Luiz Carlos de Mattos

Estudo de Aloanticorpos Antieritrocitários dos Sistemas Rh, Kell, Beta Maior e Anemia Falciforme Homozigota Politransfundidos

unesp

26

"ESTUDO DE ALOANTICORPOS ANTIERITROCITARIOS DOS SISTEMAS Rh, KELL, KIDD E DUFFY EM PORTADORES DE TALASSEMIA BETA MAIOR E ANEMIA FALCIFORME HOMOZIGOTA POLITRANSFUNDIDOS"

Luiz Carlos de Mattos

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de mestre em Genética no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Area de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus de São José do Rio Preto - SP.

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

630/94

São José do Rio Preto

1993

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum
Professor Titular do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto.

Dedico este trabalho

aos meus pais Eurico e Lydia, pela minha existência;

aos meus irmãos Valmor, Dirceu, Claudionor e Cidinha pelo amor e carinho;

à Cinara, pelo amor e incentivo,

e ao Baby que vai chegar, pela certeza do futuro.

AGRADECIMENTOS

Embora possa cometer alguma injustiça, por esquecimento, ao enumerar todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho, assumo a responsabilidade.

Ao Professor Doutor Paulo Cesar Naoum, pelo meu início na carreira científica, pela amizade e pela orientação.

Aos Doutores Durval Fernando Tricta do CIPOHI da UNICAMP, Antonio Fabron Junior da Faculdade de Medicina de Marília, Rubens Purini da Santa Casa de Misericórdia de São José do Rio Preto e Ivan de Lucena Angulo da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo auxílio na obtenção dos dados e do material biológico analisado.

A Professora Adriana Barbosa dos Santos pela assessoria estatística.

A Doutora Isabel Cristina Tavares, do Banco de Sangue do Hospital de Base de São José do Rio Preto, pela amizade e auxílio.

Ao Doutor Silvano Wendel Neto, do Instituto de Hemoterapia Sírio-Libanês de São Paulo, pelo auxílio na identificação das especificidades dos aloanticorpos antieritrocitários.

Ao Professor Luiz Savério Fochi, pelo auxílio na elaboração do Summary.

Ao Biólogo Marcos Batigaglia, pelo auxílio técnico durante a realização deste trabalho.

Aos Senhores Reni Baptista Rodrigues e Luiz Onivaldo Bizutti, técnicos do Departamento de Ciências Básicas da FARME, pelos cuidados com o material e preparação das soluções utilizadas.

Aos Professores Doutor Haroldo Wilson Moreira e Doutor Milton Artur Ruiz pelas sugestões durante a avaliação da proforma.

A Claudia R. Bonini Domingos, pela amizade, incentivo e apoio.

Aos colegas do Departamento de Ciências Básicas da FARME, pela amizade e respeito.

A Diretoria Executiva da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto, pelo apoio concedido.

Aos pacientes que fizeram parte deste estudo.

A todos, meus agradecimentos.

INDICE

I. INTRODUÇÃO..... 1

I.1. Hemoglobinas normais humanas..... 1

I.1.1. Bioquímica das hemoglobinas humanas..... 1

I.1.2. Genética das hemoglobinas humanas..... 2

I.1.3. Ontogenia das hemoglobinas humanas..... 7

I.2. Hemoglobinopatias..... 7

I.2.1. Talassemia beta maior..... 11

I.2.2. Anemia falciforme homozigota..... 12

I.3. Aloimunização antieritrocitária pós-transfusional em hemoglobinopatias..... 16

I.3.1. Fatores determinantes da aloimunização antieritrocitária..... 22

I.4. Reações imunológicas pós-transfusionais..... 25

I.4.1. Reações hemolíticas imediatas..... 28

I.4.2. Reações hemolíticas retardadas..... 28

I.5. Importância das transfusões nas hemoglobinopatias.... 29

I.6. Grupos Sanguíneos..... 31

I.6.1. Sistema Rh..... 32

I.6.2. Sistema Kell..... 36

I.6.3. Sistema Kidd..... 37

I.6.4. Sistema Duffy..... 39

I.7. Aloantígenos e Aloanticorpos de Grupos Sanguíneos..... 40

I.7.1. Membrana eritrocitária..... 40

I.7.2. Aloantígenos eritrocitários..... 40

I.7.3. Anticorpos..... 42

I.7.4. Sistema Complemento..... 45

I.7.5. Reação de aglutinação..... 49

II. OBJETIVOS..... 53

III. MATERIAL E METODOS..... 55
III.1. Material..... 55
III.1.1. Coleta de sangue..... 55
III.1.2. Identificação dos pacientes..... 56
III.1.3. Laboratórios utilizados para os estudos.... 56

III.2. Métodos..... 56
III.2.1. Preparação da suspensão de hemácias..... 57
III.2.2. Preparação das amostras de soro..... 57
III.2.3. Avaliação dos resultados das reações..... 57
III.2.4. Tipagem ABO..... 60
III.2.5. Tipagem $Rh_o(D)$..... 61
III.2.6. Prova da antiglobulina humana direta..... 62
III.2.7. Prova da antiglobulina humana indireta.... 63
III.2.8. Pesquisa e identificação de aloanticorpos. 65
III.2.9. Teste de autocontrole..... 67
III.2.10. Detecção e identificação de aloanticorpos antieritrocitários..... 68
III.2.11. Métodos enzimáticos..... 70
III.2.12. Esquema para a detecção e identicação de aloanticorpos antieritrocitários..... 72
III.2.13. Análises estatísticas..... 72

IV. RESULTADOS..... 77

V. DISCUSSAO..... 100

VI. CONCLUSOES..... 107

VII. RESUMO..... 109

VIII. SUMMARY..... 111

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... 113

X. APENDICES..... 125

I — INTRODUÇÃO

I.1 - HEMOGLOBINAS NORMAIS HUMANAS

I.1.1 - BIOQUIMICA DAS HEMOGLOBINAS HUMANAS

A hemoglobina humana é uma proteína heterogênea que compreende cerca de 95% das proteínas presentes nos eritrócitos. Sua principal função é o transporte de gases, especialmente o oxigênio. Estruturalmente, apresenta forma globular e oligomérica composta de uma porção proteica, a globina, com 574 aminoácidos, e um grupamento heme (ferroprotoporfirina IX), contendo um átomo de ferro no estado ferroso. Suas dimensões se aproximam de 50 x 55 x 64 ângstrons e seu peso molecular é 64 Kd. Compõe-se de quatro subunidades de cadeias polipeptídicas, sendo duas do tipo alfa (alfa ou zeta), com 141 aminoácidos cada, e duas do tipo beta (beta ou delta ou épsilon ou gama-GLICINA ou gama-ALANINA), com 146 aminoácidos cada (PERUTZ, 1976). Essas cadeias são sintetizadas em diferentes períodos do desenvolvimento: embrionário, fetal e pós-nascimento (WEATHERALL & CLEGG, 1981).

As hemoglobinas presentes nos períodos fetal e adulto são formadas por duas cadeias alfa combinadas com duas cadeias beta (Hb A_1, $alfa_2$-$beta_2$), com duas cadeias delta (Hb A_2, $alfa_2$-$delta_2$) ou cadeias gama (Hb Fetal, $alfa_2$-$gama_2$). A hemoglobina Fetal é heterogênea, pois existem dois tipos de cadeias gama, $gama^G$ e $gama^A$, codificadas por genes separados, as quais diferem no aminoácido que ocupa a posição 136. A presença da hemoglobina Fetal após o nascimento, com ausência de anormalidades hematológicas importantes é denominada Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) (WEATHERALL & CLEGG, 1981).

No período embrionário duas cadeias zeta se combinam com cadeias gama produzindo a Hb Portland ($zeta_2$-$gama_2$), ou com cadeias épsilon, formando a Hb Gower 1 ($zeta_2$-$épsilon_2$). A combinação de cadeias alfa e épsilon forma a Hb Gower 2 ($alfa_2$-$épsilon_2$) (WEATHERALL

& WAINSCOAT, 1985). A heterogeneidade das hemoglobinas decorrente das combinações das diferentes cadeias está representada na figura 1. Em adultos normais a hemoglobina A_1 compreende 97% do total de hemoglobina, a Hb A_2, 2,5% e a Hb Fetal, 0,5% (NAOUM, 1987).

A hemoglobina humana foi uma das primeiras proteínas que tiveram sua estrutura molecular determinada. Esta conquista resultou dos esforços conjuntos de muitos investigadores. A análise cristalográfica com raio X de alta resolução (PERUTZ, 1970), das formas oxi- e desoxi-hemoglobina, revelaram detalhes de sua estrutura espacial e do arranjo das cadeias polipeptídicas. As cadeias alfa e beta apresentam íntimas ligações, as quais permitem movimentos dessas subunidades, para possibilitar a ligação do oxigênio com os grupamentos heme. A estrutura primária das cadeias alfa, beta, gama e delta foram estabelecidas nos anos 60 (KONIGSBERG e cols., 1961). Mais recentemente tornou-se conhecida a estrutura primária das cadeias zeta e épsilon (KAMUZORA & LEHMANN, 1975; GALE e cols., 1979). Esses estudos mostraram que as cadeias alfa e zeta e as cadeias beta, gama e delta apresentam certo grau de homologia. Essa constatação, reforçada por estudos genéticos, conduziu à idéia de que o gene que codifica a porção globínica derivou de duplicações e subsequente divergência de um gene ancestral, há cerca de 450 milhões de anos (SHEN e cols., 1981).

I.1.2 - GENETICA DAS HEMOGLOBINAS HUMANAS

A seqüência de aminoácidos que especifica a porção globina é controlada por genes estruturais específicos, cujos mecanismos reguladores determinam o equilíbrio das concentrações dos diferentes tipos de hemoglobina. O complexo gênico que codifica as cadeias tipo alfa localiza-se no cromossomo 16, onde ocupa aproximadamente 30 kilobases. É composto por três pseudogenes - zeta, $alfa^1$ e $alfa^2$ - que separam o gene zeta dos genes $alfa^1$, $alfa^2$ e $teta^1$ (LAUER e cols., 1980; KAPLAN & DELPECH, 1990; HSU e cols., 1988). No cromossomo 11 localizam-se os genes para as cadeias do tipo beta, que compreendem aproximadamente 60 Kilobases. Um pseudogene $beta^1$ separa os genes épsilon, $gama^G$ e $gama^A$ dos genes delta e beta (WEATHERALL & CLEGG, 1982; WEATHERALL & WAINSCOAT, 1985). As figuras 2 e 3 mostram o

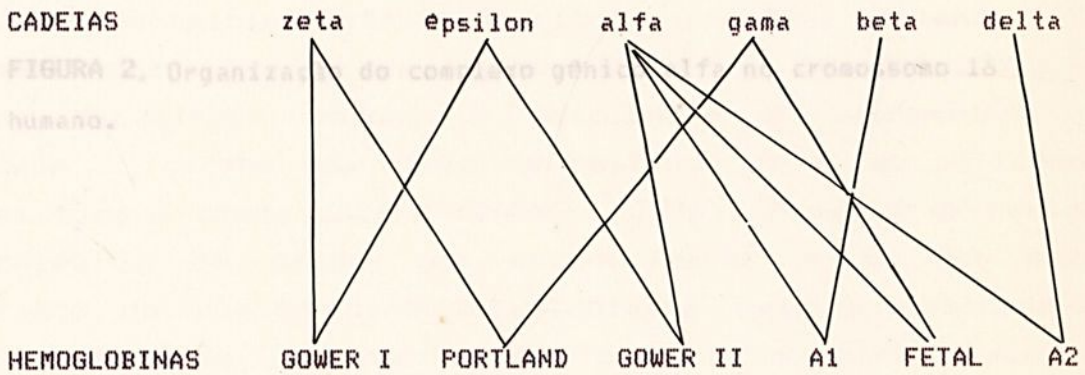


FIGURA 1. A heterogeneidade das hemoglobinas é devida às combinações das cadeias zeta, épsilon, gama, alfa, beta e delta, nos períodos embrionário, fetal e adulto.

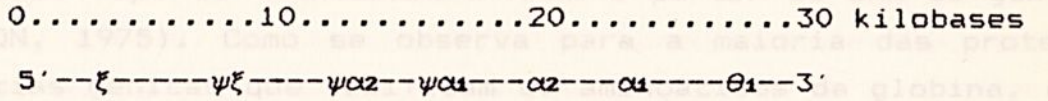


FIGURA 2. Organização do complexo gênico alfa no cromossomo 16 humano.

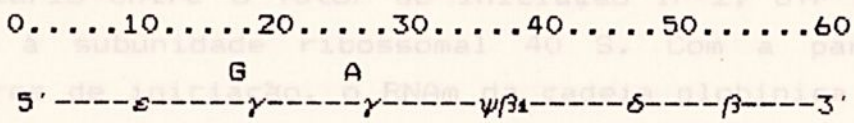


FIGURA 3. Organização do complexo gênico beta no cromossomo 11 humano.

arranjo dos complexos gênicos da globina.

Os vários genes que codificam as cadeias globínicas serão ativados e desligados durante os três períodos do desenvolvimento humano - embrionário, fetal e adulto - conforme a ordem de disposição 5'- 3' nos cromossomos. Os pseudogenes são seqüências homólogas aos genes funcionais, que devido a uma ou mais mutações tornaram-se incapazes de produzir cadeias polipeptídicas funcionais. A síntese das diferentes cadeias inicia-se com a transcrição do RNAm. Dos três tipos de RNA-polimerase identificadas em células de mamíferos, a RNA-polimerase tipo II transcreve o RNAm a partir do DNA do gene globina (CHAMBON, 1975). Como se observa para a maioria das proteínas, as seqüências gênicas que codificam os aminoácidos da globina, ou *exons*, são interrompidas por seqüências de bases não codificadoras, os *introns*. O RNAm inicialmente transcrito, o pré-RNA, contendo *introns* e *exons*, será modificado em suas extremidades 5' e 3'. O ácido guanílico metilado, denominado capuz, é adicionado à extremidade 5'. A extremidade 3' recebe uma série de resíduos de ácido poliadenílico, que constituem a cauda poli-A (DARNEL, 1976). Assim a extremidade 5' fica protegida do ataque de endonucleases e o RNA pode ser transportado do núcleo para o citoplasma pela extremidade 3'. O tamanho do pré-RNAm é maior do que o requerido para a síntese das cadeias globínicas. Um mecanismo de processamento elimina os *introns*, e o RNAm maduro é conduzido até os ribossomos (KINNINBURGH & ROSS, 1979).

A síntese das cadeias globínicas ocorre no citoplasma através de interações do RNAm com os ribossomos, RNAt e vários cofatores. Esse processo inicia-se com a formação de um complexo terciário entre o fator de iniciação IF-2, GTP e $RNAt^{MET}$, o qual se liga à subunidade ribossomal 40 S. Com a participação de outros fatores de iniciação, o RNAm da cadeia globínica e a subunidade maior do ribossomo são adicionados a esse complexo terciário, de maneira que em sua configuração final, o RNAm estará alinhado, com o códon de iniciação AUG em posição oposta ao anticódon UAC do $RNAt^{MET}$ (NIENHUIS & BENZ, 1977; BOUSSIOUS & BERTLES, 1982).

A adição de aminoácidos à extremidade N-terminal determinará o crescimento da cadeia polipeptídica. Pelo menos três estágios distintos estão envolvidos nesse processo. O primeiro é a ligação do códon do aminoacil-RNAt à região do ribossomo próxima

àquela ocupado pelo peptidil-RNAt. O peptídeo transferido se liga entre o aminoacil-RNAt e o RNA^{MET} ou peptidil-RNAt. Finalmente o novo peptidil-RNAt e o RNAm são deslocados da região aceptora para a região doadora no ribossomo. Dessa forma a região aceptora fica livre e o processo pode ser repetido; ao mesmo tempo o RNAt é liberado. Dois fatores proteicos, EF-1 e EF-2, estão envolvidos no processo de elongação. O EF-1 participa na reação GTP-dependente na qual os aminoacil-tRNA se ligam aos ribossomos, enquanto que EF-2 catalisa a etapa de translocação em outra reação dependente de GTP. A metionina N-terminal, incorporada durante a inicição, é removida enzimaticamente da cadeia globínica após a adição de aproximadamente 20 aminoácidos. Os RNAm são longos e podem comportar um número de ribossomos ativos. Se um ribossomo é movido para fora do sítio de iniciação, outro pode se ligar a ele e recomeçar a síntese formando os complexos polirribossomos. A síntese da globina termina quando o ribossomo atinge os códons de terminação UAA, UAG ou UGA (NIENHUIS & BENZ, 1977).

Embora a hemoglobina seja a molécula proteica mais bem estudada, os mecanismos que regulam a expressão dos vários genes para a porção globínica não foram totalmente elucidados. Os avanços na tecnologia das análises de DNA revelaram a presença de regiões promotoras dos genes beta, as quais parecem controlar a expressão desses genes. Essas regiões promotoras da síntese das cadeias de globina, correspondem a seqüências de DNA essenciais que se localizam próximo aos pontos de iniciação da transcrição (NIENHUIS e cols., 1984). Diversos dados da literatura relatam que mutações que afetam os promotores acarretam alterações na expressão gênica e conseqüentemente na síntese das diversas cadeias globínicas (MANIATIS e cols., 1980; FIORI & MACH, 1982; WEATHERALL & CLEGG, 1982; WEATHERALL & WAINSCOAT, 1985; BAIGET, 1990), determinando o aparecimento das hemoglobinopatias. Entretanto, alguns pontos ainda permanecem obscuros, pois a célula parece obedecer um programa previamente determinado e não se sabe quais fatores atuam nesse nível (WEATHERALL & CLEGG, 1981).

I.1.3 ONTOGENIA DAS HEMOGLOBINAS HUMANAS

Os genes que codificam as cadeias globínicas se expressam em diferentes etapas do desenvolvimento.

A hemoglobina Gower 1, composta por pares de cadeias polipeptídicas zeta e épsilon ($zeta_2$-$épsilon_2$), representa o primeiro tipo de hemoglobina que é observada nas quatro semanas iniciais de gestação. As hemoglobinas Portland ($zeta_2$-$gama_2$), e Gower 2 ($alfa_2$-$épsilon_2$) são outras hemoglobinas embrionárias que predominam até a décima segunda semana. Findo esse período cessa a expressão dos genes zeta e épsilon e inicia-se a expressão do gene que codifica a cadeia gama. Ao final da décima quarta semana a Hb Fetal ($alfa_2$-$gama_2$) é predominante, e sua síntese aumenta gradativamente durante todo o período fetal. Entre a décima e a trigésima semana constata-se a presença da Hb A_1 ($alfa_2$-$beta_2$), porém sua concentração não excede 10% (MANIATIS e cols., 1980).

No período neonatal as concentrações das hemoglobinas A_1 e Fetal estão próximas de 20% e 80%, respectivamente. A hemoglobina Hb A_2 ($alfa_2$-$delta_2$) começa a ser produzida a partir da décima segunda semana. Seis meses após o nascimento os níveis de hemoglobinas A_1, A_2 e Fetal estabilizam-se, com valores aproximadamente iguais a 97%, 2,5% e 0,5%, respectivamente (NAOUM, 1987).

I.2 - HEMOGLOBINOPATIAS

As hemoglobinopatias compreendem um grupo heterogêneo de desordens moleculares, nas quais a síntese da hemoglobina pode estar total ou parcialmente suprimida como consequência de alterações nos mecanismos reguladores dos diferentes genes, no número ou tipos de aminoácidos de suas cadeias polipeptídicas, bem como na síntese do grupamento heme (WEATHERALL & CLEGG, 1981).

Atualmente, as hemoglobinopatias são classificadas em **hemoglobinas variantes** e **talassemias.** As hemoglobinas variantes decorrem de anormalidades dos genes estruturais responsáveis pela elaboração da seqüência de aminoácidos que compõe as cadeias globínicas. Dessa forma, mutações nestes genes podem causar a troca de um aminoácido por outro, com características diferentes às do

original, produzindo lesões pouco ou muito extensas na molécula. Algumas mutações podem, inclusive, alterar o desempenho fisiológico da molécula, como por exemplo, o processo falcizante da hemoglobina S (Hb S) (SERJEANT, 1985), e a excessiva formação de metahemoglobina observada nas variantes da Hb M. Outras alterações constatadas na estrutura molecular da hemoglobina podem ser decorrentes da adição de aminoácidos à extremidade C-terminal, e mesmo deleção de alguns resíduos. Hemoglobinas variantes devido à fusão de cadeias também foram identificadas. A Hb Lepore, por exemplo, resulta da fusão das cadeias delta e beta. Muitas mutações não interferem com a fisiologia normal da molécula de hemoglobina, mas mesmo assim certas variantes podem se mostrar instáveis *in vivo* ou quando submetidas ao calor. Essa instabilidade pode ser responsável por alguns casos de anemias hemolíticas agudas ou crônicas (DACIE & LEWIS, 1970; LEHMANN & HUNSTMAN, 1974).

Algumas hemoglobinopatias causadas por hemoglobinas variantes constituem-se num grave problema de saúde para alguns países. Diversas populações como negros, latinos e alguns povos adjacentes ao Mediterrâneo e Oceano Índico apresentam elevada prevalência de doença falciforme, devido ao estado de homozigose da hemoglobina S (WHO, 1984; WINICHAGOON e cols., 1985).

As talassemias são caracterizadas pela redução da síntese de uma ou mais cadeias de globina e classificadas em: alfa, beta, delta-beta e gama-delta-beta. As talassemias alfa e beta são subdivididas em alfa^{o} e beta^{o}, quando as cadeias alfa e beta estão ausentes, e alfa^{+} e beta^{+} quando há presença parcial dessas cadeias. O desbalanceamento na síntese das cadeias alfa e beta determinará o desequilíbrio das concentrações das hemoglobinas do adulto normal (WEATHERALL & WAINSCOAT, 1985).

A ausência total das cadeias alfa, observada na talassemia alfa^{o}, é devida a deleções que removem ambos os genes alfa do cromossomo 16. Esses defeitos podem ocorrer nas formas: homozigota (_ _/_ _) onde se observa hidropsia fetal e 100% de hemoglobina Bart's (Hb Bart's, gama$_4$) devido à tetramerização das cadeias gama; e heterozigota (_ _/alfa-alfa) com 5% a 10% de Hb Bart's. Por outro lado, na talassemia alfa^{+} ocorre a deleção de um gene alfa, porém a síntese parcial de cadeias alfa é assegurada pela presença do outro gene. Esse tipo também ocorre nas formas homozigota (_ alfa/_ alfa) e

heterozigota (_ alfa/alfa-alfa), sendo que em alguns casos a hemoglobina H (Hb H, beta$_4$) pode ou não ser identificada (NAOUM, 1987).

As talassemias alfa^o e alfa$^+$ podem resultar de diferentes defeitos moleculares que afetam o complexo gênico alfa. Dois tipos de mutações que originam as talassemias alfa^o estão bem documentados: o tipo Oriental, no qual verifica-se a deleção dos dois genes alfa, embora os genes zeta estejam presentes e intactos; e o tipo Grego, devido à deleção dos dois genes alfa e um gene zeta, sendo que o outro gene zeta permanece intacto. Essas deleções provavelmente se originaram de um *crossing-over* desigual no cromossomo 16 (WEATHERALL & CLEGG, 1982; NIENHUIS e cols., 1984).

Entretanto, nas talassemias alfa$^+$ o processo é bem mais complexo. Estudos de seqüenciamento de bases do complexo gênico alfa têm mostrado que nem todo fenótipo talassemia alfa$^+$ resulta de deleções. Essas observações possibilitaram a classificação das talassemias alfa$^+$ em dois tipos: com e sem deleção (WEATHERALL & CLEGG, 1982). Vários estudos demonstraram que a síntese parcial de cadeias alfa pode ocorrer devido à instabilidade do RNAm, bem como resultado de mutações sem sentido que interferem a nível de transcrição (FIORI & MACH, 1982; WEATHERALL & CLEGG, 1982).

As talassemias beta compreendem um grupo extremamente diversificado de alterações quantitativas na síntese da cadeia beta, com comprometimento da concentração da Hb A$_1$. Fenotipicamente, são classificadas em talassemia beta^o quando há ausência total da síntese de cadeias beta, e beta$^+$ quando a síntese é parcial. Essas variações quantitativas determinam grande variabilidade na expressividade clínica desses tipos de talassemias. Estudos de seqüenciamento de bases do complexo gênico beta têm demonstrado que a maioria das alterações observadas em sua expressão são decorrentes de mutações que interferem com os níveis de transcrição, com o processamento e a estabilidade do pré-RNAm (MANIATIS e cols., 1980; WEATHERALL & CLEGG, 1982: NIENHUIS e cols., 1984). Mutações sem sentido, muitas das quais afetam um único nucleotídeo originando códons de terminalização na região codificadora, têm sido associadas às talassemias beta^o (FIORI & MACH, 1982; GALANELLO e cols., 1989). No complexo gênico beta têm se descrito deleções que diminuem sensivelmente seu nível de expressão (CURTIN, e cols., 1985).

Mais de 135 diferentes mutações foram identificadas nas talassemias beta e em geral, cada população tende a apresentar tipos predominantes (KAN, 1986; HIUSMAN, 1992).

Os estados de homozigose das talassemias beta$^+$ (beta$^+$/beta$^+$), beta^o (beta^o/beta^o) e de heterozigose (beta+/beta^o), caracterizados por um quadro de anemia hemolítica severa, são conhecidos como Anemia de Cooley, Anemia do Mediterrâneo ou talassemia beta maior. Por outro lado, as condições heterozigóticas com presença de um gene beta normal (beta^A), ou seja beta^A/beta$^+$ e beta^A/beta^o, são demoninadas talassemia beta menor. Esporadicamente, em condições de *stress*, infecções e gravidez, seus portadores apresentam anemia hemolítica. A talassemia beta intermédia, com quadro clínico intermediário entre as formas maior e menor, pode decorrer de interações das talassemias alfa e beta, como também de interações da talassemia beta com alguns tipos de hemoglobinas variantes tais como Hb S, Hb E e Hb C (WAINSCOAT e cols., 1983; WINICHAGOON e cols., 1985; YANG e cols., 1989).

A redução da síntese de cadeias beta ou mesmo sua ausência, proporcionam aos pacientes com talassemia beta maior anemia hipocrômica microcítica, alterações ósseas, deficiências cardíacas, retardo do desenvolvimento e deposição de ferro em vários tecidos. Essas condições reduzem a perspectiva de vida dos indivíduos afetados (WEATHERALL & CLEGG, 1981).

A morbidade e a mortalidade devido às hemoglobinopatias são variáveis pois estas patologias moleculares se apresentam nas formas homozigota, heterozigota e em interações. Entretanto algumas populações de risco estão bem definidas como consequência da marcante prevalência dos genes. Entre os povos de ascendência africana constata-se elevada frequência da anemia falciforme homozigota enquanto que a talassemia beta maior está associada aos povos de origem mediterrânea como italianos, gregos, cipriotas e árabes (WHO, 1984; WININCHAGOON e cols., 1985; HUISMAN, 1990).

A intensa migração de italianos, africanos e ibéricos contribuiu para a prevalência das hemoglobinopatias em nosso território. Diversos estudos populacionais (NAOUM e cols., 1983; NAOUM e cols., 1984; NAOUM, 1984; RAMALHO, 1986; ZAGO, 1986; ARAUJO e cols., 1987; ALVARES e cols., 1988) mostram a marcante heterogeneidade dessas patologias em nosso meio.

I.2.1 - TALASSEMIA BETA MAIOR

Talassemia beta maior é um termo clínico utilizado para designar a anemia grave proveniente do desbalanceamento da síntese das cadeias globínicas beta. Os primeiros relatos dessa patologia foram feitos por Cooley e Lee, em 1925, motivo pelo qual foi conhecida por muito tempo com "Anemia de Cooley" ou "Anemia do Mediterrâneo". Esses autores descreveram cinco casos de anemia crônica grave, com pronunciada eritroblastose, características faciais, icterícia, esplenomegalia, alongamento dos ossos longos e do crânio, com incidência familiar em crianças de origem mediterrânea. Em 1936, Bradford e Wipple descreveram mais casos em pacientes de mesma origem e empregaram o termo talassemia (do grego, talassa = mar), assinalando que as alterações decorriam muito mais de um defeito metabólico do que da anemia hemolítica constatada. Em 1940, Wintrobe e colaboradores relataram uma forma moderada de Anemia de Cooley em 14 membros de três famílias de origem italiana, acreditando tratar-se de uma forma leve dessa patologia. Estudos posteriores, datados de 1949, estabeleceram que a anemia de Cooley ou do Mediterrâneo representava o estado homozigoto, com conseqüências graves, e que a forma moderada correspondia à condição heterozigota, sendo portanto mais branda (WEATHERALL & CLEGG, 1981; WINTROBE e cols., 1981; ARAUJO e cols., 1987).

Atualmente a talassemia beta maior tem uma classificação genética muito ampla, pois os conhecimentos adquiridos sobre a estrutura molecular dos genes que codificam as cadeias globínicas revelaram uma série de diferentes alterações decorrentes de mutações. Os genótipos $beta^{o}/beta^{o}$, $beta^{o}/beta^{+}$ e $beta^{+}/beta^{+}$ são responsáveis pelo quadro de anemia grave encontrado na talassemia beta maior. Devido à ausência total ou parcial das cadeias beta, esses casos são caracterizados pelo nível elevado de Hb Fetal, variando de 20% a 80%. O quadro 1 mostra as diferentes características das talassemias beta maior.

O comprometimento da síntese de cadeias beta é responsável pela anemia hipocrômica microcítica grave, devido à destruição maciça de eritrócitos na medula óssea e no baço. As cadeias alfa em excesso se precipitam, dando origem a corpos de inclusão que danificam as membranas celulares, produzindo hemólise. Há um comprometimento da

eritropoiese pois, para compensar a anemia, dá-se expansão do tecido hematopoiético alterando a estrutura óssea. O glóbulos vermelhos com corpos de inclusão são retirados da circulação pelo baço, fato que determina o desenvolvimento do hiperesplenismo e esplenomegalia. Como conseqüência da excessiva hemólise ocorre aumento da bilirribuna e liberação de ferro que se deposita em vários tecidos (WEATHERALL & CLEGG, 1981; WINTROBE e cols., 1981). Os pacientes nascem aparentemente normais, porém o quadro de anemia pode ser observado logo nos primeiros meses de vida.

A manifestação precoce da talassemia beta maior restringe a expectativa de vida. Muitos pacientes morrem na primeira infância, devido às infecções e deficiências cardíacas, sendo esta última, provocada pela deposição de ferro no miocárdio. Outros fatores que contribuem para a sobrecarga de ferro são as freqüentes transfusões e a acentuada absorção intestinal.

A terapia para a talassemia beta maior, embora ainda insatisfatória, tem por finalidade corrigir a anemia através de múltiplas transfusões. O uso concomitante de drogas quelantes visa eliminar o excessso de ferro, evitando sua deposição no miocárdio, fígado e medula óssea. Entretanto, os riscos são muitos pois as transfusões permitem a transmissão de doenças infecciosas e parasitárias, bem como aloimunização pelos aloantígenos dos grupos sanguíneos menores. Essa prática, embora necessária, enquadrou os pacientes com talassemia beta maior em um grupo de risco para AIDS e hepatite. O tratamento inadequado contribui para a ocorrência de deformidades ósseas devidas à hiperplasia medular, pigmentação marrom da pele, distúrbios cardíacos e endócrinos, atraso do crescimento e da maturação sexual, bem como infecções recorrentes (MODEL & PETROU, 1983; BORGNA-PIGNATI e cols., 1985; ZURLO e cols., 1989).

I.2.2 - ANEMIA FALCIFORME HOMOZIGOTA

A anemia falciforme é caracterizada pela presença de uma hemoglobina anormal, a hemoglobina S (Hb S, $alfa_2$-$beta_2^{GLU--VAL}$), que distorce a forma dos eritrócitos tornando-os suscetíveis à hemólise. Essa patologia foi descrita pela primeira vez em 1910 pelo médico James B. Herrick, ao observar eritrócitos de forma alongada e

QUADRO 1. Características laboratoriais das talassemias beta.

TIPO	HOMOZIGOTO			HETEROZIGOTO		
	SINONIMO	% Hb F	% Hb A_2	SINONIMO	% Hb F	% Hb A_2
beta°	T. maior	100	N ou A	T. menor	N ou A	3,5-7,5
beta+ Medit.	Cooley	20-80	N ou A	T. menor	N ou A	3,5-7,5
beta+ Afric.	T. Interm.	20-40	N ou A	T. menor	N ou A	3,5-7,5
beta+ Silen.	T. Interm.	10-30	A	--------	N	2,5-3,5

T = talassemia N = normal A = aumentada

MODIFICADO DE NAOUM, 1987.

ponteagudos em um estudante da raça negra que sofria severa anemia (STRYER, 1979). Em 1917, Emmel constatou que os eritócitos desses pacientes e de pessoas aparentemente normais tornavam-se alongados *in vitro*. Em meados de 1927, Hahn e Gillespie delinearam *in vitro* as condições que induziam as alterações dos eritrócitos, associando-as principalmente com a baixa pressão de oxigênio. Constataram também que a elevação da pressão de oxigênio revertia, em alguns casos, a forma alterada para a normal (WINTROBE e cols., 1981).

O emprego do termo anemia falciforme ("sickle cell disease") deu-se pela primeira vez em 1922 por Mason. Esse autor havia constatado que algumas características eram comuns entre seus portadores: anemia intensa, icterícia, fraqueza, úlceras dos membros inferiores, reticulocitose, eritrócitos em forma de foice e raça negra (NAOUM, 1987).

No final dos anos 40 Linnus Pauling demonstrou que a hemoglobina dos portadores de anemia falciforme possuia diferente mobilidade eletroforética, quando comparada com a hemoglobina normal. Em 1956, através da técnica de "fingerprint" desenvolvida por Vernon Ingram, revelou-se que essa diferença era devida à substituição do ácido glutâmico pela valina, na posição número 6, da cadeia beta (STRYER, 1979).

A base genética da hemoglobina S é uma mutação no gene que codifica a cadeia beta. Essa mutação substitui a timina pela adenina no nucleotídeo número dois do sexto códon GTG, resultando na troca do ácido glutâmico pela valina. O ácido glutâmico, por ser um aminoácido carregado negativamente, contribui para a repulsão das moléculas de hemoglobina em seu estado oxigenado. A valina, devido à sua condição neutra, permite a polimerização da Hb S em condições de baixa pressão de oxigênio. A Hb S oxigenada se encontra relaxada, com as cadeias beta muito próximas. No estado desoxigenado essas cadeias se afastam permitindo contatos intermoleculares que favorecem sua agregação. Essa polimerização gera cristais denominados tactóides, que crescem longitudinalmente tornando os eritrócitos falcizados (PERUTZ, 1976).

O processo de polimerização parece depender da formação de um núcleo inicial, o qual favorece energeticamente o crescimento longitudinal dos polímeros, com a adição de novas moléculas de Hb S em suas extremidades. Os tactóides, assim gerados, ligam-se à membrana plasmática e alteram a morfologia dos eritrócitos dificultando sua

circulação através dos capilares. Outro aspecto que permite a formação de tactóides é o grau de solubilidade da Hb S. Em condições de desoxigenação a Hb S é 100 vezes menos solúvel que sua forma oxigenada. Essa característica possibilita a formação de um estado de gelificação semi-sólido, cujas moléculas de Hb S presentes se polimerizam. O grau de polimerização está relacionado diretamente com a intensidade da hemólise nos vários síndromes siclêmicos e a tendência para polímeros parece ser o primeiro, mas não o único fator que determina a severidade da doença. Tem-se observado que a Hb S, quando em associação com outras hemoglobinas tais como Hb Fetal e hemoglobina C (Hb C, $alfa_2$-$beta_2^{GLU--LYS}$), tende a não se polimerizar de maneira tão intensa. Altos níveis de Hb Fetal interferem com a polimerização da Hb S, devido à sua maior afinidade com o oxigênio, melhorando o curso clínico da doença. Uma terapia alternativa para pacientes com anemia falciforme consiste na utilização da 5-azacitidina, um análogo da citidina, cujo propósito é ativar o gene que codifica a cadeia gama, e conseqüentemente aumentar a síntese de Hb Fetal. Entretanto, em função de seu potencial carcinogênico, a 5-azacitidina tem sido substituída pela hidroxiuréia (BRITTENHAM e cols., 1985; SERJEANT, 1985; NOGUCHI e cols., 1988).

As interrelações entre o fenótipo clínico, o defeito celular e a presença da Hb S na doença falciforme não foram totalmente definidas e são objeto de muita especulação. Provavelmente, isso seja reflexo da complexidade de sua fisiopatologia que é influenciada, não somente por múltiplos fatores genéticos, mas também pelo marcante efeito pleiotrópico do gene beta^S (HEBBEL, 1991).

A Hb S, quando comparada às outras hemoglobinas instáveis, apresenta pequeno grau de instabilidade. Entretanto, isso é suficiente para provocar danos na membrana dos eritrócitos. A dupla camada de lipídeos perde sua assimetria, expondo moléculas de fosfatidil serina que contribuem para agregação celular. A falcização associada à agregação parece ser fundamental para a adesão eritrocitária ao endotélio . Esse fato conduz ao processo de oclusão vascular na microcirculação, o qual é responsável pelas crises dolorosas que acometem os pacientes. A falência múltipla de órgãos é conseqüência da vasculopatia. Enfarto cerebral, hemorragia intracraniana, retinopatia, priapismo, doença pulmonar aguda e falência renal dentre outras, são as principais causas de morbidade na doença falciforme. Os danos dos

órgãos são progressivos e irreversíveis (POWARS, 1990; FRANCIS & JOHNSON, 1991). A hipofunção esplênica é freqüentemente observada após os seis meses de vida e se constitui na causa mais importante que aumenta a suscetibilidade às infecções (ZAGO, 1989).

A anemia falciforme homozigota representa um grave problema de saúde pública para alguns países, pois sua expressão clínica varia de assintomática até grave, dependendo inclusive de diversos fatores ambientais (TAVARES NETO, 1981; REIDER e cols., 1991).

A doença da hemoglobina SC (Hb SC) é a segunda doença mais freqüente onde se observa o afoiçamento dos eritrócitos. Suas manifestações clínicas são qualitativamente semelhantes àquelas da anemia falciforme homozigota, porém quantitativamente menos graves. Como a hemólise é moderada nos indivíduos com Hb SC, o valor do hematócrito e a viscosidade tendem a ser mais altos. Isto leva à predominância de certas complicações decorrentes da viscosidade sanguínea: necrose asséptica da cabeça do fêmur, hemorragias na retina, episódios pulmonares agudo e hematúria. Os paciente com Hb SC apresentam anemia moderada. Freqüentemente o baço é palpável, mas a icterícia geralmente está ausente. No esfregaço de sangue periférico pode-se verificar células falcizadas (SERJEANT, 1985).

O estado de interação entre a Hb S e a talassemia beta pode ser bastante moderado ou tão grave quanto a anemia falciforme homozigota. Em geral, as manifestações clínicas correlacionam-se à quantidade de Hb A_1 presente. Pacientes com talassemia beta^0/S, e portanto sem Hb A_1, são muito afetados. Por outro lado, a forma talassemia beta$^+$/S é caracterizada pela presença de 20% a 30% de Hb A_1 e mostra menor gravidade (SERJEANT, 1985).

I.3 - ALOIMUNIZAÇÃO ANTIERITROCITARIA PÓS-TRANSFUSIONAL EM HEMOGLOBINOPATIAS

A talassemia beta maior e a anemia falciforme homozigota representam duas das patologias de base hereditária que se difundiram em nosso país através da colonização pelos estrangeiros. A medida que se processou a ocupação de áreas até então desabitadas, ocorreu também a dispersão de portadores das formas heterozigotas destas patologias. A distribuição geográfica da talassemia beta maior e da anemia

falciforme homozigota em território brasileiro é muito ampla e suas freqüências variam de uma região para outra (NAOUM, 1984; SALZANO & TONDO, 1985). Especialmente no Estado de São Paulo, este processo acompanhou a rota de colonização, permitindo a distribuição em seu território, com valores próximos de 3% (NAOUM e cols., 1983; NAOUM e cols., 1984; RAMALHO, 1986).

Os defeitos qualitativos e quantitativos que afetam a síntese da molécula de hemoglobina, observados na anemia falciforme homozigota e na talassemia beta maior respectivamente, contribuem para a diminuição da sobrevida dos eritrócitos. A fragilidade da membrana plasmática e o processo de falcização da hemácia falciforme, aliados à ação do Sistema Fagocitário Mononuclear esplênico, são os principais responsáveis pelo quadro de anemia que se instala nos portadores destas patologias. Hiperplasia medular, alterações ósseas, hiperesplenismo, hepatomegalia e suscetibilidade a infecções são freqüentemente observados (SERJEANT, 1985; WEATHERALL & WAINSCOAT, 1985; FALCÃO & DONADI, 1989).

Os protocolos terapêuticos propostos para estas patologias visam minimizar a sintomatologia. O uso de quelantes e a terapêutica transfusional amplamente empregados, têm proporcionado resultados muito significativos, aumentando a expectativa de vida e melhorando o desempenho social, educativo e sexual de portadores de talassemia beta maior (BORGNA-PIGNATTI e cols., 1985). As transfusões profiláticas empregadas aos portadores de anemia falciforme homozigota destinam-se à diminuição da morbidade na gravidez, ao tratamento de úlceras de perna, crises dolorosas e priapismo, bem como antes de procedimentos cirúrgicos que requeiram anestesia geral (GREENWALT & ZELENSKY, 1984; PIOMELLI, 1985).

Embora a transfusão de sangue homólogo seja indispensável para o tratamento da talassemia beta maior e da anemia falciforme homozigota, sabe-se que certos riscos e efeitos adversos são inerentes a esse procedimento. A transmissão de doenças é correntemente reconhecida pelas comunidades científica e pública como um dos grandes problemas dessa prática. Reações caracterizadas por calafrios, febre e urticária estão muito bem documentadas (HOGMAN, 1988; CONTRERAS & MOLLISON, 1990).

Dentre os efeitos adversos silenciosos que geralmente não apresentam manifestações nem transmissão de doenças infecciosas,

encontra-se a aloimunização antieritrocitária, uma conseqüência das diferenças antigênicas entre doador e receptor.

A aloimunização antieritrocitária é o processo que se caracteriza pela produção de aloanticorpos específicos aos aloantígenos eritrocitários que o receptor não possui, como resultado de transfusões de hemácias não compatíveis, injeções intramusculares de pequenas quantidades de aloantígenos e através da gravidez. A produção de aloanticorpos antieritrocitários leva o receptor a complicações imunológicas tais como hemólise imediata e retardada, fato que diminui o tempo de vida dos eritrócitos transfundidos (PINEDA e cols., 1978, MOORE e cols., 1980; HOGMAN, 1988; CONTRERAS & MOLLISON, 1990). As técnicas de uso rotineiro em Bancos de Sangue limitam-se à caracterização dos aloantígenos dos Sistemas de Grupos Sanguíneos ABO e Rh$_o$(D) entre doador e receptor. Entretanto os aloantígenos de outros sistemas freqüentemente não pesquisados tais como Kell, Kidd e Duffy, além dos leucocitários, plaquetários, glicoproteínas do HLA e proteínas plasmáticas, contribuem para a aloimunização de indivíduos politransfundidos (ECONOMIDOU e cols., 1971; ORLINA e cols., 1978; DAHLKE e cols., 1980; COLES e cols., 1981; GOMES-OLIVA e cols., 1985; REISNER e cols., 1987; VICHINSKY e cols., 1990). Estima-se que o risco de aloimunização do receptor para estes outros aloantígenos eritrocitários é de aproximadamente 1% para cada unidade de sangue transfundida e que a incidência de aloimunização aumenta com as repetidas exposições do receptor aos aloantígenos do doador (KIM, 1983). O quadro 2 mostra a relação entre o número de transfusões e a freqüência de aloimunização em portadores de anemia falciforme homozigota politranfundidos, em um estudo de GOMES-OLIVA e colaboradores, realizado em 1985. Esses autores demonstram que a aloimunização se eleva quando aumenta o número de unidades de sangue transfundidas, provenientes de doadores não selecionados.

A aloimunização em pacientes com doença falciforme proveniente da associação entre as hemoglobinas S e C (Hb SC) chegou a 20,9% devido às múltiplas transfusões (GOMES-OLIVA e cols., 1985). Outro estudo (CASTRO e cols., 1983) documenta uma resposta significativa a aloantígenos eritrocitários em 20% de pacientes com anemia falciforme homozigota politransfundidos, associada ao HLA Bw35. Dados colhidos por COLES e colaboradores (1981), em duas populações

QUADRO 2. Relação entre o número de transfusões e a freqüência de pacientes aloimunizados.

Nº TRANSFUSÕES	ALOIMUNIZADOS			NÃO ALOIMUNIZADOS		
	MASC.	FEM.	TOTAL	MASC.	FEM.	TOTAL
1	0	2	2	1	3	4
2 - 5	0	0	0	7	8	15
6 - 10	1	0	1	2	4	6
11 - 20	1	2	3	3	3	6
mais de 20	2	5	7	8	9	17

QUADRO 3. Números de aloanticorpos antieritrocitários de significado clínico encontrados em 74 pacientes aloimunizados provenientes de diversas regiões da Itália.

REGIÃO	SISTEMAS E ALOANTIGENOS														TOTAL	
	Rh					Kell		Kidd		Duffy		MNSs				
	C	c	D	E	Cʷ	K	Kpᵃ	Jkᵃ	Jkᵇ	Fyᵃ	Fyᵇ	M	N	S	Nº	%
NORTE	1	3	4	10	2	20	4	3	8	1	0	1	0	2	59	43,4
SUL	2	2	3	2	1	4	0	2	1	1	0	0	1	1	20	14,7
SICILIA	2	1	4	3	1	6	0	3	4	1	1	0	0	0	26	19,1
SARDENHA	0	2	1	4	0	10	1	6	2	2	3	0	0	0	31	22,8
TOTAL	5	8	12	19	4	40	5	14	15	5	4	1	1	3	136	
porcentagem de aloac.	35,3					33,1		21,3		6,6		3,7				100

de multitransfundidos, mostraram que 23% dos pacientes com anemia falciforme homozigota estavam aloimunizados, sendo que 3/4 dos aloanticorpos especificos se deviam aos aloantigenos do Sistema Rh (anti-C, anti-E, anti-C^w), e os 1/4 restantes apresentavam aloanticorpos especificos aos Sistemas Kell (anti-K), Kidd (anti-Jk^a) e MNSs (anti-S). Entre os portadores de talassemia maior, 10% encontravam-se aloimunizados, sendo que 50,1% dos aloanticorpos eram especificos aos aloantigenos do Sistema Rh (anti-D, anti-C, anti-C^w), 33,3% anti-K, e 16,7% anti-Fy^a. O quadro 3 mostra os resultados de um amplo estudo multicêntrico, realizado na Itália, envolvendo 1435 pacientes com talassemia beta maior politransfundidos (SIRCHIA e cols., 1985).

Dados da literatura mostram que a freqüência de aloimunização varia consideravelmente. Estudos realizados por ORLINA e colaboradores (1978) relatam que 36% de 50 pacientes com anemia falciforme homozigota que receberam múltiplas transfusões estavam aloimunizados. SARNAIK & LUSHER (1978) e SARNAIK e colaboradores (1986) observaram índices de aloimunização igual a 4,3% e 7,75% em duas populações de pacientes com anemia falciforme, respectivamente. Estudos realizados por COLES e colaboradores (1981) mostraram que 23% dos indivíduos pertencentes a duas populações de politransfundidos, com anemia falciforme homozigota e talassemia beta maior, estavam aloimunizados. Entretanto esses autores não constataram diferenças significativas entre as populações analisadas. Outros estudos observaram que os talassêmicos aloimunizam-se menos freqüentemente, pois nestes as transfusões geralmente iniciam-se antes do primeiro ano de vida devido ao aparecimento dos sintomas da doença (ECONOMIDOU e cols., 1971; FLOSS e cols., 1986; MICHAIL-MERIANOU e cols., 1987; SPANOS e cols., 1990). Essa prática parece permitir o desenvolvimento de um estado de tolerância imunológica aos aloantígenos eritrocitários e leucocitários em função da imaturidade do sistema imune dos neonatos (FLOSS e cols., 1986). E possível que a sobrecarga antigênica devida às transfusões atue em etapas cruciais da maturação dos subgrupos de linfócitos T determinando um estado de baixa responsividade (DeMARTINO e cols., 1985). Essa suposição esta embasada em modelos animais experimentais que provaram que a exposição precoce a antígenos pode causar modificações imunes (FUNG & KÖHLER, 1980). O quadro 4 apresenta um resumo de diversos estudos prévios que avaliaram

QUADRO 4. Resumo dos estudos prévios que avaliaram a aloimunização antieritrocitária na anemia falciforme.

AUTORES	Nº PAC.	Nº ALOAC	Nº PAC. ALOIMUN.	% ALOAC	RISCO ALOIM.
Orlina e cols, 1978	50	36	18	36	6,7 %
Coles e cols, 1981	99	44	23	23	3,0 %
Davies e cols, 1986	34	11	6	18	0,8 %
Sarnaik e cols, 1986	245	29	19	8	0,5 %
Cox e cols, 1988	73	29	22	30	3,2 %

o percentual de aloanticorpos antieritrocitários em pacientes com anemia falciforme homozigota. O risco de aloimunização (número total de aloanticorpos formados/número total de unidades de sangue transfundidas X 100) é apresentado para cada estudo.

Apesar da bibliografia ser muito heterogênea na aplicação dos termos, nesse texto será mantida a designação de aloantígenos para as substâncias de grupo sanguíneo presentes nos eritrócitos humanos, e e aloanticorpos para as glicoproteínas com as quais aqueles reagem especificamente.

I.3.1 - FATORES DETERMINANTES DA ALOMUNIZAÇÃO ANTIERITROCITARIA

A produção de aloanticorpos antieritrocitários depende de vários fatores dentre os quais destacam-se a imunogenicidade do aloantígeno considerado, sua freqüência populacional, intervalo entre as transfusões, número de unidades de sangue transfundidas, idade em que se iniciam as transfusões, sexo, bem como número de gestações (MOLLISON, 1983; REISNER e cols., 1987). Alguns autores têm observado que não há diferenças estatisticamente significativas entre entre os sexos (SARNAIK e cols., 1986; SPANOS e cols., 1990).

A exposição repetida aos aloantígenos através de transfusões determima maior produção de aloanticorpos específicos, devido à resposta imune anamnésica. Esses aloanticorpos podem permanecer por um período longo na circulação, mesmo na ausência de novos estímulos ou seus títulos podem diminuir ao longo do tempo (RAMSEY & LARSON, 1988). Pacientes politransfundidos aloimunizados podem apresentar, inclusive, mais de um aloanticorpo (COLES e cols., 1981; MICHAIL-MERIANOU e cols., 1987; VICHINSKY e cols., 1990). A presença de vários aloanticorpos em pacientes que necessitam de terapêutica transfusional freqüente reduz as chances de obtenção de doadores compatíveis. O quadro 5 mostra algumas misturas complexas de aloanticorpos e a relação com o número de doadores compatíveis.

A imunogenicidade de um antígeno pode ser definida como sua capacidade de estimular resposta imune humoral ou celular (STITES & TERR, 1991). Como os aloantígenos eritrocitários apresentam estrutura molecular muito diversificada, o grau de imunogenicidade também é

variável. Análises de aloanticorpos produzidos por 2209 pacientes politransfundidos, quando somente os Sistemas ABO e Rh eram compatíveis, forneceram um ótimo modelo para o estudo da imunogenicidade dos aloantígenos de outros grupos sanguíneos. Como as freqüências fenotípicas nessa população eram conhecidas, o número máximo de aloanticorpos esperado para uma dada especificidade pode ser calculado, assumindo que a formação do aloanticorpo ocorreu toda vez que o aloantígeno foi introduzido no receptor. A relação entre o número de aloanticorpos observado e o número máximo esperado representou um índice da relativa imunogenicidade do aloantígeno (QUADRO 6). De acordo com o seu grau de imunogenicidade, os aloantígenos puderam ser classificados na seguinte ordem decrescente: **D, K, c, E, Fy^a** e **Jk^a** (SALMON e cols., 1984).

A freqüência populacional do aloantígeno é outro fator que contribui decisivamente para o processo de aloimunização. Os aloantígenos k(cellano) e **K$_p^b$** são de alta freqüência populacional (91% e 99%) e raramente induzirão aloimunização em pacientes politransfundidos. O aloantígeno **K** (Kell) é encontrado em 8 a 9% da população caucasiana, e portanto as chances de um paciente K negativo receber sangue K positivo será de 1 em cada 11 a 12 unidades. Por outro lado o aloantígeno **Fy^a** do Sistema Duffy, é encontrado em dois terços da população caucasiana. Assim, duas de cada três unidades de sangue recebida por um paciente Fy(a$^-$) são provavelmente Fy(a$^+$). Mesmo assim o aloanticorpo anti-K é mais comum que anti-Fy^a. Essa diferença é devida à baixa imunogenicidade do aloantígeno Fy^a (MOLLISON, 1983).

Segundo SALMON e colaboradores (1984), seis pontos fundamentais devem ser considerados na aloimunização por transfusão:

1 - o sexo feminino torna-se aloimunizado duas vezes mais que o masculino (26% x 13%), qualquer que seja o número de unidades de sangue transfundidas;

2 - a aloimunização parece ser mais freqüente em certas doenças como cirrose hepática e linfomas, devido provavelmente a uma profunda disfunção do sistema imune;

3 - aloimunização múltipla pode bloquear a possibilidade de novas transfusões;

4 - pacientes com fenótipos chamados silenciosos, tais como K$_o$, Lu(a-b-), Jk(a-b-) ou sem aloantígenos de alta freqüência

QUADRO 5. Misturas complexas de aloanticorpos observadas em pacientes politransfundidos.

CASOS	ALOANTICORPOS	Nº DOADORES COMPATIVEIS
1	anti-D + C + K + Fy^a	5/10.000
2	anti-c + Jk^b	4/10.000
3	anti-c + E + S + Jk^a	2/10.000
4	anti-D + S + Fy^a + Lu^a	2/10.000
5	anti-e + S + Fy^a	3/100.000
6	anti-e + Fy^a + Jk^b	1/100.000

SALMON e cols., 1984.

QUADRO 6. Imunogenicidade de alguns aloantigenos de grupo sanguíneo medida através da produção de aloanticorpos específicos.

ESPECIFICIDADE	ESPERADO		OBSERVADO	RELAÇÃO OBSERVADO/ESPERADO
	%	Nº	Nº	
Anti-K	6,5	143	50	0,35
Anti-E	21	463	37	0,08
Anti-c	13,5	298	15	0,05
Anti-Jk^a	19	419	14	0,033
Anti-Fy^a	23	508	8	0,015

MODIFICADO DE SALMON e cols., 1984.

populacional, podem se tornar aloimunizados rapidamente mesmo diante da primeira transfusão;

5 - os títulos dos aloanticorpos podem se elevar e declinar, dependendo da freqüência dos estímulos antigênicos; portanto, os resultados dos testes de compatibilidade e o *screening* para aloanticorpos devem ser considerados em relação à história transfusional e de gravidez.

6 - os primeiros aloanticorpos que aparecem em pacientes politransfundidos são anti-HLA.

Embora o polimorfismo encontrado nos sistemas de aloantígenos de grupos sanguíneos seja representativo, não se constitui no único obstáculo para a troca de sangue entre humanos e animais. A presença de aloanticorpos *naturais* como anti-A, anti-B, anti-Le^a e anti-H representa a primeira barreira para as transfusões. Os aloanticorpos naturais são produzidos após o nascimento e apresentam comportamento térmico variável, podendo ser detectados em temperaturas inferiores a 37°C. Por esse motivo são denominados *anticorpos frios*. A aloimunização por gravidez e ou pós-transfusional permite a produção de aloanticorpos *imunes*, como os específicos dos Sistemas Rh, Kell, Kidd e Duffy. Esses aloanticorpos possuem comportamento diferente dos naturais, pois geralmente reagem em temperatura de 37°C, razão pela qual são chamados de *anticorpos quentes*. Geralmente não aglutinam eritrócitos *in vivo*, sendo por isso chamados de anticorpos *incompletos*, *bloqueadores* ou *irregulares*. A detecção desses aloanticorpos imunes é feita *in vitro*, pela prova de antiglobulina humana (BEIGUELMAN, 1983).

I.4 - REAÇÕES IMUNOLÓGICAS PÓS-TRANSFUSIONAIS

As reações imunológicas pós-transfusionais clássicas ocorrem quando eritrócitos incompatíveis são transfundidos em pacientes previamente aloimunizados. Os aloanticorpos formados podem ser detectados *in vitro*, antes dos procedimentos transfusionais, através de ensaios de aglutinação. Muitos desses aloanticorpos fixam complemento. Isso acelera a destruição dos eritrócitos na circulação, determinando hemólise intravascular, bem como contribui para a opsonização e fagocitose das células transfundidas no fígado e

baço (hemólise extravascular) (HOGMAN, 1988). A figura 4 mostra, comparativamente, a destruição eritrocitária extravascular por aloanticorpos isoladamente e em associação com o complemento.

A concentração de aloanticorpos no plasma, a classe ou a subclasse a que pertencem, capacidade de fixação do complemento, o volume de eritrócitos transfundidos e o número de epitopos antigênicos nas hemácias podem contribuir para a ocorrência de reações pós-transfusionais em maior ou menor intensidade (SALMON e cols., 1984). Muitos dos aloanticorpos são de classe IgG e não podem ser detectados por uma simples reação de aglutinação *in vitro*. Faz-se necessário o uso da antiglobulina humana (soro de Coombs), que detecta aloanticorpos imunes fixos às hemácias, que reagem em 37ºC. Estes são de grande significado clínico pois contribuem para destruição retardada de eritrócitos. O siginificado clínico de um aloanticorpo está embasado na sua capacidade de desencadear reações hemolíticas pós-transfusionais imediatas ou retardadas, com fixação do Complemento, devido à reação com seu aloantígeno correspondente em temperatura de 37ºC. Aloanticorpos que causam hemólise imediata são na maioria das vezes anti-A e/ou anti-B e mais raramente anti-P, que pertencem à classe IgM e fixam complemento pela via clássica. Outros aloanticorpos que fixam complemento, porém a eliminação dos eritrócitos ocorre no baço, são epecíficos aos seguintes Sistemas: Kell (anti-K), Duffy (anti-Fy^a, anti-Fy^b), Kidd (anti-Jka, anti-Jkb) e Lewis (anti-Le^a, anti-Le^b). Diante de altos títulos de aloanticorpos imunes, fixadores de complemento, o processo de eliminação dos eritrócitos é mais rápido e os sintomas podem lembrar aqueles causados pela hemólise intravascular (HOGMAN, 1988). Nos Estados Unidos a lei exige que as mortes relacionadas com transfusão sejam relatadas no "Office of Biologics" da "Food and Drugs Administration". Entre 1976 e 1979, foram relatadas 110 fatalidades, sendo 63 devidas às reações hemolíticas pós-transfusionais. Neste mesmo período, os hospitais americanos tranfundiram cerca de 37 milhões de unidades de sangue, dando uma taxa de mortalidade de 0,00023%. Das 63 mortes ocorridas, 47 foram devidas à incompatibilidade no Sistema ABO, 4 devidas a erros na tipagem sanguínea e 5 conseqüentes a tranfusões de emergência, cujo sangue administrado não havia sido previamente cruzado. Os 7 casos restantes foram devidos a aloanticorpos formados devido a transfusões anteriores (HONIG & BOVE, 1980).

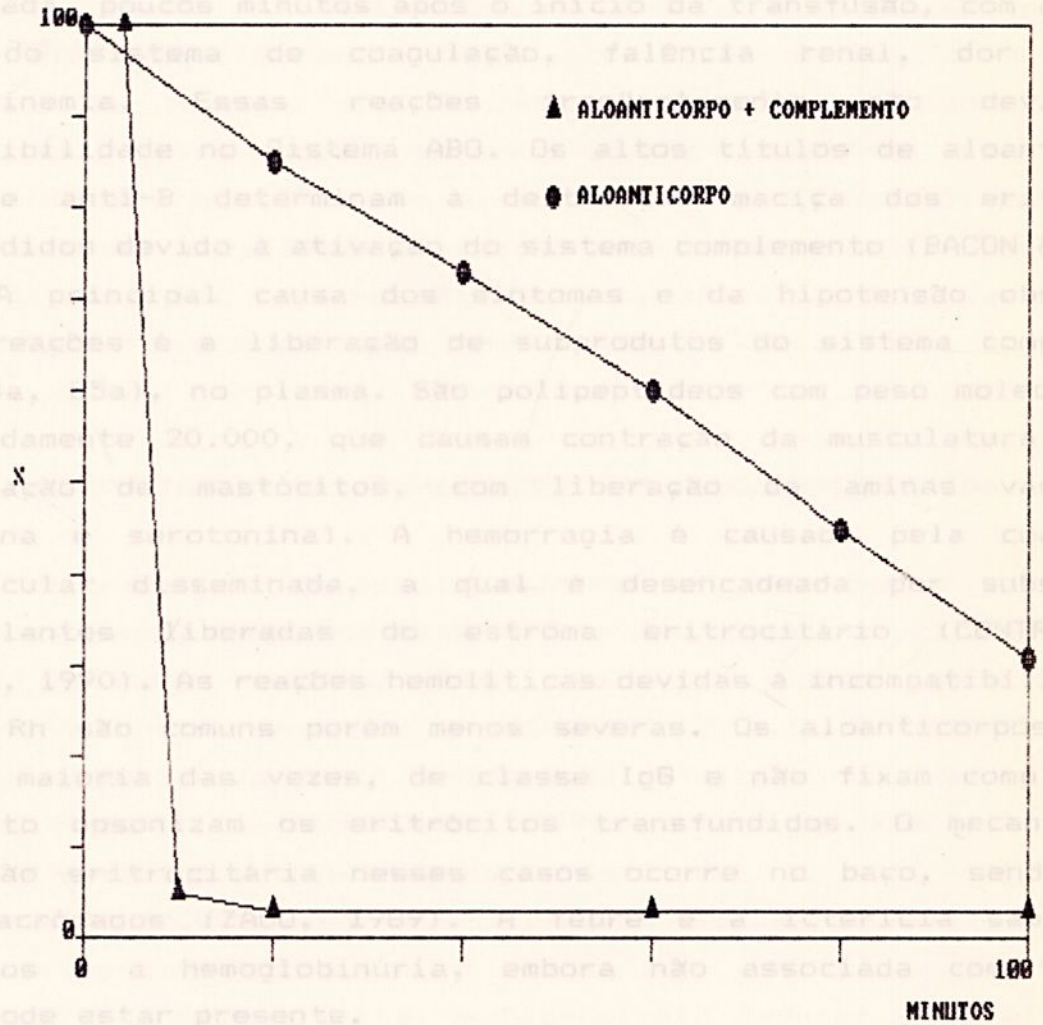


FIGURA 4. Destruição eritrocitária extravascular sob ação de aloanticorpos isoladamente e com fixação do complemento.

Dois tipos de reações imunológicas pós-transfusionais estão muito bem documentadas: as **imediatas** e as **retardadas**.

I.4.1 - REAÇÕES HEMOLITICAS IMEDIATAS

As reações imediatas provocam hemólise intravascular disseminada, poucos minutos após o início da transfusão, com ativação maciça do sistema de coagulação, falência renal, dor lombar, hemoglobinemia. Essas reações freqüentemente são devidas à incompatibilidade no Sistema ABO. Os altos títulos de aloanticorpos anti-A e anti-B determinam a destruição maciça dos eritrócitos transfundidos devido à ativação do sistema complemento (BACON & YOUNG, 1989). A principal causa dos sintomas e da hipotensão observados nessas reações é a liberação de subprodutos do sistema complemento (C3a, C4a, C5a), no plasma. São polipeptideos com peso molecular de aproximadamente 20.000, que causam contração da musculatura lisa e degranulação de mastócitos, com liberação de aminas vasoativas (histamina e serotonina). A hemorragia é causada pela coagulação intravascular disseminada, a qual é desencadeada por substâncias procoagulantes liberadas do estroma eritrocitário (CONTRERAS & MOLLISON, 1990). As reações hemolíticas devidas à incompatibilidade no sistema Rh são comuns porém menos severas. Os aloanticorpos anti-D são, na maioria das vezes, de classe IgG e não fixam complemento. Entretanto opsonizam os eritrócitos transfundidos. O mecanismo de destruição eritrocitária nesses casos ocorre no baço, sendo feito pelos macrófagos (ZAGO, 1989). A febre e a ictericia são sinais observados e a hemoglobinúria, embora não associada com falência renal, pode estar presente.

I.4.2 - REAÇÕES HEMOLITICAS RETARDADAS

Muitas das complicações transfusionais podem ocorrer algum tempo após ter se completado a transfusão. O efeito adverso mais comum de desenvolvimento tardio é a reação hemolítica retardada, na qual aloanticorpos presentes no receptor reagem com os eritrócitos transfundidos 2 ou mais dias após a transfusão. Sua incidência foi

estimada em 1 em cada 4000 unidades de sangue transfundidas (MOORE e cols., 1980). Posteriormente à transfusão de eritrócitos incompatíveis, observa-se um aumento do título dos aloanticorpos devido à resposta imune humoral anamnésica. Segue-se a hemólise com febre, diminuição da concentração da hemoglobina, icterícia e hemoglobinúria por um período de 5 a 10 dias. Obviamente, as manifestações clínicas são muito variáveis, indo desde a simples presença do teste de antiglobulina humana direto com resultado positivo até falência renal. Nessa modalidade de reação os efeitos raramente são fatais, mas a febre resultante, a anemia e as complicações renais podem agravar outros problemas clínicos do paciente (HARMENING, 1992). Os aloanticorpos que frequentemente estão envolvidos nessa modalidade de reação apresentam especificidades para os aloantígenos dos Sistemas Rh (anti-c, anti-E), Kell (anti-Kell), Duffy (anti-Fy^a) ou Kidd (anti-Jk^a) (HOGMAN, 1988).

I.5 - IMPORTANCIA DAS TRANSFUSÕES NAS HEMOGLOBINOPATIAS

A transfusão de sangue pode ser aplicada com grande sucesso após a descoberta dos Sistemas ABO e Rh. Seus princípios básicos sofreram grandes modificações com a adoção de esquemas hipertransfusionais. Segundo o PROTOCOLO PARA O TRATAMENTO DA BETA TALASSEMIA, publicado pela Associação Italiana de Hematologia e Oncologia Pediátrica (AIEOP) em 1990, a grande aceitação desses esquemas é devida aos seguintes aspectos:

1 - o paciente pode desenvolver atividades físicas normais e apresenta melhora do crescimento;

2 - reduzem a anóxia crônica, a hiperplasia medular e as alterações ósseas;

3 - promovem a redução da hipervolemia secundária à hiperplasia medular e conseqüentemente a sobrecarga cardíaca;

4 - retardam o desenvolvimento da esplenomegalia e hiperesplenismo, devido à redução do número de células contendo precipitados de cadeia alfa que alcançam o baço.

O protocolo publicado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1985), para o tratamento da talassemia propõe que, de posse do diagnóstico e com níveis de hemoglobina em torno de 7 g/dl por uma

semana ou mais e na ausência de infecções por exemplo, o programa transfusional deve ser iniciado. O volume de sangue a ser transfundido deve ser suficiente para alcançar os niveis de hemoglobina desejados. O hematócrito deve ser mantido em torno de 27% e o intervalo entre as transfusões deve ser de quatro a cinco semanas. A terapêutica transfusional deverá ser restrita para os casos com indicação especifica, e faz-se necessário o cumprimento das seguintes normas:

1 - todo paciente deve ser tipado para os antigenos comuns dos sistemas Rh, Kell, Kidd e Duffy;

2 - todo paciente deve ser transfundido com sangue compativel para os sistemas ABO e Rh e monitorado para o aparecimento de aloanticorpos antieritrocitários;

3 - antes de cada transfusão deve ser feito o *cross-match* e o *screening* para a detecção de aloanticorpos antieritrocitários, usando-se painel de eritrócitos que possua antigenos importantes em dose dupla e as hemácias do próprio paciente, em teste de antiglobulina.

4 - se comprovada a presença de aloanticorpos, o paciente deve ser transfundido com hemácias compativeis com os antigenos de relevância, e se possivel com os antigenos comuns dos Sistemas Rh, Kell, Kidd e Duffy, os quais constituem a principal causa de aloimunização. Em seguida deve ser realizada a pesquisa de aloanticorpos por um tempo indefinido, pois um terço dos pacientes produz mais que um aloanticorpo, e um quinto, mais que dois, o que vem a tornar dificil a escolha do sangue compativel.

5 - é aconselhável que o Centro Transfusional organize um banco de dados que contenha as informações relativas aos doadores e ao acompanhamento longitudinal dos pacientes imunizados, de modo a garantir um adequado tratamento transfusional para cada paciente.

6 - para pacientes que não formam aloanticorpos, o que corresponde a aproximadamente 90% dos talassêmicos homozigotos, não são necessários os exaustivos estudos pré-transfusionais, sendo suficiente aplicar sangue compativel para os Sistemas ABO e Rh, pois eles dificilmente apresentarão aloimunização. Para esses pacientes é suficiente realizar uma prova cruzada em solução de baixa força iônica, que inclua também um teste de autocontrole.

Estes procedimentos visam minimizar os riscos de aloimunização bem como a ocorrência de reações pós-transfusionais, garantindo maior aproveitamento do sangue transfundido.

Diante do elevado polimorfismo observado nos grupos sanguíneos, torna-se difícil a obtenção de unidades de sangue totalmente compatíveis entre doador e receptor em todos os sistemas. Portanto, mesmo nas transfusões esporádicas, se faz necessário a realização da prova cruzada maior, com soro do receptor e eritrócitos do doador (WHO, 1985). Especialmente para pacientes aloimunizados, a identificação da especificidade do aloanticorpo formado é muito importante. Se um paciente é O Rh^- e apresenta-se aloimunizado com anti-K, anti-Fy^a e anti-Jk^a, por exemplo, esses aloanticorpos poderão causar sérias complicações. Nesse caso, o paciente deverá ser transfundido com sangue O Rh^-, K^-, Fy(a-), Jk(a-). Como essa combinação está presente em cerca de 1% da população, dificultará a obtenção de sangue compatível (HOGMAN, 1988).

Há muito debate sobre a real necesidade de se realizar estudos imunohematológicos detalhados, tipando-se outros aloantígenos além daqueles dos Sistema ABO e Rh, em pacientes que recebem múltiplas transfusões. BLUMBERG e colaboradores (1984) estudaram 1010 pacientes politransfundidos e constataram uma freqüência de aloanticorpos de importância clínica igual a 3%. Como os índices de morbidade e mortalidade devidos a esses aloanticorpos são muito baixos, esses autores entendem que a identificação de outros aloantígenos, além dos Sistemas ABO e $Rh_o(D)$, torna o custo transfusional muito elevado. Estudos realizados por AMBRUSO e colaboradores (1987) demonstraram que a caracterização de vários aloantígenos eritrocitários, embora onerosa, se traduziu em grande benefício para os pacientes com anemia falciforme homozigota politransfundidos. Com a utilização de doadores selecionados esses autores constataram que os riscos de aloimunização nesses pacientes diminuem sensivelmente em comparação com doadores não selecionados (QUADRO 7).

I.6 - GRUPOS SANGUÍNEOS

Muitos dos componentes do plasma e dos eritrócitos são amplamente utilizados como marcadores genéticos, servindo para diferenciar o sangue de indivíduos da mesma espécie. Entretanto o termo "grupos sanguíneos" ainda está restrito à descrição das diferenças antigênicas detectadas na superfície dos eritrócitos,

através de anticorpos específicos. Macromoléculas encontradas nas secreções de indivíduos, da mesma ou de diferentes espécies, apresentam especificidades sorológicas relacionadas aos antígenos dos eritrócitos e são denominadas "substâncias de grupo sanguíneo" (GIBLETT, 1977).

Na espécie humana é possível destacar quinze sistemas independentes de grupos sanguíneos bem definidos, cada um constituído por aloantígenos que são codificados por um locus ou loci gênicos intimamente ligados. Alguns aloantígenos são encontrados em praticamente todos os indivíduos sendo, por isso, denominados *públicos*. Outros, devido sua raridade, são designados *privados*. Apenas os aloantígenos dos sistemas eritrocitários ABO, Lewis e P estão bioquimicamente bem caracterizados (WATKINS, 1980). A natureza química dos aloantígenos dos sistemas Rh, Kell, Kidd e Duffy permanece parcialmente elucidada (SALMON e cols., 1984; AGRE & CARTRON, 1991).

Dada a importância dos aloantígenos dos sistemas Rh, Kell, Kidd e Duffy na aloimunização em pacientes politransfundidos, somente esses sistemas serão abordados.

I.6.1 - SISTEMA Rh.

A descoberta do Fator Rh no início dos anos 40 foi, sem dúvida, o acontecimento que despertou grande interesse na medicina, pois permitiu a solução de dois consideráveis problemas de grande importância clínica até então inexplicáveis: a doença hemolítica perinatal e as reações hemolíticas pós-transfusionais em indivíduos com o sistema ABO compatível. Além disso, este sistema proporcionou importantes avanços nas técnicas sorológicas vinculadas à pesquisa de aglutininas e aglutinogênios. Contribuiu ainda para a descoberta dos anticorpos incompletos ou bloqueadores e permitiu a classificação da espécie humana em dois grupos: Rh positvo e Rh negativo (ISSIT, 1985).

Esse sistema, o segundo de maior importância depois do ABO, mostrou-se inicialmente simples. Atualmente são conhecidas mais de 40 variantes antigênicas (STITES & TERR, 1991). Os 5 principais aloantígenos (D, C, c, E, e) localizados na membrana do eritrócito, podem ser reconhecidos por soros específicos.

QUADRO 7. Influência de doadores selecionados e não selecionados na aloimunização em 12 pacientes com anemia falciforme homozigota em regime de transfusão crônica.

PACIENTES	DOADORES NÃO SELECIONADOS		DOADORES SELECIONADOS	
	Nº TRANF.	ALOANTICORPOS	Nº TRANSF.	ALOANTICORPOS
1	70	Anti-Le^a	229	Anti-C+K
2	22		174	Anti-C
3	25	Anti-E	200	
4	99	Anti-E+K	192	
5	4	Anti-E	143	
6	12		135	
7	2		91	
8	140	Anti-Fy^a+K+C+Jk^b+E	70	
9	37	Anti-C+E	39	
10	17		16	
11	41	Anti-C+D+S	33	
12	23	Anti-K	25	Anti-Kp^a
TOTAL	492	17	1347	4

AMBRUSO e cols., 1987.

A divisão em dois grupos, Rh positivo e Rh negativo, está embasada na presença do aloantigeno **D**, o qual é encontrado em cerca de 85% dos caucasóides. Esse aloantigeno é altamente imunogênico, sendo considerado o responsável maior pelos casos de aloimunização materno-fetal e transfusional. A maioria dos casos de doença hemolítica perinatal, inclusive com hidropsia fetal, foram descritos em crianças Rh positivas, geradas por mães Rh negativas. O aloantigeno antitético **d**, bem como o aloanticorpo anti-d não foram identificados até o presente. Os aloantigenos menores **C**, **c**, **E** e **e**, também antitéticos, podem ser detectados tanto em eritrócitos Rh positivos quanto negativos (SALMON e cols., 1984).

Raros indivíduos que não possuem os aloantigenos do Sistema Rh são referidos como Rh_{null}. Como seus eritrócitos apresentam inúmeras anormalidades tais como pleomorfismo, esferocitose e elevada sensibilidade osmótica, foi sugerido que essas moléculas desempenham importante papel na fisiologia da membrana nessas células (AGRE & CARTRON, 1991).

As bases genéticas do Sistema Rh estão sendo intensamente investigadas. Análises das seqüências de bases do cromossomo 1 tem evidenciado que esse sistema é controlado por dois genes ligados que que codificam inúmeras especificidades antigênicas (AGREE & CARTRON, 1991; COLIN e cols., 1991). Entretanto, neste texto serão utilizadas as duas nomemclaturas tradicionais aceitas pela comunidade científica há mais de 40 anos.

Pela nomemclatura de Wiener, oito alelos múltiplos R_o, R_1, R_2, R_z, r, r', r'' e r^y, codificam diferentes especificidades antigênicas. Por outro lado, Fisher postulou a existência de 3 *loci* estreitamente ligados, localizados no cromossomo 1 (COLIN e cols., 1991), ocupados por três pares de alelos (**D**, **d**, **C**, **c**, **E**, **e**). Exceto o alelo **d**, os demais codificam aloantigenos com diferentes graus de imunogenicidade (MOLLISON, 1983; SALMON e cols., 1984). Embora as nomenclaturas de Wiener e Fisher expressem concepções teóricas diferentes, ambas são utilizadas na prática. Assim, para cada alelo da de Wiener, Fisher admite três *loci* ligados, constituindo um haplótipo. O quadro 8 mostra a correspondência entre as diferentes notações.

A teoria de Fisher parece mais satisfatória sendo quase que unanimemente aceita. Na Conferência de Hematologia e Rh realizada em Dallas, em 1946, a teoria de Fisher foi considerada a mais apropriada

QUADRO 8. Correspondência entre as nomenclaturas de Wiener e Fischer-Race para o Sistema Rh.

NOTAÇÃO DE FISHER-RACE		NOTAÇÃO DE WIENER			FREQUENCIAS	
HAPLOTIPOS	ALOANTIGENOS	ALELOS	AGLUTINOG.	FATORES	BRANCOS	NEGROS
cDe	c, D, e	R^o	Rh_o	Rh_o,hr',hr''	0,064	0,374
CDe	C, D, e	R^1	Rh_1	Rh_o,rh',hr''	0,425	0,181
cDE	c, D, E	R^2	Rh_2	Rh_o,hr',rh''	0,148	0,146
CDE	C, D, E	R^z	Rh_z	Rh_o,rh',rh''	0,008	0,013
cde	c, e	r	rh	hr',hr''	0,335	0,245
Cde	C, e	r'	rh'	rh',hr''	0,015	0,038
cdE	c, E	r''	rh''	hr',rh''	0,005	0,003
CdE	C, E	r^y	rh_y	rh',rh''	0,000	0,000

ADAPTADO DE BEIGUELMAN, 1983.

para estudos sorológicos e genéticos, porém no ano seguinte o Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos chegou à conclusão que ambas devem ser usadas; como a nomenclatura de Wiener tem prioridade, deve aparecer em primeiro lugar, seguida da de Fisher, entre parênteses (LIMA e cols., 1985).

A complexidade atualmente observada no sistema Rh decorreu da descoberta de formas variantes dos aloantígenos. Esta constatação levou à suposição de que existem outros alelos. Foi encontrada uma forma variante do aloantígeno **D**, **D^u**, cuja importância prática é considerável. Detectada somente pelo teste de antiglobulina humana (Soro de Coombs), devido à sua reação fraca com soros anti-D, esta variante pode passar despercebida e o sangue ser classificado erroneamente como Rh negativo. **D^u** pode aloimunizar indivíduos Rh negativos por transfusão ou gravidez, com produção de anti-D. O aloantígeno **C^w**, uma variante de **C**, é codificado pelo alelo *C^w*. O aloanticorpo anti-C^w, embora possa ser produzido pelos indivíduos *CC*, é freqüentemente encontrado no soro de pessoas *cc* aloimunizadas (MOLLISON, 1983; SALMON e cols., 1984; STITES & TERR, 1991).

I.6.2 - SISTEMA KELL

A elevada imunogenicidade do aloantígeno **K** (Kell) tornou o Sistema Kell importante no estudo da compatibilidade sanguínea. Esse aloantígeno está associado à aloimunização por gravidez ou transfusão (FARR & GRAY, 1988).

Os aloantígenos **K** e **k** (cellano) são sintetizados a partir de um precursor molecular denominado substância Kx, codificada por um gene ligado ao cromossomo X (SALMON e cols., 1984). Raros indivíduos com ausência da substância Kx são referidos como fenótipo MacLeod. Apresentam acantocitose eritrocitária e anemia hemolítica além de associação com a doença granulomatosa crônica. Portadores do fenótipo K$_o$ não possuem a substância Kx na membrana eritrocitária e podem se tornar aloimunizados contra outros aloantígenos do Sistema Kell (MOLLISON, 1983).

Outros aloantígenos foram identificados como pertencentes a esse sistema e são codificados por genes intimamente ligados: **Kpa**, **Kpb**, **Jsa** e **Jsb** (QUADRO 9). Em testes de compatibilidade sanguínea

considera-se o aloantigeno K como o de maior importância, em razão de sua freqüência populacional de aproximadamente 9% e de sua alta imunogenicidade (MOLLISON, 1983; SALMON e cols., 1984; ISSIT, 1985).

Aloanticorpos anti-Kell, encontrados no soro de gestantes e de pacientes politransfundidos, geralmente resultam de aloimunização (MOLLISON, 1983; FARR & GRAY, 1988). Pertencem à classe IgG e são detectados pelo teste de antiglubulina humana. A elevada freqüência populacional dos outros aloantigenos **k**(Cellano), **Kpb** (Rautemberg) e **Jsb** (Mathews) constitui-se numa barreira natural para aloimunização (SALMON e cols., 1984). Raros exemplos de aloanticorpos de ocorrência natural foram observados nesse sistema.

I.6.3 - SISTEMA KIDD

O sistema Kidd é constituido por dois aloantigenos, **Jka** e **Jkb**, sendo o Jka o mais importante, devido à sua imunogenicidade. Seus aloantigenos podem ser identificados através dos soros anti-Jka e anti-Jkb e suas combinações permitem a identificação de três fenótipos: Jk(a+b-), Jk(a-b+) e Jk(a+b+) (ISSIT, 1985).

Um raro fenótipo Jk(a-b-) foi observado pela primeira vez nas Filipinas, no Havai, na Tailândia, na Polinésia e em amerindios do Mato Grosso, Brasil. Estudos genéticos suportam a hipótese de que um gene *Jk* recessivo ocorra nessas populações (SALMON e cols., 1984).

As bases genéticas deste sistema estão sedimentadas em dois genes alelos codominantes *Jka* e *Jkb*. Os genótipos, fenótipos e suas freqüências populacionais estão representados no quadro 10.

Dentre os aloanticorpos induzidos pelos aloantigenos do sistema Kidd, o anti-Jka é considerado o mais perigoso como também o mais dificil de ser demonstrado e identificado. Este aloanticorpo reage melhor com células homozigotas Jka(a+b-) que com células heterozigotas Jk(a+b+). Essa caracteristica, denominada efeito de dosagem, também foi observada para outros aloanticorpos. Casos de severas reações hemolíticas com hemoglobinúria e de doença hemolítica do recém-nascido, embora raros, têm sido associados à presença de anti-Jka (MOLLISON, 1983).

QUADRO 9. Nomenclatura e freqüência populacional dos aloantígenos do Sistema Kell

ALOANTIGENO	SIMBOLO CLASSICO	FREQUENCIA POPULACIONAL	
		BRANCOS	NEGROIDES
Kell	K	0,09	0,035
Cellano	k	0,998	0,999
Penney	Kp^a	0,002	0,001
Rautemberg	Kp^b	0,999	0,999
Sutter	Js^a	0,001	0,04
Mathews	Js^b	0,999	0,999

SALMON e cols., 1984.

QUADRO 10. Reações sorológicas e freqüência populacional dos fenótipos e genótipos do Sistema Kidd.

FENOTIPOS	GENOTIPOS	REAÇÃO COM SOROS		FREQUENCIAS
		Anti-Jk^a	Anti-Jk^b	
Jk(a+b-)	Jk^a Jk^a	+	-	0,28
Jk(a-b+)	Jk^b Jk^b	-	+	0,22
Jk(a+b+)	Jk^a Jk^b	+	+	0,50
Jk(a-b-)	*Jk Jk*	-	-	RARO

SALMON e cols., 1984.

I.6.4 - SISTEMA DUFFY

O sistema Duffy é caracterizado por dois aloantigenos antitéticos Fy^a e Fy^b, codificados pelos alelos *Fy*ª e *Fy*ᵇ. Entretanto, nas populações de raça negra, observam-se freqüentemente indivíduos de fenótipo Fy(a-b-), que são destituídos desses aloantigenos. Os aloantigenos Fy^3, Fy^4 e Fy^5, descobertos posteriormente, também pertencem ao Sistema Duffy (MOLLISON, 1983). Os fenótipos, genótipos e suas freqüências estão no quadro 11.

O aloantigeno Fy^a é considerado o de maior importância devido sua imunogenicidade. O aloanticorpo anti-Fya, mais comum, é pertencente à classe IgG e algumas vezes fixa complemento. Há relatos da presença desse aloanticorpo em casos de doença hemolítica perinatal e reações hemolíticas transfusionais (BOWEN e cols., 1988).

O fato que tornou o Sistema Duffy biologicamente importante foi a constatação de que somente células contendo os aloantigenos Fy^a e Fy^b podem ser infestadas por certas espécies de *Plasmodium*. *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium vivax* não são capazes de parasitar eritócitos de Fy(a-b-), porém penetram normalmente em células Fy(a+b-) e Fy(a-b+). Se estas células são tratadas com enzimas que destroem esses aloantigenos, ou são recobertas com anticorpos específicos, tornam-se resistentes à infestação (LUZZATTO, 1979).

QUADRO 11. Freqüências dos fenótipos e genótipos do Sistema Duffy.

FENOTIPOS	GENOTIPOS	REAÇÃO COM SOROS		FREQUENCIAS	
		Anti-Fya	Anti-Fyb	BRANCOS	NEGROS
Fy(a+b-)	*Fya Fya*	+	-	0,182	0,111
Fy(a-b+)	*Fyb Fyb*	-	+	0,330	0,198
Fy(a+b+)	*Fya Fyb*	+	+	0,475	0,014
Fy(a-b-)	*Fy Fy*	-	-	RARO	0,657

SALMON e cols., 1984.

I.7 - ALOANTIGENOS E ALOANTICORPOS DE GRUPOS SANGUINEOS

I.7.1. - MEMBRANA ERITROCITARIA

O modelo de membrana aceito para os eritrócitos é o do mosaico fluido. Sua massa, livre de hemoglobina, é estimada em 10^{-10} a 11^{-10} g e inclui 52% de proteínas associadas covalentemente, 40% de lipídeos e 8% de carboidratos. A água presente ocupa cerca de 10% a 20% de seu peso total (SALMON e cols., 1984). Através da técnica SDS-PAGE (sodium dodecyl suphate polyacrylamide gel eletrophoresis), constatou-se que 25% das proteínas da membrana são do tipo espectrina. Essas proteínas estão localizadas na superfície interna da membrana, formando uma matrix, cujas unidades constituem pacotes. Algumas dessas unidades alongadas e globulares se interagem com proteínas transmembrânicas (MOLLISON, 1983; LIU & DERICK, 1992). Quando géis obtidos de membrana solubilizada são submetidos à coloração de PAS, um grupo de proteínas com 50% de carboidratos é corado. Essas proteínas são denominadas asialoglicoproteínas, compreendendo as glicoforinas A e B.

As proteínas da membrana eritrocitária podem ser classificadas em periféricas e integrais. As proteínas periféricas podem ser dissociadas da membrana de maneira integral e livre de lipídeos. Nesse caso a espectrina e actina são consideradas periféricas. As integrais só podem ser isoladas da membrana após tratamentos drásticos e tendem a permanecer associadas aos lipídeos. Aqui se enquadram as asialoglicoproteínas (LIU & DERICK, 1992).

I.7.2 - ALOANTIGENOS ERITROCITARIOS

As substâncias que constituem os aloantígenos eritrocitários são muito complexas e suas estruturas moleculares, com poucas exceções, são desconhecidas. Proteínas, glicoproteínas, carboidratos e glicolipídeos fazem parte desse grupo diversificado de moléculas, sendo em alguns casos, responsáveis pela suas especificidades (GIBLETT, 1977).

A identificação dessas substâncias é feita, via de regra, através de reações sorológicas que utilizam soros específicos. Os anticorpos presentes nos soros reagem com certas porções do aloantígeno, os determinantes antigênicos ou epítopos, que apresentam complementaridade com seus sítios combinatórios ou parátopos. A parte do epítopo que mais contribui para a força de ligação entre essas moléculas é denominada grupo imunodominante, podendo ser constituída por resíduos de açúcares ou aminoácidos terminais. Os aloantígenos podem apresentar epítopos repetitivos ou múltiplos. Quando eritrócitos humanos são inoculados em um animal, podemos constatar a produção de anticorpos específicos para os múltiplos determinantes antigênicos presentes em seus aloantígenos (SALMON e cols., 1984; STITES & TERR, 1991).

Nem todos os aloantígenos eritrocitários estimulam a produção de aloanticorpos quando transfundidos em receptores que não os possuam. O desenvolvimento de uma resposta imune a esses aloantígenos é dependente da complexidade estrutural, do peso molecular, conformação, acessibilidade e cargas elétricas (BELLANTI, 1985). Essa somatória de fatores é a base da propriedade conhecida como imunogenicidade. Os alontígenos A, B, H, D e K são altamente imunogênicos. Por outro lado, os aloantígenos dos sitemas Xg, Chido, Rodgers e outros raramente induzem aloimunização transfusional ou gestacional.

As especificidades dos aloantígenos dos sistemas ABH, Ii, Lewis e P são determinadas pelos açúcares terminais D-galactose, N-acetil-D-glicosamina, D-manose, L-frutose, ácido N-acetilneuraminico e N-acetil-D-galactosamina, ligados a asialoglicoproteínas (WATKINS, 1980). Os aloantígenos do Sistema MNSs incluem tetrassacarídeos ricos em ácido siálico associados à asialoglicoproteínas, e suas especificidades são determinadas em parte pelo açúcar e em parte pela seqüência de aminoácidos (ANSTEE, 1981). A estrutura molecular dos aloantígenos do Sistema Rh permaneceu obscura por muito tempo, embora se suspeitasse da presença de proteínas em sua composição, visto que eritrócitos tratados com enzimas perdiam a reatividade. Estudos recentes revelaram que suas especificidades são devidas a polipeptídeos associados com lipídeos (AGRE & CARTRON, 1991). Os aloantígenos do sistema Kell incluem glicoproteínas, embora não se saiba se suas especificidades sejam devidas aos carboidratos ou às

proteínas. Como enzimas proteolíticas inativam os aloantígenos do Sistema Duffy, admite-se que suas especificidades sejam determinadas por asialoglicoproteínas (SALMON e cols., 1984).

O tratamento de eritrócitos com enzimas, tais como ficina, tripsina e bromelina, demonstrou que alguns aloantígenos perdem suas especificidades. Essa observação trouxe um benefício na metodologia de identificação das especificidades de aloanticorpos produzidos por aloimunização gestacional e ou pós transfusional. Assim, testanto-se o soro contra células tratadas e não tratadas com enzimas, pode-se verificar diferenças na reatividade de um determinado aloanticorpo (MOLLISON, 1983).

Outra característica importante dos aloantígenos é a capacidade de reagirem com algumas proteínas de origem vegetal, chamadas lectinas. Essa propriedade determina a aglutinação de eritrócitos, pois as lectinas comportam-se como anticorpos específicos (STITES & TERR, 1991).

I.7.3 - ANTICORPOS

Os anticorpos constituem um grupo de glicoproteínas séricas, pertencentes à família das imunoglobulinas (Ig), que se caracterizam pela combinação específica com certas moléculas denominadas antígenos. Quimicamente, são constituídos por duas cadeias polipeptídicas pesadas (H), com 440 aminoácidos cada, e duas leve (L), contendo 214 aminoácidos. A análise cristalográfica de raio X revelou detalhes importantes sobre a estrutura tridimensional da molécula de anticorpo. Sua conformação, que lembra a forma da letra "Y", permite a combinação simultânea com dois epítopos iguais, porém localizados na superfície de células distintas. Essa bivalência é decisiva para a aglutinação dos eritrócitos, bem como para a neutralização de outras moléculas antigênicas (STRYER, 1979).

Tanto as cadeias H como as L apresentam seqüências constantes (C), e variáveis (V) que compreendem os primeiros 110 aminoácidos. A combinação das seqüências V das cadeias L e H, localizadas na extremidade N-terminal, constituem o sítio combinatório ou parátopo que se combina especificamente, porém de maneira reversível, com os epítopos dos antígenos. As duas extremidades onde

se localizam os parátopos são designadas Fab (fraction antigen binding), e a extremidade oposta, Fc (fraction cristalizable). As cadeias L e H apresentam dobramentos compactos intra e intercadeias, chamados domínios. A cadeias L possuem os domínios V_L e C_L . Os domínios V_H, C_{H1}, C_{H2} e C_{H3} estão presentes nas cadeias H (FIGURA 5) (EDELMAN, 1973; PORTER, 1973; STITES & TERR, 1991).

Dois tipos de cadeias L e cinco de H, são encontrados nas diferentes classes de anticorpos. Cadeias L do tipo kappa estão presentes em 70% das moléculas, enquanto que as do tipo lambda compreendem 30%. As cadeias H são do tipo mu, gama, alfa, épsilon e delta, e definem as classes de imunoglobulinas IgM, IgG, IgA, IgE e IgD, respectivamente.

A molécula de anticorpo mostra-se muito versátil, pois permite interações entre diferentes elementos celulares e moleculares do sistema imune. A capacidade de fixação do complemento, por exemplo, só se torna possível após a combinação antígeno-anticorpo. Essa combinação altera o estado conformacional da molécula livre, de forma que o domínio C_{H2} fica exposto, permitindo a ligação com o componente C1q do sistema complemento. A ativação em cascata faz com que esse sistema gere subcomponentes enzimaticamente ativos, que lesam membranas, opsonizam células e partículas, tornando-as alvo marcados para a ação do Sitema Fagocitário Mononuclear. Assim, eritrócitos Rh positivos recobertos pelo subcomponente C3b e por aloanticorpos anti-D, os quais atuam como opsoninas, são falcilmente retirados da circulação e destruídos no baço (HOGMAN, 1988; STITES & TERR, 1991).

As características químicas das diversas classes de anticorpos permitem as ações sistêmica e localizada dessas moléculas na imunidade humoral. Os anticorpos da classe IgM, presentes nos espaços vasculares na forma pentamérica ($kappa_2$-mu_2 ou $lambda_2$-mu_2)$_5$, são altamente eficientes na neutralização da toxinas, bem como na opsonização de bactérias e vírus. Compreendem os anticorpos naturais anti-A e anti-B, do Sistema ABO, e fixam o complemento. A classe IgG, de maior concentração plasmática, é composta por moléculas monoméricas ($kappa_2$-$gama_2$ ou $lambda_2$-$gama_2$). Embora sejam menos eficientes na aglutinação e fixação do complemento, os anticorpos dessa classe são os únicos que atravessam a placenta, fato que explica seu papel na etiologia da doença hemolítica perinatal. Neutralizam toxinas, opsonizam vírus e bactérias, bem como participam na

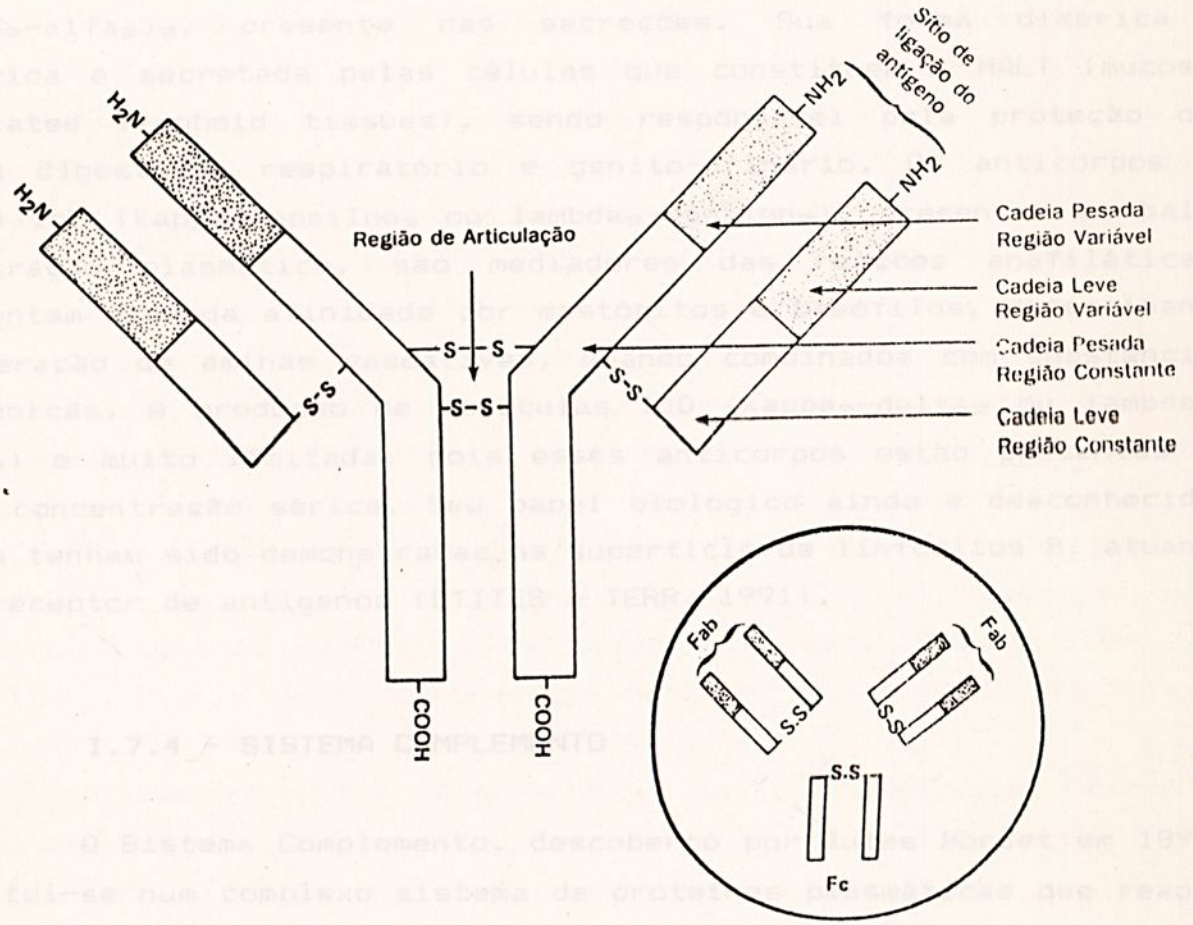


FIGURA 5. Representação esquemática da estrutura básica das imunoglobulinas. No destaque os fragmentos Fab e Fc após clivagem enzimática da molécula de IgG pela papaina.

eliminação de eritrócitos, pelo Sistema Fagocitário Mononuclear. Quatro subclasses foram identificadas no soro humano: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Os aloanticorpos imunes geralmente pertencem à classe IgG. A classe IgA é formada por moléculas monoméricas ($kappa_2$-$alfa_2$ ou $lambda_2$-$alfa_2$), quando vasculares, e diméricas ($kappa_2$-$alfa_2$ ou $lambda_2$-$alfa_2$)$_2$, presente nas secreções. Sua forma dimérica é produzida e secretada pelas células que constituem o MALT (mucosa-associated lymphoid tissues), sendo responsável pela proteção dos tratos digestivo, respiratório e genito-urinário. Os anticorpos da classe IgE ($kappa_2$-$epsilon_2$ ou $lambda_2$-$epsilon_2$), presentes em baixa cocentração plasmática, são mediadores das reações anafiláticas. Apresentam elevada afinidade por mastócitos e basófilos, determinando a liberação de aminas vasoativas, quando combinados com substâncias alergênicas. A produção de moléculas IgD ($kappa_2$-$delta_2$ ou $lambda_2$-$delta_2$) é muito limitada, pois esses anticorpos estão presentes em baixa concentração sérica. Seu papel biológico ainda é desconhecido, embora tenham sido demonstradas na superfície de linfócitos B, atuando como receptor de antigenos (STITES & TERR, 1991).

I.7.4 - SISTEMA COMPLEMENTO

O Sistema Complemento, descoberto por Jules Bordet em 1894, constitui-se num complexo sistema de proteínas plasmáticas que reagem em cascata. Suas principais funções são: ativação de células fagocitárias durante os processos inflamatórios, osponização de particulas antigênicas e lise de membranas celulares. E constituido por mais de 25 componentes, representadas pela letra C, seguida de um número. O quadro 12 mostra os 11 principais componentes. C3 é considerada a proteina mais importante devido seu papel na opsonização e na ativação de células fagocitárias (BELLANTI, 1985; STITES & TERR, 1991).

Duas vias de ativação operam no plasma (FIGURA 6). A primeira a ser descoberta, a via clássica, é ativada pela formação de complexos antigeno-anticorpo, sendo que a via alternativa é independente desses complexos. Pelo menos uma molécula de IgM ou duas de IgG adjacentes são suficientes para a ativação do Complemento. A combinação AG-AC expõe o domínio C_{H2} das imunoglobulinas, o qual

funciona como sitio de fixação do componente C1q. Este processo ativa C1r e C1s por clivagem enzimática. C1s atua sobre duas outras proteinas seguintes C4 e C2, clivando-as em dois subcomponentes C4a, C4b e C2a e C2b, respectivamente. Os subcomponentes C4b e C2a unem-se formando um complexo C4b2a, denominado C3 convertase, que se fixa na membrana e também atuam sobre o componente C3, clivando-o em C3a e C3b. A união de C4b2a com C3b origina o complexo C4b2a3b ou C5 convertase, o qual cliva o componente C5, gerando C5a e C5b. A macromolécula C5b se liga a C6 e C7, constituindo o complexo trimolecular C5b67, que por sua vez adere à membrana para se associar a C8 e C9. A ativação de várias moléculas de C9 permite a polimerização desse componente através da dupla camada de lipideos, gerando poros que lesam a membrana. Durante a ativação do Sistema Complemento pela via clássica são gerados vários subcomponentes com funções secundárias. C3a, C4a e C5a não se aderem à membrana, porém são potentes anafilatoxinas que agem recrutando células fagocitárias, degranulando mastócitos e basófilos e promovendo a contração de músculo liso. Por outro lado o subcomponente C3b se constitui numa eficiente opsonina, recobrindo e preparando partículas antigênicas, bactérias, virus e mesmo eritrócitos para os processos de fagocitose (DIAS-DA-SILVA, 1984; STITES & TERR, 1991).

O componente C3, além de atuar na via de ativação clássica, também desempenha importante papel na via alternativa. Uma forma alterada de C3, C3(H_2O), na qual uma ligação tioéster foi hidrolizada, se interage com outra proteina plasmática, o Fator B, na presença de ions magnésio, gerando o complexo C3(H_2O)B. Esse complexo sofre ação do Fator D, originando uma molécula maior, C3(H_2O)Bb, e outra menor, Ba. C3(H_2O)Bb tem ação semelhante a C4b2a e cliva outras moléculas de C3, gerando C3a e C3b. Assim, a clivagem de C3 na circulação atua como fator fundamental para a ativação da via alternativa (DIAS-DA-SILVA, 1984).

O Sistema Complemento é regulado por diversos tipos de proteinas plasmáticas, denominadas inibidoras. O inibidor de C1 reconhece as formas ativadas de C1r e C1s e as destrói. C4BP e o Fator I são inibidores de C4b, sendo que o Fator I associado ao Fator H também cliva C3b, inativando-o (STITES & TERR, 1991).

QUADRO 12. Características dos componentes do Sistema Complemento.

COMPONENTES	PM	FRAGMENTOS	CONC. SERICA (g/ml)	MOB. ELETROF.
C1q	410.000	-	70	gama-2
C1r	85.000	-	34	beta-1
C1s	85.000	-	31	alfa
C2	95.000	C2a, C2b	25	beta-1
C3	**195.000**	**C3a, C3b**	**1.200**	**beta-2**
C4	206.000	C4a, C4b	600	beta-1
C5	180.000	C5a, C5b	85	beta-1
C6	128.000	-	60	beta-2
C7	120.000	-	55	beta-2
C8	150.000	-	55	gama
C9	80.000	-	60	gama

ADAPTADO DE STITES & TERR, 1991.

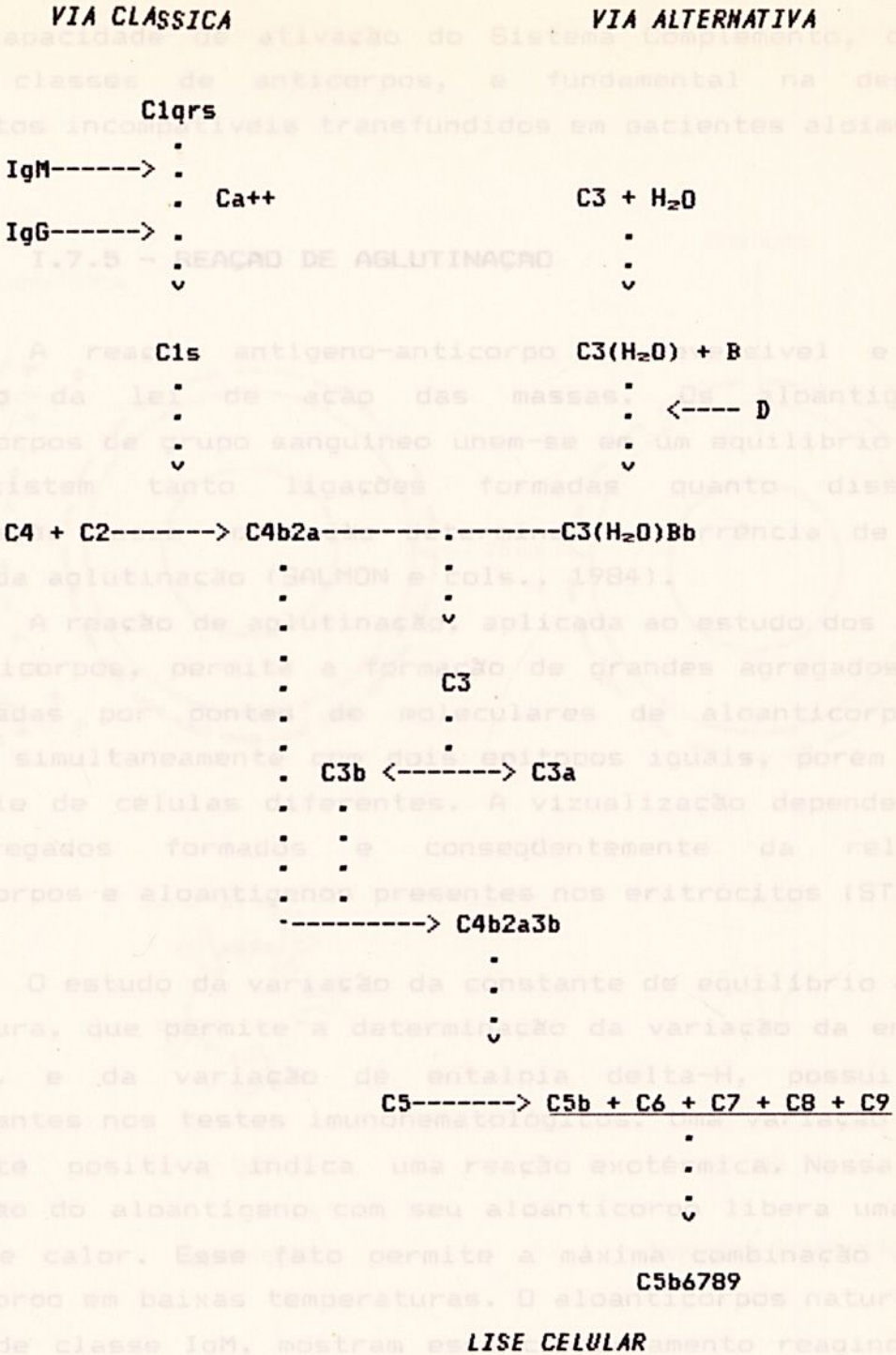


FIGURA 6. Esquema de ativação das vias clássica e alternativa do Sistema Complemento.

A capacidade de ativação do Sistema Complemento, observada em algumas classes de anticorpos, é fundamental na destruição de eritrócitos incompatíveis transfundidos em pacientes aloimunizados.

I.7.5 - REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO

A reação antígeno-anticorpo é reversível e obedece o princípio da lei de ação das massas. Os aloantígenos e os aloanticorpos de grupo sanguíneo unem-se em um equilíbrio dinâmico no qual existem tanto ligações formadas quanto dissociadas. A manifestação dessa interação determina a ocorrência de uma reação denominada aglutinação (SALMON e cols., 1984).

A reação de aglutinação, aplicada ao estudo dos aloantígenos e aloanticorpos, permite a formação de grandes agregados de células interligadas por pontes de moleculares de aloanticorpos, que se combinam simultaneamente com dois epítopos iguais, porém situados na superfície de células diferentes. A vizualização depende do tamanho dos agregados formados e conseqüentemente da relação entre aloanticorpos e aloantígenos presentes nos eritrócitos (STITES & TERR, 1991).

O estudo da variação da constante de equilíbrio em função da temperatura, que permite a determinação da variação da energia livre delta-F°, e da variação de entalpia delta-H, possui aplicações interessantes nos testes imunohematológicos. Uma variação de entalpia fortemente positiva indica uma reação exotérmica. Nessa condição, a combinação do aloantígeno com seu aloanticorpo libera uma quantidade imensa de calor. Esse fato permite a máxima combinação aloantígeno-aloanticorpo em baixas temperaturas. O aloanticorpos naturais anti-A e anti-B, de classe IgM, mostram esse comportamento reagindo melhor em temperaturas inferiores a 18°C. Por outro lado, os aloanticorpos imunes de classe IgG possuem calor de reação muito baixo e se combinam aos seus aloantígenos em temperaturas mais elevadas, geralmente 37°C (MOLLISON, 1983).

A reação de aglutinação depende de vários fatores, particularmente da superfície do eritrócito, do tipo de aloanticorpo e das condições do meio. O número de epítopos presentes nos eritrócitos desempenha um papel fundamental na aglutinação. A acessibilidade do

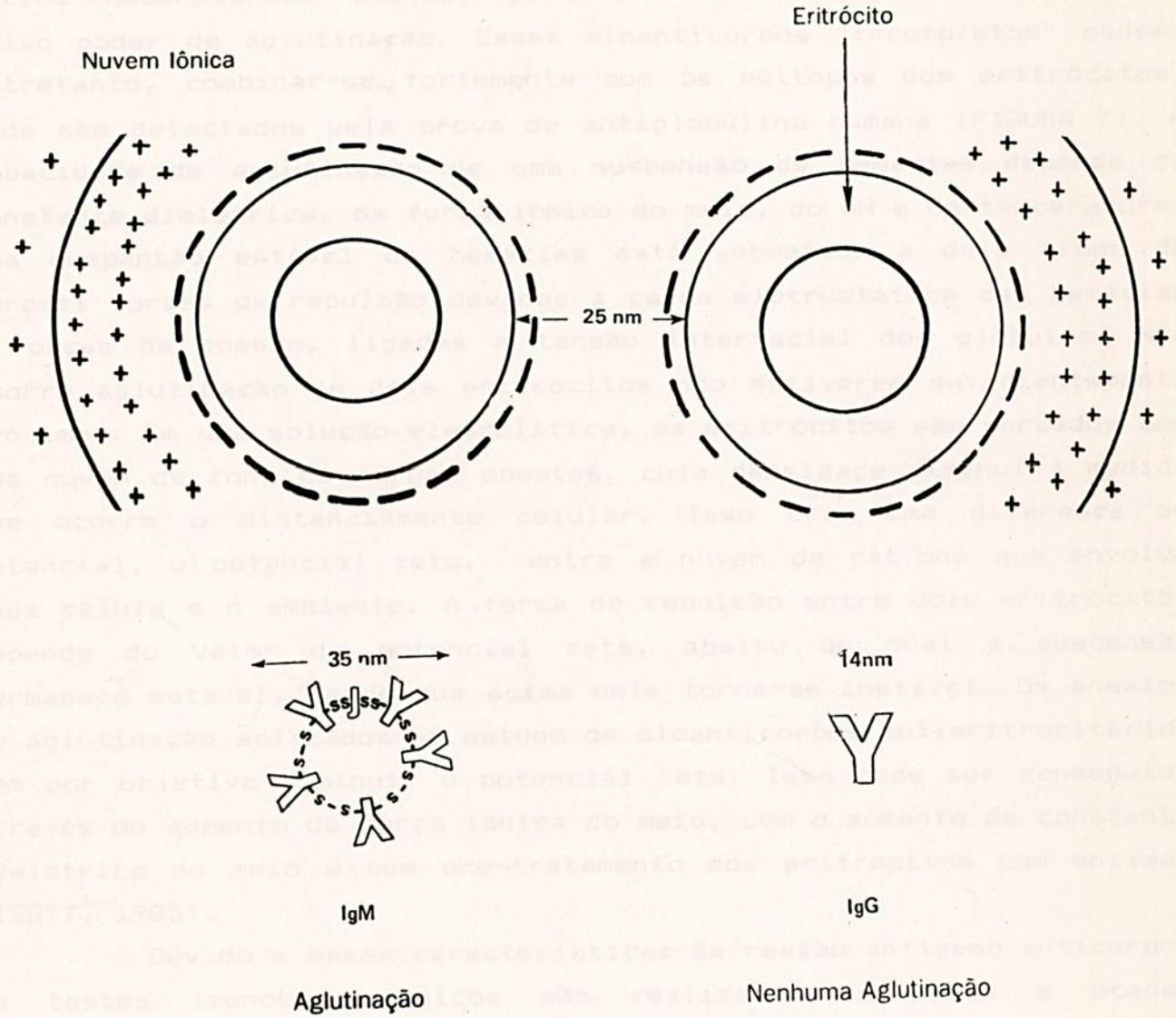


FIGURA 7. Representação esquemática do conceito de nuvem iônica e sua relevância para a hemaglutinação pelos aloanticorpos de classe IgG e IgM.

aloantigeno permite o alcance por parte do aloanticorpo. Os aloanticorpos de classe IgM aglutinam eritrócitos mais intensamente, pois são formados por pentâmeros que apresentam dez sítios combinatórios. A forma monomérica dos aloanticorpos IgG, com dois sítios combinatórios apenas, parece ser o fator determinante de seu baixo poder de aglutinação. Esses aloanticorpos "incompletos" podem, entretanto, combinar-se fortemente com os epítopos dos eritrócitos, onde são detectados pela prova de antiglobulina humana (FIGURA 7). A capacidade de aglutinação de uma suspensão de hemácias depende da constante dielétrica, da força iônica do meio, do pH e da temperatura. Uma suspensão estável de hemácias está submetida a dois tipos de forças: forças de repulsão devidas à carga eletrostática das hemácias e forças de coesão, ligadas à tensão interfacial dos glóbulos. Não ocorre aglutinação se dois eritrócitos não estiverem suficientemente próximos. Em uma solução eletrolítica, os eritrócitos são cercados por uma nuvem de íons de cargas opostas, cuja densidade diminui à medida que ocorre o distanciamento celular. Isso cria uma diferença de potencial, o potencial zeta, entre a nuvem de cátions que envolve cada célula e o ambiente. A força de repulsão entre dois eritrócitos depende do valor do potencial zeta, abaixo do qual a suspensão permanece estável, sendo que acima dele torna-se instável. Os ensaios de aglutinação aplicados ao estudo de aloanticorpos antieritrocitários têm por objetivo diminuir o potencial zeta. Isso pode ser conseguido através do aumento da força iônica do meio, com o aumento da constante dielétrica do meio e com pré-tratamento dos eritrócitos com enzimas (ISSIT, 1985).

Devido a essas características da reação antígeno-anticorpo, os testes imunohematológicos são realizados em meios e etapas distintas. O quadro 13 apresenta o comportamento dos principais aloanticorpos antieritrocitários em diferentes meios e temperaturas.

QUADRO 13. Reações dos principais aloanticorpos antieritrocitários de significado clínico, em diferentes meios.

SISTEMAS	MEIOS E REATIVIDADE				
	SALINA	SALINA	ENZIMA	ENZIMA	ALBUNINA-TCI
	T.A.	37°C	T.A.	37°C	-
Rh	Possível	Possível	Muito boa	Muito boa	Muito boa
MN	Boa	Fraca	Inativa	Inativa	Possível
S	Possível	Possível	Inativa	Inativa	Boa
s	Improvável	Improvável	Possível	Possível	Boa
P	Boa	Possível	Boa	Fraca	Improvável
Lutheran	Possível	Possível	Possível	Fraca	Boa
Kell	Possível	Possível	Possível	Possível	Boa
Lewis	Boa	Possível	Boa	Possível	Improvável
Duffy	Improvável	Improvável	Inativa	Inativa	Boa
Kidd	Improvável	Improvável	Possível	Possível	Boa
I	Boa	Possível	Muito boa	Fraca	Improvável

T.A. = temperatura ambiente TCI = teste de Coombs indireto

MARSH, 1984.

II — OBJETIVOS

A população de portadores de hemoglobinopatias constitui-se num excelente modelo para o estudo da transmissão e distribuição dos genes que codificam as cadeias da porção globina da molécula de hemoglobina. A panmixia observada em território brasileiro contribuiu para o elevado polimorfismo das hemoglobinas, por permitir o encontro de seus genes nos estados de homozigose e heterozigose. A expressão gênica, conseqüentemente, determina enorme variabilidade clínica em seus portadores e portanto a morbidade e a mortalidade também se apresentam de forma muito variável.

O comportamento desse sistema polimórfico dificulta o correto diagnóstico clínico e laboratorial em grande números de casos, conduzindo os pacientes a esquemas terapêuticos muitas vezes inadequados. Como as conseqüências de procedimentos impróprios muitas vezes podem ser danosas, torna-se necessário a realização de estudos muito amplos a nivel gênico, bioquimico, laboratorial, clínico e terapêutico e, principalmente a veiculação de informações corretas para pais e pacientes.

Como os esquemas terapêuticos estão embasados na utilização de freqüentes transfusões de sangue, o polimorfismo dos grupos sanguineos não deixa de ser uma barreira para essa terapia de reposição. A aloimunização antieritrocitária acaba por representar uma barreira a mais a ser transposta, visto que a presença de um ou mais aloanticorpos restringe cada vez mais as chances de obtenção de sangue compativel. Os Sistemas Rh, Kell, Kidd e Duffy estão freqüentemente envolvidos na aloimunização antieritrocitária pós-transfusional e seus aloanticorpos contribuem para a diminuição do tempo de vida dos eritrócitos transfundidos, devido às possiveis reações hemoliticas que podem ter efeitos danosos. Portanto, a monitoração dos pacientes politransfundidos, para o aparecimento de aloanticorpos se traduz em um beneficio que minimiza os riscos nas transfusões, bem como assegura condições favoráveis para a obtenção de sangue nas transfusões futuras.

Diante da falta de maiores dados sobre aloimunização antieritrocitária pós-transfusional em portadores de talassemia beta maior e anemia falciforme homozigota politransfundidos em nosso meio, o presente estudo tem por objetivos:

1 - determinar a freqüência de aloanticorpos antieritrocitários dos sistemas de grupos sanguineos Rh, Kell, Kidd e Duffy entre pacientes com talassemia beta maior e anemia falciforme homozigota politransfundidos.

2 - determinar a influência da idade de início das transfusões, do número de unidades de sangue transfundidas e do tempo de transfusão na aloimunização dos portadores dessas patologias.

3 - determinar quais aloanticorpos aparecem com maior freqüência para cada um das patologias.

III — MATERIAL E METODOS

III.1 - MATERIAL

O material biológico submetido ao estudo proposto constituiu-se de 119 pacientes amostras de sangue total e soro foram colhidas por punção venosa com e sem anticoagulante EDTA, respectivamente.

Os eritrócitos foram utilizados na identificação dos aloantígenos dos Sistemas de Grupo Sanguíneo ABO, $Rh_o(D)$, na realização do teste de antiglobulina humana direto e prova de autocontrole. A pesquisa de aloanticorpos antieritrocitários foi realizada nas amostras de soro.

Todo material biológico foi obtido de pacientes portadores de talassemia beta maior e anemia falciforme homozigota, que se submetem à terapêutica transfusional regular nos seguintes centros: CIPOHI - CENTRO INTEGRADO DE PESQUISAS ONCO-HEMATOLOGICAS NA INFANCIA da UNICAMP, Campinas - SP, HEMOCENTRO de Marília -SP, HEMOFARME do HOSPITAL DE BASE e SANTA CASA DE MISERICORDIA de São José do Rio Preto - SP.

III.1.1 - COLETA DE SANGUE

As amostras de sangue foram obtidas de pacientes portadores de talassemia beta maior e anemia falciforme homozigota, antes da realização de procedimentos transfusionais, por punção venosa, acondicionadas em frascos com e sem anticoagulante EDTA, previamente identificados.

III.1.2 - IDENTIFICAÇAO DOS PACIENTES

Dos pacientes analisados foram tomadas as seguintes informações: nome, idade, sexo, cor e história transfusional, compreendendo esta a idade de inicio das transfusões, intervalo entre cada transfusão, número de unidades transfundidas, tempo de transfusão e ocorrência de reações pós-transfusionais imediatas e retardadas, anotadas em um formulário especialmente preparado.

III.1.3 - LABORATORIOS UTILIZADOS PARA OS ESTUDOS

A pesquisa foi desenvolvida em dua etapas. A primeira, iniciada em junho de 1988 e que consistiu na tipagem sanguínea dos sistema ABO e Rh, na realização do teste de antiglobulina direto (Coombs direto), prova de autocontrole e pesquisa de aloanticorpos em meio salino, meio albumínico em temperatura ambiente, meio albumínico a 37ºC e teste de antiglobulina humana indireto. Estas provas foram realizadas nos respectivos laboratórios dos Centros de Transfusão.

A segunda etapa, com inicio em Julho de 1990, compreendeu a identificação das especificidades dos aloanticorpos antieritrocitários, sendo executada inicialmente no INSTITUTO DE IMUNOHEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA SIRIO-LIBANES em São Paulo, no HEMOCENTRO de Marília, no Banco de Sangue do CIPOHI da UNICAMP em Campinas e em seguida no LABORATORIO DE IMUNOLOGIA DO DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS DA FUNDAÇAO FACULDADE REGIONAL DE MEDICINA, em São José do Rio Preto, Estado de São Paulo.

III.2 - METODOS

Os métodos utilizados no presente trabalho foram obtidos de WIDMAN, 1981.

III.2.1 - PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS

PRINCÍPIOS

A maioria dos testes imunohematológicos, utiliza suspensões de eritrócitos entre 2% e 5%. Os métodos usuais aconselham duas gotas de suspensão hemácias lavadas a 2% para duas gotas de soro, ou uma gota de suspensão de hemácias a 5% para duas gotas de soro.

METODO

1 - Transferir pequeno volume de hemácias para um tubo de hemólise;

2 - Adicionar a este grande volume de solução salina a 0,9% e misturar;

3 - Centrifugar e descartar o líquido sobrenadante;

4 - Repetir os itens 2 e 3, pelo menos três vezes;

5 - Ressuspender as hemácias lavadas com solução salina a 0,9% ou outro diluente isotônico na concentração desejada.

III.2.2 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO

PRINCÍPIOS

As amostras de soro devem ser frescas, límpidas, sem turvação ou proteínas precipitadas.

METODO

1 - Colher o sangue e colocá-lo em tubo sem anticoagulante. Aguardar a formação e a retração do coágulo para separação do soro das hemácias;

2 - Transferir o soro para outro tubo limpo e identificado;

3 - Se o soro tiver sido congelado, fazer o degelo rápido a 37ºC; evitar desnecessários e repetidos congelamentos e degelos.

III.2.3 - AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DAS REAÇÕES

PRINCÍPIOS

Os testes de rotina em laboratórios de imunohematologia são avaliados pela presença de aglutinação ou hemólise dos eritrócitos.

Uma reação negativa é expressa pela falta de aglutinação e/ou hemólise. E importante que os resultados sejam avaliados tão logo o teste seja concluido.

A aglutinação é o resultado mais comum em uma reação positiva e pode ter vários graus que devem ser anotados. Esses graus devem ser padronizados para cada laboratório. As reações devem ser avaliadas macroscopicamente, o que significa visualização a olho nú ou pelo uso de um objeto óptico de aumento. Se o resultado aparentemente for negativo ou duvidoso, a suspensão de células deve ser avaliada microscopicamente.

A forma mais comum de avaliação do grau de aglutinação é o sistema que utiliza um escore de 0 a 4 cruzes (0 a ++++).

O quadro 14 apresenta os escores de 0 a 4 cruzes, bem como suas interpretações.

OBSERVAÇÕES

1 - As reações negativas ou duvidosas devem ser obrigatoriamente confirmadas ao microscópio. Assim, podem ser detectadas reações fracamente positivas, como as chamadas de campo misto (CM), por exemplo. Estas são caracterizadas por alguns agregados de hemácias em meio a inúmeras células livres e podem corresponder a:

a) um anticorpo fraco e pouco concentrado;

b) uma população mista de hemácias;

c) um subgrupo como A_{x}, por exemplo.

Estas reações, entretanto, só são relatadas como CM nos dois últimos casos que ocorrem em testes para detecção de antígenos nas hemácias, teste direto de Coombs e na prova cruzada menor.

2 - Ao se testar o soro de um paciente contra células de fenótipo conhecido (painel de hemácias) ou de um doador, uma reação de campo misto significa um anticorpo fraco ou de baixa concentração. A única exceção para isto é quando, ao invés de se usar células de um só indivíduo, com fenótipo conhecido, utiliza-se um *pool*, isto é, dois ou mais grupos de células com diferentes fenótipos. Neste caso uma reação de CM tem grande importância.

3 - Quando se testa as hemácias de um indivíduo pelo teste de Coombs, com um soro de especificidade conhecida, com o próprio soro de Coombs ou ainda com o soro de um doador, as reações de CM são muito significativas e devem ser anotadas, porque podem ser devidas a um

QUADRO 14. Escores e interpretação dos graus de aglutinação.

Avaliação em cruzes	Interpretação
++++	Aglutinação completa com apenas um agregado de hemácias:
+++	Um ou dois grandes agregados com poucos grumos menores de hemácias:
++	Vários grumos de tamanho médio com sobrenadante claro.
+	Macroscopicamente, muitos agregados pequenos e sobrenadantes possivelmente avermelhado. Ao microscópio, podem ser vistas hemácias livres.
0	Nenhuma aglutinação detectada.

ADAPTADO DE MARSH, 1984.

antígeno de reação fraca, a um subgrupo ou a uma população mista de células. Esta última situação algumas vezes ocorre após uma transfusão. Assim, um indivíduo Kell negativo, por exemplo, transfundido com sangue Kell positivo, pode apresentar uma reação de CM quando suas hemácias são testadas com anti-K. De modo similar, se o indivíduo tem ou desenvolve aloanticorpos anti-D e é transfundido acidentalmente com células $Rh_o(D)$ positivas, o seu soro anti-D sensibilizará as hemácias transfundidas, mas não as suas próprias. A prova direta de Coombs feita com as hemácias deste paciente poderá apresentar reação positiva de CM. Outro exemplo de reação de CM é visto nas chamadas quimeras de grupos sangüíneos, em crianças transfundidas intra-uterinamente e em mulheres que receberam, por ocasião de parto, grande quantidade de células fetais.

III.2.4 - TIPAGEM ABO

PRINCIPIOS

A determinação do grupo ABO deve ser feita por dois métodos: pela tipagem direta, a qual consiste na pesquisa dos antígenos A e B nas hemácias, e pela tipagem reversa, testando-se o soro contra eritrócitos conhecidos A_1 e B_o para a presença dos aloanticorpos naturais anti-A e anti-B.

TIPAGEM DIRETA

METODO EM TUBO

1 - Preparar uma suspensão de hemácias a 5% em salina a 0,9% ou em soro do próprio paciente;

2 - Marcar 3 tubos: AB, A e B;

3 - No tubo AB colocar uma gota de soro anti-AB, no tubo A, uma gota de soro anti-A e no tubo B, uma de soro anti-B;

4 - Adicionar uma gota da suspensão de células a 5% em cada tubo e misturar;

5 - Centrifugar durante 15 seg a 3500 rpm (ou 30 segundos a 1500 rpm ou 1 min a 1000 rpm);

6 - Com movimentos suaves, deslocar o botão de hemácias do fundo do tubo, avaliar o grau de reação macroscópica e, se necessário, microscopicamente.

OBSERVAÇÕES

Como alternativa, em vez de centrifugados, os tubos podem permanecer em repouso, sendo a leitura realizada cerca de 1 hora depois.

TIPAGEM REVERSA

METODO EM TUBO

1 - Marcar dois tubos: G_A e G_B;

2 - No tubo G_A colocar uma gota de uma suspensão de células A_1, e no tubo G_B uma gota de células B;

3 - Adicionar 2 gotas do soro a ser testado a cada tubo. Misturar.

4 - Centrifugar durante 15 seg a 3500 rpm;

5 - Suavemente, deslocar o botão de hemácias e avaliar o grau da reação macroscópica e microscopicamnte, se necessário.

OBSERVAÇÕES

As reações fracas podem ser aumentadas, incubando-se a mistura de células e soro a 4ºC por 30 a 60 minutos.

III.2.5 - TIPAGEM Rh_o(D)

PRINCIPIOS

A tipagem do antigeno Rh_o (D) é feita testando-se os eritrócitos com soros anti-Rh_o (D). Rotineiramente, utiliza-se o soro anti-Rh_o (D) bloqueador, também chamado de soro para técnica em lâmina ou rápida em tubo. Em situações especiais pode-se usar o soro anti-Rh_o (D) salino.

METODO EM TUBO

1 - Preparar uma suspensão de hemácias a 5% no próprio soro;

2 - Marcar dois tubos D e C_{Rh};

3 - No tubo C_{Rh} colocar uma gota de albumina bovina a 22%. No tubo D, uma gota de soro anti Rh_o(D);

4 - Em cada tubo adicionar uma gota da suspensão de hemácias 5% e misturar;

5 - Centrifugar por 15 seg a 3500 rpm;

6 - Suavemente, deslocar o botão de células do fundo do tubo e avaliar o grau de reação;

7 - Se ambos os tubos C_{Rh} e D forem negativos, prosseguir a pesquisa para a variante D^u, conforme segue:

a - ressuspender as células e incubar ambos os tubos a 37°C durante 15 a 30 minutos;

b - lavar as hemácias três vezes com solução salina a 0,9%, decantando bem a solução após cada lavagem;

c - Adicionar duas gotas de antiglobulina humana e misturar;

d - centrifugar 15 seg a 3500 rpm;

e - deslocar o botão de hemácias do fundo do tubo e avaliar a reação macroscópica e microscópicamente, se necessário.

OBSERVAÇÕES

1 - Quando o teste for feito com hemácias suspensas em solução salina a 0,9%, colocar no tubo D duas gotas de soro anti $Rh_o(D)$, ou uma gota deste mais uma gota de albumina bovina a 22%. No tubo C_{Rh}, duas gotas de albumina a 22%.

2 - Se ambos os tubos, C_{Rh} e D forem positivos após o ítem 6 e/ou 7-e, o teste não tem valor e deve ser repetido, utilizando o soro anti-D salino.

3 - Para pesquisa da variante D^u, somente o soro anti-$Rh_o(D)$ bloqueador pode ser usado.

4 - Uma vantagem importante na utilização do método em tubo para a determinação do antigeno $Rh_o(D)$, é a possibilidade de prosseguir-se o teste para a pesquisa de D^u a partir dos mesmos reagentes, isto é, do item 6.

III.2.6 - PROVA DA ANTIGLOBULINA HUMANA DIRETA (COOMBS DIRETO)

PRINCIPIOS

A prova da antiglobulina humana (AGH) direta ou teste de Coombs direto (TCD), é utilizado para a detecção de hemácias

sensibilizadas *in vivo*. O soro antiglobulina humana, de largo espectro, é capaz de demonstrar que as células estão recobertas com anticorpos e/ou componentes do sistema complemento. O soro antiglobulina (anti-IgG), detecta as gamaglobulinas enquanto que o soro anti-não gama (antibetaglobulinas ou anticomplemento), detecta somente frações do complemento.

METODO EM TUBO

1 - Preparar uma suspensão de hemácias a 5%;
2 - Num tubo marcado CD (Coombs direto), colocar uma gota da suspensão de células a 5%;
3 - Adicionar duas gotas do soro antiglobulina humana a cada tubo. Mistura bem;
4 - Centrifugar 15 seg a 3500 rpm;
5 - Suavemente, deslocar as hemácias do fundo do tubo e avaliar o grau de aglutinação macroscopicamente e, se necessario, microscopicamente;
6 - Fazer o teste com hemácias do Controle de Coombs para todas as reações negativas.

III.2.7 - PROVA DA ANTIGLOBULINA HUMANA INDIRETA (COOMBS INDIRETO)

PRINCIPIOS

A prova da antiglobulina humana indireta, ou teste de Coombs indireto (TCI), é usada para a detecção de hemácias sensibilizadas *in vitro*. Dependendo da especificidade do soro antiglobulina usado, podem ser detectados anticorpos ou frações do complemento ligados à células. O TCI pode ser empregado na pesquisa de antigenos (usando-se soros de especificidade conhecida) e também para testes de compatibilidade (provas cruzadas). A descrição abaixo é aplicada à pesquisa de aloanticorpos, utilizando-se duas células de seleção I e II com fenótipos conhecidos.

METODO EM TUBO

1ª ETAPA: MEIO SALINO A TEMPERATURA AMBIENTE.

Esta etapa visa detectar aloanticorpos salinos, de classe IgM, que reagem à temperatura ambiente.

1 - Marcar dois tubos I e II para cada amostra de soro a ser analisada;

2 - Colocar 2 gotas de soro em cada tubo;

3 - Colocar um gota da suspensão de hemácias de seleção I e II em cada tubo;

4 - Centrifugar por 15 seg a 3.500 rpm;

5 - Deslocar suavemente o botão de hemácias do fundo do tubo e avaliar o grau de aglutinação;

2ª ETAPA: MEIO PROTEICO A TEMPERATURA AMBIENTE.

Esta etapa tem por objetivo detectar aloanticorpos salinos que tem sua ação intensificada em meio proteico, bem como aloanticorpos albuminicos mais potentes, como os de classe IgG.

6 - Adicionar duas gotas de albumina bovina a 22% aos tubos I e II e misturar;

7 - Centrifugar 15 seg a 3500 rpm;

8 - Deslocar suavemente o botão de eritrócitos do fundo do tubo e avaliar o grau de aglutinação;

3ª ETAPA: MEIO PROTEICO A TEMPERATURA DE 37ºC.

Esta etapa visa detectar aloanticorpos albuminicos cuja reação se intensifica em 37ºC, especialmente os especificos para o Sistema Rh.

9 - Incubar os tubos a 37ºC entre 15 e 60 minutos;

10 - Centrifugar 15 seg a 3500 rpm;

11 - Deslocar suavemente o botão de hemácias do fundo do tubo e avaliar o grau de aglutinação;

4ª ETAPA: PROVA DA ANTIGLOBULINA HUMANA INDIRETA

Esta etapa visa detectar aloanticorpos que reagem através da antiglobulina humana, de classe IgG e fixadores de complemento.

12- Lavar a mistura de hemácias e soro pelo menos 3 vezes em solução salina, decantando o sobrenadante após cada centrifugação;

13- Adicionar duas gotas do soro de Coombs em cada tubo;

14- Centrifugar 15 seg a 3500 rpm;

15- Deslocar suavemente o botão de hemácias do fundo do tubo e avaliar o grau de aglutinação.

III.2.8 - PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE ALOANTICORPOS

PRINCIPIOS

A pesquisa e identificação de aloanticorpos antieritrocitários baseia-se na prova da antiglobulina humana indireta, a qual é realizada em quatro fases: salina, albumina em temperatura ambiente, albumina em 37ºC e de antiglobulina humana. As quatro fases empregadas visam detectar aloanticorpos que reagem em diferentes meios e temperaturas, inclusive os aloanticorpos naturais e imunes. A utilização de painéis de hemácias comerciais, contendo células fenotipadas homozigotas e heterozigotas para alguns antigenos é recomendável, pois determinados aloanticorpos apresentam efeito de dosagem e reagem mais intensamente com as células homozigotas.

METODO DO PAINEL A QUENTE

1ª ETAPA: MEIO SALINO A TEMPERATURA AMBIENTE.

O meio salino à temperatura ambiente facilita a identificação de aloanticorpos de classe IgM, tambem denominados salinos.

1 - Em uma estante, distribuir e identificar 11 tubos, de acordo com as hemácias reagentes do painel;

2 - Colocar duas gotas do soro contendo o aloanticorpo a ser identificado em cada tubo;

3 - Ressuspender as células do painel e adicionar um gota de cada hemácia reagente em cada tubo e misturar;

4 - Centrifugar 15 seg a 3500 rpm;

5 - Deslocar suavemente o botão de hemácias, observando a presença ou não de hemólise e aglutinação; graduar a intensidade das reações positivas de 1 a 4+ para cada tubo e anotar os resultados.

2ª ETAPA - MEIO PROTEICO A TEMPERATURA AMBIENTE.

Os alonticorpos de classe IgM, cujas reações se intensificam em meio proteico, e os de classe IgG são identificados nessa etapa.

6 - Adicionar duas gotas de albumina bovina a 22% em cada tubo e misturar;

7 - Centrifugar 15 segundos a 3500 rpm;

8 - Deslocar suavemente o botão de hemácias do fundo do tubo e avaliar o grau de aglutinação, anotando os resultados;

3ª ETAPA: MEIO PROTEICO A TEMPERATURA DE 37ºC

Essa etapa facilita a identificação dos aloanticorpos albuminicos específicos para os aloantígenos do Sistema Rh.

9 - Incubar todos os tubos em 37ºC entre 15 e 30 minutos.

10 - Centrifugar 15 seg a 3500 rpm;

11 - Deslocar suavemente o botão de hemácias do fundo do tubo e avaliar o grau de aglutinação, anotando os resultados;

4ª ETAPA: PROVA DA ANTIGLOBULINA HUMANA INDIRETA

Esta etapa identifica aloanticorpos de classe IgG, que regem pela prova de antiglobulina humana, tais como os específicos para os aloantígenos dos Sistemas Rh, Kell, Kidd e Duffy.

12 - Lavar as misturas de hemácias e soro pelo menos 3 vezes em salina, desprezando o sobrenadante após cada centrifugação;

13 - Adicionar duas gotas de antiglobunlina humana em cada tubo;

14 - Centrifugar 15 seg a 3500 rpm;

15 - Deslocar suavemente o botão de eritrócitos do fundo do tubo e avaliar o grau de aglutinação.

OBSERVAÇÕES

Os resultados obtidos para cada célula do painel comercial devem ser comparados com os dados do diagrama de antigenos fornecido pelo fabricante, para que se possa determinar a especificidade do aloanticorpo pesquisado.

METODO DO PAINEL A FRIO

1 - Marcar 10 tubos de acordo com as células do painel;
2 - Colocar 2 gotas do soro a ser testado em cada tubo;
3 - Adicionar 1 gota da suspensão de hemácias do painel em cada tubo;
4 - Incubar em banho de gelo por duas horas
5 - Sem centrifugar, deslocar suavemente o botão de hemácias do fundo do tubo, avaliar o grau de aglutinação e anotar os resultados.

III.2.9 - TESTE DE AUTOCONTROLE

PRINCIPIOS

A prova de autocontrole consiste no teste do soro contra as hemácias do mesmo indivíduo. Este teste deve ser realizado em todas as pesquisas de aloanticorpos e testes de compatibilidade sanguinea, pois permite detectar autoanticorpos naturais ou imunes.

METODOS

1 - Num tubo marcado AC, colocar duas gotas do soro a ser examinado;
2 - Adicionar uma gota da suspensão de hemácias a 5% do próprio indivíduo. Misturar;
3 - Prosseguir o teste exatamente do mesmo modo que a pesquisa de aloanticorpos.
4 - Avaliar o grau de reação macroscópica e microscopicamente, se necessário. O resultado do teste de autocontrole pela prova de AGH indireta é geralmente o mesmo que o da prova direta do próprio indivíduo, exceto em raras ocasiões.

III.2.10 - DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ALOANTICORPOS ANTIERITROCITARIOS

PRINCIPIOS

A detecção de aloanticorpos antieritrocitários é feita testando-se o soro contra hemácias que contenham o maior número possivel de aloantígenos conhecidos. Estas são denominadas células de seleção e podem ser obtidas comercialmente, como duas amostras de células do grupo O com antígenos já determinados. A escolha do grupo O é importante por eliminar reações devidas às aglutininas do Sisterma ABO.

Eventualmente, utiliza-se um pool de duas células diferentes de seleção, mas esta prática é menos sensivel e muitas vezes resulta em reações fracas (CM). Este pool de hemácias comerciais, quando usado, não poderá conter mais de duas amostras diferentes.

Quando não houver células diponíveis de painel comercial, usam-se amostras de hemácias de 2 ou 3 diferentes doadores, pois estas devem reunir a maioria dos antígenos de importância clínica. A desvantavem desta prática é que alguns antígenos de baixa freqüência, tais como **E, K, Le^a, Kp^a**, podem por acaso, não estar presentes em qualquer das amostras de hemácias escolhidas.

A pesquisa de aloanticorpos antieritrocitários é feita pela técnica do painel a quente. Se o soro reage com uma ou mais células do painel de seleção, pode-se deduzir que ele contém um ou mais aloanticorpos dirigidos contra um ou mais aloantígenos presentes nas hemácias usadas.

Procede-se então a identificação deste(s) aloanticorpo(s). Para tanto utiliza-se um painel de identificação, que consiste num grupo maior de hemácias do grupo O, com antígenos conhecidos. Dependendo das células com que o soro em estudo reage e daquelas com as quais ele não o faz, a especificidade do aloanticorpo do soro será determinada. Se pela técnica do painel a quente um soro reage com hemácias à temperatura ambiente, usa-se o painel a frio em temperatura de 10 a 18°C para identificação dos aloanticorpos reativos a frio.

Quando apenas um aloanticorpo se apresenta num soro a identificação é usualmente muito fácil. Mas quando há uma mistura de dois ou mais aloanticorpos, a determinação é muitas vezes complicada e requer testes adicionais além de grande experiência e habilidade. O

tipo de reatividade do aloanticorpo geralmente nos dá boa pista sobre sua especificidade.

OBSERVAÇÕES

1 - Aloanticopos que reagem a frio, isto é, em meio salino à temperatura ambiente, são na maioria da vezes anti-Le^{a}, Le^{b}, S, M, N, P ou auto-anti-I.

2 - Aloanticorpos que reagem somente pela prova de AGH indireta são, geralmente, dos sistemas Kell, Kidd ou Duffy.

3 - Aloanticorpos que reagem com albumina e pela prova AHG indireta são geralmente do Sistema Rh.

4 - Anticorpos que reagem pela AGH indireta, mas em geral não o fazem por técnica enzimática, são na maioria das vezes anti-M, N, S, Fy^{a} ou Fy^{b}.

5 - Anticorpos que causam hemólise *in vitro* são, na maioria das vezes, anti-Le^{a}, Le^{b}, auto-anti-I e raramente, anti-Jka e anti-P.

6 - Outras pistas de valor na determinação das especificidades dos aloanticorpos são: a força das reações devida ao efeito de dose e a frequência com a qual o soro reage com a média das células do painel.

7 - Quando houver uma mistura de vários aloanticorpos, devem-se usar técnicas de absorção e eluição, de modo a separá-los e identificá-los.

8 - Uma vez identificado o aloanticorpo procede-se então a pesquisa do aloantígeno correspondente nas hemácias do indivíduo, com um soro especifico, para confirmar-lhe a ausência (exceto em casos de autoanticorpos). A determinação dos aloantígenos presentes nas hemácias do paciente, cujo soro esta sendo testado, será muito útil para se saber quais os aloanticorpos que ele poderá ou não formar. Se possuir determinado aloantígeno em suas hemácias, não podera desenvolver o aloanticorpo correspondente, exceto autoanticorpos. E preciso cuidado na interpretação do fenótipo de qualquer pessoa após a transfusão, pois podem aparecer reações de campo misto (CM) tornando-

se dificil identificar quais são as células do paciente e as transfundidas.

9 -Quando um soro reage com todas as células do painel e a maioria das células dos doadores, deve-se suspeitar da presença de aloanticorpos especificos para os aloantigenos de alta freqüência, desde que a hipótese de aloanticorpos múltiplos tenha sido descartada. Nestes casos, muitas vezes será recomendável a consulta de um laboratório de referência.

III.2.11 - METODOS ENZIMATICOS

PRINCIPIOS

O tratamento de hemácias com certas enzimas interfere no grau de aglutinação proporcionado por alguns aloanticorpos. Esse fato decorre da capacidade das enzimas retirarem resíduos de àcido siálico das membranas eritrocitárias. O tratamento prévio de eritrócitos com ficina resulta na destruição dos aloantigenos **M**, **N**, **Fy^a** e **Fy^b**. Por outro lado essa mesma enzima potencializa as reações com aloantigenos dos Sistemas Rh, Lewis, Ii e P (MARSH, 1984).

As técnicas com enzimas podem ser realizadas em um estágio onde incuba-se eritrócitos, soro e enzimas, ou em dois estágios, que consiste no tratamento prévio das hemácias, antes da incubação.

Hemácias tratadas com enzimas, muitas vezes apresentam aspecto em suspensão finamente granulado, o que pode resultar em reações falso-positivas. Deve-se ainda evitar a leitura microscópica, para não aumentar as dificuldades de avaliação dos resultados.

Embora as técnicas enzimáticas sejam de grande utilidade na detecção e identificação de aloanticorpos, na classificação sanguinea e nas provas cruzadas, revelando aloanticorpos e/ou aloantigenos que não foram demonstrados por outras técnicas de rotina, jamais se deve abandonar ou substituir o teste de Coombs indireto.

As técnicas que envolvem o uso de enzimas devem ser controladas. Em primeiro lugar, a solução enzimática deve ser testada periodicamente para assegurar sua atividade. Em segundo, controles positivos e negativos bem como autocontrole, devem ser feitos.

As enzimas comumente usadas para estudos de aloanticorpos são bromelina, ficina, papaina e tripsina. Normalmente a bromelina e a papaina podem ser utilizadas em um ou dois estágios

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE PAPAINA A 1%

REAGENTES

1 - 1 g de papaina

2 - 0,325 g de hidrocloreto de L-cisteina

3 - 100 ml de solução salina a 0,9% tamponada

PROCEDIMENTO

1 - misturar bem os reagentes para dissolver;

2 - centrifigar a 2500 rpm, durante 10 min;

3 - desprezar o precipitado e congelar o sobrenadante em alíquotas de 2 ml. Descongelar apenas no momento do uso.

TRATAMENTO DOS ERITROCITOS COM PAPAINA

METODO EM UM ESTAGIO

1 - adicionar em um tubo de hemólise 1 gota de soro, 1 gota da solução de papaina a 1% e 1 gota da suspenão de hemácias a 5%;

2 - incubar em temperatura ambiente, por 30 min;

3 - avaliar o grau de aglutinação;

4 - se negativo, incubar em 37°C por 30 min;

5 - avaliar o grau de aglutinação sem centrifugar.

METODO EM DOIS ESTAGIOS

1 - diluir a solução de papaina a 1% a 1:20, com solução salina tamponada;

2 - adicionar uma gota da solução de papaina diluida em 11 tubos previamente marcados;

3 - adicionar em cada tubo, uma gota de hemácias do painel;

4 - incubar a 37°C durante 30 min;

5 - adicionar duas gotas do soro a ser avaliado em cada tubo;

6 - centrifugar e interpretar o grau de aglutinação.

III.2.12 - ESQUEMA PARA A DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ALOANTICORPOS ANTIERITROCITARIOS

METODOS

1 - Tipagens ABO e Rh.

2 - Prova de AGH direta. Se positivo, fazer eluição e painel com o eluato.

3 - Triagem de aloanticorpos e autocontrole

4 - Painel pela prova de AGH indireta. Se necessário, fazer painel por técnica enzimática.

5 - Determinar os antigenos dos eritrócitos

6 - Interpretação, avaliação e confronto dos resultados com a história clinica e condições atuais do paciente.

OBSERVAÇÕES

1 - Para evitar reações inespecíficas por aloanticorpos naturais e/ou fixação do complemento, aquecer as hemácias, o soro, a salina e o soro de Coombs antes de fazer o painel.

2 - Prolongar o tempo de incubação para aumentar a sensibilidade do teste.

3 - Aumentar a proporção de soro em relação às hemácias para melhorar a sensibilidade do teste.

4 - Diluir o soro para evitar o efeito prozona.

5 - Adicionar soro fresco de cobaio como fonte de complemento, se for o caso.

6 - Concentrar os aloanticorpos.

7 - Diminuir a força iônica da solução para aumentar a fixação de aloanticorpos frios.

8 -Fazer o eluato, mesmo que a prova de AGH direta seja negativa, se houver evidência de anemia hemolítica.

III.2.13 - ANALISES ESTATISTICAS (BUSSAB & MORETTIN, 1986)

As principais ferramentas estatisticas utilizadas para análises dos dados foram:

a - cálculo de estatísticas descritivas;

b - testes de hipóteses para comparação de valores médios;

c - testes de independência entre variáveis qualitativas.

DESCRIÇÃO DAS FERRAMENTAS APLICADAS

Os cálculos de média, desvio-padrão, mínimo, máximo, mediana e coeficiente de variação foram introduzidos a fim de fornecer um resumo dos dados, além de permitir uma explanação inicial dos dados observados, induzindo possíveis comparações.

Considera-se que $X_1, ..., X_n$ é uma amostra de n indivíduos nos quais foi observada a variável X.

MÉDIA : $\bar{X} = \sum_{i=n}^{n} \frac{X_i}{n}$

DESVIO PADRÃO : $S = \sqrt{\sum_{i=1}^{n} \frac{(X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$

VARIÂNCIA : S^2

MÍNIMO: o menor valor observado na amostra.

MÁXIMO: o maior valor observado na amostra.

MEDIANA: valor que ocupa posição central do conjunto de dados quando estes estão ordenados segundo suas grandezas.

O teste de comparação de médias aplicado foi o t de Student, cujo intuito é verificar as possíveis diferenças de comportamento entre os grupos analisados, com respeito a uma determinada variável quantitativa.

HIPOTESES DE TESTES:

$H_o : \mu_1 = \mu_2$: o grupo 1 e o grupo 2 são iguais em média.

contra

$H_A : \mu_1 \neq \mu_2$: existe alguma diferença entre os grupos 1 e 2.

ESTATISTICA DE TESTE:

a - supondo-se que duas populações tem mesma variância:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S_p \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}}$$ → tem distribuição t-Student com n + m - 2 graus de liberdade

onde,

$$\bar{X}_1 = \frac{\sum_{i=1}^{n} X_{1i}}{n}$$ → média amostral do grupo 1 com n elementos

$$\bar{X}_2 = \frac{\sum_{i=1}^{m} X_{2i}}{m}$$ → média amostral do grupo 2 com m elementos

$$S_p^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} (X_{1i} - \bar{X}_1)^2 + (X_{2i} - \bar{X}_2)^2}{n + m - 2}$$

e $X_{11}, \ldots, X_{1n}$ e $X_{21}, \ldots, X_{2n}$ são amostras provenientes de populações com distribuição normal.

b - supondo que duas populações não tem mesma variância:

$$t = \frac{(X_1 - X_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n} + \frac{S_2^2}{m}}}$$ → tem distribuição t-Student com ν graus de liberdade

onde,

$$\upsilon = \frac{\frac{S_1^2}{n} + \frac{S_2^2}{m}}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n}\right)^2}{n-1} + \frac{\left(\frac{S_1^2}{m}\right)^2}{m-1}}$$

: são as variâncias amostrais dos grupos 1 e 2 respectivamente.

REGRA DE DECISÃO:

Fixado um nível de significância alfa de 5%, a rejeição de H_o se dá sempre que se obtiver uma probabilidade de significância inferior a alfa, isto é, 5%. Deste modo, pode-se ter ou não evidências em favor da hipótese H_o considerada, pois a cada teste uma variável é verificada em duas condições populacionais distintas.

O teste de independência é apropriado para avaliar associações entre variáveis qualitativas, ou seja, aquelas cuja resposta é um atributo. Assim os elementos observados correspondem ao número de ocorrências dos atributos de cada variável.

A estatística X^2 é aplicada no teste das seguintes hipóteses:

H_o: há independência entre as duas variáveis,

contra

H_1: há associação entre as duas variáveis.

A finalidade no cálculo do X^2 é quantificar descritivamente o grau de dependência entre as duas variáveis confrontadas

$$X^2 = \Sigma \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

onde o_i é aa freqüência observada e e_i é a freqüência esperada, sob hipótese de independência. Quanto maior for valor de X^2, mais o observado se distancia do esperado e maior é a dependência entre as variáveis.

A estatística X^2 tem distribuição qui-quadrado com (l-1) x (c-1) graus de liberdade, no qual l e c correspondem aos números de atributos das variáveis confrontadas.

Para um valor de alfa fixado em 5%, a rejeição da hipótese de indenpendência se verifica à medida que aumenta o valor de X^2 e consequentemente diminui a probabilidade de significância, sendo inferior ao nivel alfa de 5%.

Em ambas as situações de teste de hipóteses o que se obtém são evidências em favor de uma ou outra hipótese.

IV – RESULTADOS

Os dados gerais sobre os 119 pacientes estudados foram colhidos junto aos respectivos Serviços de Transfusão. Os prontuários médicos foram consultados para conhecimento do quadro evolutivo da patologia para cada caso. Foram anotados a idade, o sexo, a cor, a idade em que se deu o diagnóstico da hemoglobinopatia, a idade em que se iniciaram as transfusões, o intervalo entre cada transfusão, o número de unidades transfundidas e se haviam sido esplenectomizados. O número de unidades de sangue transfundidas e o intervalo entre cada transfusão foram obtidos com base nas datas em que os pacientes retornaram ao Serviço de Transfusão. Cada paciente ou seu responsável foram questionados sobre a ocorrência de reações após as transfusões, e se essas se manifestaram imediatamente ou em dias posteriores. Nenhum caso foi confirmado. Alguns pacientes não iniciaram essa terapia nos Centros de Tranfusão onde esse estudo foi realizado. Por esse motivo, seus dados transfusionais prévios são incompletos. As tabelas 1 e 2 apresentam dados gerais sobre a população.

O sangue colhido com anticoagulante permitiu a tipagem direta para os aloantigenos dos Sistemas ABO e Rh sendo que a prova reversa para o Sistema ABO foi feita com soro. Como as amostras de soro foram colhidas antes dos procedimentos transfusionais, ao serem submetidas à prova de antiglobulina humana direta (Coombs direto) e prova de autocontrole, apresentaram resultados negativos. Esse procedimento visou eliminar possíveis casos com presença de autoanticorpos antieritrocitários, bem como aqueles com eritrócitos remanescentes da transfusão anterior.

A pesquisa de aloanticorpos antieritrocitários de significado clínico foi efetuada nas amostras de soro.

Foram detectados aloanticorpos antieritrocitários de significado clínico em 19 (15,97%) pacientes, de um total de 119 estudados. O método de detecção baseou-se na utilização da prova de antiglobulina humana indireta (Coombs indireto), através de um painel

TABELA 1. Procedência dos pacientes analisados separados por sexo e patologia.

PROCEDÊNCIA	TALASSEMIA BETA MAIOR			ANEMIA FACIFORME HOMOZ.			TOTAL
	M	F	T	M	F	T	
CAMPINAS	12	18	30	14	4	18	48
MARILIA	11	4	15	9	9	18	33
S J R PRETO	9	8	17	14	7	21	38
TOTAL GERAL	32	30	62	37	20	57	119

TABELA 2. Distribuição da população por patologia, sexo, tipo sanguíneo nos Sistemas ABO e Rh e esplenectomia.

	TALASSEMIA			FALCIFORME		
	M	F	T	M	F	T
A	14	8	22	5	4	9
B	3	3	6	3	1	4
AB	0	1	1	0	0	0
O	15	18	33	29	15	44
Rh+	28	27	55	31	18	49
Rh-	3	3	6	6	2	8
ESPLENECT.	7	5	10	1	0	1

contendo duas células de seleção I e II, ambas do grupo O, fenotipadas para os aloantigenos dos Sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, Xg, Lewis, MNS, P e Lutheran. Essa prova foi realizada com células pré-tratadas e não tratadas com papaina, para facilitar a detecção de aloanticorpos que reagem mais intensamente nessa condição. O apêndice 1 apresenta as caracteristicas das células de seleção I e II utilizadas.

As 19 amostras de soro que apresentaram aloanticorpos foram analisadas em um painel de eritrócitos com 11 células do grupo O, sendo 10 fenotipadas para os aloantigenos dos Sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, Xg, Lewis, MNS, P e Lutheran, e 1 de cordão umbelical, pré-tratadas e não tratadas com papaina. Esse procedimento permitiu a identificação de 6 especificidades para os aloanticorpos detectados, assim distribuidas: 5 anti-D, 1 anti-CD, 1 anti-c, 2 anti-E, 9 anti-K e 1 anti-Fy^a. O apêndice 2 apresenta as características das células do painel de identificação. As figuras 8 e 9 mostram reações de aglutinação positivas com uso das células de Seleção I e II e do painel de identificação. A tabela 3 mostra as especificidades dos aloanticorpos por grupo.

Abaixo são apresentadas as codificações utilizadas junto às tabelas com os respectivos resultados:

TAL = talassemia beta maior.
FAL = anemia falciforme homozigota.
F = sexo feminimo.
M = sexo masculino.
INICIO = idade de inicio das transfusões.
TEMPO = tempo de transfusão.
UNID = número de unidades de sangue transfundidas.
IDADE = idade do paciente no momento do estudo.

Os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com o tipo de hemoglobinopatia: TALASSEMIA (**TAL**) e FALCIFORME (**FAL**). Essa divisão objetivou facilitar a comparação entre os grupos estudados para as diferentes caracteristicas analisadas. Assim foi possivel compará-los quanto à idade de inicio das transfusões, quanto ao número de unidades de sangue transfundidas e aloimunização.

O grupo TALASSEMIA constituiu-se de 62 (52,1%) pacientes, sendo 32 do sexo masculino e 30 femininos. No grupo FALCIFORME com 57 (47,9%) pacientes, 37 eram masculinos e 20 femininos. A figura 10

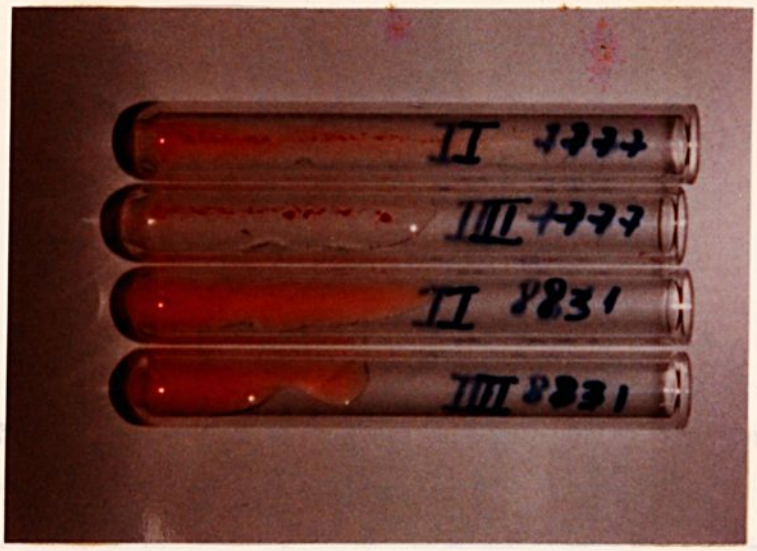


FIGURA 8. Reação das células de Selação I e II com amostras de soro com e sem aloanticorpos antieritrocitários.



FIGURA 9. Reação das células do painel de identificação com amostra de soro contendo aloanticorpo antieritrocitário.

TABELA 3. Distribuição dos aloanticorpos antieritrocitários detectados na população por grupo e especificidade.

GRUPOS	Nº	ESPECIFICIDADES											
		Anti-D		Anti-CD		Anti-c		Anti-E		Anti-K		Anti-Fy^a	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
TAL	62	2	3,2	0	0	0	0	0	0	8	12,9	0	0
FAL	57	3	5,2	1	1,7	1	1,7	2	3,5	1	1,7	1	1,7
TOTAL	119	5	4,2	1	0,8	1	0,8	2	1,6	9	7,56	1	0,8

mostra a distribuição percentual dos aloanticorpos por grupo.

Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos I e II. O primeiro compreende os pacientes que inciaram a terapêutica transfusional antes dos 18 meses de vida e o segundo, após essa idade. Essa divisão objetivou determinar se a idade de inicio das transfusões exerce influência na aloimunização. Como as manifestações clinicas dessas patologias são geralmente evidenciadas após o sexto mes, entendemos que 18 meses representa um periodo suficiente para o aparecimento dos sinais e sintomas e consequentemente para o inicio das transfusões na maioria dos casos. Alguns estudos tem atestado que as transfusões realizadas antes dos 12 meses de idade reduz as chances de aloimunização em função da imaturidade do sistema imune (LUDVIGSEN e cols., 1982; FLOSS e cols., 1986). Dados da literatura atestam que, em modelos animais, a exposição a antigenos no periodo neonatal contribui para a aquisição de tolerância imunológica devida à supressão da maturação dos precurssores dos linfócitos B (FUNG & KOHLER, 1980). Foram anotados 55 pacientes no subgrupo I e 64 no grupo II. As tabelas 11 e 14 mostram o percentual de aloimunização para os subgrupos I e II.

Os resultados apresentados a seguir enfatizam o interesse do estudo em estabelecer comparações e associações envolvendo os dois grupos estudados.

A idade de início das transfusões, número de unidades de sangue transfundidas, tempo de transfusão e idade de diagnóstico da doença foram enfatizadas com propósito de investigar comparativamente a aloimunização entre os grupos considerados. Os dados são apresentadas nas tabelas a seguir, onde a população estudada é dividida por grupo e subdividida por sexo, inicialmente. Posteriomente, cada grupo é subdividido em I e II.

Os resultados apresentados na tabela 4 mostram uma visão inicial do comportamento geral de cada grupo para o início, tempo e unidades de sangue transfundidas. Através desses valores é possível se obter noções de posição e variabilidade, comparativamente, por grupo.

Considerando os dados apresentados na tabela 4, verifica-se que os pacientes com anemia falciforme homozigota iniciam as transfusões com aproximadamente o dobro da idade dos portadores de talassemia beta maior, revelando uma diferença de média significativa ($p = 0,0003$). Essa diferença pode ser resultante da manifestação

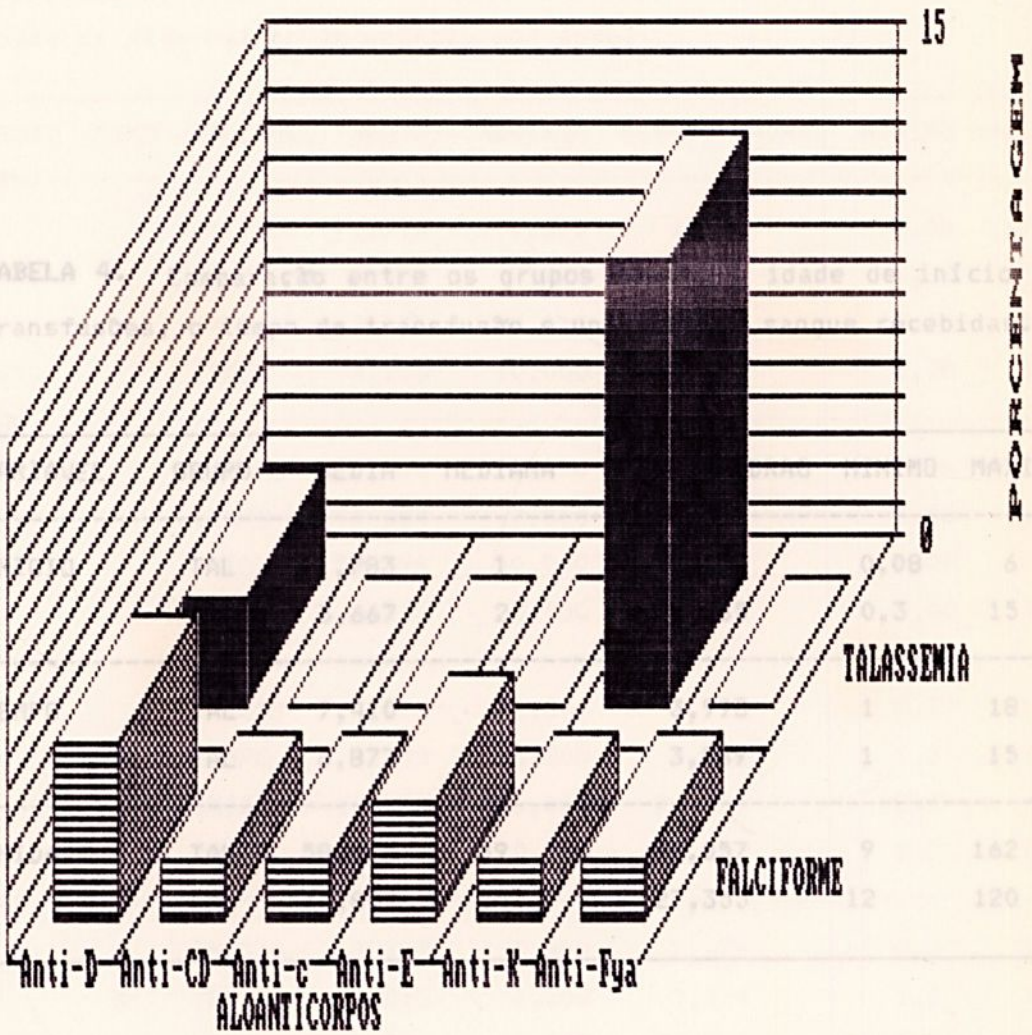


FIGURA 10. Distribuição dos aloanticorpos por patologia.

TABELA 4. Comparação entre os grupos quanto à idade de início das transfusões, o tempo de transfusão e unidades de sangue recebidas.

VARIAVEL	GRUPO	MEDIA	MEDIANA	DESVIO-PADRAO	MINIMO	MAXIMO
INICIO	TAL	1,783	1	1,475	0,08	6
	FAL	3,667	2	3,435	0,3	15
TEMPO	TAL	7,410	7	3,993	1	18
	FAL	6,877	6	3,889	1	15
UNIDADE	TAL	58,835	59	28,057	9	162
	FAL	54,807	54	27,355	12	120

TABELA 5. Comparação entre os grupos quanto à idade de início das transfusões, tempo de transfusão, unidades de sangue transfundidas e idade de diagnóstico da doença, por sexo.

GRUPO	SEXO	VARIAVEL	MEDIA	MEDIANA	DESVIO-PADRAO	MINIMO	MAXIMO
TAL	F	INICIO	1,795	1,000	1,554	0,08	6,0
		TEMPO	7,438	7,875	3,253	1,30	15,2
		UNID	67,883	63,500	29,389	18,00	162,0
		IDADE	9,230	10,000	3,048	2,00	16,0
	M	INICIO	1,772	1,000	1,422	0,16	5,0
		TEMPO	7,384	7,000	4,635	1,00	18,0
		UNID	50,594	50,000	24,328	9,00	95,0
		IDADE	9,156	8,000	4,873	3,00	19,0
FAL	F	INICIO	4,425	2,000	4,587	0,3	15,0
		TEMPO	6,625	6,000	4,442	1,0	15,0
		UNID	46,350	36,000	26,757	12,0	94,0
		IDADE	11,060	10,500	6,202	2,0	28,0
	M	INICIO	3,257	3,000	2,326	0,5	11,0
		TEMPO	7,013	6,000	3,614	1,0	15,0
		UNID	59,378	60,000	26,926	12,0	120,0
		IDADE	10,270	9,00	4,799	2,0	21,0

TABELA 6. Comparação entre os grupos considerando os indivíduos que iniciaram as transfusões com idade igual ou menor que 18 meses.

VARIAVEL	GRUPO	MEDIA	MEDIANA	DESVIO-PADRAO	MINIMO	MAXIMO
	TAL	0,772	1,00	0,325	0,08	1,0
INICIO						
	FAL	0,889	1,00	0,330	0,30	1,5
	TAL	7,850	7,00	4,043	1,30	18,0
TEMPO						
	FAL	5,722	5,25	3,554	1,00	12,7
	TAL	58,648	59,00	27,713	15,00	162,0
UNID						
	FAL	47,722	46,50	22,836	12,00	94,0

TABELA 7. Comparação entre os grupos considerando os indivíduos que iniciaram as transfusões após os 18 meses.

VARIAVEL	GRUPO	MEDIA	MEDIANA	DESVIO-PADRAO	MINIMO	MAXIMO
	TAL	3,280	3	1,208	2	6
INICIO						
	FAL	4,948	4	3,464	2	15
	TAL	6,760	7	3,908	1	16
TEMPO						
	FAL	7,410	6	3,965	1	15
	TAL	59,360	59	29,113	9	120
UNID						
	FAL	58,077	60	28,892	12	120

precoce da talassemia beta maior em comparação à anemia falciforme homozigota, bem como do diagnóstico precoce e correto, o qual favorece a adoção de esquemas terapêuticos adequados. O grupo de portadores de talassemia beta maior se comportou de forma mais homogênea, tendo menor variabilidade quanto à idade de início das transfusões.

Outro aspecto de relevância, que envolve a idade de início das transfusões, é a divergência de comportamento dos indivíduos que iniciaram as transfusões com até 18 meses de idade daqueles que o fizeram com idade maior. Não se observa diferença significativa na idade de início das transfusões entre os grupos, tomando a subamostra de indivíduos que começaram a se transfundir com menos de 18 meses. Nestas condições os pacientes com anemia falciforme homozigota se comportam da mesma forma que os portadores de talassemia beta maior. Entretanto, esse fato não é constatado para os pacientes inicialmente transfundidos com idade superior a 18 meses, pois estes já apresentam diferença de média significativa ($p = 0,0081$). As tabelas 6 e 7 fornecem os valores médios observados para os dois grupos na duas condições acima mencionadas, com os respectivos desvios-padrão, fornecendo uma breve noção de variabilidade dentro de cada grupo.

De maneira geral a idade de início das transfusões, quando explorada segundo o sexo dentro de cada grupo, não revela diferenças significativas ao se aplicar o teste t para comparação das médias. Portanto não há evidências para crer que portadores de talassemia beta maior e de anemia falciforme homozigota iniciem suas transfusões com idade diferenciada por sexo. A tabela 5 mostra os dados que permitem uma possível diferenciação entre os grupos para um sexo em comum.

O tempo de transfusão, também comparado entre os grupos, representa o total de anos que o paciente se submeteu à terapêutica transfusional. Analisando os dados da tabela 5 constata-se inicialmente semelhança entre os grupos TALASSEMIA e FALCIFORME quanto a esse fator. As evidências estatísticas indicam que não há diferenciação entre as patologias e que os pacientes dos dois grupos se transfundem, em média, durante o mesmo período ($p = 0,463$). A homogeneidade entre os grupos persiste mesmo quando a comparação é aplicada aos pacientes que iniciaram as transfusões antes dos 18 meses de idade. A diferença de médias encontrada não é significativa pois $t = -1,902$ e $p = 0,0626$. Observa-se tambem que para os indivíduos restantes, cuja primeira transfusão foi realizada em idade acima de 18

meses, a diferença não é significativa. Tal fato demonstra que, embora exista uma pequena inversão quanto aos valores amostrais, neste subconjunto populacional os portadores de anemia falciforme homozigota se transfundem a mais tempo que os com talassemia beta maior. Porém não se pode caracterizar a diferença resultante como significativa. A tabela 5 apresenta as médias amostrais para comparação entre os grupos quanto ao tempo de transfusão.

A comparação entre os sexos, dentro de cada grupo, para o tempo médio de transfusão não mostra diferença significativa ($p > 0,05$). Como pode ser notado na tabela 5, dentro do grupo de portadores de talassemia beta maior, a média amostral para o sexo feminino é ainda mais próxima da média para o masculino, quando comparada com o grupo de anemia falciforme homozigota.

Os resultados obtidos para o número de unidades de sangue transfundidas se assemelham àqueles para o tempo de transfusão. Assim, provém da aplicação dos testes de comparação de valores médios que:

a - o número médio de unidades de sangue transfundidas pelos portadores das duas patologias não difere significativamente, pois $t = 0,8116$ e $p = 0,4187$.

b - tanto para aqueles cuja primeira transfusão foi feita até os 18 meses de vida quanto para os restantes, o número médio de unidades não é considerado diferente entre os dois grupos. Portadores de anemia falciforme homozigota e de talassemia beta maior recebem, em média, o mesmo número de unidades durante o tratamento das doenças.

c - embora não se note diferença significativa para os dois grupos como um todo, nota-se um comportamento diferenciado entre os sexos dentro do grupo TALASSEMIA. Com $p = 0,0143$ tem-se evidências suficientes para constatar que o sexo feminino se transfunde mais vezes que o masculino. De acordo com os valores amostrais da tabela 5, nota-se um nítida superioridade do sexo feminino, recebendo maior número de unidades de sangue. Este aspecto comparece como um ponto de divergência de comportamento entre os dois grupos, pois para os pacientes com talassemia beta maior o sexo masculino é mais homogêneo que o feminino. Acreditamos que questões de ordem econômica, bem como os cuidados da família para com o paciente, possam responder por essa

diferença. No grupo FALCIFORME a situação se inverte, embora a diferença não seja significativa.

Com o propósito de determinar a influência do número de transfusões na aloimunização, a população foi dividida em 3 faixas etárias: 0 a 6 anos, 7 a 12 anos e 13 anos ou mais. Na faixa etária mais elevada, que recebeu maior número de unidades de sangue, situa-se a maioria dos pacientes aloimunizados para os dois grupos. As tabelas 8 e 9 mostram essas relações.

Na tabela 10 são apresentados os dados sobre os grupos estudados. Os valores de $X^2 = 0,003$ e $p = 0,960$ indicam que a frequência de aloimunização em pacientes com anemia falciforme homozigota não é significativamente diferente daquela encontrada em portadores de talassemia beta maior.

Na tabela 12 estão relacionados 3 fatores: idade de início das transfusões, sexo e grupo. Observa-se que não há diferença significativa na proporção de pacientes do sexo feminino nos dois níveis de idade ($>$ 18 e $<$ 18 meses). Esse resultado é verificado tanto para o grupo com anemia falciforme homozigota ($X^2 = 1,011$ e $p = 0,315$) como para o grupo com talassemia beta maior homozigota ($X^2 = 0,003$ e $p = 0,960$). Portanto constata-se que não há diferença entre sexo e idade de início da transfusões para as duas patologias consideradas (TABELA 11).

Pela análise da tabela 13 nota-se que não há diferença significativa na proporção de indivíduos aloimunizados com idade de início de transfusão até 18 meses em relação àqueles que iniciaram as tranfunsões com mais de 18 meses. Dos cálculos de $X^2 = 0,742$ e $p = 0,389$, pode-se concluir, por falta de evidências contrárias, que o número de aloimunizados não difere significativamente de um grupo para outro. Isto significa que pacientes com anemia falciforme homozigota e talassemia beta maior se aloimunizaram na mesma proporção depois dos 18 meses de idade (TABELA 14).

Baseando-se nesses dados amostrais verifica-se uma diferença altamente significativa entre as idades médias de diagnóstico da duas patologias, sendo que a anemia falciforme homozigota é detectada posteriormente à talassemia beta maior. Este ponto vem de encontro ao obtido para a idade de início das transfusões, demonstrando que as transfusões iniciam-se a partir do diagnóstico da doença ou próximo dele (TABELAS 5 e 15).

TABELA 8. Número médio de unidades de sangue transfundidas por faixa etária na população geral.

FAIXA ETARIA	Nº PACIENTES	MEDIA	DESVIO-PADRAO
0 - 6	28	31,07	15,529
7 - 12	59	59,60	24,570
13 ou mais	32	74,71	25,138

TABELA 9. Número de pacientes aloimunizados por faixa etária dentro de cada grupo.

FAIXA ETARIA	TALASSEMIA		FALCIFORME		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0 - 6	1	5,26	1	5,26	2	10,52
7 - 12	4	21,05	2	10,52	6	31,57
13 ou mais	5	26,31	6	31,57	11	57,88
TOTAL	10	52,63	9	47,37	19	100,00

TABELA 10. Distribuição do percentual de aloimunização por grupo de pacientes estudados.

		ALOIMUNIZAÇÃO	
GRUPO	NÚMERO	NÚMERO	PORCENTAGEM
TALASSEMIA	62	10	16,13
FALCIFORME	57	9	15,79
TOTAL	119	19	15,97

TABELA 11. Distribuição percentual de aloimunização para os pacientes que iniciaram as transfusões antes de 18 meses de idade.

GRUPO	Nº	NÚMERO DE ALOIMUNIZADOS	PORCENTAGEM
TALASSEMIA	37	4	10,81%
FALCIFORME	18	3	16,67
TOTAL	55	7	12,73

TABELA 12. Distribuição de sexo para idade de início das transfusões nos diferentes grupos.

IDADE DE INICIO (MESES)	SEXO	FALCIFORME			TALASSEMIA		
		TOTAL	Nº	%	TOTAL	Nº	%
< 18	F	18	8	44,44	37	18	48,65
> 18	F	39	12	30,77	25	12	48,00
TOTAL		57	20	35,09	62	30	48,39

TABELA 13. Distribuição da aloimunização por idade de início de transfusão par os diferentes grupos.

IDADE DE INICIO (MESES)	FALCIFORME			TALASSEMIA		
	TOTAL	Nº	%	TOTAL	Nº	%
< 18	18	3	16,67	37	4	10,81
> 18	39	6	15,38	25	6	24,00
TOTAL	57	9	15,79	62	10	16,13

TABELA 14. Distribuição de aloimunização para indivíduos que iniciaram as transfusões com mais de 18 meses de idade.

GRUPO	Nº	ALOIMUNIZAÇÃO	
		Nº	%
TALASSEMIA	25	6	24,00
FALCIFORME	39	6	15,38
TOTAL	64	12	18,75

TABELA 15. Valores para idade de diagnóstico da doença, por grupo.

GRUPO	MEDIA	MEDIANA	DESVIO-PADRÃO	MINIMO	MAXIMO
TALASSEMIA	1,995	1	1,587	0,3	8
FALCIFORME	3,625	3	2,821	0,6	14

A tabela 16 fornece alguns resultados envolvendo comparações entre indivíduos aloimunizados e não aloimunizados mediante os fatores idade de início das transfusões, número de unidades de sangue recebidas, tempo de transfusão e idade. A partir desses resultados pode-se concluir que no grupo TALASSEMIA há uma diferença significativa, embora sem fortes evidências (p = 0,049), entre a idade média dos pacientes aloimunizados e dos não aloimunizados. Constata-se que os aloimunizados são um pouco mais velhos que os não aloimunizados.

Outro ponto que merece destaque é a diferença significativa entre o tempo médio de transfusão dos portadores de anemia falciforme homozigota aloimunizados e o tempo dos não aloimunizados. Esse fato revela com alta significância (p = 0,0101) que, em média, os pacientes com anemia falciforme homozigota aloimunizados se transfundem a mais tempo que aqueles que não se aloimunizaram. A tabela 17 mostra o número de pacientes aloimunizados por cidade de origem. Da análise desses dados verifica-se que os pacientes com talassemia beta maior provenientes da região de Campinas apresentam maior freqüência de aloanticorpos anti-K. Essa diferença pode ser decorrente de transfusões incompatíveis. Antes de serem admitidos no CIPOHI, esses pacientes provavelmente receberam unidades de sangue que eram fenotipadas apenas para os aloantígenos dos Sistema ABO e Rh$_o$(D). Por outro lado, os pacientes da região de São Jose do Rio Preto mostraram maior freqüência de aloanticorpos do Sistema Rh. Os esquemas transfusionais adotados nessa região não preconizam a utilização de sangue fenotipado para os vários aloantígenos do Sistema Rh, exceto o D. Essa conduta contribui decisivamente para a aloimunização. As figuras 11, 12 e 13 apresentam a distribuição dos aloanticorpos na talassemia beta maior, na anemia falciforme homozigota e na população geral, respectivamente.

TABELA 16. Resultados provenientes da aplicação do teste t.

GRUPO	VARIAVEL	ALOIMUNIZAÇÃO	ESTATISTICAS			
			MEDIA	DESV-PADR	t	p
TAL	INICIO	SIM	2,296	1,824	-1,025	0,2329
		NÃO	1,684	1,397		
	TEMPO	SIM	9,204	4,200	-1,569	0,1219
		NÃO	7,065	3,900		
	UNID	SIM	66,100	15,926	-1,312	0,2022
		NÃO	57,557	29,738		
	IDADE	SIM	11,500	3,535	-2,009	0,049
		NÃO	8,750	4,033		
FAL	INICIO	SIM	3,333	4,131	0,3147	0,7542
		NÃO	3,729	3,336		
	TEMPO	SIM	9,888	3,698	-2,666	0,0101
		NÃO	6,312	3,693		
	UNID	SIM	62,111	23,321	-0,871	0,3875
		NÃO	53,437	28,052		
	IDADE	SIM	13,222	6,906	-1,681	0,0983
		NÃO	10,042	4,859		

TABELA 17. Número de pacientes aloimunizados por patologia e procedência.

PROCEDENCIA	PACIENTES		PACIENTES ALOIMUNIZADOS			
	Nº	%	TALASSEMIA		FALCIFORME	
			Nº	%	Nº	%
CAMPINAS	48	40,0	6	12,5	1	2,08
MARILIA	33	27,7	1	3,3	2	6,60
S J RIO PRETO	38	31,9	3	7,8	6	15,78
TOTAL	119		10		9	

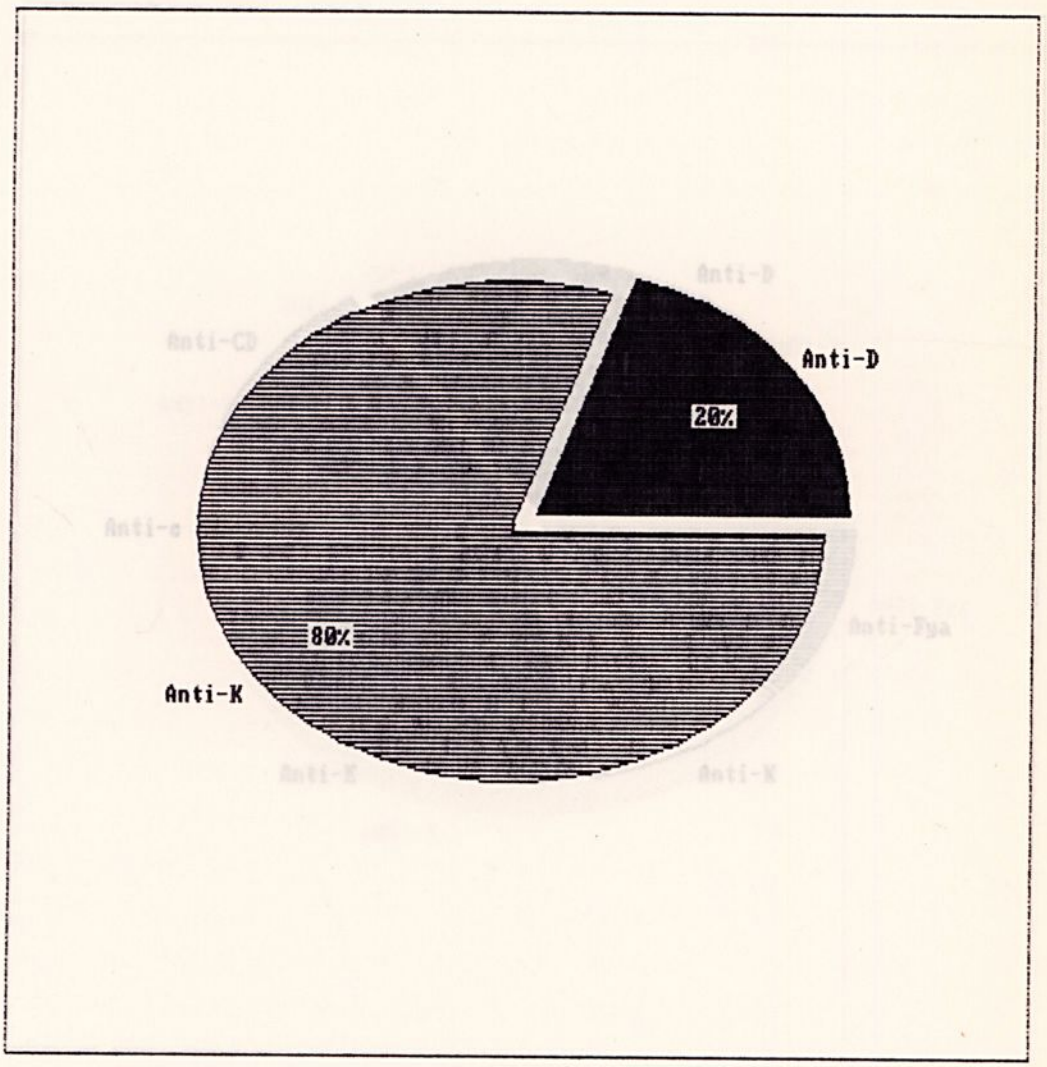


FIGURA 11. Distribuição dos aloanticorpos na talassemia beta maior.

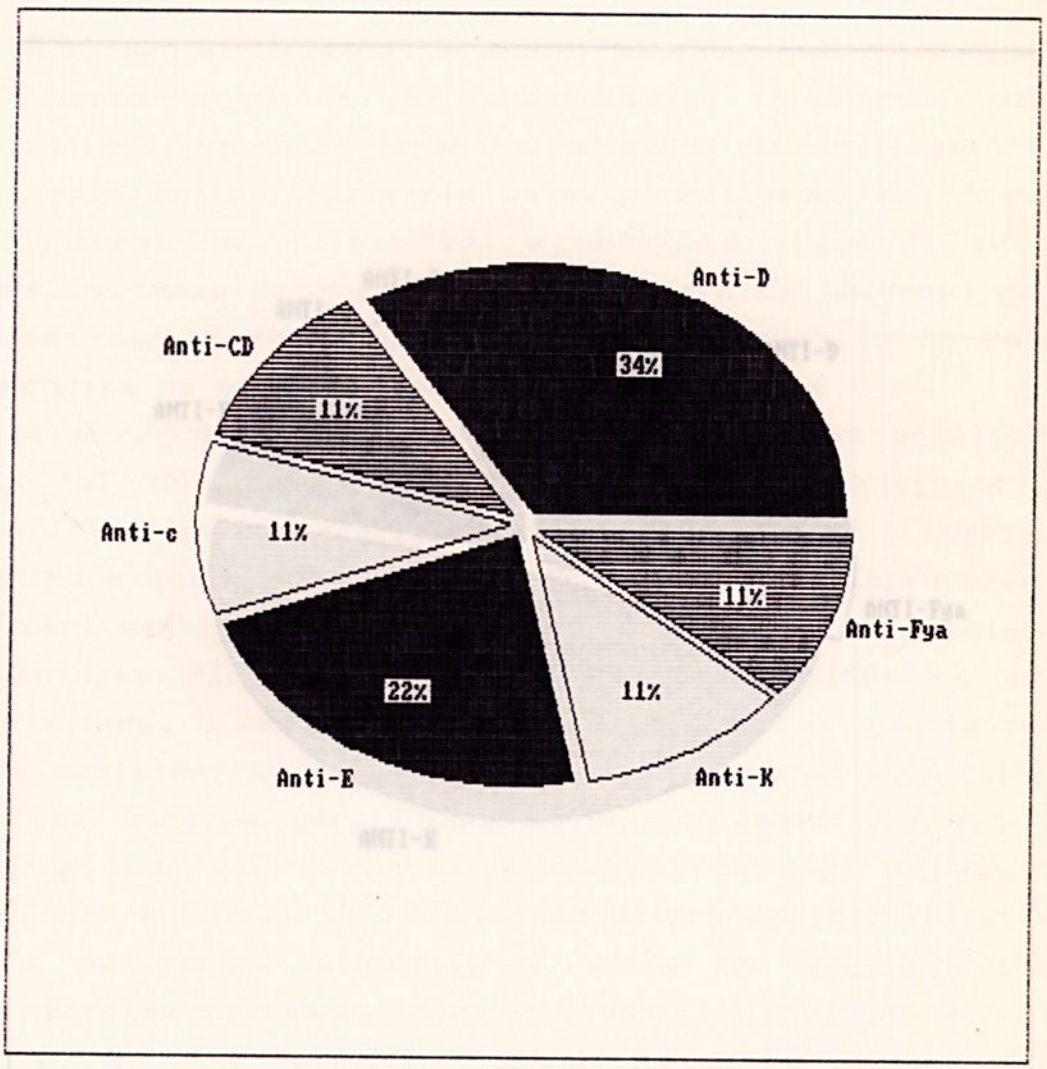


FIGURA 12. Distribuição dos aloanticorpos na anemia falciforme homozigota.

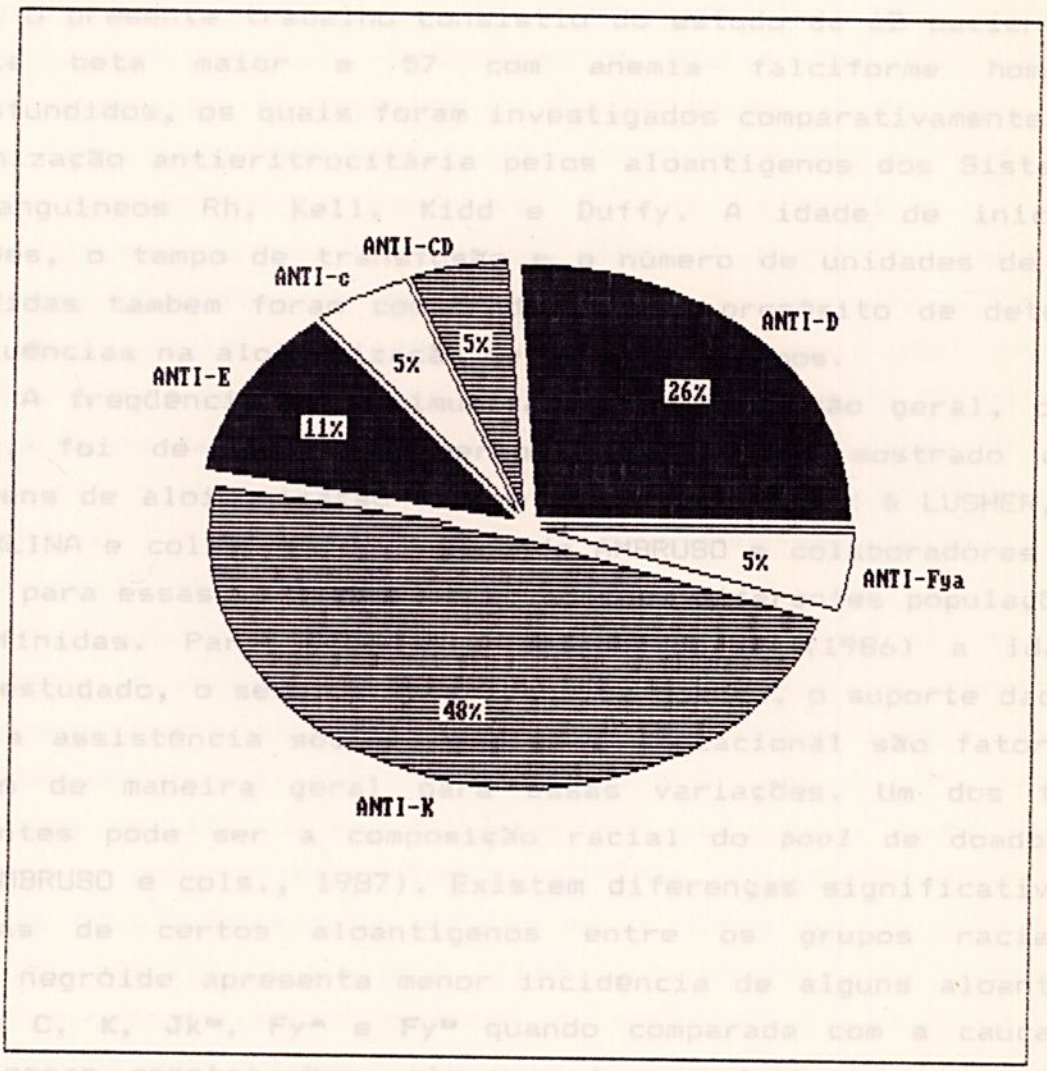


FIGURA 13. Distribuição dos aloanticorpos na população geral.

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

V - DISCUSSÃO

O presente trabalho consistiu do estudo de 62 pacientes com talassemia beta maior e 57 com anemia falciforme homozigota politransfundidos, os quais foram investigados comparativamente quanto à aloimunização antieritrocitária pelos aloantígenos dos Sistemas de Grupos Sanguíneos Rh, Kell, Kidd e Duffy. A idade de início das transfusões, o tempo de transfusão e o número de unidades de sangue transfundidas também foram comparados com o propósito de determinar suas influências na aloimunização de ambos os grupos.

A freqüência de aloimunização na população geral, com 119 pacientes, foi de 15,97%. Diversos estudos tem mostrado que as porcentagens de aloimunização variam de 4,3% (SARNAIK & LUSHER, 1978) a 36% (ORLINA e cols., 1978). Segundo AMBRUSO e colaboradores (1987) as razões para essas variações observadas em diferentes populações não estão definidas. Para SARNAIK e colaboradores (1986) a idade do paciente estudado, o sexo, a severidade da doença, o suporte dado pela familia, a assistência social, médica e educacional são fatores que contribuem de maneira geral para essas variações. Um dos fatores determinantes pode ser a composição racial do *pool* de doadores de sangue (AMBRUSO e cols., 1987). Existem diferenças significativas nas freqüências de certos aloantígenos entre os grupos raciais. A população negróide apresenta menor incidência de alguns aloantígenos tais como **C**, **K**, **Jk^b**, **Fy^a** e **Fy^b** quando comparada com a caucasóide. Baseado nessas constatações, alguns autores admitem que transfusões intraraciais diminuem a incidência de aloimunização enquanto outros discordam desse princípio (GIBLETT, 1961; ORLINA e cols., 1978). Não foi possível estabelecer comparações quanto a esse aspecto na população estudada, visto que o sangue utilizado nas transfusões era proveniente de doadores não selecionados. Entretanto foi possível constatar que os pacientes com anemia falciforme homozigota mostraram maior diversidade de especificidades para os aloanticorpos identificados. Das 9 especificidades encontradas nesse grupo, 7

pertenciam ao Sistema Rh (3 anti-D, 1 anti-CD, 1 anti-c, 2 anti-E), sendo uma do Sistema Kell (1 anti-K) e outra do Sistema Duffy (1 anti-Fy^a). A aloimunização em portadores de anemia falciforme homozigota pelo Sistema Rh é devida, em grande parte, à freqüência do gene $R_o(cDe)$ nesse grupo predominantemente constituido por negróides (COLES e cols., 1981). Segundo BEIGUELMAN (1983) esse gene ocorre em aproximadamente 37% dos negróides brasileiros, sendo que os caucasóides o apresentam em menor freqüência. A maioria dos pacientes analisados no presente estudo não iniciaram a terapêutica transfusional nos respectivos Centros de Transfusão, pois muitos são provenientes de diversas regiões do Estado de São Paulo. Somente após serem admitidos no CIPOHI em Campinas e no HEMOCENTRO de Marília é que passaram a receber sangue compatível para os Sistemas $Rh_o(D)$ e Kell. Como não tivemos acesso aos dados sobre a história transfusional prévia desses pacientes, acreditamos que os mesmos tenham se tornado aloimunizados devido às transfusões freqüentes não totalmente compatíveis para esses sistemas. Essa constatação pode servir de base para a aloimunização mais diversificada pelo Sistema Rh nesses pacientes. Dos 9 pacientes com anemia falciforme aloimunizados, 1 era proveniente do CIPOHI de Campinas, 2 do HEMOCENTRO de Marília e os demais da região de São José do Rio Preto.

O grupo formado pelos pacientes com talassemia beta maior mostrou menor diversidade de especificidades para os aloanticorpos identificados. Foram encontrados 10 pacientes aloimunizados, sendo que 8 deles apresentaram aloanticorpos anti-K e 2, anti-D. O aparecimento de aloanticorpos anti-K em pacientes com talassemia beta maior tem sido relatado em vários estudos. SIRCHIA e colaboradores (1985) encontraram 40 aloanticorpos anti-K, de um total de 136 detectados em 74 pacientes com talassemia beta maior aloimunizados. Os aloanticorpos com especificidade anti-K parecem decorrer muito mais da elevada imunogenicidade do que propriamente da freqüência populacional do aloantígeno K. Baseado em estudos que abrangeram o período de 1970 a 1987, WALKER e colaboradores (1989) admitem que o aumento nas freqüências relativa e absoluta de aloanticorpos anti-K seja reflexo do uso intensivo de transfusões no tratamento de várias doenças. Os protocolos terapêuticos recomendam menor intervalo entre as transfusões na talassemia beta maior em comparação à anemia falciforme homozigota. Para ECONOMIDOU e colaboradores (1971), pequenos

intervalos são mais importantes que a quantidade de sangue transfundida na determinação do aparecimento e persistência de aloanticorpos. O aparecimento de aloanticorpos anti-K nos portadores de talassemia beta maior analisados, pode decorrer do fato que a maioria desses pacientes tem história transfusional prévia semelhante aos portadores de anemia falciforme homozigota. Esses começaram ser transfundidos com sangue compatível para os subgrupos do Sistema Rh e Sistema Kell após serem admitidos nos Centros de Transfusão de Campinas e Marília. Dos 10 pacientes com talassemia beta maior aloimunizados, 6 eram provenientes do CIPOHI de Campinas, 1 do HEMOCENTRO de Marília e 3 da região de São José do Rio Preto.

Esquemas de transfusão embasados no uso de sangue proveniente de doadores selecionados, mostraram redução significativa na freqüencia de aloanticorpos para os sistemas compatíveis. AMBRUSO e colaboradores (1987) constataram menor incidência de aloanticorpos antieritrocitários nessas circunstâncias, na anemia falciforme homozigota, sendo que as poucas especificidades detectadas eram dirigidas apenas para os sistemas não compatíveis entre doadores e receptores. Em outro relato, DAVIES e colaboradores (1986) não detectaram aloanticorpos antieritrocitários em 18 pacientes com anemia falciforme homozigota fenotipados como Rh_o(cDe) e Kell negativo, após transfusão de 537 unidade de sangue Rh negativo (rr) e Kell negativo.

Comparando-se os dois grupos de pacientes, nota-se que há diferenças na predominância das especificidades de aloanticorpos no grupo talassemia beta maior. A presença de uma dado aloanticorpo parece ter uma ação bloqueadora sobre o aparecimento de outro. Quando um paciente encontra-se aloimunizado e recebe transfusão com eritrócitos contendo o aloantígeno correspondente, há uma imediata reação de ambos que contribui para a destruição precoce dos eritrócitos, diminuindo as chances de aloimunização para um segundo aloantígeno. Esse fato tornou-se evidente diante da baixa freqüência de aloimunização pelo aloantígeno D do Sistema Rh alcançada após o uso da gamaglobulina anti-D em gestantes Rh negativas (MOLLISON, 1983).

Outro aspecto a ser considerado na freqüência de aloimunização antieritrocitária em diferentes grupos de pacientes, se refere ao HLA (Human Leucocyte Antigens). Em estudos realizados em pacientes com anemia falciforme homozigota politransfundidos, CASTRO e colaboradores (1983) encontraram associação entre aloimunização

antieritrocitária e HLA-Bw35. A freqüência desse aloantígeno de histocompatibilidade na raça negra é de 30%, sendo que em caucasóides esse valor é de 18%. Para esses autores, a elevada prevalência de HLA-Bw35 não é meramente um reflexo das diferenças raciais entre doadores e receptores. Outra constatação de CASTRO e colaboradores (1983) foi a presença de HLA-DR3 em pacientes não aloimunizados, que parece falar a favor dessa diversificação na aloimunização. Essas glicoproteinas de histocompatibilidade controlam a resposta imune pois, de maneira geral, o reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T se dá em sua presença. Portanto seu elevado polimorfismo determina diferenças na capacidade de resposta imune a diferentes substâncias antigênicas (STITES & TERR, 1991). Para CHARACHE (1990) a utilização de doadores intraraciais contribui para amenizar as diferenças nos tipos de HLA e, consequentemente reduzir as chances de aloimunização do receptor, quando comparado com doadores não selecionados. Assim, tais doadores constituiriam fontes de outros produtos sanguíneos bem como de medula óssea para possíveis transplantes. E possível que essas diferenças observadas na predominância de aloanticorpos entre os dois grupos possam decorrer do complexo principal de histocompatibilidade humano (HLA), inclusive.

Os grupos TALASSEMIA e FALCIFORME não diferiram no percentual de aloimunização, cujos valores observados foram 16,3% e 15,79%, respectivamente. Esses valores contrastam com os obtidos por outros autores que encontraram menor freqüência de aloimunização em pacientes com talassemia beta maior (ECONOMIDOU e cols., 1971; MICHAIL-MERIANOU e cols., 1987; SIRCHIA e cols., 1985). Por outro lado, notamos concordância com os resultados obtidos por COLES e colaboradores (1981). Esses autores constataram que pacientes com anemia falciforme homozigota e talassemia beta maior não diferem na freqüência de aloimunização, mesmo quando recebem diferentes números de unidades de sangue. No presente estudo, constatamos que os pacientes com anemia falciforme homozigota iniciaram as transfusões com praticamente o dobro da idade em relação àqueles com talassemia beta maior, mostrando diferença significativa para esse fator ($p = 0,0003$). Acreditamos que a ausência de diferença significativa na freqüência de aloimunização entre os grupos decorra do fato que, em média, os pacientes receberam o mesmo número de unidades de sangue

oriundas de doadores não selecionados. O tempo de transfusão entre os dois grupos não mostrou diferenças de médias.

Com o propósito de investigar comparativamente os grupos TALASSEMIA e FALCIFORME, cada um foi subdividido I e II. O primeiro compreende aqueles pacientes que receberam primeira transfusão antes dos 18 meses de idade e o segundo, após essa idade. Essa divisão objetivou comprovar se as transfusões iniciadas num período precoce, contribuem para a redução da aloimunização devido à aquisição de um estado de tolerância imune aos aloantígenos eritrocitários, em conseqüência da imaturidade do sistema imune. A literatura mostra vários estudos que atestam esse fato, especialmente para pacientes com talassemia beta maior (SIRCHIA e cols.,1985; MICHAIL-MERIANOU e cols., 1987; SPANOS e cols., 1990). Dentro do subrupo I os pacientes com talassemia beta maior se mostraram um pouco menos aloimunizados que os com anemia falciforme homozigota (10,81% X 16,67%). Essa diferença percentual, embora não significativa, parece concordar com as diversas citações da literatura. Entretanto, é necessário lembrar que as dificuldades inerentes ao diagnóstico preciso das duas patologias estudadas expõe esses pacientes com idade precoce a múltiplas transfusões, sem que o sangue seja classificado corretamente. Obviamente, não se pode descartar os aspectos de ordem econômica que envolvem essa questão, uma vez que os custos laboratoriais são proibitivos em muitas ocasiões. Para BLUMBERG e colaboradores (1984), estudos imunohematológicos detalhados dos aloantígenos de outros grupos sanguíneos, além dos Sistemas ABO e Rh-(D), elevam os custos da hemoterapia. Outro ponto que esse autor destaca é a baixa freqüência de reações hemolíticas retardadas devidas a outros aloanticorpos. Mesmo diante da baixa frequência, estimada em 1 em cada 4.000 transfusões, os regulamentos do "FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION", órgão governamental dos Estados Unidos, exigem a realização da prova cruzada para todas transfusões (MASOUREDIS, 1982). A adequada aplicação desse procedimento em todos os bancos de sangue em nosso país, seguramente contribuiria para minimizar as chances de aloimunização em pacientes que necessitam de múltiplas transfusões.

Quanto ao subgrupo II, ou seja , aquele constituido pelos pacientes de ambos os grupos que iniciaram as transfusão após os 18 meses de idade, não foram constatadas diferenças significativas na aloimunização. Entretanto, esse subgrupo se comportou de maneira

inversa ao subgrupo I apresentando valores iguais a 24% na talassemia beta maior e 15,38% na anemia falciforme homozigota (TABELA 13). Acreditamos que pelas mesmas razões apresentadas para o subgrupo I, esse subgrupo não diferiu no percentual de aloimunização. Um fato que chama atenção no subgrupo II é a divergência entre as duas patologias, quanto à idade de início das transfusões. Os pacientes com anemia falciforme homozigota iniciaram as transfusões com idade bem mais elevada que aqueles com talassemia beta maior, após os 18 meses de idade (TABELA 7). Possivelmente, a variabilidade na expressividade clínica observada na anemia falciforme homozigota seja o fator responsável por essa diferença significativa ($p = 0,0081$).

As comparações entre os grupos TALASSEMIA e FALCIFORME foram estendidas para outras variáveis. Quando divididos por sexo, não apresentaram diferenças significativas na freqüência de aloimunização. Dentro do grupo TALASSEMIA foi constatado que o sexo feminino se transfundiu mais vezes que o sexo masculino ($p = 0,0143$) (TABELA 5). Não foi possível determinar com precisão as razões para essa diferença significativa. É provável que fatores de ordem econômica, bem como aqueles que envolvem o aspecto cultural e educacional sejam determinantes dessa diferença. Pacientes de famílias com melhor nível sócio-econômico e bem orientados quanto à condução do esquema transfusional, encaram com maior seriedade a árdua tarefa de comparecimento periódico aos Centros de Transfusão.

Uma constatação que chama atenção, se refere à idade dos pacientes aloimunizados na população. Esses pacientes apresentam média de idade superior aos não aloimunizados. Para verificar a influência do número de unidades transfundidas e do tempo de transfusão na aloimunização, a população foi dividida em 3 faixas etárias: 0 a 6 anos, 7 a 12 anos e maiores de 13 anos. SIRCHIA e colaboradores (1985) constataram que a aloimunização antieritrocitária na talassemia beta maior ocorre usualmente depois do sexto ano de vida e após grande número de transfusões. Para confirmar essa constatação, os pacientes foram divididos nas faixas etárias acima especificadas. Conforme se observa nas tabelas 8 e 9 os valores médios de unidades de sangue transfundidas se elevam com o tempo. A maioria dos pacientes aloimunizados encontrados nas duas patologias receberam maior número de unidades num espaço maior de tempo. Esse fato é evidenciado no grupo de pacientes com anemia falciforme homozigota revelando

diferença significativa ($p = 0,0101$). Dessa observação pode-se concluir que quanto maior a exposição do receptor aos aloantígenos do doador, maior será a chance de aloimunização. Esses dados encontram respaldo na literatura (GOMES-OLIVA e cols., 1985; AMBRUSO e cols., 1987; COX e cols., 1988).

A análise geral realizada entre os grupos permite alguns comentários finais. A idade de diagnóstico da patologia aparece como um ponto de divergência entre os grupos. Essa diferença significativa vem de encontro à idade de início das transfusões. O diagnóstico preciso dessas patologias muitas vezes é demorado, pois exige vários estudos a nível clínico e laboratorial. Lamentavelmente, poucos laboratórios em nosso país detém condições para o estudo detalhado e preciso das hemoglobinopatias. Devido à origem, torna-se mais fácil associar quadros de anemia grave com talassemia quando os pacientes são de ascendência italiana ou mediterrânea, permitindo que as transfusões se iniciem em período precoce. Para a anemia falciforme homozigota, a situação é um pouco mais crítica. A expressão clínica da doença é mais tardia e os sinais e sintomas passam a ser reconhecidos em período de idade mais avançada. Por essas e outras razões, inclusive as de ordem social e econômica, os pacientes acabam tendo acesso a esquemas terapêuticos muitas vezes insatisfatórios.

Entendemos que o estudo de aloanticorpos antieritrocitários em pacientes que recebem múltiplas transfusões deva ser implantado em todos os serviços de hemoterapia do país. Embora haja muita discussão a respeito dos custos elevados da fenotipagem eritrocitária para outros sistemas além do ABO e $Rh_o(D)$, da aplicação da prova cruzada bem como da aquisição de painéis de hemácias, acreditamos que essa barreira econômica possa ser vencida. Num esforço coletivo, os Hemocentros espalhados pelo país deveriam desenvolver tecnologia para a produção de reagentes com maior qualidade e menor custo, distribuindo-os através das Secretarias Estaduais de Saúde aos bancos de sangue dos hospitais públicos. Assim os hemoterapêutas poderiam contar com mais esse avanço na segurança da prática transfusional.

Finalmente, salientamos que a aplicação dessa conduta poderá garantir maior segurança antes, durante e após os procedimentos transfusionais. O estabelecimento da compatibilidade sanguínea para os Sistemas ABO, Rh, Kell, Kidd e Duffy deve oferecer melhores condições para que tais pacientes possam alcançar melhor expectativa de vida.

VI - CONCLUSÕES

1 - Os pacientes com anemia falciforme homozigota e talassemia beta maior politransfundidos não diferiram na freqüência de aloimunização pelos aloantígenos dos Sistemas Rh, Kell, Kidd e Duffy quando recebem, em média, o mesmo número de unidades de sangue.

2 - Os pacientes com anemia falciforme homozigota mostraram maior diversidade de especificidades para os aloanticorpos produzidos, quando comparados com os portadores de talassemia beta maior, provavelmente em decorrência das diferenças raciais, as quais podem implicar diversidade na resposta imune.

3 - Embora não se tenha constatado diferença significativa na idade de início das transfusões, a precocidade dessa prática pareceu retardar o aparecimento de aloanticorpos em portadores de talassemia beta maior.

4 - Quando comparados por sexo, os portadores das duas patologias não apresentaram diferenças na freqüência de aloimunização.

5 - O número de unidades de sangue transfundidas pareceu exercer influência na aloimunização da população, pois quando os pacientes foram comparados por faixa etária constatou-se aumento do número de aloimunizados.

6 - A idade mostrou se um fator importante para a aloimunização na talassemia beta maior, visto que os pacientes aloimunizados são mais velhos que os não aloimunizados.

7 - O tempo de transfusão se mostrou decisivo na aloimunização dos pacientes com anemia falciforme homozigota devido ao maior tempo de exposição aos aloantígenos eritrocitários.

8 - Os portadores dessas patologias devem receber sangue compatível pelo menos para os Sistemas ABO, $Rh_o(D)$ e Kell, pois neles são encontrados os aloantígenos de maior imunogenicidade.

VII — RESUMO

A talassemia beta maior e a anemia falciforme homozigota são duas patologias moleculares que se difundiram amplamente em nosso pais através do processo de colonização pelos estrangeiros. Os defeitos qualitativos e quantitativos que afetam a síntese da hemoglobina, observados nessas patologias, contribuem para a diminuição do tempo de vida dos eritrócitos, e conduzem seus portadores a um quadro de anemia hemolítica, geralmente grave, cujas conseqüências são muitas vezes danosas em função do efeito peloitrópico de seus genes.

Os protocolos terapêuticos aplicados a essas patologias estão embasados na transfusão de sangue, cujo propósito fundamental é corrigir a anemia sintomática e seus efeitos secundários. Embora seja indispensável, certos riscos são inerentes a esse procedimento. Dentre os efeitos adversos silenciosos decorrentes das transfusões, destaca-se a aloimunização antieritrocitária que se caracteriza pela produção de aloanticorpos específicos para os aloantígenos eritrocitários que estão ausentes no receptor.

Os objetivos do presente trabalho constavam de:

a — determinar a freqüência de aloanticorpos antieritrocitários em portadores de talassemia beta maior e anemia falciforme homozigota.

b — determinar se a idade de início das transfusões, o tempo de transfusão e o número de unidades de sangue transfundidas influenciam a aloimunização nas duas patologias consideradas.

c — estabelecer quais aloanticorpos dos Sistemas Rh, Kell, Kidd e Duffy aparecem com maior freqüência.

No decorrer deste trabalho foram analisados 119 amostras de sangue e soro, sendo 62 de pacientes com talassemia beta maior e 57 com anemia falciforme homozigota.

Numa análise geral da população constatou-se que 19 pacientes (15,97%) encontravam-se aloimunizados. A freqüência de aloanticorpos não diferiu entre as duas patologias, sendo 16,13% para

talassemia beta maior e 15,79% para anemia falciforme homozigota. Quando os pacientes foram comparados por patologia e por sexo, não se constatou diferenças significativas na freqüência de aloanticorpos antieritrocitários. Embora os pacientes com anemia falciforme homozigota iniciem a terapêutica transfusional com o dobro da idade dos portadores de talassemia beta maior, não diferem significativamente na aloimunização. A predominância de especificidades diferiu entre os grupos. As especificidades dos aloanticorpos detectados ficaram assim distribuidas: 4 do Sistema Rh, (anti-D, anti-CD, anti-c , anti-E), 1 do Sistema Kell (anti-K) e 1 do Sistema Duffy (anti-Fy^a). O número de aloanticorpos detectados foi: 5 anti-D, 1 anti-CD, 1 anti-c, 2 anti-E, 9 anti-K e 1 anti-Fy^a.

Os pacientes com talassemia beta maior aloimunizados apresentaram média de idade maior que os não aloimunizados. O tempo de transfusão diferiu significativamente entre os pacientes com anemia falciforme homozigota aloimunizados e não aloimunizados.

Concluimos que a freqüência de aloimunização não diferiu entre as duas patologias e que a idade de início das transfusões não exerceu influência sobre o aparecimento de aloanticorpos antieritrocitários. Os Sistemas Rh e Kell se mostraram os principais responsáveis pela aloimunização de pacientes politransfundidos.

VIII – SUMMARY

Thalassemia major and sickle cell disease are both molecular pathologies that have spread vastly in our contry by the immigration process of colonization. The qualitatives and quantitatives defects that affect the syntesis of hemoglobin, observed on those pathologies, contribute for decreasing of the red blood cells' life time, and lead to the carriers to an hemolytic anemia state, whose consequences are mosthly damage in function of the pleiotropic effect of their genes.

The therapeutics protocols applied to these pathologies are embased on blood transfusion, whose fundamental purpose is to correct the sintomatic anemia and their secundary effects. Although it is essential, certain risks are inherent to such procedure. Among the silent adverse effects resulting from transfusions, emphasis the red blood cell alloimmunization, which characterized by the production of specific alloantibodies against to the aloantigens that are absent in the receivers.

The objectives in this present work consisted of:

a – to determine the frequences of the red blood cell alloantibodies in carriers of thalassemia major and sickle cell disease.

b – to determine if starting age of the transfusions, the transfusions' time and the number of the blood unities transfused have influence to the alloimmunization on both considered pathologies.

c – to determine which alloantibodies of the Rh, Kell, Kidd and Duffy Systems appear more frequently.

During this work, 119 blood and serum samples were analysed, from which 62 of the patients with talassemia major and 57 with sickle cell disease.

In a general population analyses it was verified that 19 patients (15,97%) were alloimmunizated. The frequences of alloantibodies has not diverged between both pathologies, being 16,13% for thalassemia major and 15,79% for sickle cell disease. When the patients were compared by pathology and sex, significative differences

were not verified in the red blood cells alloantibodies frequences. Although the sickle cell disease patients start the transfusional therapeutics with the double ages of the carriers of thalassemia major, have no significative differences in alloimmunization. The predominance of specificities diverged on both groups. The specificities of the detected alloantibodies had the following distribution: 4 on the Rh System (anti-D, anti-CD, anti-c and anti-E), 1 on the Kell System (anti-K) and 1 on the Duffy System (anti-Fy^a). The number of the detected allontibodies was: 5 anti-D, 1 anti-CD, 1 anti-c, 2 anti-E, 9 anti-K and 1 anti-Fy^a.

The thalassemia major alloimmunizated patients seem average age bigger than the not alloimmunizated. The transfusion period had significative differences among the sickle cell disease alloimmunizated patients and not alloimmunizated.

We conclude that the prevalence of the alloimmunization had no differences between both pathologies and that the starting age of the transfusion had no influences on the alloimmunization. The Rh and Kell Systems are the main responsibles for the alloimmunization for the politransfused patients.

IX - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGREE, P., CARTRON, J. P. Molecular biology of the Rh antigens *Blood*, v. 78, n. 3,p. 551-563, 1991.

AIEOP Associação Italiana de Hematologia e Oncologia Pediátrica. Recomendações para o tratamento da beta talassemia, edição 1990.

ALVARES Fº, F., NAOUM, P. C., MOREIRA, H. W., ANGULO, I. L., Variabilidade polimórfica de hemoglobinas humanas anormais em indivíduos das cidades de Barretos e Colina, São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Pat. Clin.* v. 24, n. 2, p. 32-39, 1988.

AMBRUSO. D. R., GITHENS, J. H., ALCORN, R., DIXON, D. J., BROWN, L. J., VAUGHN, W. M., HAYES, T. Experiences with donors matched for minor blood group antigens in patients with sickle cell anemia who are receiving chronic transfusion therapy. *Transfusion*, v. 27, n. 1, p. 94-98, 1987.

ANSTEE, D. J., The blood group MNSs-active sialoglycoproteins. *Seminars in Hematology.* v. 18, n. 1, p. 13-31, 1981.

ARAUJO, J. T., RIBEIRO, V. S., ARAUJO, R. A. T. Formas de talassemias identificadas na cidade de São Paulo. *Rev. Hosp. Clin, Fac. Med. S. Paulo*, v. 42, n. 6, p. 267-272, 1987.

BACON, J. M., YOUNG, I. F. ABO incompatible blood transfusion. *Pathology*, v. 21, p. 181-184, 1989.

BAIGET, M. Talasemia 1990 (Edit). *Med. Clin*(Barcelona), v. 94, p. 96-97, 1990.

BEIGUELMAN, B. *Farmacogenética e Sistemas Sanguíneos Eritrocitários.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983 192p.

BELLANTI, J. A. *Immunology III.* Tokyo: Igaku-Shoin/Saunders, 1985 598p.

BLUMBERG, N., ROSS, K., AVILA, E., PECK, K. Should chronic transusions be matched for antigens other than ABO and $Rh_o(D)$?. *Vox Sang.* v.47, p. 295-208, 1984.

BORGNA-PIGNATTI, C., DESTEFANO, P., ZONTA, L., VULLO, C., DE SANCTIS, V., MELEVENDI, C., NASELLI, A., MASERRA, G., TERZOLI, S., GABUTTI, V., PIGA, A. Growth and sexual maturation in thalassemia major. *Journ of Pediatrics* n. 106, v. 1, p. 150-155, 1985.

BOUSSIOUS, T.; BERTLES, J. F. Simultaneous expression of globin genes for embryonic and adult hemoglobins during mammalial ontogeny. *Science* n. 218, p. 1225-1227, 1982.

BOWEN, D. T., DEVENISH, A., DALTON, J., HEWITT, P. Delayed haemolytic transfusion reaction due to simultaneous appearance of anti-Fy^a and anti-Fy^b. *Vox Sang* n. 55, p. 35-36, 1988.

BRITTENHAN, G. M., SCHECHTER, A. N., NOGUCHI, C. T. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickilling syndromes. *Blood* n. 65, p. 183-189, 1985.

BUSSAB, W. O., MORETTIN, P. A. *Estatística Básica.* São Paulo: Atual Editora, 1986. 321p.

CASTRO, O., ALARIF, L., OFOSU, M. HLA-Bw35 is associted with red cell alloimmunization in sickle cell disease. *Blood*, v. 62(suppl 1), p. 233a, 1983.

CHAMBON, P. Eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* v. 44, p. 613-620, 1975.

CHARACHE, S. Problems in transfusion therapy. *NEJM*, v. 322, n. 23, p. 1666-1668, 1990.

COLES, S. M., KLEIN, H. G., HOLLAND, P. Alloimmunization in two multitransfused patient populations. *Transfusion* v. 21, n. 4, p. 462-466, 1981.

COLIN, Y., CHERIF-ZAHAR, B., KIM, C. L. V., RAYNAL, V., HUFFEL, V. V. CARTRON, J. P. Genetics basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determinated by southern analysis. *Blood*, v. 78, n. 10, p. 2747-2752, 1991.

CONTRERAS, M., MOLLISON, P. L. Immunological complications of transfusion. *BMJ*, v. 300, p. 173-176, 1990

COX, J., STEANE, E., CUNNINGHAM, G., FRENKEL, E. P. Risck of alloimmunization in patients with sickle cell disease. *Arch Intern Med*, v. 148, p. 2485-2489, 1988.

CURTIN, P., PIRASTU, M., KAN, Y. W., GOBERT-JONES, J. A., STEPHENS, A. D. and LEHMANN, H. A distant gene deletion affects beta-globin gene function in a atypical gamma-delta-beta thalassemia. *J Clin Invest*, v. 76, p. 1554-1557, 1985.

DACIE, J. V., LEWIS, M. S. *Hematologia practica*. Barcelona, Editora Toray, 1970 445p.

DAHLKE, M. B., KEASHEN, M. A., ALAVI, J. B., KOCH, P. A., OKPARA, R.A. Response to granulocyte transfusions in the alloimmunized patients. *Transfusion* n. 20, v. 5, p. 555-558, 1980.

DARNEL, F. E. mRNA structure and function. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, v. 19, p. 493-500, 1976.

DAVIES, S. C., McWILLIAM, A. C., HEWITT, P. E., DEVENISH, A., BROZOVIC, M. Red cell alloimmunization in sickle cell disease. *Br J. Haematol*, n. 63, v. 2, p. 241-245, 1986.

DeMARTINO, M., ROSSI, M. E., MUCCIOLI, A. T., VULLO, C., VIERUCCI. A. Altered T cells subsets an function in polytransfused beta-thalassemia patients: correlation with sex and age at first transfusion. *Vox Sang*, n. 48, p. 296-304, 1985.

DIAS-DA-SILVA, W. Sistema Complemento: um engenhoso mecanismo bioquímico, um co-participante na defesa natural e um mediador de interações celulares. *Rev. Ass. Med. Bras.*, v. 30, p. 3-4, 1984.

ECONOMIDOU, J., CONSTANTOULAKIS, M., AUGOUSTAKI, O., ADNOLFI, M. Frequency of antibodies to various antigenic determinants in polytransfused patients with homozygous thalassaemia in Greece. *Vox Sang*, v. 20, p. 252-58, 1971.

EDELMAN, G. M. Antibody structure and molecular immunology. *Science*, n. 180, p.830-840, 1973.

FALCÃO, P. R., DONADI, E. A. Infecções e imunidade na doença falciforme. *Rev. Ass Med Brasil*. v. 35, n. 2, p. 70-75, 1989.

FARR, V., GRAY, E. Pregnancy outcome in mothers who develop kell antibodies. *Scot. Med. J.*, v. 33, p. 300-303, 1988.

FIORI, J. G. M., MACH, B. A new nonsense mutation as the molecular basis for beta^o thalassaemia. *J. Mol. Biol.* v. 154, p. 537-540, 1982.

FLOSS, A. M., STRAUSS, R. G., GOEKEN, N., KNOX, L. Multiple transfusions fail to provoke antibodies against blood cell antigens in human infants. *Transfusion*, v. 26, n. 5, p. 419-422, 1986.

FRANCIS, R. B., JOHNSON, C. S. Vascular occlusions in sickle cell disease: currents concepts and unanswered questions. *Blood*, v. 77, n. 7, p. 1405-1414, 1991.

FUNG, J., KÖHLER, H. Mechanism of neonatal idiotype suppression. II Alterations in the T cells compartment suppress the maturation of B cell precursors. *J. Immun.*, v. 125, p. 2489-2495, 1980.

GALANELLO, R. Molecular analysis of beta° thalassemia intermedia in Sardinia. *Blood*, v. 74, n. 2, p. 823-827, 1989.

GALE, R. E., CLEGG, J. B., HUEHNS, E. R. Human embryonic haemoglobins Gower 1 and Gower 2. *Nature*, v. 280, p. 162-175, 1979.

GIBLETT, E. R. A critique of theoretical hazard of inter vs intra-racial transfusion. *Transfusion*, v. 1, p. 233-238, 1961.

GIBLETT, E. R. Blood group alloantibodies: an assessment of some laboratory practices. *Transfusion*, v. 17, n. 4, p. 299-308, 1977.

GOMEZ-OLIVA, P., BASANTA-OTERO, P, GONZALES-VILLALONGA, C., BATISTA-VERANES, M., ORBEAL-ALDAMA, L and GARCIA-ECHEVARRIA, M. Aloinmunización en pacientes con enfermedad por hemoglobina S politranfundidos. *Sangre*, v. 30, n. 4, p. 406-410, 1985.

GREENWALT, T. J., ZELENSKY, K. R. Transfusion support for haemoglobinopathies. *Clinics in haematology*, v. 13, n. 1, p. 151-165, 1984.

HARMENING, D. *Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão*. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 1992 445p.

HEBBEL, R. P. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood*, v. 77, n. 2, p. 214-237, 1991.

HOGMAN, C. F. Immunologic transfusion reactions. *Acta anaesthesiol Scand*, v. 32(suppl 89), p. 4-12, 1988.

HONIG, C. L., BOVE, J. R. Tranfusion-associated fatalities: A review of Bureau of Biologics reports 1976-1978. *Transfusion*, v. 20, p. 653-661, 1980.

HSU, S. L., MARKS, J., SHAW, J. P., TAM, M., HIGGS, D. R., SHEN, C. C., SHEN, C. K. J. Structure and expression of the human teta¹ globin gene. *Nature*, n. 331, p. 94-96, 1988.

HUISMAN, T. H. J. Frequencies of common beta-thalassaemia alleles among different populations: variability in clinical severity. *Brit J. Haematol*, v. 75, p. 454-457, 1990.

HUISMAN, T. H. J. The beta and gama thalassaemia repository. *Hemoglobin*, n. 16, v. 4, p. 237-258, 1992.

ISSIT, P. D. *Applied blood group serology*. Miami: Montgomery Scientific Publications, 1985 497p.

KAMUZORA, H., LEHMANN, H. Human embryonic haemoglobins including a comparison by homology of the human zeta and alfa chains. *Nature*, v. 256, p. 511-520, 1975.

KAN, Y. W. Thalassemia: molecular mechanism and detection. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 38, p. 4-12, 1986.

KAPLAN, J. C., DELPECH, M. *Biologie Moléculaire et Médicine*. Paris: Flammarion, 1990 720p.

KIM, H. C. Red blood cell transfusion in the neonate. *Sem in Perinatology*, v. 7, n. 3, p. 159-74, 1983.

KINNINBURGH, A. J., ROSS, J. Processing of the mouse beta-globin mRNA precursor: at least two cleavage-ligation reactions are necessary to excise the larger intervening sequence. *Cell*, v. 17, p. 915-924, 1979.

KONIGSBERG, W., GUIDOTTI, G., HILL, R. J. The amino acid sequence of the alfa chain of human haemoglobin. *J. Biol.Chem.*, v. 236, p. 55-63, 1961.

LAUER, J., SHEN C. K. J., MANIATIS, T. The chromosomal arrangement of human alfa-like globin genes: sequences homology and alfa-globin gene deletions. *Cell*, v. 20, p. 119-130, 1980.

LEHMANN, H., HUNSTMAN, R.G. *Man's haemoglobin*. Amsterdan: North Holland, Publ, 1974 478p.

LIMA, A. O., SOARES, J. B., GRECCO, J. B., GALIZZI, J., CANÇADO, J. R. *Métodos de laboratório aplicados à clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985 699p.

LIU, S. C., DERICK, L. H. Molecular anatomy of red blood cell membrane skelton: structure-function relationships. *Seminars in Hematolology*. v.29, n. 4, p. 231-243, 1992.

LUDVIGSEN, C., SWANSON, J., THOMPSON, T., McCULLOGH, J. Failure of neonates to form red blood cell alloantibodies following transfusions (abstract). *Transfusion*, v. 22, p. 405, 1982.

LUZZATO, L. Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood*, v. 54, p. 961-976, 1979.

MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., LAUER,J., LAWN, R. M. The molecular genetics of human hemoglobins. *Ann. Rew. Genet.* v. 14, p. 145-178, 1980.

MARSH, L. Princípios técnicos em imunohematologia. Tradução Carrano, A., Pinho, M. *Boletim*, v. 6, n. 129, p. 6-15, 1984.

MASSOUREDIS, S.P. Pretransfusion tests an compatibility: Questions of safety an efficacy. *Blood*, v. 59, n. 5, p. 873-875, 1982.

MICHAIL-MERIANOU, V., PAMPHILI-PANOUSOPOULOU, L., PIPERI-LOWES, L., PELEGRINIS, E., KARAKLIS, A. Alloimmunization to red cell antigens in thalassemia: comparative study of usual verus better-match transfusion programmes. *Vox Sang*, v. 52, p. 95-98, 1987.

MODEL, B., PETROU, M. Management of thalassemia major. *Arch. Dis Child.*, v. 58, p. 1026-1030, 1983.

MOLLISON, P. L. *Blood transfusion in clinical medicine.* Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1983 988p.

MOORE, S. B., TASWELL, H. F., PINEDA, A. A., SONNENBERG, C. L. Delayed hemolytic transfusion reactions. *Am J Clin Pathol*, v. 74, n. 1, p. 94-97, 1980.

NAOUM, P. C., MATTOS, L. C., CHALELLA, C. R., UEZONO, M. M. Hemoglobinas anormais em uma população do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Pat. Clin.*, v. 19, n. 3, p. 86-88, 1983.

NAOUM, P. C., MATTOS, L. C., CURI, P. R. Prevalence and geographic distribution of abnormal hemoglobins in the State of São Paulo, Brazil. *Bull Pan Am Heath Organ*, v. 18, n. 2, p. 127-138, 1984.

NAOUM, P. C. Anemias imigrantes. Origem das anemias hereditárias no Brasil. *Ciência Hoje*, v. 3, p. 58-64, 1984.

NAOUM, P. C. *Diagnóstico das Hemoglobinopatias.* São Paulo: Sarvier, 1987 242p.

NIENHUIS, A. W., BENZ, E. J. Regulation of hemoglobin synthesis during the development of the red cell. Parts 1, 2 and 3. *NEJM*, v. 297, n. 1313, n. 1371, n. 1430, 1977.

NIENHUIS, A. W., ANAGNOU, N. P., LEY, T. J. Advances in thalassemia research. *Blood*, v. 63, n. 4, p. 738-758, 1984.

NOGUCHI, C. T., RODGERS, G. P., SERJEANT, G. R., SCHECHTER, A. N. Levels of fetal hemoglobinn necessary for treatment of sickle cell disease. *NEJM*, v. 312, n. 2, p. 96-99, 1988.

ORLINA, A. R., UNGER, P. J., KOSHY, M. Post-transfusion alloimmunization in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol*, v. 5 p. 101-106, 1978.

PERUTZ, M. F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature*, v. 228, p. 726-739, 1970.

PERUTZ, M. F. Structure and mechanism of hemoglobin. *Br. Med. Bull*, v. 32, p. 195-208, 1976.

PINEDA, A. A., BRZICA, Jr., S. M., TASWELL, H. F. Hemolytic transfusion reaction. *Mayo Clin. Proc.* v. 53, p. 378-390, 1978.

PIOMELLI, S. Chronic transfusions in patients with sickle cell disease. *Am J Pedr Hemat Oncol*, v. 7, n. 1, p. 51-55, 1985.

PORTER, R. R. Structural studies of immunoglobulins. *Science*, n. 180, p. 713-716, 1973.

POWARS, D. R. Sickle cell anemia and major organ failure. *Hemoglobin*, v. 14, n. 6, p. 573-598, 1990.

RAMALHO, A. S. A talassemia minor como causa de anemia no Estado de São Paulo. *Rev.Bras.Pat.Clin*, v. 22, n. 2, p. 32-38, 1986.

RAMSEY, G., LARSON, P. Loss of red blood cell alloantibodies over time. *Transfusion*, v. 28, n. 2, p. 162-165, 1988.

REIDER, R. F., SAFAYA, S., GILLETTE, P., FRYD, S. HSU, H., ADAMS III, J. G., STEINBERG, M. H. Effect of beta-globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. *Am J Hematol*, v. 36, p. 184-189, 1991.

REISNER, E. G., KOSTYU. D. D., PHILLIPS, G., WALKER, C., DAWSON, D. V. Alloantibody responses in multiply transfused sickle cell patients. *Tissue Antigens*, v. 30, p. 161-166, 1987.

SALMON, C., CARTRON, J. P., ROUGER, P. *The human blood groups*. Chicago: Year Book Medical Publishers. INC, 1984 460.p.

SALZANO, F. M., TONDO, C. V. Hemoglobin types in Brazilian populations. *Hemoglobin*, v. 6, p. 85-97, 1985.

SARNAIK, S., LUSHER, J. M., Incidence of development of irregular antibodies in patients with sickle cell anemia (abstract). *Blood*, v. 52(supll. 1), p. 302, 1978.

SARNAIK, S., SCHORNACK, J., LUSHER, J. M. The incidence of development of irregular red cell antibodies in patients with sickle cell anemia. *Transfusion* v. 26, n. 3, p. 249-252, 1986.

SERJEANT G. R. "Sickle cell disease" In: Holfbrandt, A. V. *Recents Advances in Haematology - 4*, Edinburg, Churchil-Livingstone, 1985.

SHEN, S. H., SLIGHTOM, J. L., SMITHIES, O. A history of the fetal globin gene duplication. *Cell*, v. 26, p. 191-197, 1981.

SIRCHIA, G., ZANELLA, A., PARRAVICINI, A., MORELATI, REBULLA, P., MASERA, G. Red cell aloantibodies in thalassemia major: results of an italian cooperative study. *Transfusion*, v. 25, n. 2, p. 110-112, 1985.

SPANOS, T., KARAGEORGA, M., LADIS, V., PERISTERI, J., HATZILIAMI, A., KATTAMIS, Ch. Red cell alloantibodies in patients with thalassemia. *Vox Sang*, v. 58, P. 50-55, 1990.

STITES, D. P., TERR, A. I. *Basic and Clinical Immunology*. New Jersey: Prentice Hall, 1991 870p.

STRYER, L. *Bioquímica*. Barcelona: Editorial Reverté, 1979 875p.

TAVARES NETO, J. A hemoglobina S: um problema de saúde pública e ocupacional. *Bol Of Sanit Panam*, n. 90, v. 3, p. 229-238, 1981.

VICHINSKY, E. P., EARLES, A., JOHNSON, R., HOAG, M. S., WLLIAMS, A., LUBIN, B. Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. *NEJM* v. 322, N. 23, p. 1617-1621, 1990.

WAINSCOAT, J. S., KANAVAKIS, E., WOOD, W. G., LETSKY, E. A., HUEHNS, E. R., MARSH, G. W., HIGG, D. R., CLEGG, J. B., WEATHERALL, D. J. Thalassaemia intermedia in Cyprus: The interaction of alfa and beta thalassaemia. *Br J. Haematol*, n. 53, p. 411-415, 1982.

WALKER, R. H., LIN, D. T., HARTRICK, M. B. Alloimmunization following blood transfusion. *Arch Pathol Lab Med*, v. 113, p. 254-261, 1989.

WATKINS, W. M. Biochemistry and genetcs of the ABO, Lewis, and P blood group Systems. *Adv Hum Genet*, v. 10, p. 1-136, 1980.

WEATHERALL, D. J., CLEGG, J. B. *The thalassaemia Syndromes*. London: Blackwell Scientific Publications, 1981 875p.

WEATHERALL, D. J., CLEGG, J. B. Thalassemia revisited. *Cell*, v. 29, p. 7-9, 1982.

WEATHERALL, D. J., WAINSCOAT, J. S. "The molecular pathology os thalaessemia" In: Holfbrandt, A. V. *Recents advances in Haematology - 4*, Edinburg, Churchil-Livingstone, 1985.

WHO Summary of global distribution of beta haemoglobinopathies birts. Associated document (HMG/WG/85.8a). Mode education aids to assist in haemoglobinopathy control. 1984.

WHO A short guide to the management of thalassemia. 2nd Mediterranean Meeting on Thalassemia, Milano, Italy, Nov 28-30, 1985.

WIDMAN, F. K. (ed) *Technical Manual of the American Association of Blood Banks*. Philadelphia: J B Lippincott Co, 1981 250p.

WININCHAGOON, P., FUCHAROEN, S., WEATHERALL, D., WASI, P. Concomitant inheritance of alfa thalassemia in beta^{o} thalassemia/Hb E disease. *Am J Hematol*, v. 20, p. 217-222, 1985.

WINTROBE, M. M., LEE, G. R., BOGGS, D. R., BITCHELL, T. C., FOERSTER, J., ATHENS, J. W., LUKENS, J. N. *Clinical Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981 2.021p.

YANG, K. G., KUTLAR, F., GEORGE, E., WILSON, J. B., KUTLAR, A., STOMING, A., GONZALES-REDONDO, J. M., HUISMAN, T. H. J. Molecular characterization of beta-globin gene mutations in Malay patients with Hb E-beta-thalassaemia and thalassaemia major. *Br J. Haematol*, v. 72, p. 73-80, 1989.

ZAGO, M. A. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. *Rev. Paul. Med.*, v. 104, n. 6, p. 300-304, 1986.

ZAGO, M. A. The evaluation of spleen in man. *Brazilian J Med Biol Res.*, v. 22, n. 2, p. 159-169, 1989.

ZURLO, M. G., DE STEFANO, P., BORGNA-PIGNATTI, C., DI PALMA, A., PIGA, A., MELEVENDI. C., DI GREGORIO, F., BURATTINI, M. G., TERZOLI, S. Survival and causes of death in thalassaemia major. *Lancet*, v. july 1, p. 27-30, 1989.

X - APENDICES

Apêndice 1

Lote n.º

Válido até

| Diagrama de Antígenos | | Rh-hr | | | | | | | | Resultados | | | | | | | |

Apêndice 2 PAINEL DE HEMÁCIAS

Lote nº _____ Válido até _____

	Diagrama de antígenos		Rh-Hr								Resultados										KELL						DUFFY		KIDD		LEWIS		MNS						P	Lutheran		Outros antígenos	
	Nº Doador	genotipo	D	C	E	c	e	f	C^w	V											K	k	Kp^a	Kp^b	Js^a	Js^b	Fy^a	Fy^b	Jk^a	Jk^b	Le^a	Le^b	S	s	M	N	P_1	Lu^a	Lu^b		
1	100345	$R_1{}^wR_1$	+	+	0	0	+	0	+		1										0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	LW+ P1+++	1
2	204651	R_1 R_1	+	+	0	0	+	0	0		2										0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	P1+++	2
3	401936	R_2 R_2	+	0	+	+	0	0	0		3										+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	P1+++	3
4	601605	r r	0	+	0	+	+	+	0		4										0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+	P1+++	4
5	700961	r'' r	0	0	+	+	+	+	0	0	5										0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	P1++	5
6	807330	r r	0	0	0	+	+	+	0	0	6										0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	JSa+ Lua+	6
7	807349	r r	0	0	0	+	+	+	0	0	7										+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	P1+	7
8	807358	r r	0	0	0	+	+	+	0	0	8										0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	Kp2+ P1++	8
9	807367	r r	0	0	0	+	+	+	0	0	9										0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	Lua+	9
10	807376	r r	0	0	0	+	+	+	0	0	10										0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	Lua+ P1+++	10
11	C-53	GLOB. CORD. (POOL)									11																				0	0								11
auto											auto																														auto
	modo usual de reação		albumina / antiglobulina								I										antiglobulina									variável		frio								
											II																													
									A1																															
									A2																															
									B																															

Nome _____ Sexo _____ Cor _____

Serviço _____ Idade _____

Grupo _____ Rh _____ Coombs direto _____

Observações _____

_____

_____

_____

_____ / _____ / _____

TÉCNICO DATA

Reagente de glóbulos vermelhos humanos para a identificação de anticorpos.




cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19