

Artigo / Article

## Estudo do método da extração da camada leucoplaquetária na produção de hemocomponentes – avaliação laboratorial

### *A study of the Buffy-coat extraction method for blood component processing – laboratorial analysis*

Mario I. Serinolli<sup>1</sup>

Márcia C. Z. Novaretti<sup>2</sup>

Pedro E. Dorlhiac-Lacer<sup>3</sup>

Dalton A. F. Chamone<sup>4</sup>

Dentre os métodos para a obtenção de hemocomponentes destaca-se o método do plasma rico em plaquetas (PRP) e o método da extração da camada leucoplaquetária (ECLP). Este estudo tem por objetivo comparar os métodos do PRP e da ECLP na produção de hemocomponentes. Foram processadas 88 bolsas de sangue total (ST) pelo método do PRP, 130 bolsas triplas pelo método da ECLP (ECLPT) e 215 bolsas coletadas em bolsas quádruplas pelo método da ECLP (ECLPQ) com o uso de extrator automático. Encontramos diferença estatisticamente significativa na quantidade de Hb total /unidade entre ECLPT e ECLPQ ( $p=0,005$ ) e entre ECLPT e PRP ( $p=0,007$ ) no ST. Houve diferença estatisticamente entre ECLPT e ECLPQ ( $p<0,001$ ) e entre ECLPQ e PRP ( $p<0,001$ ) para a quantidade de leucócitos. No CH, encontramos diferença estatisticamente significativa entre o método do PRP e ECLPT e ECLPQ hematócrito ( $p<0,001$ ), recuperação de Hb ( $p<0,001$ ), Hb total ( $p<0,001$ ), leucócitos ( $p<0,001$ ), depleção de leucócitos ( $p<0,001$ ), quantidade de plaquetas ( $p<0,001$ ) e depleção de plaquetas ( $p<0,001$ ). Para o concentrado de plaquetas houve diferença estatisticamente significativa entre PRP, ECLPT e ECLPQ para o volume, recuperação de plaquetas e depleção de leucócitos ( $p<0,001$ ). A utilização do método da ECLP é vantajosa qualitativamente, pois os hemocomponentes obtidos apresentam menor quantidade de leucócitos e plasma. O método da ECLP com a utilização de bolsas quádruplas e a produção de CP a partir de uma unidade de CLP é de implantação viável e de fácil padronização, permitindo boa reprodutibilidade, bem como melhor aproveitamento de plasma e plaquetas. Rev. bras. hematol. hemoter. 2004;26(3):167-176.

**Palavras-chave:** Transfusão de sangue; leucócitos; camada leucoplaquetária; concentrado de plaquetas; leucorredução.

<sup>1</sup>Médico Hemoterapeuta. Mestre em Administração em Saúde pela Fundação Getúlio Vargas. Doutor em Hematologia pela Faculdade de Medicina da USP.

<sup>2</sup>Professora Colaboradora da Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Doutora em Hematologia pela Faculdade de Medicina da USP.

<sup>3</sup>Professor Livre-docente da Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Diretor Técnico-científico da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo.

<sup>4</sup>Professor Titular da Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Presidente da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo.

Local onde o trabalho foi realizado: Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo

**Correspondência para:** Mario Ivo Serinolli

Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo

Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 155 / 1º andar

05403-000 – São Paulo-SP

Tel.: 11 306155 44 ramal 240 – Fax 11 3088 26 38 – email: miserinolli@uol.com.br

## Introdução

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

Os efeitos deletérios dos leucócitos em pacientes transfundidos são conhecidos desde o final da década de 50. Brittingham et al<sup>4</sup> reportaram que a retirada da camada leucoplaquetária (CLP) poderia prevenir reações transfusionais febris não-hemolíticas. Em 1959, Chaplin et al<sup>5</sup> descreveram o método da centrifugação invertida do sangue total (ST), utilizando uma bolsa tripla convencional. Esse método apresentava vantagem sobre o das hemácias lavadas, pois mantinha o sistema fechado e, portanto, livre da possibilidade de contaminação bacteriana, possibilitando armazenar as hemácias por até três semanas. No entanto, o método da centrifugação invertida apresentava como inconveniência o fato de ser muito laborioso, removendo até 70% dos leucócitos à custa de grande perda de hemácias (mais de 30%).

Em 1977, Polesky<sup>6</sup> e Rock et al,<sup>7</sup> em 1984, descreveram que, além da centrifugação invertida, os métodos mais utilizados até então para a remoção da camada leucoplaquetária eram a utilização de hemácias lavadas, hemácias deglicerolizadas e o uso de filtros de microagregados. Esses métodos eram trabalhosos e pouco eficientes para a remoção de leucócitos, com grande perda de hemácias e depleção de leucócitos nem sempre adequada, o que ensejou o desenvolvimento de outras técnicas.

Já em 1962, Grenwalt et al<sup>8</sup> descreveram a utilização de um filtro composto de fibras de nylon e lã fortemente empacotadas, que poderiam ser esterilizadas a gás e permitir boa redução de leucócitos. Diepenhorst et al<sup>9</sup>, em 1972, descreveram a quase completa remoção de todos os leucócitos (98%) de plaquetas (90%) e uma boa recuperação de volume de hemácias com a utilização de colunas preenchidas com fibras de nylon e lã fortemente empacotadas, ou fibras de acetato de celulose. Outros estudos realizados demonstraram a eficiência dos filtros de leucócitos.<sup>10,11,12</sup>

Atualmente a utilização de filtros é considerada o método mais eficiente para a remoção de leucócitos. Com

os produtos atuais é possível remover mais de 99% dos leucócitos, ou seja, obter redução da ordem de 3 a 4 logs.<sup>13,14</sup> Isto é suficiente para diminuir ou mesmo evitar as RFNH, aloimunização, refratariedade plaquetária<sup>15,16</sup> e transmissão de CMV.<sup>17</sup> Atualmente existem dois tipos de filtração: a pré-estocagem, e a pós-estocagem, também chamada de filtração à beira do leito.<sup>18,19</sup> O mais recomendado é que se faça a filtração pré-estocagem, evitando-se assim a permanência e a degradação dos leucócitos responsáveis pela produção de citoquinas.<sup>20</sup> Estudos clínicos confirmam que o percentual de reações agudas, após transfusão de concentrado de plaquetas (CP) não filtrado, foi superior a 35%.<sup>21</sup> Com filtração pós-estocagem foi de 25%; com a filtração pré-estocagem foi de 12,5%.<sup>22,23</sup>

Antes do desenvolvimento dos atuais filtros de leucorredução, os europeus retiravam a CLP através de método descrito por Prins et al, em 1980.<sup>24</sup> Esse método era menos laborioso e oneroso que os outros utilizados na época.

O grande passo no desenvolvimento da metodologia de obtenção de componentes sanguíneos pela extração da camada leucoplaquetária (ECLP) foi dado por Högman et al,<sup>25,26</sup> no final da década de 80, que patentearam as bolsas tipo *top and bottom* (TAB) e um equipamento automático controlado por fotocélulas, que separa o sangue total em CH, plasma pobre em plaquetas e CLP, de forma surpreendentemente mais rápida e prática. Neste método, a separação de componentes demora em média cerca de 13 minutos. Com um técnico, uma centrifuga e seis equipamentos, aproximadamente trinta unidades de ST poderão ser processadas em uma hora, ou seja, trinta unidades homem/hora. Comparado ao método utilizado por Pietersz et al,<sup>27</sup> que retiravam a CLP manualmente, o ganho em produtividade foi importante.

Neste estudo, pretendemos comparar as características dos componentes obtidos pelo método do PRP com os resultantes pelo método de extração da camada leucoplaquetária (ECLP), utilizando bolsas TAB e extrator automático. Cabe salientar que, até a presente data, não existem regulamentos definidos pelo Ministério da Saúde que descrevam as especificações dos componentes obtidos pelo método de ECLP.

## Casística e Método

Neste estudo, realizado na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, foram comparados a qualidade e o rendimento do método clássico, também denominado de método da extração do plasma rico em plaquetas (PRP), e outro, denominado método da extração da camada leucoplaquetária (ECLP) para o processamento do sangue total (ST), com a obtenção dos seguintes componentes sanguíneos: concentrado de hemácias (CH), plasma fresco (PF) e concentrado de plaquetas (CP). Inicialmente,

foram coletadas 88 bolsas de ST em bolsas triplas, sendo todas fracionadas pelo método clássico em CH e em PRP. A partir de cada unidade de PRP, originou-se uma unidade de CP. Esta foi denominada de a *primeira fase do estudo*. Na *segunda fase do estudo*, utilizou-se o método da ECLP, onde foram coletadas 130 bolsas triplas TAB e processados em CH, PF e CLP. As unidades de concentrado de plaquetas foram produzidas a partir de um conjunto de quatro ou cinco unidades de CLP juntamente com uma unidade de PF. Na *terceira fase do estudo*, foram coletadas 215 unidades de ST com bolsas quádruplas tipo TAB, sendo todas fracionadas pelo método da ECLP em CH, PF e CLP. Cada unidade de CLP deu origem a uma unidade de CP. Todas as unidades coletadas nas três fases iniciais foram analisadas laboratorialmente e seus parâmetros comparados.

Neste estudo, foram empregados três tipos de bolsas plásticas de coleta de sangue todas de marca Baxter, Fenwal Division, Deerfield, USA. As bolsas triplas CPDA-1 foram utilizadas para a preparação dos componentes sanguíneos pelo método clássico. Bolsas triplas e quádruplas modelo TAB Optipac® foram utilizadas para a obtenção dos componentes pelo método da ECLP.

Todas as coletas de ST, no estudo, foram realizadas segundo a legislação.<sup>28</sup> O tempo de sangria não foi superior a 10 minutos, sendo coletados 450 mL ± 50 mL, sob homogeneização constante do equipamento Optimix V02, marca Fenwal Division-Baxter, Deerfield, EUA). As bolsas de ST com volume inferior a 400 mL e superior a 500 mL foram excluídas do estudo. Todas as bolsas utilizadas neste estudo foram mantidas por duas horas em repouso, em temperatura ambiente entre 20°C e 24°C, sendo todas fracionadas em até seis horas após o término da coleta.

### Processamento

*Validação do método de obtenção de hemocomponentes pela extração da camada leucoplaquetária (ECLP)*

Inicialmente foi feita a validação do método de ECLP com 96 bolsas de ST processadas com o uso de extratores automáticos Optipress® (Fenwal Division-Baxter, Deerfield, EUA) e de testes para escolha da melhor combinação de tempo e força g por minuto (dez combinações diferentes: 2.490 g/10 min, 2.490 g/12 min, 2.833 g/10 min, 3.013 g/10 min, 3.013 g/10 min, 3.199 g/10 min, 3.199 g/12 min, 3.390 g/10 min, 3.586 g/10 min, 3.996 g/10 min, 4.427 g/13 min), dando origem a 96 bolsas de CH, PF e de CLP.

Para a preparação de CP, foram conectadas quatro ou cinco unidades de CLP, com o uso de um sistema de conexão estéril (SCD-Terumo®, Japão), em conjunto com uma unidade de plasma, e transferidos para uma bolsa de transferência em PVC, com capacidade para 600 mL.

Para verificar a estabilidade da CLP, avaliou-se o pH em 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas em sete conjuntos de CLP contendo cinco unidades cada.

Para aumentar o percentual de recuperação de hemoglobina no CH a partir do sangue total centrifugado na força g por minuto escolhida, trocou-se a placa reta que acompanha os extratores automáticos Optipress® por outra de concavidade central (placa côncava). O pH de 33 unidades de CP foi medido nos dias 1, 2, 3, 4 e 5 de armazenamento.

Após a validação foi iniciado o estudo comparativo entre os métodos de PRP e ECLP em bolsas triplas e quádruplas.

*Processamento pelo método do PRP (Método clássico) – Primeira fase do estudo*

Nessa fase foram coletadas e analisadas 88 bolsas de sangue total, CH, PF e CP, totalizando 440 unidades. Estes componentes foram escolhidos aleatoriamente, sendo todos analisados no dia da coleta.

As bolsas de ST foram homogeneizadas manualmente antes de serem centrifugadas (Centrífuga marca Sorvall, modelo RC3B, Kendro®, EUA) a 1.730 g por quatro minutos (incluído o tempo de aceleração) com nível de desaceleração ajustado em 5 (3,14 minutos), o que corresponde a 7,14 minutos de centrifugação. Após o que as bolsas foram colocadas em um extrator manual (Fenwal Division-Baxter, Deerfield, EUA). As unidades de CP e plasma foram obtidos a partir do PRP centrifugado a 2.490 g por 12 minutos, com nível de desaceleração 5 (3,14 minutos). A seguir, as unidades de PRP foram colocadas no extrator manual, permanecendo na bolsa o CP. As bolsas de CP foram pesadas, devendo estar entre 50 e 70 gramas.

*Processamento pelo método da ECLP com o uso de bolsas triplas – Segunda fase do estudo – Método automatizado*

As bolsas triplas do tipo TAB com ST foram centrifugadas a 3.390 g por dez minutos e a seguir colocadas no equipamento automatizado (Optipress® Fenwal Division, Baxter, Deerfield, EUA), onde ocorre a separação do CH, CLP e plasma. A CLP permaneceu no corpo principal da bolsa, o CH foi transferido para a bolsa satélite inferior, e o plasma, pelo tubo de transferência superior, fluiu para a bolsa satélite superior. Os tubos de transferência das unidades de CLP foram unidos um a um (quatro ou cinco unidades) com uma unidade de plasma e uma bolsa de transferência (PVC) de 600 mL. O conteúdo foi transferido para a bolsa em PVC de 600 mL, que foi então conectado a uma bolsa de transferência de poliolefina de 1.000 mL. Posteriormente, o conjunto foi centrifugado a 1.339 g por três minutos, com 2,3 minutos de desaceleração; ou a 2.169 g por cinco minutos com 2,35 minutos de desaceleração. Após a centrifugação, a bolsa de 600 mL foi

colocada no extrator manual, transferindo o sobrenadante (CP) para a bolsa de 1.000 mL de poliolefina. O resíduo que permaneceu na bolsa de 600 mL foi descartado.

#### *Processamento pelo método da ECLP com o uso de bolsas quádruplas – Terceira fase do estudo*

As bolsas quádruplas do tipo TAB com ST foram centrifugadas a 3.788 g por dez minutos e a seguir colocadas no equipamento automatizado (Optipress® Fenwall Division, Baxter, Deerfield, EUA), onde ocorre a separação do CH, CLP e plasma. Foram colocadas a seguir no equipamento automatizado (Optipress®, Fenwall, Baxter Division, Deerfield, EUA), onde ocorreu a separação do CH, CLP e plasma. A CLP permaneceu no corpo principal da bolsa conectado a uma bolsa satélite, para a qual foi transferido o CP após a segunda centrifugação. O CH foi transferido para a bolsa satélite inferior e o plasma fluiu do tubo de transferência superior para a bolsa satélite superior. As bolsas satélites contendo CH e plasma foram separadas do corpo principal por um selador manual. A preparação de CP foi realizada a partir de uma unidade de CLP.

Antes da centrifugação, a unidade de CLP permaneceu em repouso por pelo menos duas horas, para que ocorresse desagregação das plaquetas. Após o que foi realizada centrifugação a 335 g por cinco minutos com 2,05 minutos de desaceleração. Após a centrifugação, a bolsa foi colocada no extrator manual que transferiu o sobrenadante (CP) para a bolsa satélite. O resíduo que permaneceu na bolsa principal foi descartado.

#### **Análise laboratorial dos hemocomponentes**

As análises laboratoriais foram realizadas em 440 componentes (88 ST, 88 CH, 88 CP, 88 PF e 88 PRP) processados pelo método do PRP, 1.275 processados pelo método automatizado em bolsas quádruplas TAB (215 ST, 215 CH, 215 PF, 215 CLP e 215 CP), e 520 componentes (130 ST, 130 CH, 130 PF, 130 CLP), processados pelo método automatizado em bolsas triplas TAB. Também, por este último método, foram analisados 24 componentes de conjuntos de 5 CLP (12 conjuntos de 5 unidades de CLP e 12 CP), 80 componentes em conjuntos de 4 CLP (40 conjuntos de 4 unidades de CLP e 40 CP) e 33 CP obtidos com 4 unidades de CLP.

Os parâmetros analisados nas unidades de ST, CH e CLP foram: volume (mL), concentração de hemoglobina total (g/dL e g/unidade), hematócrito, contagem de plaquetas e de leucócitos. Nas unidades de CH foram ainda analisados: percentual de recuperação de hemoglobina, percentual de depleção de leucócitos e de plaquetas. Nas unidades de PRP, PF e CP foi medido o volume (mL) e realizada a contagem de plaquetas e de leucócitos. Nas unidades de PF foi também analisado o percentual de recuperação de plasma. Por fim, nas unidades de CP foram

ainda pesquisados a recuperação de plaquetas, depleção de leucócitos, pH e *swirling*.<sup>29,30</sup>

#### **Metodologia estatística**

As comparações das rotações quanto aos componentes de ST, CH, PF, CLP e CP foram realizadas pela análise de variância (nos casos de três ou mais forças g/min) e teste t de Student para amostras independentes<sup>31</sup> (nos casos de duas forças g/min) com suposição de homocedasticidade, quando os desvios-padrão não diferiam significativamente, ou com suposição de heterocedasticidade, quando os desvios-padrão diferiam significativamente. Comparações múltiplas foram feitas com base na estatística de Wald. Para as situações em que a suposição de normalidade dos dados não estava satisfeita, utilizaram-se os testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon para amostras independentes.<sup>32</sup>

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

#### **Resultados**

Os resultados da validação do método de ECLP (dados aqui não apresentados) levaram à escolha da força de centrifugação de 3.390 g/10 min para a primeira centrifugação, pois apresentaram menor quantidade e maior depleção de leucócitos, maior recuperação de hemoglobina e boa depleção de plaquetas, tendo sido esta a força g e o tempo de centrifugação escolhidos para o processamento de ST coletado em bolsas triplas do tipo TAB.

Já para as bolsas quádruplas, escolheram-se a primeira centrifugação a 3.788 g por 10 min, e a segunda a 335 g, por 5 min. Os produtos resultantes apresentaram as seguintes características: CH com maior percentual de depleção de leucócitos e plaquetas, boa recuperação de hemoglobina e menor quantidade de leucócitos em números absolutos; CP com maior quantidade de plaquetas em números absolutos e excelente percentual de recuperação de plaquetas e depleção de leucócitos.

A média e desvio-padrão do pH e do primeiro ao quinto dia de armazenamento de 33 unidades de CP obtidos de um conjunto de quatro unidades de CLP variou no primeiro dia de  $6,9 \pm 0,2$  a  $6,6 \pm 0,2$  no quinto dia de armazenamento. Nenhuma unidade apresentou pH abaixo de 6,0 no último dia de armazenamento.

Durante a validação do método de ECLP foi testado o uso de placa de extração côncava e reta para obtenção de CH, tendo sido demonstrado que, com a placa côncava, o volume, a quantidade de hemoglobina em g/dl, a quantidade total de hemoglobina por unidade, o hematócrito e a depleção de leucócitos foram maiores que com a placa reta, sendo essas diferenças estatisticamente significantes ( $p=0,0001$ ). Foi escolhida para processamento, a

partir da CLP coletada em bolsas triplas, a centrifugação de 1.399 g por 3 min com 4 CLP obtidos com a placa côncava.

Após a validação é que foi iniciado o estudo comparativo entre os métodos do PRP e da ECLP. Na análise da tabela 1 encontramos diferença estatisticamente significativa quando comparamos o volume nas unidades de sangue total entre os métodos do PRP e ECLPT ( $p=0,002$ ); e na quantidade de Hb total /unidade entre ECLPT e ECLPQ ( $p=0,005$ ) e entre ECLPT e PRP ( $p=0,007$ ). Houve diferença estatisticamente entre ECLPT e ECLPQ ( $p<0,001$ ) e entre ECLPQ e PRP ( $p<0,001$ ) para a quantidade de leucócitos.

Na tabela 2 são apresentados os resultados laboratoriais no CH obtidos por PRP e por ECLPT e ECLPQ. Encontramos diferença estatisticamente significativa entre o método do PRP e ECLP (tanto em bolsas triplas como quádruplas) para volume ( $p=0,02$ ), hematócrito ( $p<0,001$ ), recuperação de Hb do CH ( $p<0,001$ ), Hb total ( $p<0,001$ ), leucócitos ( $p<0,001$ ), depleção de leucócitos ( $p<0,001$ ), quantidade de plaquetas ( $p<0,001$ ) e depleção de plaquetas ( $p<0,001$ ).

O volume de plasma encontrado para o PRP, ECLPT e ECLPQ foi:  $\mu=174,6\pm 26,3$  mL,  $\mu=203,9\pm 17,0$  mL e  $\mu=214,5\pm 22,1$  mL, respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa entre ECLP (tanto para bolsas

triplas como quádruplas) e PRP ( $p<0,001$ ); entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre ECLPT e ECLPQ ( $p=0,1704$ ). O percentual de recuperação de plasma foi de  $\mu=72\pm 3,9\%$  para o PRP,  $\mu=73,9\pm 2,4\%$  para ECLPT e  $\mu=79,1\pm 6,2\%$  para ECLPQ, havendo diferença estatisticamente significativa entre PRP, ECLPT e ECLPQ.

Na tabela 3 podemos observar que para a CLP houve diferença estatisticamente significativa entre ECLPT e ECLPQ para a quantidade de Hb em g/dL ( $p=0,006$ ), para a quantidade de Hb total/unidade ( $p=0,002$ ), hematócrito ( $p<0,001$ ) e número de leucócitos ( $p=0,001$ ).

Na análise da estabilidade da CLP analisou-se o pH encontrado a 24, 48, 72 e 96 horas em sete unidades de CLP armazenadas em repouso em temperatura ambiente (20-24°C): variou de  $7,1\pm 0,2$  no final do primeiro dia foi em média; no segundo dia, caiu para  $7,0\pm 0,0$ ; no terceiro dia, para  $6,8\pm 0,3$ ; e no final do quarto dia, para  $6,5\pm 0,0$ .

Na tabela 4, podemos notar que para o CP houve diferença estatisticamente significativa entre PRP, ECLPT e ECLPQ para o volume, recuperação de plaquetas, e depleção de leucócitos ( $p<0,001$ ).

## Discussão

O suporte transfusional é vital no manuseio de diversas situações clínico-cirúrgicas como tumores sólidos, doenças onco-hematológicas, cirurgias e transplantes, dentre outras. Depende da doação de sangue a partir de doadores voluntários, que é submetido a testes laboratoriais que garantam a sua segurança e qualidade. Portanto, toda e qualquer metodologia que possa vir a ser implementada com o intuito de obter componentes de melhor qualidade, maior eficácia e segurança transfusional, deve ser almejada e, quando possível, ava-

**Tabela 1**

Médias e desvios-padrão dos resultados de testes laboratoriais realizados em unidades de sangue total (ST) coletados em bolsas triplas em CPDA-1 e processadas pelo método do PRP, e pelo método da ECLP com o uso de bolsas triplas (ECLPT) e quádruplas (ECLPQ)

Método	Volume (mL)	Ht <sup>§</sup> (%)	Hb T* (g/dL)	Hb T <sup>†</sup> (g/unid)	Leuc. <sup>¶</sup> / unid x10 <sup>9</sup>	Plaq. <sup>‡</sup> / unidx10 <sup>10</sup>
PRP	450,0 ± 8,6	39,3 ± 3,1	13,3 ± 1,2	59,7 ± 5,3	3,4 ± 1,3	7,7 ± 1,6
ECLPT	458,7 ± 16,6	40,0 ± 3,2	3,8 ± 1,0	3,4 ± 5,4	3,2 ± 1,0	7,9 ± 2,0
ECLP-Q	451,7 ± 15,0	39,8 ± 3,8	13,0 ± 1,2	58,5 ± 6,2	2,1 ± 0,4	8,0 ± 0,8

<sup>§</sup> hematócrito; \* hemoglobina g/dl; <sup>†</sup> hemoglobina total; <sup>¶</sup> número de leucócitos / unidade

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

**Tabela 2**

Médias e desvios-padrão dos resultados de testes laboratoriais realizados em unidades de concentrado de hemácias (CH) coletados em bolsas triplas processadas pelo método do PRP, e pelo método da ECLP com o uso de bolsas triplas (ECLPT) e quádruplas (ECLPQ)

Método	Volume (mL)	Ht <sup>§</sup> (%)	Hb T <sup>†</sup> (g/dL)	Hb T <sup>†</sup> (g/unid)	Leuc. <sup>¶</sup> / unidx 10 <sup>9</sup>	Plaq. <sup>‡</sup> / unidx10 <sup>9</sup>	Rec. Hb # (%)	Dep. Plaq. <sup>❖</sup> (%)	Dep. Leuc. <sup>•</sup> (%)
PRP	273,4 ± 26,9	70,8 ± 2,7	23,6 ± 1,0	64,6 ± 6,3	3,1 ± 0,9	20,8 ± 10,1	108,3 ± 4,3	74,6 ± 12,8	8,5 ± 1,3
ECLPT	286,8 ± 15,8	60,8 ± 2,8	20,3 ± 0,8	58,4 ± 5,0	0,8 ± 0,6	0,6 ± 0,6	89,2 ± 9,5	99,3 ± 0,7	76,9 ± 14,0
ECLPQ	287,2 ± 21,6	59,0 ± 4,2	18,6 ± 2,4	53,5 ± 8,6	0,5 ± 0,3	0,03 ± 0,02	90,5 ± 11,7	99,6 ± 0,2	74,8 ± 14,6

<sup>§</sup> hematócrito; <sup>†</sup> hemoglobina total; <sup>‡</sup> hemoglobina g/dl; <sup>¶</sup> número de leucócitos/unidade; <sup>•</sup> número de plaquetas/unidade

<sup>#</sup> percentual de recuperação de hemoglobina em CH; <sup>❖</sup> percentual de depleção de plaquetas em CH

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

**Tabela 3**

Médias e desvios-padrão dos resultados de testes laboratoriais realizados em unidades de camada leucoplaquetária (CLP) processadas pelo método da ECLP com o uso de bolsas triplas (ECLPT) e quádruplas (ECLPQ)

Método	Volume (mL)	Ht § (%)	Hb T † (g/dl)	Hb T † (g/unid)	Leucócitos # (10 <sup>9</sup> /unid)	Plaquetas* (1010/unid)
ECLPT	111,5±11,7	24,6±3,1	8,1±1,0	9,1±2,0	2,6±0,9	7,5±1,7
ECLPQ	113,7±7,0	31,0±3,2	10,8±3,9	12,1±3,6	1,8±0,7	7,6±1,1

§ hematócrito; † hemoglobina total; # número de leucócitos/unidade  
\* número de plaquetas/unidade

**Tabela 4**

Médias e desvios-padrão dos resultados de testes laboratoriais realizados em unidades de concentrado de plaquetas (CP) processados pelo método do PRP, e pelo método da ECLP com o uso de bolsas triplas (ECLPT) ou quádruplas (ECLPQ)

Método	Volume (mL)	Swirling	pH	Leuc. □ (10 <sup>9</sup> /unid)	Plaq. ¥ (10 <sup>10</sup> /unid)	Rec. Plaq. ♦ (%)	Dep. Leuc. ◇ (%)
PRP	61,9 ± 3,8	3,0 ± 0,1	7,4 ± 0,2	36,1 ± 20,8	7,3 ± 1,5	93,6 ± 8,6	56,4 ± 24,9
ECLPT	66,1 ± 3,2	2,6 ± 0,5	7,4 ± 0,2	9,6 ± 4,3	7,2 ± 1,3	88,7 ± 16,1	99,5 ± 0,2
ECLPQ	56,2 ± 5,6	3,0 ± 0,0	7,3 ± 0,1	1,1 ± 0,5	6,8 ± 0,8	89,6 ± 9,6	99,9 ± 0,2

□ número de leucócitos / unidade; ¥ número de plaquetas / unidade; ♦ percentual de recuperação de plaquetas em CP; ◇ percentual de depleção de leucócitos em CP

liada. Antes, porém, da implantação de um método na rotina laboratorial, há a fase de validação, que é o estabelecimento de evidência documental, que possibilita que o mais alto grau de segurança de um processo específico resulte, consistentemente, em um produto com características pre-determinadas e de qualidade, sendo que, em relação ao sangue e seus componentes, a literatura existente é escassa.

Na primeira fase do estudo avaliamos as características dos componentes sanguíneos produzidos pelo método PRP atualmente em uso na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. O ST utilizado para a obtenção de componentes pelo método do PRP estava dentro das especificações do Ministério da Saúde. A quantidade de leucócitos residuais no CH encontrada neste estudo é compatível com os dados encontrados por Heaton. As unidades de plaquetas estiveram dentro das especificações do Ministério da Saúde,<sup>28</sup> sendo os resultados obtidos próximos aos encontrados no estudo de Heaton,<sup>34</sup> ou seja, quantidade média de plaquetas por unidade na ordem de  $7,0 \times 10^{10}$ , e de leucócitos residuais, na ordem de  $10^7$ .

As características dos componentes obtidos com o método do PRP foram comparadas às dos componentes obtidos pelo método da ECLP com o uso de bolsas triplas e quádruplas. A padronização desse método seguiu os preceitos descritos pelos pesquisadores que o idealizaram.<sup>24,35,36,37</sup> Os melhores resultados foram obtidos com o uso do extrator automático tipo côncavo quando

comparados ao da placa tipo reta. O uso da placa côncava permite melhor recuperação de hemoglobina e maior depleção de leucócitos nas unidades de CH, melhorando o rendimento e qualidade do produto. É descrito que o método da ECLP está associado a perdas de hemácias que permanecem na CLP, em média 24 mL (IC 95%, 23,5-24,5 mL), o que representa a média de 12,7% da quantidade total de hemácias (IC 95% 12,5-12,9%).<sup>34</sup> Utilizando a placa côncava, a quantidade de hemoglobina que permanece na CLP é menor, melhorando o seu aproveitamento.

Em 1996, Wildt-Eggen et al relataram que, em muitos centros, o CP é obtido de um conjunto de CLP suspensa em uma unidade de plasma ou solução aditiva e armazenadas por cinco dias em bolsas de poliolefina de 1.000 mL. Os autores afirmam que apesar do armazenamento nessas bolsas, 29 entre 39 unidades de CP

que apresentam mais de  $3,1 \times 10^{11}$  de plaquetas possuem queda acentuada de pH, ou seja, pH menor que 6,8 e fenômeno de "swirling" não satisfatório, sugerindo que, nesses casos, as unidades de plaquetas sejam separadas em duas bolsas ou a quantidade de plaquetas ajustada. Em nosso estudo, 27 de 33 unidades apresentaram pH menor que 6,5 no quinto dia de armazenamento, indicando a necessidade de redução do período de armazenamento para três dias ou ajustes na quantidade de plaquetas armazenadas em cada bolsa. Outra possível causa da queda do pH pode ser o período de espera de até 24 horas para processamento dos conjuntos de CLP para a produção de CP, em função do grande número de células presentes. Os conjuntos de CLP só foram processados após a expedição dos resultados dos testes sorológicos.

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

Hurtado et al apresentaram os resultados obtidos na análise de qualidade de hemocomponentes produzidos pelo método da ECLP utilizando bolsas TAB e extrator automático Optipress®. O volume de CH no referido estudo foi de  $279 \pm 20$  mL, valores similares aos obtidos por nós tanto nos CH-ECLPT ( $286,8 \pm 15,8$

mL) quanto nos CH-ECLPQ ( $287,2 \pm 21,6$  mL). Quanto à quantidade de Hb por bolsa,  $Hb=54,92 \pm 7,16$  g, a casuística de Hurtado et al<sup>40</sup> foi semelhante à por nós observada para CH-ECLPT ( $58,4 \pm 5$  g/bolsa) e para CH-ECLPQ ( $53,5 \pm 8,6$  g/bolsa). A quantidade de leucócitos nos CH, em nosso estudo, variou de  $0,8 \pm 0,6 \times 10^9$  (CH-ECLPT) a  $0,5 \pm 0,3 \times 10^9$  (CH-ECLPQ), enquanto em Hurtado et al,<sup>40</sup> a quantidade de leucócitos encontrada foi de até  $1,2 \times 10^9$ , em 96% das unidades de CH.

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

Na análise do plasma obtido por PRP, ECLPT e ECLPQ, nossos resultados para volume foram inferiores aos descritos por Hurtado et al<sup>40</sup> ( $279 \pm 19$  mL). O percentual de recuperação de plasma foi maior com a utilização do método da ECLPQ ( $79,1 \pm 6,2\%$ ) do que com o método do PRP ( $72 \pm 3,9\%$ ). Heaton et al<sup>34</sup> descrevem em seus resultados que maior quantidade de plasma residual permanece no CH-PRP (21%) em relação ao CH-ECLP com bolsas TAB (6%).

A recuperação de plaquetas na CLP-ECLPT e na CLP-ECLPQ foi acima de 90% da quantidade total de plaquetas existentes nas unidades de ST na nossa casuística e na casuística de Hurtado et al.<sup>40</sup> O percentual de remoção de leucócitos na CLP encontrado por esse grupo foi de  $74 \pm 10\%$  da quantidade de leucócitos existentes nas unidades de sangue total, sendo compatível com os dados encontrados por nós, que foi de  $74,8 \pm 14,6\%$  de remoção de leucócitos nas unidades de CH-ECLPQ e com a grande quantidade de leucócitos presentes nas unidades de CLP-ECLPQ em nosso estudo ( $1,8 \pm 0,7 \times 10^9$  por unidade). O mesmo grupo descreve que 13 a 15% das hemácias são perdidas nas unidades de CLP. Neste estudo, o percentual de recuperação de hemoglobina do CH em relação ao ST foi de  $89,2 \pm 9,5\%$  para o CH-ECLPT e de  $92,7 \pm 6,3\%$  para o CH-ECLPQ.

Quando o volume dos CP-PRP ( $\mu=61,9 \pm 3,8$  mL) foi comparado com aqueles por ECLPT ( $\mu=66,1 \pm 3,2$  mL) e ECLPQ ( $\mu=56,2 \pm 5,6$  mL), a diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Bertolini et al encontraram valores bastante próximos para o CP-PRP ( $62 \pm 3,2$  mL), porém muito inferiores para os CP-ECLP ( $45 \pm 3,2$  mL), assim como para os descritos por Boeri et al<sup>43</sup> ( $46 \pm 6$  mL). Koerner et al<sup>44</sup> ( $68 \pm 18$  mL) e Kluter et al<sup>45</sup> ( $67,4 \pm 3,4$  mL) encontraram volumes semelhantes aos por nós observados nos CP-ECLPQ.

Em nosso estudo, o número de leucócitos encontrados nos CP obtidos a partir do PRP foi de  $36,1 \pm 20,8 \times 10^6$ , próximo aos descritos por Muylle e Peetermans<sup>46</sup> ( $39 \pm 21$

$\times 10^6$ ) e inferior aos encontrados por Anderson et al<sup>47</sup> ( $73 \times 10^6$ ), porém superior aos observados por Bertolini et al<sup>42</sup> ( $25,6 \times 10^6$ ). Anderson et al<sup>47</sup> e Bertolini et al,<sup>42</sup> ao estudarem a quantidade de leucócitos em CP-ECLP, encontraram níveis que variaram de  $1$  a  $13,6 \times 10^6$  a  $1,9 \times 10^6$ , respectivamente, valores próximos aos dos obtidos por nós em CP-ECLP ( $1,1 \pm 0,5 \times 10^6$ ).

Eriksson et al<sup>48</sup> conduziram elegantes estudos nos quais demonstraram que CP preparados a partir de conjuntos de 4 unidades de camada leucoplaquetária no dia da coleta de sangue apresentaram, *in vivo*, resultados semelhantes aos observados após a transfusão de CP por aférese, pela análise do cálculo do CCI (cálculo do incremento plaquetário corrigido) e pelo teste de sangramento de Ivy.<sup>49</sup>

Em nossa casuística, não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de plaquetas em CP-PRP ( $\mu=7,3 \times 10^{10}$ ), CP-ECLPT ( $\mu=7,2 \times 10^{10}$ ) e CP-ECLPQ ( $\mu=6,8 \times 10^{10}$ ). Nossos dados em CP-ECLPT mostraram-se similares aos descritos por Bubel et al<sup>50</sup> ( $7,0 \times 10^{10}$ ), inferiores aos obtidos por Boomgard et al<sup>51</sup> ( $9,0 \times 10^{10}$ ), mas superiores aos descritos por Kluter et al<sup>45</sup> ( $5,4 \pm 0,9 \times 10^{10}$ ). De acordo com a experiência de Hogman et al,<sup>36</sup> a quantidade de plaquetas obtidas pelo método da ECLP varia consideravelmente conforme o hematócrito do conjunto de CP-ECLP. Uma explicação para as baixas contagens de plaquetas encontradas por alguns autores em CP-ECLP foi atribuída à síndrome denominada "cherry buffy-coat", em que os CP-ECLP que apresentavam coloração vermelho-cereja estavam associados ao acúmulo de O<sub>2</sub>, menor CO<sub>2</sub>, maior pH e menor contagem plaquetária, quando comparados aos CP-ECLP com coloração normal usados como controles.<sup>52</sup>

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

Além da preocupação em reduzir o número de leucócitos de hemocomponentes, com o intuito de diminuir a frequência de reações transfusionais e efeitos imunomodulatórios da transfusão, é importante o tempo em que a leucorredução é realizada, após a coleta do sangue. Estudo de Bordin et al<sup>54</sup> mostra que leucorredução pós-estocagem de produtos sanguíneos pode não ser tão eficiente como a feita no período pré-estocagem na prevenção do efeito promotor de crescimento tumoral das transfusões alogênicas em modelos animais.

A queda do pH e a alteração da morfologia plaquetária (efeito de *swirling*) foram analisadas em nosso estudo. O bicarbonato plasmático é utilizado durante a estocagem dos CP-PRP como principal tampão para estabilizar o pH.<sup>55</sup> Diferentemente do que descreveram Bertolini et al,<sup>42</sup> em que o pH nos CP-ECLP manteve-se, durante o arma-

zenamento, praticamente igual ao observado no primeiro dia de estocagem ( $6,9 \pm 0,13$ ), outros autores, como Boeri et al,<sup>43</sup> observaram uma queda significativa durante a estocagem. O mesmo foi por nós encontrado, principalmente nos CP-ECLPT, sendo o pH no primeiro dia de  $6,9 \pm 0,2$  e no quinto dia foi de  $6,6 \pm 0,2$ . Nos CP-ECLPQ, o pH no primeiro dia de estocagem em nosso estudo ( $7,3 \pm 0,1$ ), apresentou níveis superiores ao do CP-ECLPT ( $6,9 \pm 0,2$ ), praticamente iguais aos observados por Boeri et al<sup>43</sup> ( $7,3 \pm 0,08$ ), similares aos reportados por Kluter et al,<sup>45</sup> ( $7,2 \pm 0,04$ ), mas superiores aos descritos por Muylle e Peetermans<sup>46</sup> ( $7,05 \pm 0,17$ ).

A presença de *swirling* correlaciona-se bem com os valores de pH de CP, sendo um método não-invasivo e que possibilita avaliar visualmente a viabilidade dos CP produzidos.<sup>56,57</sup> Os escores de *swirling* foram maiores nos ECLPQ e PRP ( $3,0 \pm 0,0$ ) que nos CP-ECLPT<sup>2,6</sup> em todos os CP analisados, sendo que Boeri et al<sup>43</sup> encontraram escore de *swirling* maior ou igual a 2,5 em 94% das bolsas avaliadas. O menor escore obtido pelo CP-ECLPT deve-se ao fato de as unidades de plaquetas terem sido obtidas a partir de um conjunto de CLP após período de quarentena de até 24 horas para liberação dos testes sorológicos.

Um das vantagens apontadas para os CP-ECLP é que a remoção dos leucócitos do conteúdo plaquetário é precoce evitando a ativação das plaquetas. A prevenção da ativação plaquetária é importante para adequada função in vivo das plaquetas após a transfusão.<sup>58</sup> Em 1984, Gottschall et al<sup>59</sup> já chamavam a atenção para a importância da quantificação dos leucócitos no controle de qualidade dos CP.

Muitos países na Europa e ao redor do mundo estão em prestes a implementar a leucorredução universal para os CH e CP ou já o fizeram, sempre levando em consideração os benefícios da remoção precoce dos leucócitos desses hemocomponentes para aumentar a segurança transfusional.<sup>60,61,62</sup> Para tanto, controle dos processos e de validação da produção de componentes sanguíneos têm sido desenvolvidos e são cruciais para se atingirem os níveis de leucorredução desejados ( $1$  ou  $5 \times 10^6$  leucócitos residuais).<sup>63,64</sup>

Pietersz et al<sup>65</sup> estudaram os efeitos da preparação de CP-ECLP e a filtração pré-estocagem com o filtro Autostop<sup>TM</sup>, tendo conseguido um nível de leucorredução (leucócitos  $< 1 \times 10^6$ ) em 99% dos CP assim processados. Foi publicado estudo em que foi comparada a eficácia da transfusão de CP-ECLP associados à filtração pré-estocagem e à beira do leito, quando ficou constatado que ambas preparações apresentaram excelente resultados na avaliação da contagem corrigida do incremento plaquetário.<sup>53</sup>

Já existem no mercado sistemas integrados que consistem em uma bolsa, um filtro e um container para a estocagem de plaquetas. Após avaliarem esses sistemas,

van der Meer et al<sup>66</sup> concluíram que conjuntos de CP assim produzidos possuem vários benefícios, como menor sobrecarga de trabalho, facilitando a operacionalização, alertando, entretanto, que nem todas as combinações de filtros e containeres para estocagem de plaquetas mostraram-se adequados. Por fim, recomendaram a validação em cada banco de sangue antes de implantação dessa sistemática na rotina de processamento de hemocomponentes.

Estudo similar publicado por Krailadsiri et al<sup>67</sup> mostrou que os conjuntos de CP-ECLP preparados a partir de uma combinação de três filtros e bolsas para o armazenamento de plaquetas, apesar de serem equivalentes no primeiro dia, diferiram significativamente durante a estocagem em termos de ativação ou microvesiculação das plaquetas.

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

---

#### Abstract

*The most commonly used methods for blood component processing are the "plasma rich in platelets method" (PRP), and the Buffy-coat extraction method (BC). The purpose of this study was to compare these two methods in the processing of blood components. Eighty-eight whole blood units (WB) were processed by the PRP method, 130 blood units were processed by the BC triple blood bag method (BCT) and 215 blood units were collected in quadruple blood bags by the BC method (BCQ) using an automatic extractor. A statistically significant difference was observed in the number in the total Hb per unit of WB between the BCT and BCQ methods ( $p=0.005$ ) and between the BCT and PRP methods ( $p=0.007$ ). There were also statistically significant differences between the BCT and BCQ methods ( $p<0.001$ ) and between BCQ and PRP methods ( $p<0.001$ ) in relation to leukocytes/mL. In the RBC concentrates, we found statistically significant differences between the PRP method and both the BCT and BCQ methods in respect to hematocrit levels, Hb recovery, total Hb, leukocytes, leukocyte depletion, platelets and platelet depletion ( $p<0.001$  in all cases). We also found statistically significant differences between the PRP, BCT and BCQ methods for the volume, platelet recovery, and leukocyte depletion ( $p<0.001$ ) in platelet concentrates. The use of the BC method is qualitatively advantageous as the blood components obtained present a lower quantity of leukocytes and plasma. The BC method with the use of quadruple blood bags for the production of PC from one BC unit is reliable, easy to standardize, allows good reproducibility, as well as*

better utilization of plasma and platelets. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2004;26(3):167-176.

**Key words:** Blood transfusion; leukocytes; Buffy coat; platelet concentrates; leukoreduction.

## Referências Bibliográficas

- Brand A, van de Watering LMG, Claas FHJ. Clinical significance of leukoreduction of blood components. *Vox Sang* 2000;78 (suppl 2): 227-9.
- Blajchman MA. The case for universal WCLP reduction. The Compendium 2000- A selection of short topic presentations from the Technical /Clinical and Scientific Tracks. American Association of Blood Banks Press. Washington, 2000: 433-6.
- Dzik S, AuBuchon J, Jeffries L et al. Leukocyte reduction of blood components. Public policy and new technology. *Transf Med Rev* 2000;14:34-52.
- Brittingham T, Chaplin Jr H. Febrile transfusion reactions caused by sensitivity to donor leukocytes and platelets. *JAMA* 1957; 165:19.
- Chaplin Jr H, Brittingham TE, Casselli M. Methods for preparation of suspensions of Buffy-Coat-Poor red Blood cells for transfusion. *Am J Clin Pathol* 1959;31:373-83.
- Polesky HF. The Emily Cooley Lecture: Leukocyte poor blood, a study in the evolution of component therapy. In: Seminar on Blood Components. American Association of Blood Banks 1977;53.
- Rock G, Baxter A, Gray E. Leukocyte-depleted blood: a comparison of available preparations. *Can Med Assoc J* 1984; 130:1566-1568.
- Greenwalt TJ, Gajewski M, McKenna JL. A new method for preparing Buffy-coat poor blood. *Transfusion* 1962;2:221-9.
- Diepenhorst P, Sprockholt R, Prins HK. Removal of leukocytes from whole blood and erythrocyte suspensions by filtration through cotton wool I. filtration technique. *Vox Sang* 1972; 23:308-20.
- Engelfriet DP, Diepenhorst P, van der Giesen M. Removal of leukocytes from whole blood and erythrocyte suspensions by filtration through cotton wool. IV Immunization studies in rabbits. *Vox Sang* 1975;28: 81-9.
- Reesink HK, Veldman H, Henrichs HJ et al. Removal of leukocytes from blood by fibre filtration. A comparison study on the performance of two commercially available filters. *Vox Sang* 1982;42:281-8.
- Sirchia G, Parravicini A, Rebulli P. Effectiveness of red blood cells filtered through cotton wool to prevent leukocyte production in multitransfused patients. *Vox Sang* 1982;42:190-7.
- Bruil A, Beugeling T, Feijen J et al. The mechanisms of leukocyte removal by filtration. *Transf Med Ver* 1995;9(2):45-66.
- Pieterz RNI, Steneker I, Reesink HW et al. Comparison of five different filters for the removal of leukocytes from red cell concentrates. *Vox Sang* 1992;62:76-81.
- Dzik WH. Leukoreduced blood components: Laboratory and clinical aspects. In: Rossi EC, Simon TL, Moss GS, Gould AS eds. Principles of Transfusion Medicine. Baltimore, MD; Williams & Wilkins. 1996:353-73.
- The trial to reduce alloimmunization to platelets study group. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. *N Engl J Med* 1997;337:1861-9.
- Hillyer CD, Emmens RK, Zago-Novaretti MC et al. Methods for the reduction of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection: filtration versus the use of seronegative donors. *Transfusion* 1993; 39:232-8.
- Popovsky MA. Quality of blood components filtered before storage and at the bedside: Implications for transfusion practice. *Transfusion* 1996;36:470-4.
- Aubuchon JP. Evaluation of a new pre-storage leukoreduction filter for red blood cell units. *Vox Sang* 1997;72:101-6.
- Aye MT, Palmer DS, Giulivi A et al. Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage. *Transfusion* 1995; 35: 117-24.
- Heddle NM, Klama L, Griffith L et al. A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusion. *Transfusion* 1993;33:794-7.
- Heddle NM, Klama L, Meyer R et al. A randomized control trial comparing plasma removal with white cell reduction to prevent reactions to platelets. *Transfusion* 1999;39:231-8.
- Heddle NM, Meyer R, Sher G. A randomized control trial comparing plasma removal to two types of pre storage leukoreduction to prevent reactions to platelets. *Transfusion* 1999;39(suppl):96S.
- Prins HK, de Bruijn JC, Henrichs HP et al. Prevention of Microaggregate formation by removal of "Buffy-coats". *Vox Sang* 1980;39:48-51.
- Hogman CF, Akerblom O, Hedlund K et al. Red cell suspensions in SAGM medium. Further experience in vivo survival of red cells, clinical usefulness and plasma-saving effects. *Vox Sang* 1983;45 (suppl 3):217-3.
- Hogman CF, Erikson L, Hedlund K et al. The Bottom and Top system: A new technique for blood component preparation and storage. *Vox Sang* 1988;55:211-7.
- Pieterz RNI, Loos JA, Reesink HW. Platelet concentrates stored in plasma for 72 hours at 22 °C prepared from Buffy coats of cytrate-phosphate-dextrose blood collected in a quadruple bag saline-adenine-glucose-mannitol system. *Vox Sang* 1985;49:81-5.
- Brasil. Diário Oficial da União. Seção 1. 19 de dezembro de 2002. Resolução RDC nº 343 de 13 de dezembro de 2002, pág. 133-143.
- Bertolini F, Murphy S. A Multicenter inspection of swirling phenomenon in platelet concentrates prepared in routine practice. *Transfusion* 1996;36:128-32.
- Rock GI, Seghatchian MJ. Quality Assurance In Transfusion Medicine. CRC Press. Inc. Volume II. 1992:512p.
- Rosner B. Fundamentals of Biostatistics, PWS Publishers, Massachusetts, 2nd Edition, 1986: 246-251, 442-480.
- Rosner B. Fundamentals of Biostatistics, PWS Publishers, Massachusetts, 2nd Edition, 1986:288-293, 467-472.
- Dumont LJ, Dzik WH, Rebulli P, Brandwein H and the members of the BEST working party of the ISBT. Practical guidelines for process validation and process control of white cell-reduced blood components: report of the biomedical excellence for safer transfusion (BEST) working party of the international society of blood transfusion (ISBT). *Transfusion* 1996;36:11-12.
- Heaton WM, Rebulli P, Pappalera D, et al. A comparative analysis of different methods for routine blood component preparation. *Transfus Med Rev* 1997;11:116-29.
- Cleghorn TE. Platelet collection at Edgware. In: Lister TA, Malpas JS, eds. Platelet transfusion. Lancaster, PA: M.T.P.Press, 1980:p21-8.
- Hogman C, Johansson A. A simple method for the preparation of microaggregate-poor whole blood. *Vox Sang* 1981;40:286-8.
- Pieterz RNI, De Korte HW, Reesink HW, et al. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from Buffy-coats. III Effect of leukocyte contamination on storage conditions. *Vox Sang* 1988;55:14-20.
- Wildt-Eggen J, Bins M, Van Prooijen HC. Evaluation of storage conditions of platelets concentrates prepared from pooled Buffy coats. *Vox Sang* 1996;70:11-5.

39. Kluter H, Schlenke P, Muller-Steinhardt M, et al. Impact of Buffy-coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation. *Transfusion* 1994; 34:881-6.
40. Hurtado C, Bonanand S, Soler MF, et al. Quality analysis of blood components obtained by automated Buffy-coat layer removal with a top & bottom system (Optipress® II). *Haematologica* 2000;85: 390-5.
41. Greenwalt TJ, Sostok CZ, Dumaswala UJ. In red blood preservation. I. Effect of the other formed elements. *Vox Sang* 1990;58:85-9.
42. Bertolini F, Rebulli P, Porreti L, et al. Platelet quality after 15-day storage of platelet concentrates prepared from Buffy-coats and stored in a glucose-free crystalloid medium. *Transfusion* 1992;32:9-16.
43. Boeri N, Saleun S, Pelissier E, et al. Influence of a 12-hour, 22 °C holding period for Buffy coats on the preparation of platelet concentrates stored in plasma. *Transfusion* 1997;37:362-7.
44. Koerner K, Sahmen P, Zimmermann B, et al. In vitro Platelet function during storage in three different additive solutions. *Vox Sang* 1994;67:154-9.
45. Kluter H, Dorges I, Maass E, et al. In vivo evaluation of random donor platelet concentrates from pooled Buffy coats. *Ann Hematol* 1996;73:85-9.
46. Muylle L, Peetermans ME. Effect of prestorage leukocyte removal on the cytokine levels in stored platelet concentrates. *Vox Sang* 1994;66:14-7.
47. Anderson NA, Gray S, Coplestone JA, et al. A prospective randomized study of three types of platelet concentrates in patients with haematological malignancy: corrected platelet count increments and frequency of non haemolytic febrile transfusion reactions. *Transf Med* 1996;6:33-9.
48. Eriksson L, Shanwell A, Gulliskson H, et al. Platelet concentrates in an additive solution prepared from pooled Buffy coats. *Vox Sang* 1993;64:133-8.
49. Eriksson L, Kristensen J, Olsson K, et al. Evaluation of platelet function using the in vitro bleeding time and corrected count increment of transfused platelets. *Vox Sang* 1996;70:69-75.
50. Buble S, Wilhem D, Entelmann M, et al. Chemokines in stored platelets concentrates. *Transfusion* 1996;36:445-6.
51. Boomgaard MN, Jousa-Dijkhuis AM, Gouwerok CWN, et al. In vitro evaluation of platelet concentrates, prepared from pooled Buffy coats stored for 8 days after filtration. *Transfusion* 1994;34:311-6.
52. Rebulli P, Smachia C, Greppi N, Porreti L, Lopa R, Cernuschi M, Sirchia G. The "cherry Buffy-coat syndrome", a cause of decreased platelet yield in platelet concentrates. *Vox Sang* 2001;80:57-60.
53. Bjlachman MA, Bordin JO. Mechanisms of transfusion-associated immunosuppression. *Curr Opin Hematol* 1994; 1: 457-61.
54. Bordin JA, Bardossy L, Blajchman MA. Growth enhancement of established tumors by allogeneic blood transfusion in experimental animals and its amelioration by leukodepletion: the importance of the timing of the leukodepletion. *Blood* 1994;84:334-8.
55. Kilksn HJ, Holme S, Murphy S. Platelet metabolism during storage of platelet concentrates. *Blood* 1984;64:406-14.
56. Fijnheer R, Pietersz RNI, De Korte D, et al. Monitoring of platelet morphology during storage of platelet concentrates. *Transfusion* 1989;29:36- 40.
57. Bertolini F, Murhpy S. A multicenter inspection of swirling phenomenon in platelet concentrates prepared in routine practice. *Transfusion* 1994;36:665-70.
58. Fijnheer R, Veldman HA, van den Eerweght AJM, et al. In vitro evaluation of Buffy-coat derived platelet concentrates stored in a synthetic medium. *Vox Sang* 1991;60:16-22.
59. Gottschall JL, Jhonson VL, Rzd L, et al. Importance of white blood cells in platelet storage. *Vox Sang* 1984;47:101-7.
60. Yomotovian R, Gernsheimer T, Assman SF, et al. WBC reduction in RBC concentrates by pre-storage filtration: multicenter experience. *Transfusion* 2001;41:1030-36.
61. Wallis JP. Leukoreduction vs. Buffy-coat depletion and the safety of blood transfusion. *JAMA* 2003;290(12):1580.
62. Seghatchian J. Universal leucodepletion: an overview of some unresolved issues and the highlights of lessons learned. *Transfus Apheresis Sci* 2003;29(2):105-17.
63. Masse M. Universal leukoreduction of cellular and plasma components: process control and performance of the leukoreduction process. *Transfus Clin Biol* 2001;8:297-302.
64. Pruss A, Kalus U, Radtke H, et al. Universal leukodepletion of blood components results in a significant reduction of febrile non-hemolytic but not allergic transfusion reactions. *Transfus Apheresis Sci* 2004;30(1):41-6.
65. Pieterz RNI, van der Meer PF, Teneker I, et al. Preparation of leukodepleted platelet concentrates from pooled Buffy coats: pre-storage filtration with autostop TMCLP. *Vox Sang* 1999;76:231-6.
66. van der Meer P, Pieterz R, Reesink H. Leukoreduced platelet concentrates in additive solution: an evaluation of filters and storage containers. *Vox Sang* 2001;81:102-7.
67. Kariladsiri P, Seghatchian J, Williamson M. Platelet storage lesion of WBO-reduced, pooled, Buffy coat-derived platelet concentrates prepared in three in-process filter/storage bag combinations. *Transfusion* 2001;41:243-50.

*Avaliação:* Editor e dois revisores externos.

*Conflito de interesse:* não declarado

*Recebido:* 12/03/2004

*Aceito após modificações:* 31/08/2004