 a 35% de todas admissões. Estudos anteriores relatam uma prevalência de 1 a 5% de trombocitopenia em todos os recém-nascidos. A maioria dos nados vivos terá trombocitopenia moderada, no entanto, 5 a 10% terá trombocitopenia severa ao nascimento (plaquetas $<50 \times 10^9/L$) factos que requerem investigação urgente para identificação da causa e instituição de tratamento para prevenção de incapacidades ou morte a longo prazo¹.

A grande variedade de etiologias obriga a uma atitude seletiva e protocolada sobre a sua investigação, no sentido de minimizar a espoliação repetida e rentabilizar recursos.

A trombocitopenia neonatal aloimune (TNAI) é a causa mais comum de trombocitopenia isolada no recém-nascido saudável, com uma incidência que varia entre 1:2000 a 1:3000 nados vivos, devendo-se esta, à destruição das plaquetas fetais/neonatais induzida por aloanticorpos plaquetários maternos dirigidos contra antigénios plaquetários fetais herdados do pai, ocorrendo, no entanto, na primeira gravidez, em mais de 50% dos casos¹.

Segundo os “Consensos Nacionais em Neonatologia 2004” da Sociedade Portuguesa de Neonatologia a transfusão profilática de plaquetas em recém-nascidos de termo ou em prematuros deve ser feita quando a contagem de plaquetas for inferior a 30.000/ μ l.

Em recém-nascidos com febre, septicémia ou que apresentem hemorragia, este valor deve ser de 50.000/ μ L.

A transfusão terapêutica está indicada na presença de hemorragia, quando a contagem de plaquetas se situa abaixo de 50.000/ μ L.

A grande maioria dos recém-nascidos desenvolve refratariedade plaquetária. O estado “refratário” é definido como a impossibilidade de obter hemostase (controlo da hemorragia) ou o esperado aumento na contagem de plaquetas, após a transfusão.

Entre os pacientes que apresentam refratariedade plaquetária estima-se que aproximadamente 60% seja por causas não imunes, e, 40% por causas imunes.

As causas para a refratariedade devida a fatores não imunes são ocasionadas, na grande maioria dos casos, por consumo excessivo das plaquetas transfundidas. Particularmente em patologias apresentando hemorragias graves, perdas plaquetárias causadas por sequestro (esplenomegalia e/ou hepatomegalia), consumo plaquetário secundário a infecções, ou em patologias apresentando CID (coagulação intravascular disseminada). Outras complicações clínicas também têm sido descritas como fator de consumo acelerado das plaquetas transfundidas tais como febre e uso de algumas drogas (por ex.: anfotericina B). O tratamento dos pacientes que apresentam refratariedade plaquetária por causas não imunes é feito pelo tratamento direto da causa. Uma vez tratada a causa, a transfusão plaquetária volta a ser eficaz.

Em cerca de 40% dos pacientes que apresentam baixa eficácia da transfusão de plaquetas, as causas são de natureza imune, ou seja, ocorre a formação de anticorpos pelos pacientes contra as plaquetas transfundidas (aloimunização). O mecanismo imune que resulta em aloimunização para os componentes sanguíneos ainda não está bem esclarecido porém, sabe-se que está relacionado com a composição celular do componente transfundido e com o estado imune do paciente. Basicamente dois mecanismos têm sido definidos como indicador da resposta aloimune:

Reconhecimento direto, no qual os linfócitos T “auxiliadores” do paciente interagem diretamente com moléculas *HLA (Human Leukocyte Antigens) classe II* presentes nas células apresentadoras de antígenos do dador. As células T auxiliaadoras do paciente, após interação com células apresentadoras do dador, estimulam os linfócitos B do paciente a produzir anticorpos contra estes antígenos. Portanto, para que ocorra este mecanismo, um dos critérios mais relevantes é a presença de células (ou seja leucócitos) com moléculas *HLA classe II* no componente transfundido.

Reconhecimento indireto em que as células transfundidas são fagocitadas e processadas pelas células apresentadoras de antígenos do paciente, que por sua vez, irão apresentar estes antígenos para as suas próprias células T “auxiliaadoras”, para então induzir a produção de anticorpos. Este mecanismo necessita da colaboração das células apresentadoras de

antígenos do recetor, diferentemente do reconhecimento direto, quando a apresentação é feita diretamente pelas células do dador.

Caso a unidade contendo as plaquetas a serem transfundidas não seja desleucocitada, ou seja, que não se faça previamente à remoção dos leucócitos do dador é possível ativar o mecanismo direto da resposta aloimune.

Dentro dos tipos de pacientes que mais frequentemente apresentam o processo de aloimunização, encontram-se aqueles sob tratamentos imunossupressores (tratamento com quimioterápicos ou radioterapia) e que devido à imunossupressão recebem em geral, uma maior dose de hemocomponentes durante o tratamento, tornando-se pacientes poli-transfundidos. Apesar destes pacientes estarem com o seu sistema imune comprometido, ainda são capazes de apresentar aloimunização com taxas que variam de 30 a 50% de aloimunização para antígenos plaquetários.

Na década de 80, foi introduzida a utilização de filtros para remoção dos leucócitos ainda presentes nos concentrados de plaquetas e nas plaquetas colhidas por aférese. Este procedimento reduziu em aproximadamente 50% os casos de aloimunização plaquetária em pacientes poli-transfundidos, pois ao reduzir o número de leucócitos no componente transfundido, reduziu-se a possibilidade de ocorrer o mecanismo direto da aloimunização. Porém, estudos clínicos recentes com pacientes que receberam componentes sanguíneos desleucocitados, permitiram verificar a presença de aloimunização variando de 10 a 40% dos casos estudados. Acredita-se que nestes casos o mecanismo indireto seja o responsável pela aloimunização. Os anticorpos mais comumente envolvidos nestes casos são anticorpos contra antígenos do sistema *HLA* e anticorpos plaquetários específicos pertencentes aos sistemas *HPA (Human Platelet Antigens)*².

O tratamento geralmente utilizado para pacientes que apresentam refratariedade de causas imunes é a identificação do(s) anticorpo(s) envolvido(s) para a seleção de plaquetas compatíveis com o paciente. Porém, existem ainda dificuldades para definir a verdadeira especificidade do(s) anticorpo(s) envolvido(s), seja em função das metodologias usadas para identificação destes anticorpos, seja por problemas de disponibilidade de dadores compatíveis.

1.1 Transfusão de Plaquetas

As plaquetas são produzidas pela fragmentação do citoplasma de megacariócitos, células grandes e poliploides que se desenvolvem na medula óssea e no baço³. Ao serem libertadas na circulação sanguínea, exercem um papel essencial na hemóstase, cicatrização de feridas e processos de fibrose⁴. Nos seres humanos, são produzidos diariamente 1×10^{11} plaquetas que apresentam uma sobrevivência média de dez dias e são removidas da circulação pelo sistema retículo endotelial, principalmente no fígado e no baço⁵.

A transfusão de plaquetas pode ser realizada em duas situações clínicas: na profilaxia de hemorragias graves, sobretudo intracerebrais, e em pacientes com trombocitopenia profunda, e no tratamento de hemorragia em pacientes trombocitopénicos. O primeiro tipo de transfusão é chamado de transfusão profilática, e o segundo, de transfusão terapêutica.

Segundo os Consensos Nacionais de Neonatologia da Sociedade Portuguesa de Neonatologia de 2004, a transfusão profilática de plaquetas em recém-nascidos de termo ou em prematuros deve ser feita quando a contagem de plaquetas for inferior a 30.000/ μl .

O uso profilático de plaquetas não está indicado após transfusão maciça de concentrado de eritrócitos a não ser por anteceder procedimentos invasivos.

A transfusão terapêutica está indicada na presença de hemorragia, febre, ou septicémia quando a contagem de plaquetas se situa abaixo de 50.000/ μL ⁶.

As plaquetas a serem transfundidas podem ser obtidas por separação a partir de unidades de sangue total, pelos métodos de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) ou de *Buffy Coat* (BC). Por estes métodos, cada unidade de concentrado de plaquetas (CP), unitárias ou *standard*, contém um valor $> 60 \times 10^9$ plaquetas suspensas num volume > 40 mL de plasma. Outro método de obtenção de CP é o procedimento de aférese, plaquetas obtidas de um só dador usando um equipamento de separação automática de células, obtendo-se plaquetas de uma dose terapêutica efetiva suspensa numa mistura de plasma e solução aditiva^{7,11}.

Quando ocorrem falhas nos processos de obtenção, conservação, manipulação e infusão dos hemocomponentes podem desencadear danos nos

componentes celulares e plasmáticos, gerando incidentes e acidentes transfusionais graves.⁸ Para manter a boa qualidade na produção e armazenamento de plaquetas, três fatores devem ser considerados: 1) redução da ativação plaquetária durante a colheita, 2) fracionamento e armazenamento; atividade glicolítica mínima e 3) disponibilidade de glicose durante todo o período de armazenamento⁹.

Desde 1980, tem sido adotado pelos serviços de hemoterapia o armazenamento dos produtos plaquetários à temperatura ambiente ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) por um período máximo de cinco dias¹⁰ e alguns protocolos estabelecem pH mínimo de 6,4.¹¹ A recuperação média após cinco dias de armazenamento é de 63% e a sobrevivência média é de 160,8 horas¹².

Existe um consenso de que as plaquetas devem ser armazenadas sob agitação constante. O ideal é que, uma vez retiradas dos homogeneizadores, as plaquetas sejam transfundidas o mais rapidamente possível. No entanto um estudo mostrou que os concentrados plaquetários poderiam permanecer até 24 horas fora dos agitadores sem que a sua função ficasse comprometida¹³.

Muitas pesquisas têm sido efetuadas no sentido prolongar o período de validade e melhorar as condições de armazenamento para diminuir o risco de crescimento bacteriano.

Com o objetivo de diminuição do risco de transmissão de doenças são utilizadas estratégias como: a redução do número de leucócitos por filtração (desleucocitação); a irradiação dos componentes e uso de concentrados plaquetários obtidos por aférese.

Além disso, os métodos de desleucocitação contribuem para a diminuição do risco de aloimunização a antígenos leucocitários humanos (HLA), condição que pode afetar a resposta à transfusão^{14,15}. O que se tem preconizado é que o número de leucócitos por unidade seja menor que 5×10^6 ^{11,16}.

1.2 Resposta à transfusão de plaquetas

Habitualmente, é da responsabilidade do serviço de Medicina Transfusional a convocação de dadores, triagem clínica, recolha de sangue, processamento, armazenamento, rastreio e análises serológicas, tipagem

imuno-hematológica, provas de compatibilidade e controlo de qualidade dos hemocomponentes. No entanto o controlo da eficácia do procedimento transfusional fica restrito à avaliação do médico assistente.

O controlo de transfusão de plaquetas é feito pelo cálculo do incremento corrigido da contagem (ICC) ou da percentagem de recuperação plaquetária pós-transfusão (RPP), prática raramente observada nos serviços de Imunohemoterapia.

Para o cálculo do ICC e RPP utilizam-se as seguintes fórmulas:

$$\text{ICC} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pós-transfusão} - \text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pré-transfusão}) \times 10^{11} \times \text{SC} (\text{m}^2)}{\text{N}^\circ \text{ Plaquetas} \times 10^{11}}$$

$$\text{RPP} (\%) = \frac{(\text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pós-transfusão} - \text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pré-transfusão}) \times 10^{11} \times \text{VS} (\text{mL})}{\text{N}^\circ \text{ Plaquetas} \times 10^{11}}$$

Sendo que SC é a superfície corporal (altura em cm é multiplicada pelo peso (Kg) e por 0,00718 e VS é o volume sanguíneo (o volume sanguíneo estimado num recém-nascido é de 75mL/Kg).

$\text{SC} = [(4 \times \text{Kg}) + 9] / 100$ é usada em recém-nascidos com peso < 10 Kg.

Desta forma, o ICC e a RPP ajustam o número de plaquetas transfundidas para o volume de sangue do recém-nascido e são consideradas ferramentas úteis na comparação mais precisa da resposta à transfusão, uma vez que as diferenças no ICC e na RPP podem ocorrer com produtos que tenham a mesma dose, mas diferentes qualidades.

Quando o incremento é insatisfatório, o recém-nascido é denominado como “refratário” à transfusão de plaquetas^{17,18}.

A grande maioria dos recém-nascidos desenvolve refratariedade plaquetária. O estado “refratário” é definido como a impossibilidade de obter

hemostase (controle da hemorragia) ou o esperado aumento na contagem de plaquetas, após a transfusão.

De forma geral, a refratariedade é definida de acordo com os valores do incremento corrigido com 10-60 minutos e com 18-24 horas após a transfusão e devem ser iguais ou inferiores a 5.000 e 2500 plaqueta/ μ L, respetivamente. Os valores que indicam refratariedade apresentam percentagem de RPP menor que 20% até uma hora ou menor que 10% com 16 horas. Enquanto a contagem de plaquetas uma hora após a transfusão avalia, principalmente, a resposta imediata à transfusão, a contagem com 24 horas monitoriza a sobrevida das plaquetas².

A definição do limiar de refratariedade à transfusão de plaquetas com base no ICC e no RPP é muito útil, desde que os resultados sejam bem interpretados. No contexto clínico, é considerado importante o aumento maior ou igual a 20% no ICC (5×10^9 plaquetas/L com uma hora e $2,4 \times 10^9$ plaquetas/L com 24 horas) e no intervalo até próxima transfusão ($\geq 8,4$ horas)².

O ICC é uma avaliação essencial para o sucesso da transfusão de plaquetas, principalmente, para os pacientes que recebem transfusões profiláticas. Observa-se diminuição progressiva no intervalo entre as transfusões quando há diminuição nos valores do ICC, o que indica menor sobrevida das plaquetas¹⁹. Além disso, a falta de resposta satisfatória parece estar relacionada à maior incidência de complicações hemorrágicas e à menor sobrevida do paciente, provavelmente, em decorrência de um maior grau de dano endotelial.

Existem diversas condições clínicas que podem influenciar a sobrevida das plaquetas após a transfusão e comprometer o incremento plaquetário. Essas condições podem ser de causas imunes ou não imunes. Dentre as não imunes, que representam cerca de 80% das causas de refratariedade, destacam-se: sepsis, febre, esplenomegalia, transplante de medula óssea e de células progenitoras de sangue periférico, coagulação intravascular disseminada, doença do enxerto contra o hospedeiro, doenças vaso-oclusivas, trombocitopenia pelo uso de medicamentos (quidina, penicilina, sulfas, heparina e vancomicina) e hemorragias. Estes fatores podem encurtar a sobrevida de plaquetas, com queda significativa no ICC de 24 horas, porém com pouco efeito sobre o ICC de uma hora^{14,19}.

As causas imunes relacionam-se com a necessidade de maior número de transfusões e em intervalos menores devido à persistência de trombocitopenia decorrente da presença de anticorpos contra antigênios presentes na membrana plaquetária do dador.

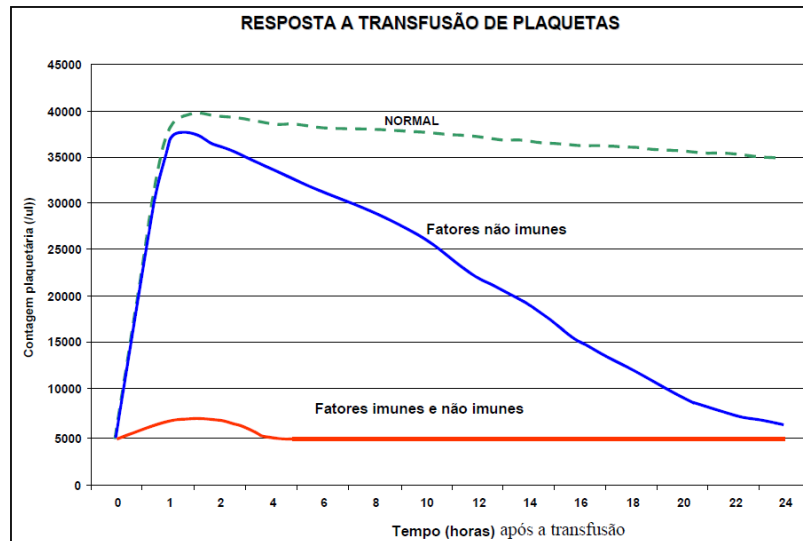


Figura1. Esquema gráfico mostrando a recuperação na contagem plaquetária em pacientes transfundidos com uma dose padrão de plaquetas.
Adaptado de Benson K⁶

Resposta normal esperada em pacientes transfundidos com plaquetas: a contagem no sangue periférico do paciente eleva-se rapidamente após a transfusão, com um ligeiro e lento decréscimo nas primeiras 24 horas como se verifica na linha tracejada a verde, se o paciente apresenta fatores não imunes, pode ocorrer aumento rápido na primeira hora após a transfusão com queda acentuada nas primeiras 24 horas (linha azul). Em pacientes com fatores imunes (na presença ou ausência de fatores não-imunes) ocorre um rápido sequestro das plaquetas transfundidas não ocorrendo quase nenhuma elevação na contagem plaquetária do sangue periférico do paciente, como aliás é visível na linha vermelha.

1.3 Aloimunização plaquetária

As plaquetas apresentam antígenos do sistema ABO na sua membrana e podem também absorver esses antígenos do plasma. A refratariedade por anticorpos anti-ABO pode ser contornada pela transfusão de plaquetas ABO compatíveis. Embora seja clara a interferência de anticorpos anti-A e anti-B nos incidentes de hemólise intravascular, permanece em discussão o quanto a transfusão de plaquetas ABO incompatíveis pode influenciar a resposta à transfusão de plaquetas.

Um estudo demonstrou que cerca de 50% dos serviços de hemoterapia norte-americanos providenciam plasmas ou plaquetas ABO incompatíveis quando não há disponibilidade de produtos compatíveis. Desses 17% não realizam monitorização no uso de plaquetas ABO incompatíveis²⁰.

Os dois sistemas de antígenos com mais envolvimento na aloimunização plaquetária são: os antígenos leucocitários humanos (*Human Leukocyte Antigen – HLA*), presentes na membrana das plaquetas e também em outros tecidos e células sanguíneas, e os antígenos plaquetários humanos (*Human Platelet Antigen – HPA*) específicos das plaquetas^{21,22}.

A aloimunização a estes antígenos ocorre devido à sensibilização prévia durante a gestação, transfusões ou transplantes. Também depende de diversos fatores tais como o tipo de produto plaquetário transfundido, o número de transfusões recebidas e estado imunológico do paciente¹. O principal tipo de concentrado de plaquetas transfundido, é o de *pool* de quatro a seis doadores de plaquetas, desleucocitados. Neste caso, os pacientes são expostos a um maior número de antígenos de doadores aumentando o risco de aloimunização.

Os aloanticorpos do sistema *HLA* são dos menos frequentes e mais importantes dos fatores imunológicos responsáveis pela contagem inadequada do incremento plaquetário.

A introdução de desleucocitação universal dos hemocomponentes permitiu diminuir a ocorrência de formação de anticorpos *HLA*, assim como, anticorpos contra antígenos plaquetários humanos (*HPAs*), um fator imunológico ainda menos comum²³.

Pacientes aloimunizados, a sangrarem ou submetidos a procedimentos invasivos e sem plaquetas compatíveis levou a que uma variedade de abordagens fosse tentada.

Foram utilizadas modalidades terapêuticas que incluem esplenectomia, corticosteroides, plasmaferese, a administração de imunoglobulina intravenosa (IGIV), e transfusões repetidas de plaquetas. Exceto para a IGIV, há poucas evidências de que qualquer um destes tratamentos funcione²³.

1.3.1. Aloimunização HLA

O sistema *HLA* origina-se do Complexo de Histocompatibilidade Principal que codifica proteínas polimórficas da superfície celular responsáveis pela apresentação de antígenos. As plaquetas podem sintetizar antígenos *HLA* de classe I e também adsorver antígenos *HLA* solúveis no plasma e com isso, o número de antígenos *HLA* na superfície de plaquetas é relativamente alto em comparação às células vermelhas e granulócitos²⁴.

Logo após a introdução de transfusões profiláticas de plaquetas, tornou-se evidente a redução da sua eficácia em muitos pacientes. Muitos estudos reconhecem que a ineficácia transfusional resulta da indução de aloanticorpos *HLA* e outros antígenos.

A maioria dos casos de refratariedade plaquetária poderia ser revertida pelo uso de transfusões de plaquetas fenotipicamente combinados no *locus HLA-A* e *HLA-B*. Foi também reconhecido que o desenvolvimento de anticorpos *HLA*, medido pela atividade linfocitotóxica está correlacionado com o aumento do estado refratário imune.

Sabe-se atualmente, que a resposta aloimune a antígenos do *locus HLA-A* e *HLA-B* é a principal causa de falência pós-transfusional aloimune²³.

O que se tem estabelecido para a prevenção da aloimunização *HLA* é que a quantidade de leucócitos nos produtos sanguíneos seja menor que um milhão (padrões europeus) ou cinco milhões (padrão nos Estados Unidos)²⁵. As principais estratégias implementadas são a redução no número de leucócitos por filtração, irradiação gama ou UV, ou pelo uso de concentrados obtidos por aférese¹⁴.

As recomendações para o uso de plaquetas de aférese aplicam-se aos casos de suporte com plaquetas *HLA*-compatíveis em pacientes aloimunizados e aos casos de trombocitopenia neonatal alo-imune. Nas demais situações, a opção pelos concentrados de aférese é perfeitamente aceitável, e talvez superior, embora não se possa garantir que a relação custo/benefício seja satisfatória^{2,25}.

Considerando-se a preponderância do sistema *HLA* e sabendo que as complicações transfusionais podem ser resolvidas em aproximadamente dois terços dos casos quando é feito a tipagem *HLA* ou identificação cruzada, o caminho óbvio para a prevenção da aloimunização parece ser a seleção de doadores que partilhem todos os antígenos de histocompatibilidade com o receptor. No entanto, a única compatibilidade total será entre gêmeos idênticos. Em todos os outros casos, os indivíduos serão incompatíveis e é provável que ocorram reações aloimunes¹⁷.

Há uma enorme dificuldade em se encontrar doadores totalmente compatíveis devido às diversas variações polimórficas do sistema *HLA*. Por esta razão, muitos pacientes recebem órgãos, plaquetas ou células-tronco de doadores incompatíveis¹⁷.

No caso da transfusão de plaquetas, tais procedimentos podem levar à refratariedade plaquetária. O único meio de contornar este problema é selecionando doadores com base em provas cruzadas negativas. Assim, a transfusão é realizada somente se o paciente não apresentar aloanticorpos contra antígenos *HLA* ou específicos de plaquetas doador. Num primeiro momento isto parece impossível devido à grande variação polimórfica do sistema *HLA*; no entanto, o que vários estudos demonstram é que existem incompatibilidades mais ou menos prováveis de induzirem aloimunização. Em geral, os enxertos incompatíveis para antígenos *HLA* Classe I permissíveis, apresentam sobrevida similar à de enxertos *HLA* idênticos. Para tanto, vêm sendo estabelecidos programas especiais de avaliação de incompatibilidades aceitáveis, estudados por grupos de transplantes²⁶.

Observa-se que existem muitos estudos voltados para o valor da compatibilidade *HLA* no transplante, mas faltam estudos similares na avaliação da compatibilidade na transfusão de plaquetas, uma vez que a incompatibilidade pode ser responsável por reações aloimunes e sensibilização

prévia com influência para pacientes recém-nascidos especialmente de pré-termo e imunodeprimidos.

O que se espera é que a monitorização aprofundada dos pacientes, com diferentes testes *in vitro*, permita identificar parâmetros ideais na predição da presença ou ausência de resposta aloimune prejudicial na transfusão.

A compatibilidade *HLA* pode ser avaliada por ensaios de linfocitotoxicidade, ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), ensaios fluorescentes, citometria de fluxo e testes de biologia molecular.

A escolha do método a utilizar na caracterização alélica do sistema *HLA* depende das especificidades de cada laboratório e dos objetivos do trabalho. Desde a rapidez necessária até ao número de amostras, passando pelo equipamento existente, orçamento disponível e experiência dos recursos humanos, inúmeras são as variáveis que influenciam a escolha do método. Consoante as necessidades e os objetivos dos laboratórios, nomeadamente se pretendem baixa ou alta resolução, poderão optar por utilizar mais de um método. No entanto, em qualquer dos casos, qualquer um dos métodos disponíveis necessita de ser continuamente atualizado por forma a integrar as alterações que permitem a evolução das técnicas e considerar os novos alelos que continuamente são descobertos^{27,28}.

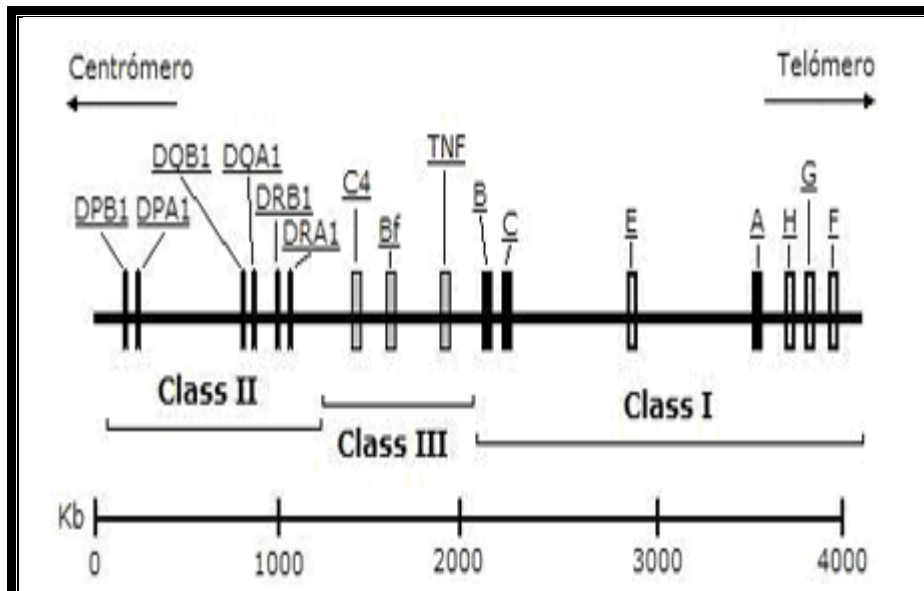


Figura 2. Mapa da região HLA (banda 6p21.3 do cromossoma6). Os genes e pseudogenes não clássicos classe I estão representados por retângulos não preenchidos.
 Fonte: http://www3.uma.pt/lqh/investigacao_hlas.html

1.3.2. Aloimunização HPA

A membrana plaquetária apresenta recetores celulares representados por complexos de Glicoproteínas (GPs) que são fundamentais para a função hemostática plaquetária normal. Algumas glicoproteínas plaquetárias são polimórficas, podendo existir na população sob duas ou mais formas alélicas diferentes, resultantes da substituição de um único nucleotídeo que provoca, conseqüentemente, a mudança de aminoácidos.

Os polimorfismos das GPs plaquetárias são determinantes antigénicos denominados como antigénios plaquetários humanos ou *HPAs*. Aloanticorpos contra esses aloantigénios podem surgir durante a gravidez ou transfusão conduzindo à trombocitopenia aloimune neonatal, púrpura pós transfusional, e refratariedade plaquetária transfusional. Os anticorpos aderem à superfície plaquetária e esse imunocomplexo é fagocitado pelas células mononucleares resultando na diminuição do número de plaquetas²⁹.

Das dezenas de glicoproteínas da membrana plaquetária reconhecidas, pelo menos, cinco [GPIa, Ib (alfa e beta), IIb, IIIa, e CD 109] são polimórficas e demonstraram ser aloimunogénicas.

Até à data, vinte e três antigénios específicos de plaquetas, foram descritos, incluindo a localização de estruturas de glicoproteína de superfície das plaquetas, a quantificação da densidade de antigénios sobre a superfície das plaquetas, e a determinação de polimorfismos de ADN (ácido desoxirribonucleico) nos genes que codificam os antigénios².

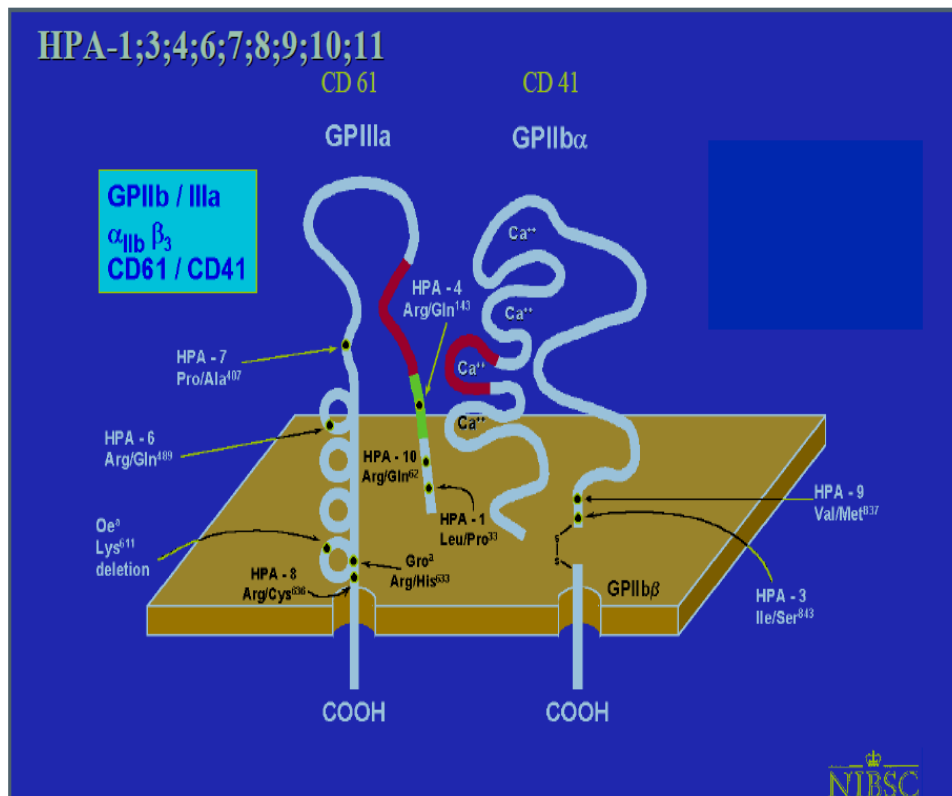


Figura 3. Representação do complexo glicoproteico GPIIb/IIIa

Fonte: National Institute of Biological Standards and Controls – NIBSC, Inglaterra.

As plaquetas possuem aproximadamente 80.000 moléculas deste imunocomplexo (GPIIbIIIa) na sua membrana. Na GPIIIa (CD61) estão localizados os sistemas antigênicos plaquetários conhecidos como *HPA-1; 4;6;7;8;10;11*. Na GP IIb (CD41) estão localizados os sistemas *HPA-3* e *HPA-9*. Este complexo também está presente nas células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas, recetor para fibrinogénio, recetor para fator *Von Willebrand*, fibronectina, vitronectina e trombospondina.

Vários sistemas de antigénios plaquetários são agora reconhecidos. A nomenclatura adotada pela Sociedade Internacional de Transfusão de sangue (*ISBT*) classifica os sistemas numericamente de acordo com a data de publicação e em ordem alfabética para refletir a prevalência de sistemas na população recebendo em geral a letra "a" o alelo de alta frequência e a letra "b" o de baixa frequência. Para os sistemas que foram descritos apenas o antigénio de baixa frequência com a deteção do anticorpo correspondente, e a não deteção do seu correspondente de alta frequência, recebe a letra w e o

sistema que ainda não recebe a numeração correspondente até que se identifique o anticorpo que caracteriza o antígeno de alta frequência²⁷. Tal como acontece com os eritrócitos, as diferentes terminologias para antígenos plaquetários muitas vezes coexistem.

O primeiro antígeno reconhecido, Zw^a , é agora designado como antígeno de plaquetas humanas (*HPA*)-1a do sistema *HPA*-1.

O antígeno *HPA*-1a é muitas vezes conhecido como $P1^{A1}$. *HPA*-1a ($P1^{A1}$) está presente nas plaquetas de cerca de 98% dos caucasoides.

O antígeno antitético, *HPA*-1b ($P1^{A2}$), ocorre em 27% da linhagem branca.

A base molecular do aparecimento dos diferentes antígenos destes sistemas é a troca de um único nucleótido no ADN, causando a troca de um único aminoácido na glicoproteína envolvida, caracterizando o antígeno correspondente.

Por exemplo: para o *HPA*-1, se na posição 33 da glicoproteína se encontra leucina forma-se o antígeno *HPA*-1a, se por outro lado se encontra prolina, forma-se o antígeno *HPA*-1b. Para os restantes sistemas confrontar a figura 3 e a tabela 1.

Com a larga divulgação e disponibilidade das técnicas moleculares Reações em Cadeia da Polimerase (*PCR*) assistiu-se a um considerável aumento de estudos sobre genotipagem de antígenos plaquetários em diferentes populações. Os estudos que utilizam a *PCR*, possibilitaram aumento na disponibilidade de plaquetas genotipadas para elaboração de painéis de células para identificação de anticorpos plaquetários específicos, facto até então limitado devido à escassez de soros com adequada potência e sensibilidade para fenotipagem destas plaquetas.

Assim com o desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais como a imobilização de antígenos plaquetários por anticorpos monoclonais (*MAIPA*) para deteção de anticorpos plaquetários específicos, aliados aos novos conhecimentos obtidos com a genotipagem plaquetária, novas especificidades de anticorpos diferentes de *HLA* (apesar de ainda serem os anticorpos mais comuns envolvidos com aloimunização plaquetária) têm sido observadas (como por exemplo, anticorpos contra antígenos *HPA*), possibilitando melhor identificação do(s) anticorpo(s) envolvido(s) com a aloimunização e, portanto,

oferecendo uma melhor escolha terapêutica para os pacientes poli-transfundidos apresentando refratariedade plaquetária.

Porém uma grande variedade de frequência e especificidade destes anticorpos é encontrada. Alguns autores sugerem a própria diversidade de métodos utilizados na identificação destes anticorpos, bem como a variabilidade inerentes a diferenças genéticas populacionais, como responsáveis pelas variações observadas³⁰.

Tabela1: sistemas antigênicos plaquetários (HPA) e seus respectivos antígenos

Fonte: Wendel.Rita,2008

Sistema	Antígeno	Outros nomes	Glicoproteína	CD	Subst nn	Subst AA	Aloimunização
HPA-1	HPA-1a	Zw ^a , Pl ^{A1}	GPIIIa	CD61	T 196	Leu 33	x
	HPA-1b	Zw ^b , Pl ^{A2}			C 196	Pro 33	x
HPA-2	HPA-2a	Ko ^b	GPIIb α	CD42b	C 524	Thr 145	?
	HPA-2b	Ko ^a , Sib ^a			T 524	Met 145	x
HPA-3	HPA-3a	Bak ^a , Lek ^a	GPIIb	CD41	T 2622	Ile 843	x
	HPA-3b	Bak ^b			G 2622	Se 843	x
HPA-4	HPA-4a	Yuk ^b , Pen ^a	GPIIIa	CD61	G 526	Arg 143	x
	HPA-4b	Yuk ^a , Pen ^b			A 526	Gln 143	o
HPA-5	HPA-5a	Br ^b , Zav ^b	GPIa	CD49b	G 1648	Glu 505	x
	HPA-5b	Br ^a , Zav ^a , Hc ^a			A 1648	Lys 505	x
	HPA-6bw	Ca ^a , Tu ^a	GPIIIa	CD61	G 1564 A 1564	Arg 489 Gln 489	
	HPA-7bw	Mo ^a	GPIIIa	CD61	C 1317 G 1317	Pro 407 Ala 407	
	HPA-8bw	Sr ^a	GPIIIa	CD61	T 2004 C 2004	Arg 636 Cys 636	
	HPA-9bw	Max ^a	GPIIb	CD41	G 2603 A 2603	Val 837 Met 837	
	HPA10bw	La ^a	GPIIIa	CD61	G 281 A 281	Arg 62 Gln 62	
	HPA11bw	Gro ^a	GPIIIa	CD61	G 1996 A 1996	Arg 633 His 633	
	HPA12bw	Iy ^a	GPIIb β	CD42c	G 141 A 141	Gly 15 Glu 15	
	HPA13bw	Sit ^a	GPIa	CD49b	C 2531 T 2531	Thr 799 Met 799	
	HPA14bw	Oe ^a	GPIIIa	CD61			
HPA-15	HPA-15a	Gov ^b	CD109	CD109			x
	HPA-15b	Gov ^a					x
	HPA-16bw	Duv ^a	GPIIIa	CD61			

Dos antígenos *HPA*-6 ao 14 e 16, apenas o antígeno de baixa frequência foi descrito e por isto recebem a letra w. Na coluna de “outros nomes” encontram-se os nomes originalmente dados aos antígenos antes da nomenclatura da *ISBT*. Na coluna seguinte aos sinónimos, encontra-se a glicoproteína do sistema, seguida do respetivo CD (“*Cluster of Differentiation*”). Após, segue a posição e substituição do nucleotídeo (nn) no ADN codificador da glicoproteína, seguido da coluna explicativa sobre qual é o aminoácido (AA) que está presente na referida glicoproteína (GP). Na última coluna apresenta-se o envolvimento em aloimunização (x: presença; o: ausência; ?: sem certeza de seu envolvimento; em branco: ainda nenhum relato descrito) ³⁰.

Tabela 2: Frequência dos antígenos plaquetários (*HPA*) em diferentes populações

Fonte: Wendel.Rita,2008

Antígeno	Holanda ^{2b}	Finlândia ^{2b}	Americanos Caucasianos ^{2b}	Japoneses ^{2b}	Coreanos ^{2b}	Chineses ^{2b}	Brasileiros Castro ^{3b}	Caucasianos Torales-Pereira ^{3f}
HPA-1a	97,9	99	98	100	99,5	>99,9	99	96,1
HPA-1b	28,8	26,5	20	0,3	2	<0,15	14	28,8
HPA-2a	100	99	97	99,2	99		97	97,8
HPA-2b	13,5	16,5	15	19,7	14		27	20,5
HPA-3a	81	83,5	88	85,1	82,5	78,54	83	41,9
HPA-3b	69,8	66,5	54	66,2	71,5	71,85	47,7	52,8
HPA-4a	100		100	100	100	>99,99	100	100
HPA-4b	0		0	2	2	<0,17	0	0
HPA-5a	100	99,5	98	99	100	99,29	99	99,6
HPA-5b	19,7	10	21	7	4,5	17,73	15	16,6
HPA-6a		100		99,7	100			
HPA-6b		2,4		4,8	4			
HPA-15a								
HPA-15b								

Na tabela 2 encontram-se descritas algumas frequências populacionais. A frequência de alguns genótipos varia com a população estudada, geralmente devido a diferenças raciais³⁰.

1.3.3 Trombocitopenia fetal

As plaquetas são passíveis de visualização pela primeira vez na circulação embrionária, entre as 5 e 6 semanas de idade após-concepção. Os valores médios fetais normais (desvio padrão) são de $159(34) \times 10^9/L$ no primeiro trimestre, $245(65) \times 10^9/L$ no segundo e no terceiro trimestre, e $308(69) \times 10^9/L$ nos recém-nascidos de termo.

No momento do nascimento, apenas 1% a 2% das crianças de termo são trombocitopénicas, mas a incidência de trombocitopenia durante o período neonatal, em seguida, eleva-se de 3% a 5% e pode mesmo atingir 35% a 72% em prematuros em cuidados intensivos.³¹

1.3.4 Trombocitopenia neonatal aloimune

A trombocitopenia neonatal aloimune (TNAI) é uma síndrome que envolve a destruição imunológica das plaquetas fetais por anticorpos maternos, o qual é análoga à destruição de células vermelhas na doença hemolítica do feto e do recém-nascido.

Durante a gravidez, a mãe pode tornar-se sensibilizada a um antigénio plaquetário fetal específico incompatível herdado do pai.

A IgG específica para o antigénio das plaquetas é formado e atravessa a placenta, causando trombocitopenia fetal e neonatal. TNAI é a causa mais comum de trombocitopenia fetal ou neonatal grave e os fetos ou recém-nascidos afetados correm risco de complicações hemorrágicas do foro gastrointestinal, pulmonar e especialmente hemorragia intracraniana.

A hemorragia intracraniana é a hemorragia interna que ocorre mais frequentemente na TNAI e provoca grave morbidade perinatal e até mesmo a morte.

O antigénio plaquetário mais vulgarmente implicado na incompatibilidade da TNAI é o *HPA-1a*, mas um grande número de outros antigénios têm sido implicados na TNAI.

O desenvolvimento de anticorpos anti-*HPA-1a* está fortemente associada com a presença de *HLA* de classe tipo II *DRB3*0101*. A ausência de *DRB3*0101* na mulher *HPA-1a*-negativo praticamente impede o desenvolvimento de anticorpos. No entanto cerca de um terço das mulheres *HPA-1a*-negativas que são *DRB3*0101*-positivos desenvolvem anticorpos.

A incidência de trombocitopenia grave causada por anticorpos anti-*HPA-1a* é de aproximadamente 1 em 1100 gravidezes³¹.

O diagnóstico serológico para TNAI pode ser feito por meio de testes para detecção de anticorpos no soro materno de plaquetas utilizando ensaios que podem diferenciar a reatividade específica de plaquetas da reatividade de plaquetas não-específicas, e através da realização de genotipagem do antígeno plaquetário no ADN dos pais.

Tanto a evidência de um anticorpo específico de plaquetas no sangue materno como o antígeno correspondente nas tipagens parentais confirma o diagnóstico.

O tratamento de recém-nascidos com trombocitopenia aguda inclui a administração de imunoglobulina intravenosa (IGIV) com ou sem antígeno compatível e transfusões de plaquetas.

A maioria dos casos de trombocitopenia aloimune fetal é identificada após o nascimento de uma criança afetada. O grau de trombocitopenia fetal permanece supostamente semelhante ou aumenta em 80% das gestações posteriores quando o pai é homocigoto para o antígeno nocivo³¹.

Assim, uma vez confirmado o diagnóstico de TAIN numa família, os fetos subsequentes estão em risco. O tratamento pré-natal com IGIV com ou sem esteroides provou ser um meio eficaz de reduzir a trombocitopenia fetal e prevenir a hemorragia intracraniana².

O risco de hemorragia intracraniana perinatal como um resultado da trombocitopenia fetal *HPA-1a* induzida é de aproximadamente 11% sem morte fetal e 15%, incluindo morte fetal.

Vários estudos prospectivos em conjunto com programas de triagem de anticorpo *HPA-1a* documentaram uma incidência de trombocitopenia aloimune fetal grave de 0,04%, de morte intrauterina de 0,002% e de 0,006% de hemorragia intracraniana.

O risco de hemorragia intracraniana numa gravidez subsequente de mulheres aloimunizadas por *HPA-1a* depende da sua história obstétrica.

Na grande maioria dos casos de trombocitopenia aloimune fetal o risco de uma hemorragia intracraniana ocorrer numa gravidez subsequente com um feto *HPA-1a*-positivo, após o nascimento de um irmão trombocitopénico sem hemorragia intracraniana, aproxima-se de 7%³¹.

Em contraste, a taxa de recorrência de hemorragia intracraniana em filhos subsequentes de mulheres com história de trombocitopenia aloimune fetal/neonatal aproxima-se de 75%.

A maior parte dos casos de hemorragia intracraniana no útero ocorre no terceiro trimestre, no entanto já foi documentada a sua presença antes das 20 semanas. A hemorragia intracraniana no útero pode causar morte fetal ou, se o feto sobrevive, hidropsia fetal ou hidrocefalia.

Não se sabe porque é que um feto com trombocitopenia fetal/neonatal aloimune pode apresentar hemorragia intracraniana pré-natal enquanto outro feto com um grau comparável de trombocitopenia não apresenta o mesmo quadro. Além disso, os fetos e recém-nascidos com graus semelhantes de trombocitopenia causada por trombocitopenia isoimune não estão em risco de hemorragia intracraniana ou outra hemorragia interna com risco de vida.

O complexo IIb / IIIa GP na membrana plaquetária não só transporta os antígenos *HPA-1a* ou *HPA-1b*, mas também a maior parte dos auto-antígenos envolvidos com anticorpos da trombocitopenia isoimune. O complexo IIb / IIIa é também expresso no endotélio vascular. Embora não existam dados disponíveis, pode postular-se que a densidade de moléculas antigénicas de *HPA-1a* e os auto-antígenos em IIb / IIIa, podem ser diferentes³¹.

A investigação destes aloantígenos é importante na seleção de dadores de plaquetas em casos de refratariedade plaquetária e pode ser realizada por técnicas que utilizam anticorpos monoclonais, *MAIPA* (*Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens assay*), citometria de fluxo e biologia molecular (*PCR-RFLP* e *PCR-SSP*). Os dados da prevalência desses antígenos plaquetários humanos numa dada população são importantes para o diagnóstico de trombocitopenias imunes, o planeamento de programas de *screening* em mulheres com risco de trombocitopenia aloimune neonatal, consulta genética e terapia adequada para pacientes com anticorpos anti-*HPA*,

são aconselháveis além de apresentarem impacto prático na realização da transfusão de plaquetas, estes dados podem contribuir com um melhor conhecimento da distribuição destas patologias na população³⁰.

A avaliação pré-gestacional começa com um diagnóstico preciso da trombocitopenia aloimune fetal/neonatal na gravidez anterior. A aloimunização plaquetária deve fazer parte do diagnóstico em todos os casos de trombocitopenia neonatal (contagem de plaquetas $<150 \times 10^9/L$ em recém-nascidos pré termo e de termo).

Quatro grandes vertentes orientadoras de investigação diagnóstica relacionam-se com o facto de:

- O recém-nascido ser de termo ou pré termo.
- A sintomatologia hemorrágica/evidência de trombocitopenia, ter ocorrido antes ou após as 72 horas de vida.
- A trombocitopenia revestir-se de maior ou menor gravidade.
- O recém-nascido estar estável ou não, apresentar ou não outros sinais e sintomas para além dos que decorrem da trombocitopenia.

Os algoritmos a seguir referidos, procuram definir linhas orientadoras de diagnóstico, baseadas nestas quatro vertentes, com prioridade para a condição ou não da prematuridade³³.

Figura 4. Algoritmo diagnóstico para investigação do RN (recém nascido) pré-termo com trombocitopenia

PLT- plaquetas; NEC-enterocolite necrosante; TNAI- trombocitopenia neonatal aloimune

Fonte: Normas Orientadoras-Trombocitopenia Neonatal-UMJD-CHP

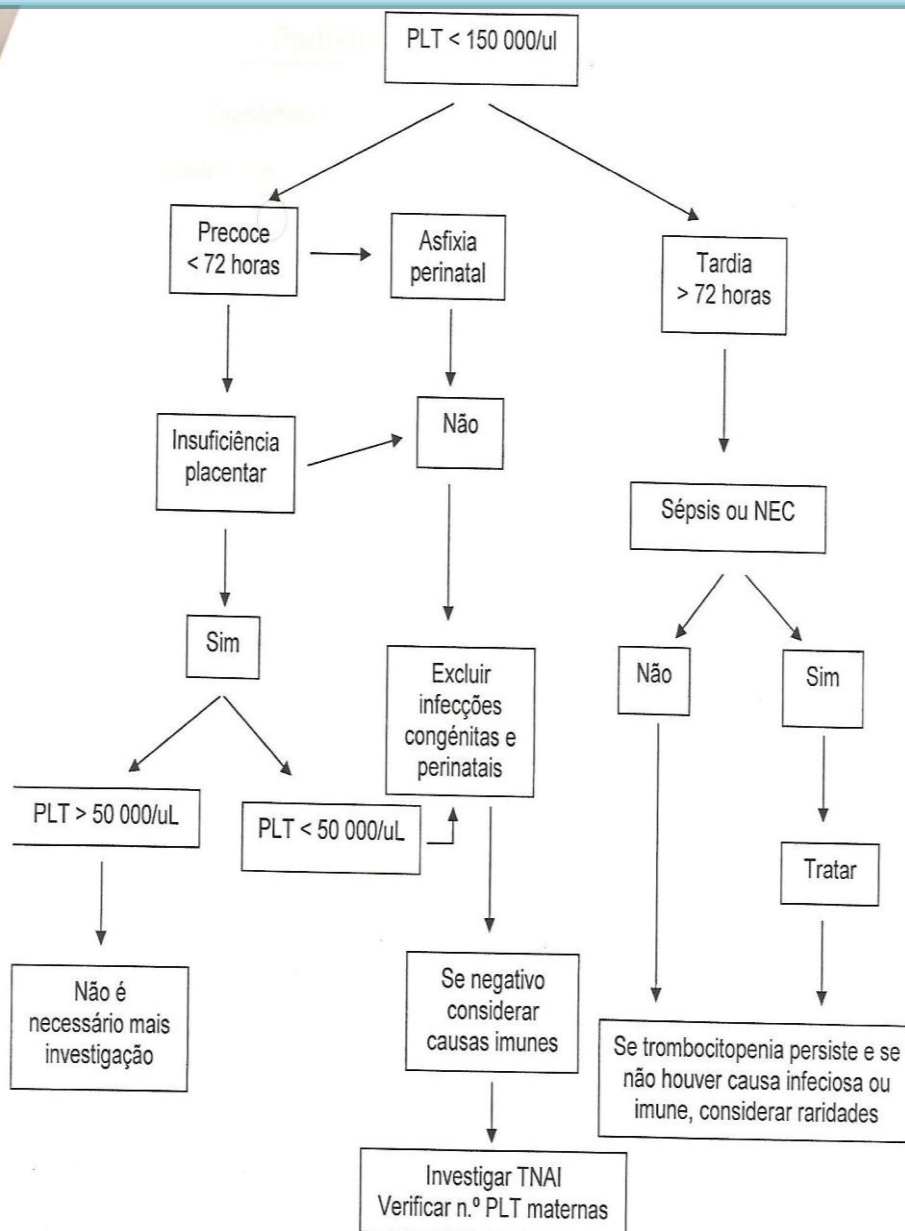
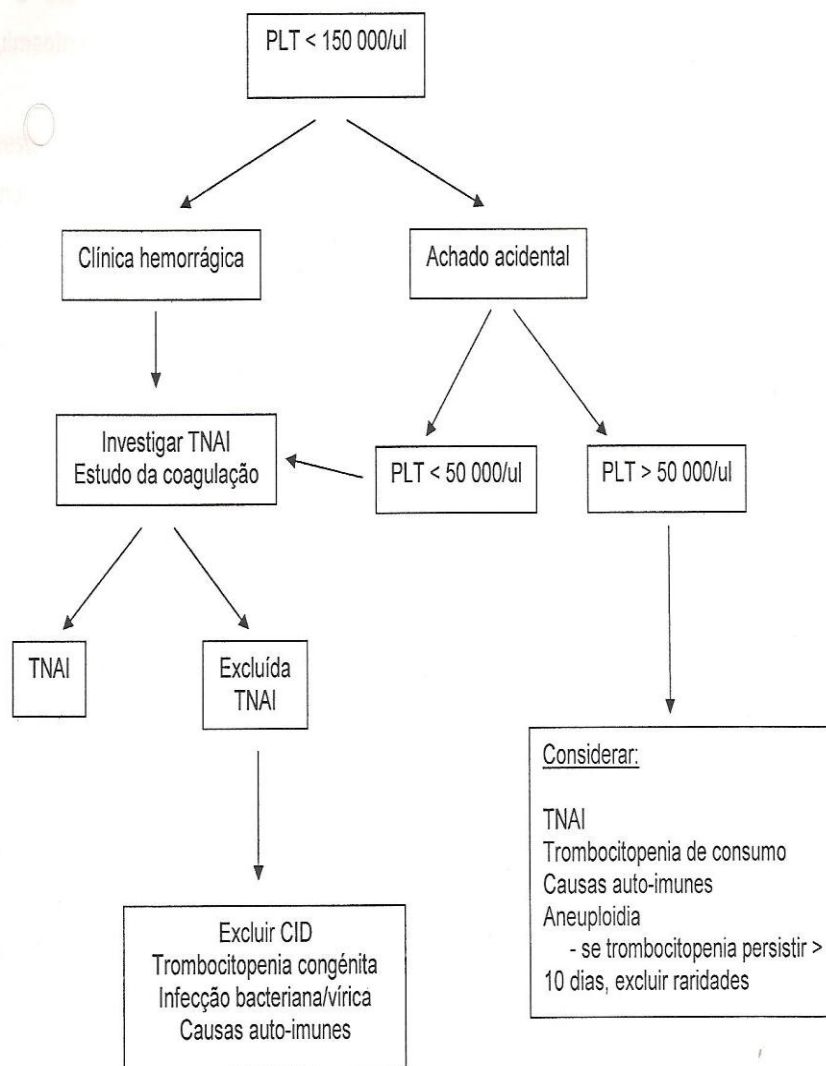


Figura 5. Algoritmo diagnóstico para investigação do RN termo com trombocitopenia

PLT-plaquetas; TNAI- trombocitopenia neonatal aloimune; CID- coagulação intravascular disseminada

Fonte: Normas Orientadoras-Trombocitopenia Neonatal-UMJD-CHP



No diagnóstico da imunização plaquetária deve considerar-se diversos pontos, entre eles a confirmação da presença de anticorpos anti-*HLA* no soro materno; reações cruzadas do soro materno com plaquetas paternas, ambos tratados e não tratados com cloroquina (para eliminar antigénios *HLA* que podem causar testes falsos-positivos); a fenotipagem ou genotipagem *HPA* da mãe e do pai e a exclusão da trombocitopenia materna.

Quando o diagnóstico de trombocitopenia fetal/neonatal é estabelecido, e o casal pondera uma nova gravidez, é recomendado o aconselhamento pré-gestacional num centro especializado. O aconselhamento deve incluir a documentação da gravidade da doença, a especificidade do anticorpo, e a hetero/homozigose do pai.

Em casos muito graves, inseminação artificial ou diagnóstico de pré-implantação usando uma única célula do blastómero podem ser considerados³¹.

Pré-natal

Várias estratégias podem ser usadas para o controlo e tratamento de gravidezes em risco de trombocitopenia aloimune fetal/neonatal, incluindo a amostra de sangue fetal (ASF), com uma transfusão de plaquetas, quando indicado, e o tratamento da mãe com imunoglobulina intravenosa e corticosteroides.

Numa revisão da literatura, foram detetadas 26 diferentes combinações de tratamento. Infelizmente, não há relatos de estudos controlados que comparem intervenção e ausência de intervenção, e todas as recomendações são baseadas em controlos históricos e pesquisas de história natural. Com estas limitações, o tratamento atual de eleição é uma infusão de imunoglobulina materna semanal numa dose de 1 g / kg de peso materno^{30,33,44}.

Vários estudos, publicados confirmam que a IGIV semanal aumenta a contagem de plaquetas fetais num grau variável. Significativamente não existiram casos de hemorragia intracraniana em neonatos tratados com IGIV, ainda que sem resposta a um aumento da contagem de plaquetas.

Torna-se pois necessário mais ensaios clínicos para determinar a dose ideal de IGIV.

Embora a amostra de sangue fetal seja a única ferramenta disponível para monitorizar diretamente a gravidade da trombocitopenia fetal, o seu uso por rotina não é recomendado. A ASF pode causar hemorragia fatal no local da punção do cordão umbilical em fetos com uma contagem baixa de plaquetas.

Sabe-se que um conjunto de precauções especiais pode diminuir o risco de complicações nesses pacientes. A literatura que relata uma taxa de perda fetal média com a recolha de sangue fetal em gestações com trombocitopenia aloimune fetal/neonatal de 1,6%. Além disso, há um risco de complicações relacionadas com o procedimento, como cesariana de emergência devido ao sangramento fetal e bradicardia em 2,4% dos casos³⁰.

As complicações relatadas podem ser relacionadas com o método, pois o risco não aumentou quando foi utilizada para a punção uma agulha com guia.

A transfusão de plaquetas é problemática porque a semi-vida de plaquetas transfundidas é somente de 4 a 5 dias. Assim, a recolha de sangue fetal e transfusões de plaquetas são necessárias com grande frequência durante a gravidez, e uma vez iniciada, deve ser considerado um risco cumulativo de complicações.

As plaquetas transfundidas podem desgranular e libertar serotonina, aumentando o risco de bradicardia. O risco cumulativo de perda fetal com a terapia transfusional é de aproximadamente 6% na gravidez³⁰.

Em situações em que as contagens de plaquetas fetais entre as 20 e as 28 semanas de gravidez sejam iguais ou inferiores a $50 \times 10^9/L$ e existam irmãos afetados com trombocitopenia, a probabilidade de trombocitopenia aloimune fetal/ neonatal é de 70%³⁰.

Daí a sugestão de que a IGIV deva ser iniciada como precaução, após os resultados dos genótipos fetais confirmarem um feto afetado.

Devem ser tomadas precauções de segurança adicionais para colheita de sangue fetal em gestações de risco para trombocitopenia grave. O procedimento deve ser realizado pelos membros mais experientes de uma unidade de medicina fetal: A amostra é colhida na veia umbilical e, portanto, deve-se evitar a perfuração da artéria; utilizar um contador de células

hematológicas, de forma a obter a contagem de plaquetas, no tempo de 2 minutos.

Se a contagem de plaquetas fetais for $<50 \times 10^9/L$, plaquetas compatíveis podem ser transfundidas antes de ser retirada a agulha.

Os protocolos de tratamento pré-natal da trombocitopenia aloimune fetal/neonatal devem basear-se nos seguintes princípios: em primeiro lugar, o objetivo principal é a prevenção da hemorragia intracraniana e não apenas da trombocitopenia fetal, e em segundo, o protocolo deve refletir a história obstétrica da mãe. Dado o facto de a grande maioria dos pacientes ter um irmão com um história de trombocitopenia mais ou menos grave, mas sem hemorragia intracraniana, e que o risco dessa hemorragia ocorrer aproxima-se da taxa de complicações relacionadas com o procedimento invasivo da terapia, é melhor evitar a colheita do sangue fetal.

Considerando que a maioria das hemorragias intracranianas *in útero* ocorre na fase mais tardia da gravidez, a administração IGIV nas gestações sem história hemorragia intracraniana pode ser adiada para as 28 a 32 semanas de gestação, atendendo ao elevado custo do tratamento^{1,30}.

Em fetos cujos irmãos tiveram uma hemorragia intracraniana, a IGIV deve ser iniciada entre as 12 e 18 semanas, e a recolha de sangue fetal entre as 24 e 28 semanas para avaliar a resposta. Quando o risco de complicação antecipada da colheita de sangue fetal é mais elevada (por exemplo, os operadores menos experientes), a administração da IGIV pode ser continuada sem amostragem periódica da amostra de sangue fetal³⁰.

Nos últimos anos, têm sido tratadas sete gestações em cada cinco mulheres com um filho mais velho com hemorragia intracraniana, de acordo com este protocolo menos invasivo³¹.

Na trombocitopenia imune, cada recém-nascido recebe 1g IGIV / Kg, 1-2 doses. O controlo deve ser efetuado às 72 horas (se só tiver feito uma dose) e se o valor de plaquetas $> 20 \times 10^9/L$ deve repetir a mesma dose. Na TNAI a dose recomendada é de 400mg/Kg/dia 3 a 4 dias ou 1g/Kg/dia durante 1 a 3 dias⁶.

As trombocitopenias de natureza imune ocupam, dentro do âmbito de diagnósticos diferenciais, um lugar especial e de grande importância na medida em que são diagnosticadas através de metodologias muito particulares, realizadas em laboratórios de referência, que dependem de recursos

importantes tanto humanos como financeiros. Implicam abordagens terapêuticas distintas e específicas, que podem ser decisivas na evolução da situação clínica, tanto em termos de morbidade como de mortalidade. O seu diagnóstico pode ter implicações importantes relativamente ao seguimento de gravidezes posteriores.

É neste contexto que se torna importante uma boa articulação entre a neonatologia e os laboratórios implicados no diagnóstico de trombocitopenias imunes.

Compete ao Serviço de Neonatologia referenciar, de forma oportuna e pertinente, o recém-nascido ao serviço responsável pelo esclarecimento da natureza imune da trombocitopenia, dando-lhe conhecimento, sucinto e objetivo, da situação da investigação face aos algoritmos que a orientam. Para isso é fundamental uma definição clara sobre os contactos a efetuar assim como das colheitas necessárias.

Compete ao serviço de Imunohemoterapia dar uma resposta abrangente que integre a informação oriunda dos laboratórios tais como citometria de fluxo e de genética molecular.

Uma articulação otimizada entre os dois serviços permitiria, para além do mais, uma melhor perceção da importância e das limitações do contributo da Imunohemoterapia no diagnóstico e caracterização das trombocitopenias neonatais. Esta articulação permitiria uma confrontação dos resultados analíticos com a evolução clínica assim como com a resposta às diferentes terapêuticas (recuperação pós-transfusão de plaquetas e/ou administração de IVIG)³³.

2.OBJETIVO

2. Objetivo

Considerando a escassez de dados sobre a ocorrência de refratariedade plaquetária e das suas causas nos serviços de Imunohemoterapia, proponho a realização deste estudo para ampliar o conhecimento deste problema e assim contribuir com informações relevantes no sentido de implementação de medidas apropriadas para a melhoria do tratamento dos recém-nascidos e racionalização no uso de concentrados de plaquetas.

Pretende-se ainda Identificar a ocorrência e as causas de refratariedade à transfusão de plaquetas em recém-nascidos submetidos a esta terapêutica na unidade de cuidados intensivos de Neonatologia da Maternidade de Júlio Dinis do Centro Hospitalar do Porto.

2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a resposta à transfusão de plaquetas;
2. Determinar as causas de refratariedade;
3. Avaliar a frequência de aloimunização plaquetária e dos aloanticorpos *HLA* Classe I envolvidos;
4. Avaliar a associação entre aloimunização plaquetária e desenvolvimento de refratariedade à transfusão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

Nota: Era objetivo inicial, fazer a avaliação a todos os recém-nascidos que efetuassem transfusão de plaquetas e que tivessem ICC diminuído, a pesquisa de anticorpos do sistema *HPA* e *HLA* envolvidos quer no recém-nascido quer nos pais. Verificou-se ser impossível, pelo que o estudo teve que ser retrospectivo e basear-se apenas nos dados, que felizmente, existem de forma quase completa nos processos clínicos dos pacientes.

3.1 Caracterização da amostra

Participaram no estudo 50 dos 61 recém-nascidos que realizaram transfusões de concentrados de plaquetas entre os anos de 2009 e 2012, referente a 169 episódios transfusionais, os restantes 11 foram excluídos por não possuírem registos completos.

Verificou-se que a todos os recém-nascidos foram efetuadas colheitas de 1ml de sangue periférico em tubo contendo anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) antes da transfusão e após 24h da transfusão de plaquetas. Estas amostras foram utilizadas para contagem de plaquetas pré e pós transfusionais. A contagem de plaquetas foi efetuada no equipamento hematológico *Sysmex XE 2100TM*. A todas as contagens fora da faixa de sensibilidade do equipamento (<50.000/ μ L), foi realizada a confirmação microscópica das plaquetas (lente ampliação 100 X) em esfregaço sanguíneo com coloração de *Wright*.

Com estes dados foi realizado o cálculo do ICC e RPP utilizaram-se as seguintes fórmulas:

$$\text{ICC} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pós-transfusão} - \text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pré-transfusão}) \times 10^{11} \times \text{SC} (\text{m}^2)}{\text{N}^\circ \text{ Plaquetas} \times 10^{11}}$$

$$\text{RPP (\%)} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pós-transfusão} - \text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pré-transfusão}) \times 10^{11} \times \text{VS (mL)}}{\text{N}^\circ \text{ Plaquetas} \times 10^{11}}$$

Sendo que SC é a superfície corporal (altura em cm é multiplicada pelo peso (Kg) e por 0,00718 e VS é o volume sanguíneo (o volume sanguíneo estimado num recém-nascido é de 75mL/Kg).

SC= [(4xKg)+9]/100 é usada em recém-nascidos com peso < 10 Kg.

De forma geral, a refratariedade é definida de acordo com os valores do incremento corrigido com 10-60 minutos e com 18-24 horas após a transfusão e devem ser iguais ou inferiores a 5.000 e 2500 plaqueta/ μL , respetivamente. Os valores que indicam refratariedade apresentam percentagem de RPP menor que 20% até uma hora ou menor que 10% com 16 horas. Enquanto a contagem de plaquetas uma hora após a transfusão avalia, principalmente, a resposta imediata à transfusão, a contagem com 24 horas monitoriza a sobrevivência das plaquetas.²

A definição do limiar de refratariedade à transfusão de plaquetas com base no ICC e no RPP é muito útil, desde que os resultados sejam bem interpretados. No contexto clínico, é considerado importante o aumento maior ou igual a 20% no ICC (5×10^9 plaquetas/L com uma hora e $2,4 \times 10^9$ plaquetas/L com 24 horas) e no intervalo até próxima transfusão ($\geq 8,4$ horas).²

Se ICC (com colheita após uma hora da transfusão) inferior a 5000/ μL no mínimo após dois eventos transfusionais, considera-se que a transfusão foi ineficaz e que o paciente apresenta refratariedade plaquetária de causa imune se estivermos na presença de aloanticorpos plaquetários. Este diagnóstico é considerado de importância clínica e causador de ineficácia de transfusão de plaquetas.

Se ICC (com colheita após uma hora de transfusão) superior ou igual a 5.000/ μL considerou-se a transfusão eficaz e paciente sem refratariedade plaquetária de causa imune, independente da presença ou não de anticorpos.

No nosso estudo apenas é realizado o ICC e o RPP nas 24 horas pós-transfusão.

Aplicação das Formulas

Usamos a aplicação Microsoft Editor de Equações 3.0, que já vem incorporado na aplicação Microsoft Word, para apresentar as fórmulas matemáticas, melhorando desta forma a apresentação das mesmas.

Usando os dados recolhidos, iniciamos o processo de aplicação das fórmulas indicadas. ICC – Incremento Corrigido da Contagem e RPP – Recuperação Plaquetária Pós-transfusão.

Para a aplicação das fórmulas ICC e RPP é necessário proceder primeiro ao cálculo de dois valores necessários nessas fórmulas.

SC – Superfície Corporal

VS – Volume Sanguíneo

Foi necessário proceder a algumas conversões de dados, para ser possível a aplicação das fórmulas pretendidas.

Dados/Valores Originais	Fórmula de Conversão	Dados/Valores Finais
Peso ao nascer (g)	$\frac{Valor_Original}{1000}$	Peso (kg)
Hemograma pré-transfusão Plaq. ($\times 10^3$)	$Valor_Original \div 10^3$	Nº Plaquetas Pré-Transfusão
Hemograma pós-transfusão Plaq. ($\times 10^3$)	$Valor_Original \div 10^3$	Nº Plaquetas Pós-Transfusão

Como a avaliação foi efetuada retrospectivamente não foi possível calcular o número de plaquetas existente em cada pool de plaquetas transfundido, utilizamos como o valor da média ($2,95 \times 10^{11}$) do número de plaquetas dos produtos sujeitos a controlo de qualidade e que tem como referência o número de plaquetas $\geq 2 \times 10^{11}$ /por unidade¹¹.

SC

A superfície corporal (SC) é obtida multiplicando a altura em centímetros pelo peso em quilogramas e por 0,00718, isto é:

$$SC = altura_{(cm)} \times peso_{(kg)} \times 0,00718$$

No entanto, para recém-nascidos com peso inferior a 10kg, a fórmula matemática usada é:

$$SC = \frac{(4 \times \text{peso}_{(kg)}) + 9}{100}$$

Como nos dados recolhidos, o recém-nascido com o peso mais elevado é de 3800g, faz com que a fórmula do SC utilizada para todos os casos, seja a última apresentada. O valor calculado de SC encontra-se em m².

VS

O Volume Sanguíneo (VS) estimado de um recém-nascido é de 75 mL/Kg, isto é:

$$VS = 75 \text{ mL} \times \text{Peso}_{(kg)}$$

O valor calculado de VS encontra-se em mL.

ICC

Fórmula matemática:

$$ICC = \frac{(\text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pós-transfusão} - \text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pré-transfusão}) \times 10^{11} \times SC \text{ (m}^2\text{)}}{\text{N}^\circ \text{ Plaquetas} \times 10^{11}}$$

RPP

Fórmula matemática:

$$RPP (\%) = \frac{(\text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pós-transfusão} - \text{N}^\circ \text{ Plaquetas Pré-transfusão}) \times 10^{11} \times VS \text{ (mL)}}{\text{N}^\circ \text{ Plaquetas} \times 10^{11}}$$

Exclusão Inicial de Casos

Foram identificados dois motivos para a exclusão inicial de dados:

- Faltar a variável “Peso ao nascer (g)”, o que impede o cálculo das variáveis SC e VS, e conseqüentemente das variáveis ICC e RPP, fundamentais para este trabalho.
- Faltarem dados do Hemograma pré e pós transfusão, fundamentais para o cálculo das variáveis ICC e RPP.

Casos excluídos em Excel

Falta da variável “Peso ao nascer (g)” = 27 casos

Falta de dados de Hemograma pré e pós transfusão = 1

Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa SPSS versão 19.0.0. Todas as variáveis foram submetidas ao teste T para avaliar se os valores apresentavam distribuição normal, e ao teste de Levene para testar a homogeneidade das variâncias.

Como se tratam de variáveis numéricas utilizaram-se os testes de Krushal-Wallis e o teste de Wilcox para verificação da hipótese da igualdade de distribuição das variâncias.

Utilizou-se o teste do Qui-Quadrado com nível de significância 0,05.

O nível de significância para a rejeição da hipótese nula (H0) foi de 5% ($p < 0,05$).

4.RESULTADOS

4.Resultados

ANÁLISE DESCRITIVA

As estatísticas descritivas escolhidas são:

Média: valor médio das respostas

Desvio de Padrão: variação do valor médio, positiva e negativamente

Frequências: contagem de respostas e respetiva percentagem

EPISÓDIO TRANSFUSIONAL

Foram estudados 50 recém-nascidos sujeitos a 169 episódios relativos a transfusão de plaquetas.

Verificamos a existência de mais do que um episódio transfusional por recém-nascido, sendo que no máximo existe um recém-nascido com 17 episódios transfusionais.

SEXO

A maior percentagem (86%) de episódios transfusionais pertence a recém-nascidos do sexo feminino



Gráfico nº1- Episódios transfusionais por sexo

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico mais frequente (88% dos casos) é de Sepsis Neonatal.

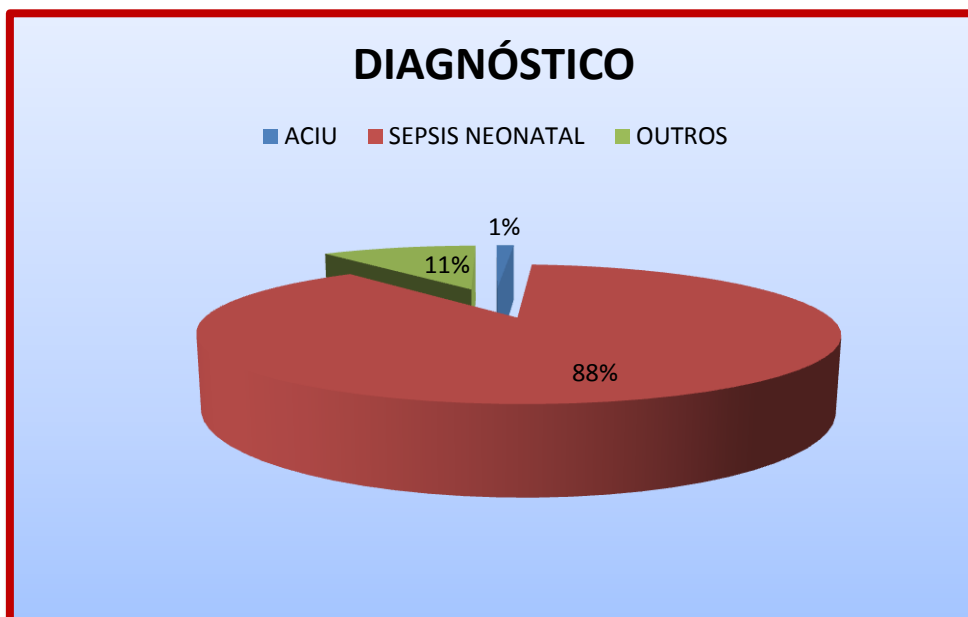


Gráfico n°2 – Diagnósticos dos recém-nascidos

PESO

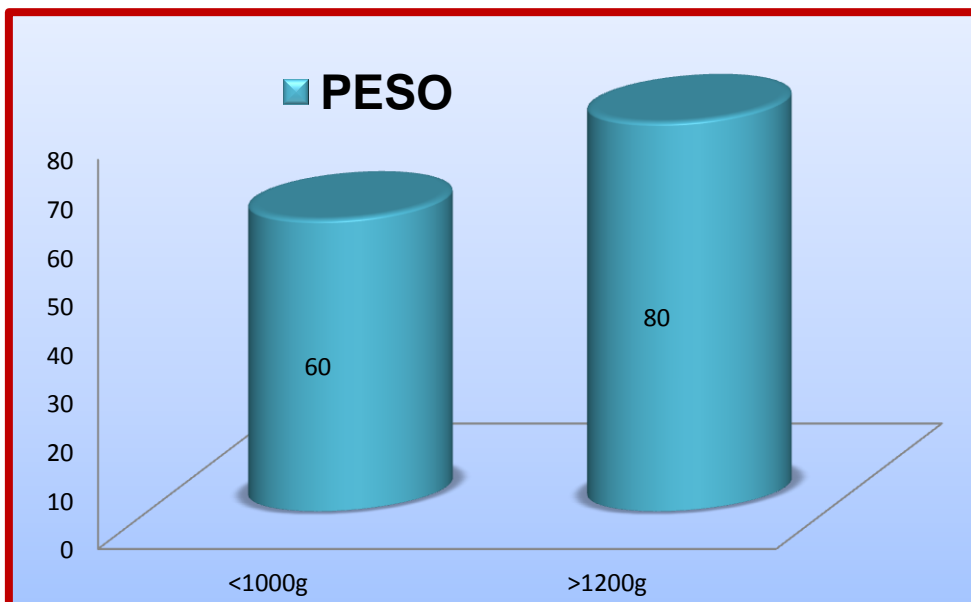


Gráfico n°3 – Peso médio dos recém-nascidos

O peso destes indivíduos (n=50) variava de 370 a 3800g. Sendo o valor médio de 1162,44g.

IRRADIAÇÃO

Em relação aos pool de plaquetas transfundidos verificamos que 148 (87,6%) dos concentrados de pool plaquetas transfundidos foram irradiados, e 20 (11,8%) não foram irradiados.

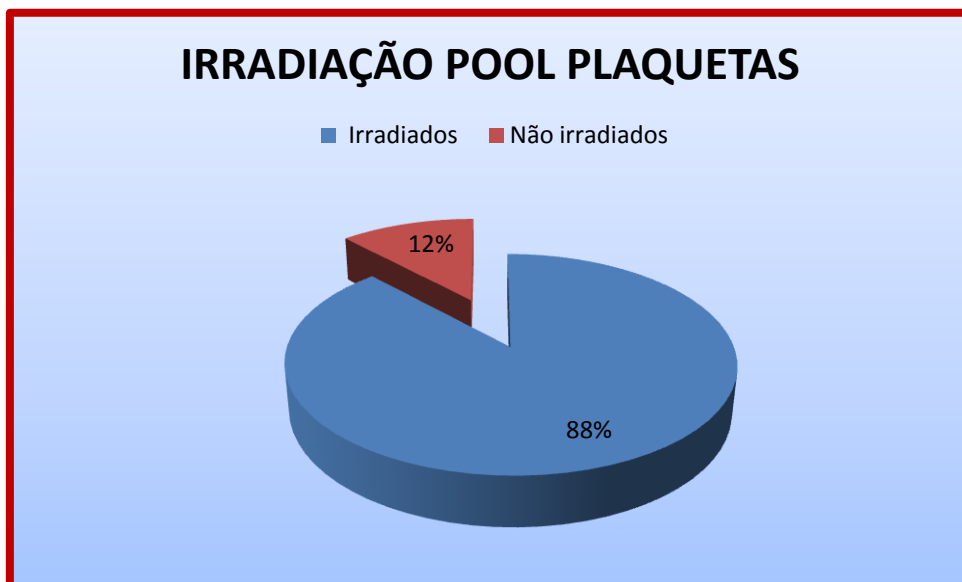


Gráfico nº4 – Irradiação de Produtos Plaquetários

VOLUME DE POOL DE PLAQUETAS TRANSFUNDIDO

Relativamente ao volume destes concentrados de pool de plaquetas, verificou-se que em 80% (n=35) dos recém-nascidos o volume transfundido foi inferior a 21ml.

HEMOGRAMA PRÉ-TRANSFUSÃO-Hemoglobina (Hb)

Em todos os recém-nascidos estudados a quem foi efetuado um hemograma pré-transfusional verificou-se que os valores variavam entre 7,6 e 25g/dL, com um valor médio de 13,7g/dL. Podendo afirmar-se que mais de metade dos recém-nascidos a quem foi efetuado um hemograma pré-transfusional apresentam valores > 13,7 g/dL.

Para melhor visualização destes dados, apresentamos o histograma com a curva da normalidade.

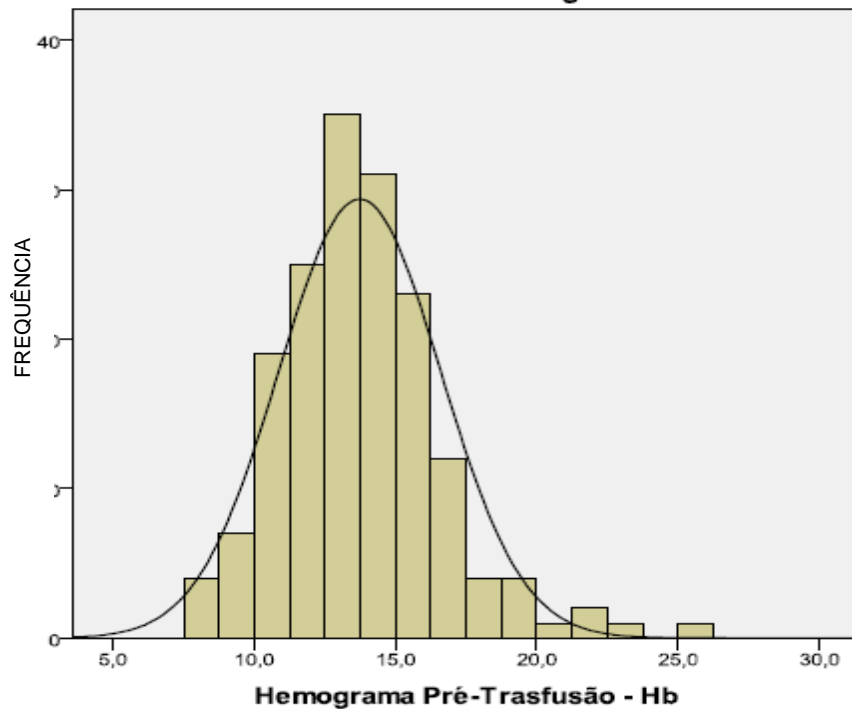
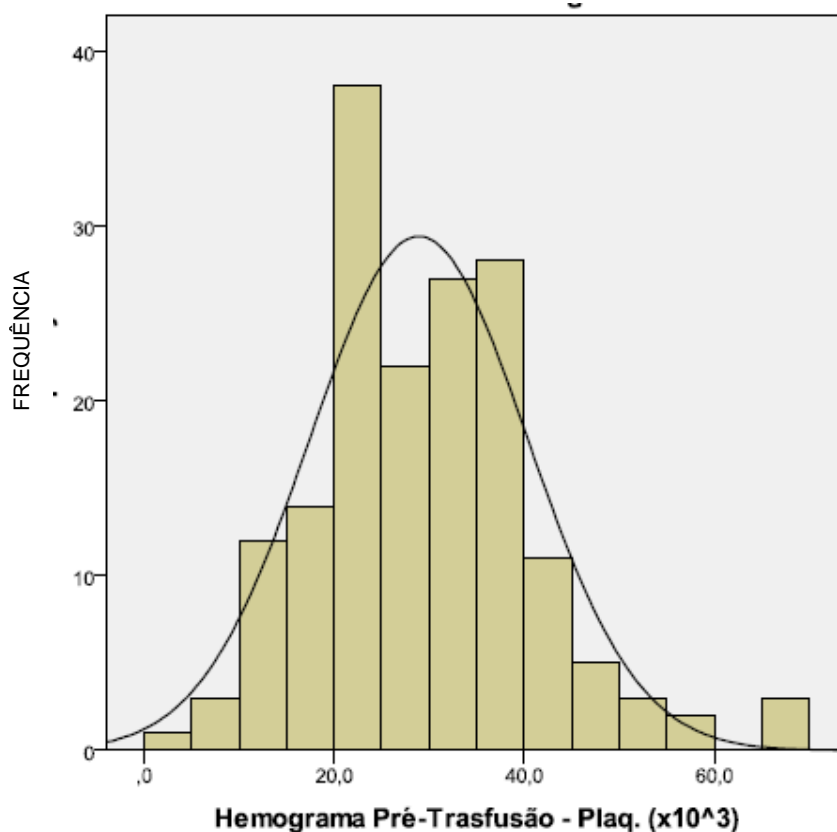


Gráfico nº5 – Histograma do valor da hemoglobina pré-transfusão

HEMOGRAMA PRÉ-TRANSFUSÃO- PLAQUETAS ($\times 10^3/\text{ul}$)

Ainda na avaliação pré-transfusional verifica-se que os resultados do número de plaquetas variam de 3 a $69 \times 10^3/\text{ul}$. Saliendo-se o facto de que metade destes indivíduos apresenta um número de plaquetas $< 27 \times 10^3/\text{ul}$.



HEMOGRAMA PÓS-TRANSFUSÃO – HEMOGLOBINA (Hb)

Vinte e quatro horas após a transfusão de plaquetas e de acordo com o protocolo instituído, foi efetuada nova determinação analítica.

Os valores da hemoglobina variavam entre 6,9 e 23,5 g/dL com um valor médio de 13,4g/dL. Podendo afirmar-se que mais de metade, apresentam agora 13,3g/dL, denotando um leve diminuição dos valores de hemoglobina.

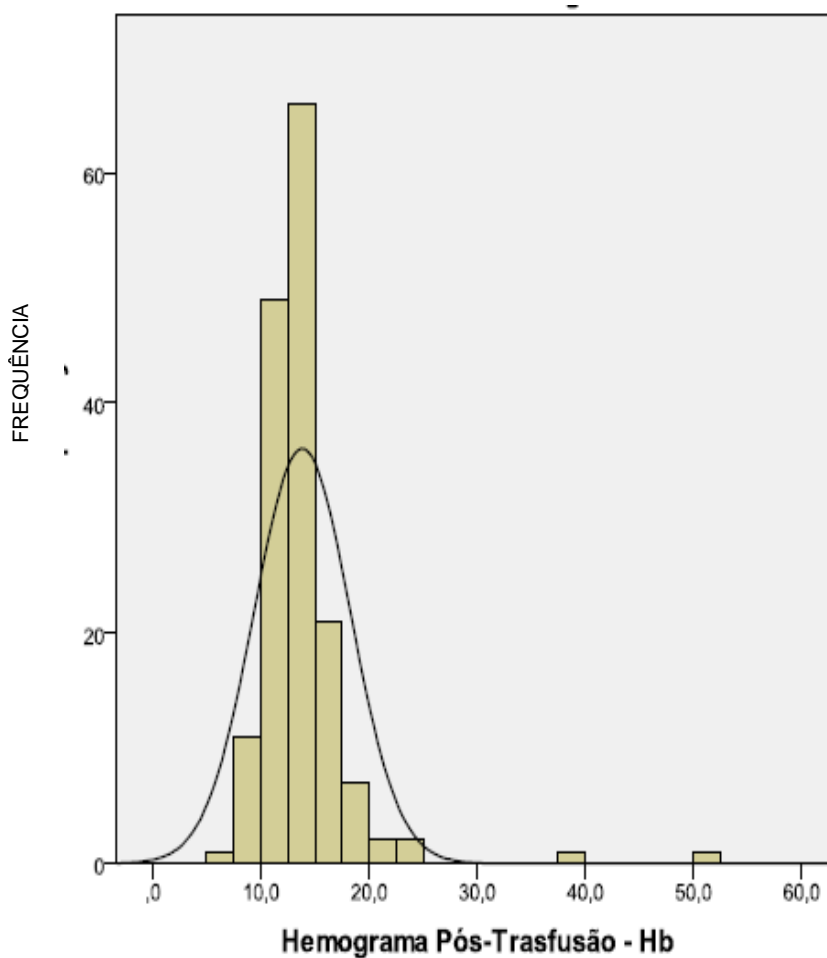


Gráfico nº7 – Histograma do valor da hemoglobina pós-transfusão

HEMOGRAMA PÓS-TRANSFUSÃO - PLAQUETAS ($\times 10^3/uL$)

Os resultados dos valores do número de plaquetas variam agora, entre 10 e $225 \times 10^3/uL$, verificando-se que metade dos recém-nascidos apresenta um número de plaquetas inferior a $49 \times 10^3/uL$. Salienta-se que em 80% dos indivíduos o número de plaquetas é $< 87 \times 10^3/uL$.

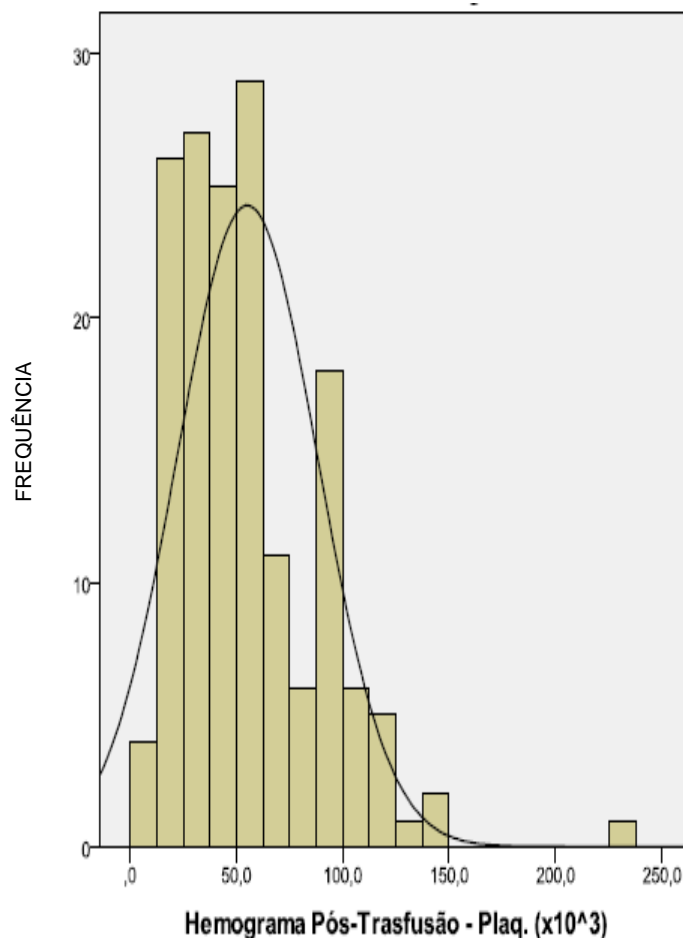


Gráfico nº8 – Histograma do valor do número das plaquetas pós-transfusão

SUPERFÍCIE CORPORAL (SC)

Em relação à avaliação da superfície corporal verifica-se que os recém-nascidos apresentam valores entre 0,105 e 0,242m².

VOLUME SANGUÍNEO (VS):

Quanto ao volume sanguíneo, os recém-nascidos estudados apresentam um volume mínimo de 27,75 e máximo de 285,0ml.

INCREMENTO CORRIGIDO DA CONTAGEM (ICC):

No cálculo do ICC verifica-se que em cerca de 31,1% dos recém-nascidos que efetuaram transfusão de concentrado de pool de plaquetas, não se verificou nenhum incremento no valor do número de plaquetas após a transfusão.

RECUPERAÇÃO PLAQUETÁRIA PÓS-TRANSFUSÃO (RPP)

Após a transfusão de concentrado de pool de plaquetas verifica-se que em 14,9% (n=198) dos episódios transfusionais dos recém-nascidos não se verificou qualquer taxa de recuperação plaquetária. Nos restantes 86,1% (n=152) verifica-se uma recuperação plaquetária que varia entre 0,020 e 8,642%.

VALORES DO NÚMERO DE PLAQUETAS PRÉ TRANSFUSÃO $<10 \times 10^3/\text{ul}$

Analisando os resultados verificamos que nos recém-nascidos com valores do número de plaquetas pré-transfusão inferiores a $10 \times 10^3/\text{ul}$ encontramos 4 pacientes cada um com 1 episódio transfusional e nenhum se verificou refratário à transfusão de plaquetas.

VALORES DO NÚMERO DE PLAQUETAS ENTRE 10 E $50 \times 10^3/\text{ul}$

Nos recém-nascidos que apresentam valores do número de plaquetas entre $10 \times 10^3/\text{ul}$ e $50 \times 10^3/\text{ul}$ encontramos 45 pacientes com 150 episódios transfusionais, 37,7% (n= 17) e que foram refratários à transfusão de plaquetas.

VALORES DO NÚMERO DE PLAQUETAS ENTRE $> 50 \times 10^3 / \mu l$

Nos recém-nascidos com valores de plaquetas superiores a $50 \times 10^3 / \mu l$ com 11 episódios transfusionais, verificou-se um caso de refratariedade, para um nível de significância ($p > 0,001$).

Refere-se ainda que os recém-nascidos que apresentaram refratariedade plaquetária pós-transfusional apresentavam diagnóstico clínico de sépsis bacteriana neonatal e prematuridade extrema.

Num dos casos refratários foi efetuada a pesquisa de anticorpos antiplaquetários *HPA* quer ao recém-nascido quer à mãe verificando-se que ambos eram negativos.

Um dos recém-nascidos evoluiu para óbito por diagnóstico de prematuridade extrema.

ASSOCIAÇÃO DE VARIÁVEIS

PESO / RPP

Em 33,9% casos ($n=$) verificou-se quanto maior for o peso da criança maior serão os valores de recuperação plaquetária (RPP); ($p=0.05$)

PESO / ICC

Para 16,1% dos casos quanto maior o peso do recém-nascido, maior serão os valores de Incremento Corrigido da Contagem Plaquetária (ICC).

PRODUTOS IRRADIADOS

Em 22,7% dos casos em que foram transfundidos produtos plaquetários irradiados, verificou-se um baixo valor de ICC.

Em 23,6% dos casos em que foram transfundidos produtos plaquetários irradiados, também apresentam uma baixa taxa de RPP.

HEMOGLOBINA

Quando analisamos a variável hemoglobina pré-transfusão verificamos que em 24,6% dos casos quanto maior foi este valor, maior o valor de ICC. Constatou-se ainda que, em 24,4% dos casos quanto maior é a hemoglobina maior é o valor de RPP.

Em relação à hemoglobina pós-transfusão verificamos que em 18,2% dos casos quanto maior foi o seu valor maior foi o ICC. Em 17,6% dos casos maior foi a taxa de RPP.

PLAQUETAS

Analisando a variável Plaquetas pré-transfusão verifica-se que em 16,1% dos casos quanto maior o seu valor maior foi o valor da taxa de ICC. Em 11% dos casos, verificou-se aumento da taxa de RPP.

Analisando a variável plaquetas pós-transfusão em 88,7% dos casos, quanto maior o seu número maior o valor de ICC. E em 85% dos casos verificou-se um aumento do RPP.

Em 94% dos casos verificamos que quanto maior for o valor do ICC maior o valor de RPP.

5.DISSCUSSÃO

5. Discussão

A refratariedade plaquetária é um grave problema para os recém-nascidos especialmente prematuros internados ou em tratamento nas unidades de cuidados intensivos. A sepsis neonatal acarreta trombocitopenia grave e persistente em decorrência da falta de produção e consumo aumentado. Como resultado estes pacientes recebem repetidas transfusões de plaquetas e sujeitam-se à exposição a vários dadores. A necessidade de mais transfusões é agravada quando há refratariedade plaquetária e que pode implicar um maior número de complicações ainda mais se o paciente desenvolver refratariedade aloimune.

Avaliou-se no presente estudo a ocorrência de refratariedade plaquetária e a possível presença de aloanticorpos em recém-nascidos trombocitopênicos, por ser um grupo de doentes que requer repetidas transfusões de plaquetas.

5.1 A Refratariedade Plaquetária e a qualidade do Concentrado de Plaquetas

A restituição da contagem de plaquetas depende de vários fatores entre eles a qualidade do concentrado de plaquetas transfundido, pois durante a produção e o acondicionamento pode existir lesão das plaquetas com perda da viabilidade e funcionalidade (atividade hemostática).

Os produtos plaquetários devem ser conservados à temperatura ambiente (+20°C a +24°C) em agitação constante pelo tempo máximo de cinco dias e apresentarem pH mínimo de 6,4¹¹.

A desleucocitação e o menor tempo de armazenamento diminuem a frequência de reações transfusionais e melhora a eficácia da transfusão de plaquetas³⁴. No presente estudo, todos os concentrados de plaquetas foram armazenados em condições adequadas, conforme os critérios de qualidade do Ministério da Saúde para a Autoridade para os Serviços de Sangue e da Transplantação (ASST)³⁵. Quanto ao número de plaquetas em cada

concentrado, este fator não influenciou as comparações uma vez que a avaliação foi baseada no incremento corrigido.

Os filtros de leucócitos agem fundamentalmente na prevenção da aloimunização. Este efeito não é garantido pela irradiação uma vez que não há alteração na conformação antigénica ou perda da função celular pela irradiação. Desta forma a irradiação não exclui a necessidade de uso de filtros de desleucocitação quando se deseja prevenir a aloimunização^{35,43}.

No presente estudo e apesar de 87,6% dos produtos transfundidos serem irradiados ainda obtivemos resultados de 22,7 e 23,6 % de baixo ICC e RPP respetivamente.

5.2 A Refratariedade Plaquetária e o Doente

Os fatores inerentes ao doente representam os principais determinantes da falta de resposta à transfusão de plaquetas independente de fatores relacionados à qualidade dos concentrados³⁶.

Neste caso, o recém-nascido deve ser avaliado quanto às suas características clínicas, como febre, infeção, hemorragia, esplenomegalia, interferência de medicações e a condição imune: imunossupressão ou aloimunização a antigénios plaquetários. Todos estes fatores podem dificultar o tratamento com os concentrados de plaquetas em recém-nascidos trombocitopénicos por influenciarem negativamente a resposta à transfusão de plaquetas.

5.3 O Doente e a sua Condição Clínica

Todos os recém-nascidos que apresentaram refratariedade plaquetária apresentavam diagnóstico de sepsis bacteriana e prematuridade (88%), condição favorável à trombocitopenia dados que parecem estar de acordo com a literatura que apontam valores de taxas entre os 50 e 91%^{1,11,44,45}. A redução do número de plaquetas nas primeiras horas de vida deve-se frequentemente a

fatores maternos ou eventos perinatais³⁷. Os recém-nascidos prematuros têm uma taxa de sepsis aumentada. A incidência de sepsis é significativamente mais alta nos neonatos com peso à nascença inferior a 1000g (26 por 1000 nascimentos) do que nos com pesos à nascença entre 1000-2000g (8-9 por 1000 nascimentos)³⁸.

As barreiras físicas e químicas que protegem o corpo humano de uma infecção estão presentes no recém-nascido, mas são funcionalmente deficientes. A pele e as membranas mucosas quebram facilmente a sua integridade nos recém-nascidos prematuros. Quando estes estão doentes correm riscos adicionais devido aos procedimentos invasivos, a que estão sujeitos e que violam as suas barreiras físicas.

Devido à interdependência da resposta imune, estas deficiências individuais dos vários componentes da atividade imune no neonato, conspiram para criar uma situação perigosa para os recém-nascidos expostos a ameaças infecciosas³⁸.

5.4 O Tratamento da Refratariedade Plaquetária

Para o tratamento nos doentes aloimunizados, várias estratégias podem ser utilizadas, o mais lógico seria a seleção de dadores compatíveis. É necessário avaliar a importância da identificação de aloanticorpos na resposta à transfusão de plaquetas. Os dadores de plaquetas não são genotipados para *HLA* e *HPA* por rotina devido à baixa prevalência de aloanticorpos anti-*HLA* e anti-*HPA* e pela dificuldade em se encontrar concentrados de plaquetas *HLA* e *HPA* compatíveis.

Seria necessário um banco de aproximadamente 3000 dadores para que se possa encontrar um dador adequado. As hipóteses de seleção de um dador podem aumentar ao selecionar indivíduos que apresentem antígenos *HLA* de determinados grupos antigénicos como *HLA B12* que é encontrado em aproximadamente 25% da população, considerando que até 70% dessas incompatibilidades viáveis apresentam ICC satisfatório.

Uma ferramenta útil para a avaliação da compatibilidade *HLA* é o *HLAMatchmaker*, um *software* algorítmico (<http://tpis.upmc.edu/tpis/HLAMatchmaker/>)

desenvolvido que identifica epítomos imunogénicos que se expressam em regiões da molécula *HLA* acessíveis aos aloanticorpos³⁹.

Pode também usar-se o teste de *crossmatching*, uma vez que um teste positivo representa a hipótese de ICC insatisfatório em 70 a 100% dos casos e um *crossmatching* negativo com ICC satisfatório em 80 a 90% dos casos³⁹.

Na falta de plaquetas compatíveis, a transfusão mais frequente de plaquetas é o mais recomendado. A esplenectomia não está recomendada.

A aloimunização e a refratariedade plaquetária são um problema clínico comum e relevante. Não se sabe ainda qual o real impacto da aloimunização e quais são os seus efeitos na resposta à transfusão de plaquetas, como ela exerce influência e se essa influência pode ser minimizada.

No nosso estudo o diagnóstico mais relevante foi o do sepsis neonatal (88%) (ausência de diagnóstico de aloimunização), no entanto obtivemos taxas de refratariedade plaquetária de 14,9% sendo que o grupo em que se verificou a taxa mais elevada foi o que tinha valores de números de plaquetas entre $10\text{-}50 \times 10^3/\text{ul}$. Pode verificar-se que a condição pré-transfusional do valor do número de plaquetas não implica um aumento na taxa do incremento ou da recuperação plaquetária, até porque é evidente pela ausência de refratariedade no grupo dos recém-nascidos que têm valores do número de plaquetas abaixo de $10 \times 10^3/\text{ul}$. No entanto verificou-se que em 94% dos casos quanto maior o incremento da contagem corrigida do número das plaquetas maior a taxa de recuperação plaquetária.

O tratamento da causa deve ser imediato. A transfusão é necessária se o valor de plaquetas for inferior a $30 \times 10^3/\text{ul}$ utilizando-se um dador único de fenótipo HPA compatível com a mãe, assim como ABO e Rh compatíveis. A administração de IGIV 1g/KG em dois dias consecutivos; 1mg de metilprednisolona a cada 8 horas/IV durante 2 dias. Estes procedimentos permitem manter níveis de plaquetas superiores a $50 \times 10^3/\text{ul}$, assistindo-se a uma recuperação plaquetária em cerca de duas a três semanas³⁷.

Não existe atualmente um consenso sobre o limite de transfusão de recém-nascidos com trombocitopenia. As diretrizes sobre a transfusão diferem significativamente entre os países e instituições médicas. Em casos de trombocitopenia os seguintes aspetos devem ser considerados. O risco de hemorragia em recém-nascidos muito prematuros é maior na primeira semana

de vida. Além disso, a hemorragia está associada a doenças subjacentes como trombocitopenia aloimune, sepsis e NEC (enterocolite necrosante) por serem particularmente propensas a sangrar. Nos casos de hemorragia grave, a maioria dos especialistas concorda que a transfusão de plaquetas deve ser administrada se a contagem de plaquetas for menor que $100 \times 10^9/L$. No entanto, a maioria das transfusões de plaquetas são efetuadas profilaticamente para doentes com contagens baixas de plaquetas. Os riscos não hemorrágicos e o benefício dessas transfusões profiláticas não foram totalmente ensaiados e definidos. Torna-se pois necessário a existência de consensos de especialistas baseados na evidência, de forma a estabelecer diretrizes no processo de transfusão de plaquetas.⁴⁰

Não existe atualmente nenhuma evidência experimental sobre a dose ótima de plaquetas a administrar ou sobre a frequência de administração de transfusões de concentrados plaquetários. Sabe-se que maiores volumes (20 ml / kg) parecem produzir maior e mais sustentados aumentos na contagem de plaquetas em comparação com menor volumes (10 ml / kg), e são geralmente bem tolerados. Uma vez que a maioria dos recém-nascidos só recebe uma transfusão de plaquetas parece prudente para garantir esse resultado e um bom incremento de plaquetas utilizar um volume maior e também assim minimizar a exposição dos recém-nascidos a mais dadores⁴¹. Neste estudo 80% dos recém nascidos foram transfundidos com volumes inferiores a 21ml, o que denota o seu baixo peso e prematuridade, não devendo por isso a transfusão ser de volumes exageradamente elevados. Verificou-se que este facto obrigou a aumentar a necessidade de recorrer a várias transfusões e consequente exposição a dadores.

A mortalidade na sepsis neonatal pode ser superior a 50% se não for tratada. A infeção é a maior causa fatal durante o primeiro mês de vida, contribuindo para 13-15% de todas as mortes fetais. Em suma, baixo peso à nascença e infeção por gram-negativos estão associados a eventos adversos³⁸.

A ocorrência de refratariedade à transfusão de plaquetas em 18 (36%) dos recém-nascidos com diagnóstico de sepsis avaliados no presente estudo demonstra a relevância desta condição clínica, facto este que está de acordo com a literatura que afirma que 13 a 30% dos doentes politransfundidos

desenvolvem refratariedade plaquetária, não existindo no entanto muitos estudos para o grupo de recém-nascidos.^{1,23,13}

Todos os recém-nascidos refratários manifestavam alguma causa não imunológica que pudesse estar envolvida na refratariedade. As principais causas foram: febre, infecção, uso de antibióticos e hemorragia.

As causas imunológicas não foram detetadas. Apenas um recém-nascido e a respetiva mãe foram estudados e ambos foram negativos para os anticorpos anti-HPA.

A sépsis neonatal (88%) foi mais frequente que a refratariedade plaquetária (36%), indicando que o desenvolvimento de sépsis não resulta da refratariedade à transfusão plaquetária. Por outro lado torna-se cada vez mais evidente que as plaquetas desempenham um papel complexo na sépsis. Interferir na função plaquetária pode ser um bom caminho para o tratamento da sépsis. No esforço para a redução da mortalidade os clínicos perante um recém-nascido trombocitopénico séptico e refratário devem procurar incessantemente a causa e corrigir os fatores que contribuem para a trombocitopenia, fim último deste trabalho de investigação.

6. Conclusão

6. Conclusão

Após o início deste estudo, foi formado um grupo de trabalho multidisciplinar na instituição Centro Hospitalar do Porto, que estabeleceu um novo protocolo de atuação no sentido de identificar e estudar novos casos de trombocitopenias neonatais, as suas causas e refratariedade.

Como prevenção, a irradiação dos componentes plaquetários transfundidos diminui a aloimunização a antígenos *HLA* de classe I, já que os antígenos *HLA* em leucócitos transfundidos iniciam uma resposta imune primária que conduz à produção de anticorpos específicos anti-*HLA*-dador. Algumas instituições defendem a pesquisa de anticorpos anti-*HLA* para todos os pacientes com história de transfusão ou gravidez anteriores que requerem suporte de plaquetas em curso^{39,43}.

O futuro seria implementar medidas como a seleção de doadores compatíveis e certamente contribuir para a redução da morbi-mortalidade destes pacientes.

A Refratariedade à Transfusão de Plaquetas emergiu como um dos maiores desafios associado à Medicina Transfusional. Cada doente refratário tem uma constelação única de fatores que contribuem para a insuficiente resposta à Transfusão de Plaquetas, desenvolvendo-se em aproximadamente 10% dos doentes politransfundidos, de forma persistente ou transitória⁴⁵.

O suporte transfusional eficaz do doente aloimunizado e refratário apesar de complexo, dado o *status* clínico laboratorial de cada doente e as diferentes estratégias envolvidas, é possível em aproximadamente dois terços dos casos, recorrendo a plaquetas frescas, de aférese ABO compatíveis, irradiadas e selecionadas por crossmatch orientado. Para este ser exequível é necessário um painel alargado nacional de doadores regulares de aférese, fenotipados para o sistema HLA, respetiva plaquetoteca e programa de colheita de plaquetas de aférese⁴⁵.

A promoção das boas práticas da Medicina Transfusional é um desafio que se coloca a todos os especialistas desta área, que pelo seu cariz transversal a todas as especialidades médicas e cirúrgicas, obriga à referência a *standards*, à produção de recomendações racionalizantes, à

vigilância da sua aplicação prática e à responsabilização do médico prescritor num quadro de melhoria contínua da Qualidade, irá provocar a longo prazo a manutenção da tendência de diminuição da incidência, um diagnóstico mais precoce e uma abordagem mais objetiva desta entidade nosológica que apesar de rara se mantém potencialmente fatal.

7. Bibliografia

7. Bibliografia

1. Roberts I.; Stanworth S.; Murray A. N. Thrombocytopenia in the Neonate Blood Reviews 2008; 22:173-186. Elsevier.
2. McFarland Janice G, MD. Platelet and Granulocyte Antigens and Antibodies. AABB, 2008; 18: 525-542.
3. LEEKSMA, C.H., COHEN, J.A. Determination of the life of human blood platelets using labelled diisopropylfluorophosphate. Nature; v.26, p.552-3, 1955.
4. SOARES, S. et al. Participação das plaquetas no processo de fibrose dos pacientes com esquistossomose mansônica. Rev Soc Br Med Trop; v.40, p.321-325, 2007.
5. MASON K.D. et al: Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. Cell; v.128, p.1173-1186, 2007.
6. http://www.asst.min-saude.pt/SiteCollectionDocuments/ma_cft_ger_conferencia_consensos.pdf
7. MAURER-SPUREJ, E.; CHIPPERFIELD, K. Past and future approaches to assess the quality of platelets for transfusion. Transfusion Med Rev; v.21, p.295-306; 2007.
8. ROSSI, E. Principles of transfusion medicine. 3Thed. 2002
9. GULLIKSSON H. Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. Transfusion Med Rev; v.17 (3), p.209-15, 2003.
10. SIMONSEN, A.C. et al. Transfusion of 7-day-old amotosalen photochemical treated buffy-coat platelets to patients with thrombocytopenia: a pilot study. Transfusion; v.46, p.424-433, 2006.
11. GUIDE TO THE PREPARATION, USE AND QUALITY ASSURANCE OF BLOOD COMPONENTS, 12th edition. Strasbourg: Council of Europe Publishing; 2011.
12. DUMONT, L.J. et al. Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. Transfusion; v.4, p.847-54, 2002.

13. BRASIL. ANVISA, Resolução nº 153, de 14 de junho de 2004. Diário Oficial da União. Agência Nacional de Vigilância. Aprova o Regulamento Técnico para os procedimentos de hemoterapia para colheita, processamento, testes, armazenamento, transporte, utilização e controle de qualidade do sangue e seus componentes obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea para uso humano.
14. CAMERON, B. et al. Evaluation of platelet transfusion triggers in a tertiary-care hospital. *Transfusion*; v.47, p.206-211, 2007.
15. NAKAZAWA, Y. et al. A possible role for the production of multiple HLA antibodies in fatal platelet transfusion refractoriness after peripheral blood progenitor cell transplantation from the mother in a patient with relapsed leukemia. *Transfusion*; v.47, p.326-334, 2007.
16. KAO, K.J. et al. White cell reduction in platelet concentrates and packed red cells by filtration: a multicenter clinical trial. *Transfusion*; v.35, p.13–19, 1995.
17. REBULLA, P. A mini-review on platelet refractoriness. *Haematologica*; v.90, p.247-253, 2005.
18. DZIK, S. How I do it: platelet support for refractory patients. *Transfusion*; v.47, p.374-378, 2007.
19. SLICHTER, S. J. et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood*; v.105, p.4106-14, 2005.
20. FUNG, M.K., DOWNES, K.A., SHULMAN, I.A. Transfusion of platelets containing ABO-incompatible plasma. A survey of 3156 North American laboratories. *Arch Pathol Lab Med*; v. 131, p. 909–16, 2007.
21. DELAFLORE-WEISS, E.; MINTZ, P. D. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. *Transfusion Med Rev*; v.14, p.180-96, 2002.
22. TINMOUTH, A.T. et al. Platelet immunopathology and therapy: a Canadian Blood Services Research and Development Symposium. *Transfusion Medicine Reviews*; v.20, p.294-314, 2006.
23. Hillyer, C. et al. *Blood Banking and Transfusion Medicine: Basic Principles & Practice*, Second Edition, chapter 40, p.551-556, 2007.

24. LALEZARI, P.; DRISCOLL, A.M. Ability of thrombocytes to acquire HLA specificity from plasma. *Blood*; v.59, p.167-170, 1982.
25. Wandt et al. Safety and Cost Effectiveness for prophylactic Transfusions. *Blood*, vol 91, No 10 (May 15),1998: pp 3601-3606.
26. DANKERS, M.K.A. et al. The HLA-DR Phenotype of the Responder is Predictive of Response Against HLA Class I Antigens. *Human Immunology*; v.65, p.13–19, 2004.
27. Sato S, Sakurai T, Yamamoto Y, Maekawa I, Ikeda H: Earlier detection of HLA alloimmunization in platelets transfusion refractoriness by flow Cytometric analysis. *Transfusion* 2005; 45: 1399-1401.
28. www3.uma.pt/lgh/investigacao_hlas.html; consultado em 01 de Maio de 2013.
29. ERTEL, Katharina et al. Relevance of the HPA-15 (gov) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion*; v.45, p.366-373, 2005.
30. Wendel Rita, Avaliação de diferentes metodologias laboratoriais para deteção de aloanticorpos plaquetários. Determinação da prevalência e importância clínica destes aloanticorpos em pacientes transfundidos. Programa de Pós-graduação em Farmácia, área de Análises clínicas, Faculdade de ciências farmacêuticas; USP,2008
31. James David, Steer J. Philip, Weiner P. Carl, and Gonik Bernard. High Risk Pregnancy: Management options, chapter 14, 229-238. e3, fourth edition, 2011.
32. MK Killie, A Husebekk, J Kjeldsen-Kragh, and B Skogen. A Prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. *Haematologica* 93 (2008), pp.870-877.
33. Normas Orientadoras-Trombocitopenia Neonatal; Hematologia Pediátrica /Neonatologia. Protocolo de atuação na Unidade da Maternidade de Júlio Dinis-Centro Hospitalar do Porto.
34. HEIM, D. et al. Patient and product factors affecting platelet transfusion results. *Transfusion*; v.48, p. 681-7, 2008.
35. Decreto-Lei nº 100/2011 e o Decreto-Lei nº 267/2007 do Ministério da Saúde para a Autoridade para os Serviços de Sangue e da Transplantação (ASST).

36. KERKHOFFS, J.L. et al. A multicenter randomized study of efficacy of transfusions with platelets stored in platelet additive solution II versus plasma. *Blood*; v.108, p.3210-15, 2006.
37. Moreira, A. et al. Trombocitopenia severa neonatal. *Nascer e crescer*; v.XX, nº1, p.20-2, 2011.
38. Anderson-Berry, A. et. al. Neonatal Sepsis. *Medscape drugs, diseases & procedures*, 2012.
39. Hendrickson, J. et. al, Platelet transfusion refractory Patients Transfusion Medicine and Hemostasis: Clinical and Laboratory Aspects the Chapter 40 p 283-286; 1 ed, ELSEVIER, 2009.
40. Holzhauser, S. et. al. Diagnosis and management of neonatal thrombocytopenia. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 16 (2011) p.305-310, ELSEVIER, 2011.
41. Roberts, I. et, al, Thrombocytopenia in the Neonate. ELSEVIER, *Blood Reviews* 22, 173–186, 2008.
42. Landi, E.P.; et, al, Doença do enxerto contra o hospedeiro pós-transfusional- guia para irradiação de hemocomponentes. *Rev Ass Med Brasil*; 45(3): 261-721,999.
43. Thomas S. Kickler, The Trial To Reduce Alloimmunization To Platelets Study Group: Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. *N Engl J Med* 337:1861-1869, 1997.
44. Vargas, A.et al. Prevalência de Sepsis Neonatal Precoce em Recém-Nascidos de Muito Baixo Peso de Nascimento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Salão de Iniciação Científica, livro de resumos*. Porto Alegre: UFRGS, 2009.
45. Guerreiro, T. Refratariedade Plaquetária. *Rev. ABO*, nº 30, pag.7-30,2007.