

JULIANA OLIVEIRA MARTINS

**ASSOCIAÇÃO DE ANTICORPOS LEUCOCITÁRIOS EM
INDIVÍDUOS COM ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo - Escola Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo

2017

JULIANA OLIVEIRA MARTINS

**ASSOCIAÇÃO DE ANTICORPOS LEUCOCITÁRIOS EM
INDIVÍDUOS COM ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo - Escola Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. José Orlando Bordin

Coorientadora: Dra. Elyse Moritz Sacconato

**São Paulo
2017**

Martins, Juliana Oliveira

Associação de anticorpos leucocitários em indivíduos com aloimunização eritrocitária/Juliana Oliveira Martins - São Paulo, 2017.
xviii, 95f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Hematologia e Hemoterapia.

Association of leukocyte antibodies in individuals with red blood cell antibodies

1. Anticorpos Eritrocitários 2. HLA. 3. Neutrófilos. 4. Aloimunização. 5. TRALI.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ONCOLOGIA CLINICA E EXPERIMENTAL

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Otávio César Carvalho Guimarães Baiocchi

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo

JULIANA OLIVEIRA MARTINS

**ASSOCIAÇÃO DE ANTICORPOS LEUCOCITÁRIOS EM INDIVÍDUOS COM
ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA**

BANCA EXAMINADORA

1. Prof. Dr. Alex Freire Sandes
2. Prof. Dr. Antonio Fabron Junior
3. Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

SUPLENTE

1. Profa. Dra. Karin Zattar Cecyn

Dedicatória

Eu sei que sempre foi você Deus, em todos os momentos de felicidades e principalmente de fraquezas. Em todos os momentos em que as situações ficaram difíceis. A Você eu agradeço desde o primeiro até o último momento, por sua inestimável bondade, por depositar sua confiança em mim, e acima de tudo, por nunca me abandonar.

Aqueles que me trouxeram até aqui e que ainda me levarão muito adiante, meus pais Maria Aparecida e Etelvino Martins. Agradeço por toda a paciência e compreensão que tiveram que ter comigo. Obrigada por todo o apoio, mesmo que indiretamente, eu sabia que vocês estavam lá me ajudando em todas as atividades do meu dia a dia. Sem vocês eu certamente não teria conseguido!

Aos meus queridos irmãos Ericsson Martins e William Martins, agradeço pelo amor, carinho e pelos momentos de felicidades que vocês me proporcionaram. Agradeço pelas palavras de incentivo, e por dizerem que eu era o orgulho da casa, palavras como essas eram capazes de me fortalecer para um novo dia.

Ao meu esposo, companheiro e amigo de todas as horas, Bruno Ramos, mesmo sabendo que a minha trajetória não seria fácil, você aceitou estar comigo em todos os momentos, mesmo aqueles que eu precisei estar ausente da sua vida. Agradeço por cada palavra de incentivo e encorajamento, pelas comemorações nos pequenos e grandes passos. Obrigada por tornar a minha caminhada mais leve.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a todas as mulheres que voluntariamente aceitaram participar desse estudo, sem a compreensão e apoio de vocês esse trabalho não seria possível.

Àquela pessoa que esteve comigo desde o início da minha jornada na pesquisa, querida amiga Luzia Lima. Agradeço a Deus por ter você em minha vida, pois além de uma excelente amiga você também é uma ótima pesquisadora (para a minha sorte!). Obrigada pelas conversas de incentivo, apoio, correções e conselhos. Mas acima de tudo, agradeço por simplesmente estar sempre lá, pronta para mim.

Aos amigos e também doadores de granulócitos: Thamy, Sidneia, Akemi, Ceíça, Marlene, Maria Helena e Bruno Ramos, agradeço pela compreensão e por acordarem cedo ou até mesmo irem até a UNIFESP só para que eu pudesse coletar o sangue de vocês. Vocês fazem parte desse trabalho!

Agradeço especialmente à amiga e conselheira Thamy. Obrigada por sempre estar comigo, compartilhando momentos de alegrias e tristezas, pelos conselhos e pelas longas conversas. Ainda bem que eu tenho você!

Agradeço a Samira, pela amizade e pela ajuda na coleta das amostras das gestantes. Obrigada por toda a atenção e dedicação que você teve com esse trabalho e principalmente comigo. Além de uma companheira de pesquisa eu ganhei uma grande amiga!

Aos meus grandes amigos, Luzia, Marcos, Sandra e Maze, por todo o apoio, conselhos, sugestões e reclamações! Por sempre estarem comigo e se preocuparem com meu bem estar físico e psicológico! A vocês o meu muito obrigada!

Agradeço a minha amiga de faculdade, pós-graduação e da vida, Stephany. Amiga obrigada por me auxiliar na realização dos testes finais da minha

dissertação, sem a sua ajuda eu não conseguiria ter terminado a tempo. Obrigada por estar sempre comigo!

Agradeço aos colegas da pós-graduação: Thamy, Dr. Dante, Leandra, Vanessa, Bruno Cruz, Larissa, Dra. Iara, Dra. Claudia, Elisama, Stephany, Sidneia, Samira, Dra. Melca, Akemi, Ceiza. Por todo o apoio ao longo da minha trajetória e também por todas as dicas, comentários e sugestões realizadas durante minhas apresentações nas reuniões.

Agradeço a todos os funcionários do hemocentro da UNIFESP e da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, em especial: Cleusa, Cida, Marlene, Lucimara e Cintia. Obrigada por me ajudarem a coletar as amostras de sangue e também pelas conversas enquanto aguardávamos as doadoras.

As funcionárias da imunohematologia Simone, Adriana, Priscila e Dra. Melca, pelo auxílio na coleta dos dados das pacientes.

Ao Fábio Guirão, excelente funcionário e amigo, muito obrigada por me auxiliar nos testes que envolviam o citômetro, obrigada por me ensinar os princípios básicos e avançados, obrigada pela paciência e confiança. Agradeço também pelas palavras de incentivo!

Agradeço à Dra. Stella, responsável pelo laboratório de estudos em anemias, por permitir o uso de alguns equipamentos pertencentes ao seu laboratório. E a Dra. Miyoko, responsável pelo laboratório de biologia celular e citometria de fluxo, por ter me permitido utilizar as suas instalações para a realização de algumas metodologias necessárias para o mestrado. Agradeço a vocês pelo espaço e equipamentos cedidos.

A Maria Helena Ayala, secretária da pós-graduação, agradeço pelo apoio e amizade, paciência e palavras de incentivo.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. José Orlando Bordin, meu orientador, os maiores e mais sinceros agradecimentos. Toda a minha admiração por sua excelente carreira como médico e professor. Agradeço por ter acreditado em mim e nesse trabalho, por ter me aceitado como sua aluna, mesmo não me conhecendo. Agradeço também por toda a orientação, por me incentivar, apoiar e ensinar. Não apenas profissionalmente, mas também pessoalmente.

Agradeço em especial minha coorientadora Dra. Elyse Moritz. Palavras seriam poucas para expressar a gratidão e a admiração que eu tenho por você. Obrigada por ter me conduzido por toda a minha trajetória. Obrigada por dividir comigo momentos de alegrias e momentos não tão bons quanto gostaríamos, principalmente quando as técnicas não davam certo...Obrigada pelos ensinamentos e conhecimentos a mim transmitido. Pelas reuniões e incansáveis orientações ao longo desse período. Agradeço também por toda a paciência que você teve comigo!

Agradecimentos a CAPES

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES – pela bolsa “demanda social” conferida ao meu mestrado. Agradeço a ajuda financeira, sem a qual não teria realizado meu mestrado.

Preâmbulo

De tudo na vida,
Ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de
terminar...

Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte.

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Agradecimentos Especiais.....	viii
Agradecimentos a CAPES.....	ix
Preâmbulo.....	x
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Quadros e Tabelas.....	xiv
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xvi
Resumo.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivos.....	4
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1. Antígenos Eritrocitários.....	6
2.2. Aloimunização Eritrocitária.....	7
2.3. Aloimunização Materna.....	12
2.4. Aloimunização HLA.....	13
2.5. Aloimunização leucocitária em indivíduos com anticorpos eritrocitários.....	14
2.6. Antígenos de Neutrófilos Humanos	15
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	19
3.1. Técnicas para Pesquisa e Identificação de Anticorpos Eritrocitários.....	22
3.2. Técnicas para Pesquisa e Identificação de Anticorpos Granulocitários.....	22
3.3. Técnicas moleculares.....	28
3.4. Análise Estatística.....	33
3.5. Aspectos Éticos.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Aloimunização Eritrocitária.....	35
4.2. Aloimunização leucocitária nos indivíduos com anticorpos eritrocitários.....	37
4.3. Aloimunização Neutrofílica.....	38
4.4. Aloimunização Leucocitária.....	45
4.5. Aloimunização eritrocitária relacionada com anticorpos anti-HNA e HLA	50
4.6. Persistência de Anticorpos Leucocitários.....	52
4.7. Histórico Gestacional.....	54
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES.....	74
7. ANEXOS.....	76

8. REFERÊNCIAS.....	86
Abstract	
Trabalhos apresentados	
Bibliografia consultada	

Lista de Figuras

Figura 1.	Funções biológicas dos principais antígenos eritrocitários.....	6
Figura 2.	Fluxograma do estudo.....	21
Figura 3.	Resultado obtido no teste GAT. Figura 3a: resultado positivo, figura 3b: resultado negativo. Acervo próprio.....	25
Figura 4.	Foto obtida do programa HLA Fusion 4.1. A imagem apresenta uma amostra com resultado positivo para anti-HNA-1a (NBG:14,1 e RAW:2365).....	28
Figura 5.	Relação da especificidade dos anticorpos eritrocitários.....	36
Figura 6.	Frequência de anticorpos anti-HNA em mulheres múltiparas.....	41
Figura 7.	Especificidade de anticorpos anti-HNA nos grupos 1, 2 e total segundo o teste LSM.....	42
Figura 8.	Classes dos anticorpos anti-HLA nos grupos 1, 2 e total.....	48
Figura 9.	Porcentagem dos resultados obtidos no teste GAT nos grupos 1, 2 e total.....	49
Figura 10.	Distribuição dos indivíduos estudados conforme o número de gestações.....	54

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1.	Relação dos antígenos neutrofílicos e suas principais funções.	16
Quadro 2.	Perfil dos antígenos de neutrófilos dos indivíduos utilizados na pesquisa.....	23
Quadro 3.	Sequência dos <i>primers</i> dos antígenos HNA.....	29
Tabela 1.	Distribuição dos grupos estudados conforme o número de gestações.....	35
Tabela 2.	Relação da especificidade dos anticorpos eritrocitários nos 147 indivíduos estudados.....	36
Tabela 3.	Especificidade dos anticorpos eritrocitários em relação aos anticorpos leucocitários.....	38
Tabela 4.	Frequência de anticorpos neutrofílicos nos grupos 1, 2 e total, conforme o número de gestação.....	39
Tabela 5.	Distribuição dos indivíduos conforme a inespecificidade do anticorpo anti-HNA identificado no teste LSM nos 710 indivíduos estudados.....	40
Tabela 6.	Distribuição dos indivíduos nos grupos 1 e 2, por presença de anticorpos anti-HNA.....	41
Tabela 7.	Distribuição dos indivíduos com anticorpos neutrofílicos, segundo testes GAT e LSM.....	43
Tabela 8.	Distribuição dos indivíduos com anticorpos neutrofílicos, segundo testes Flow-WIFT e LSM.....	44
Tabela 9.	Relação dos resultados obtidos nos testes GAT e Flow-WIFT nos casos com anticorpos anti-HNA identificados pelo teste LSM.....	44
Tabela 10.	Frequência de anticorpos leucocitários nos grupos estudados conforme o número de gestação.....	45
Tabela 11.	Resultados obtidos no teste LSM, distribuídos pelo número de gestações em ambos os grupos estudados.....	46
Tabela 12.	Resultados obtidos no teste LSM conforme a classe do anticorpo anti-HLA, distribuídos pelo número de gestações em ambos os grupos estudados.....	47
Tabela 13.	Distribuição dos indivíduos nos grupos 1 e 2, segundo o resultado do teste GAT.....	48
Tabela 14.	Comparação entre as técnicas LSM e GAT por presença e ausência de anticorpos anti-HLA.....	49

Tabela 15.	Distribuição dos indivíduos nos grupos 1 e 2, conforme a classe dos anticorpos anti-HLA segundo testes GAT e LSM.....	50
Tabela 16.	Distribuição dos indivíduos nos grupos 1 e 2, por presença de anticorpos anti-HNA e anti-HLA, segundo o teste LSM.....	51
Tabela 17.	Comparação dos indivíduos com anticorpos anti-HNA e HLA, segundo teste LSM.....	51
Tabela 18.	Relação das 24 mulheres com anticorpos anti-HNA, segundo a classe dos anticorpos HLA.....	53
Tabela 19.	Relação da persistência (anos) dos anticorpos neutrofílicos conforme o número de gestações.....	53
Tabela 20.	Distribuição dos grupos estudados de acordo com a presença de anticorpos leucocitários, segundo o número de gestações...	55
Tabela 21.	Distribuição dos grupos estudados de acordo com a presença e ausência de anticorpos anti-HNA segundo o número de gestações.....	56
Tabela 22.	Distribuição dos grupos estudados de acordo com a presença e ausência de anticorpos anti-HLA, segundo o número de gestações.....	56
Tabela 23.	Distribuição dos grupos estudados de acordo com a classe dos anticorpos anti-HLA, segundo o número de gestações.....	57

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (Acquired immunodeficiency syndrome)
BSA	Albumina de soro bovino (Bovine serum albumin)
CMV	Citomegalovírus
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CTL	Proteína transdutora de colina (choline transporter-like protein)
DHFRN	Doença hemolítica do feto e do recém-nascido
EDTA	Ácido etileno diaminotetra acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)
FcγRIIIb	Fc-γ-receptor IIIb
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína (fluorescein isothiocyanate)
GAT	Teste de Aglutinação de Granulócitos
GP	Glicoproteína
Flow-WIFT	Teste de Imunofluorescência de Granulócitos (White cell immunofluorescen test)
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (Human leukocyte antigen)
HNA	Antígeno Neutrófilo Humano (Human neutrophil antigen)
HGH	Hormônio de Crescimento Humano (Human growth hormone)
HGH-F	Hormônio de Crescimento Humano <i>Forward</i>
HGH-R	Hormônio de Crescimento Humano <i>Reverse</i>
H ₂ O	Água
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Ic 95%	Intervalo de Confiança de 95%
IAI	Identificação dos Anticorpos Eritrocitários Irregulares
KHCO ₃	Bicarbonato de Potássio
LSM	LabScreen Multi
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (Major histocompatibility complex)
NaCl	Cloreto de Sódio
NAN	Neutropenia Aloimune Neonatal
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônio

NK	<i>Natural Killer</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
p	Probabilidade de a diferença observada ser casual
PAI	Pesquisa de Anticorpos Eritrocitários Irregulares
pH	Potencial de Hidrogênio
PBS	Tampão Salina Fosfato (Phosphate buffered saline)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
PE	Ficoeritrina (Phycoerythrin)
PMN	Leucócitos Polimorfonucleares (Polymorphonuclear leukocytes)
Primer-F	<i>Primer Forward</i>
Primer-R	<i>Primer Reverse</i>
RFLP	Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RPM	Rotações por minuto
RTFNH	Reação transfusional febril não hemolítica
SSP	Amplificação sequência-específica (Single Specific Primer)
TEB	Tris/EDTA/Borato
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIU	Transfusão Intrauterina
TRALI	Insuficiência Pulmonar Aguda Associada a Transfusão (Transfusion-related acute lung injury)
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
X ²	Qui-quadrado

RESUMO

Introdução: Anticorpos leucocitários contra HLA classe I, classe II e antígenos de neutrófilos humanos (HNA) são formados por exposição a esses antígenos por meio de transfusão sanguínea, gravidez ou transplante e podem estar associados à lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI) e neutropenias imunes. Os fatores de risco para a aquisição dos anticorpos leucocitários não são totalmente compreendidos, entretanto apresentam grande importância para a prevenção de reações transfusionais graves e fatais.

Objetivos: Comparar a prevalência de anticorpos leucocitários em mulheres com ou sem aloimunização eritrocitária. Determinar a frequência e a especificidade de anticorpos leucocitários.

Métodos: Trata-se de um estudo transversal que incluiu mulheres cujo único estímulo à aloimunização foi a gestação, ou seja, sem histórico transfusional. Foram analisadas 147 amostras de sangue de mulheres com aloimunização eritrocitária. Os anticorpos eritrocitários foram investigados e identificados pela técnica DG Gel-Card (Grifols-Spain). O grupo de controle foi composto por 563 mulheres doadoras de sangue com história de gestação, mas sem aloimunização eritrocitária. A identificação dos anticorpos leucocitários foi realizada por: 1) teste de aglutinação de granulócitos (GAT), 2) teste de imunofluorescência de células brancas (Flow-WIFT), ambos testes foram realizados usando um painel de neutrófilos obtidos a partir de três doadores com genótipos conhecidos de HNA e 3) ensaio com *bead-based* - LABScreen Multi (LSM) (One Lambda), capaz de detectar anticorpos contra antígenos HNA-1a, -1b, -1c, -2, -3a, -3b, -4a, -5a, -5b e HLA classe I e II. Os anticorpos anti-HNA identificados foram confirmados por genotipagem do antígeno correspondente.

Resultados: Na coorte de mulheres com aloimunização eritrocitária, encontramos 178 anticorpos eritrocitários: anti-Le^a (25,3%), anti-D (24,7%), anti-C (9,0%), anti-E (9,0%), anti-K (5,6%) e outros anticorpos (26,4%). Foram identificados 74/147 (50,3%) amostras com anticorpos anti-HLA e 11/147 (7,5%) amostras com anticorpos anti-HNA com as seguintes especificidades: 5/11 anti-HNA-1a, 2/11 anti-FcγRIIIb e 4/11 anti-HNA-3b. No grupo controle, encontramos 238/563 (42,3%) amostras com anti-HLA e 24/563 (4,3%) com anti-HNA: 8/24 anti-HNA-1a, 1/24 anti-HNA-1c, 3/24 anti-HNA-2, 2/24 anti-HNA-3a, 5/24 anti-HNA-3b, 3/24 anti-HNA-5a e 2/24 anti-HNA-5b. Em relação ao histórico gestacional, 82/147 (55,8%) mulheres no grupo com aloimunização eritrocitária e 493/563 (87,6%) no grupo controle tiveram duas ou mais gestações. A análise estatística foi realizada em todas as amostras, independentemente do número de gestações, porém nenhuma diferença significativa foi observada na taxa de prevalência de anticorpos anti-HNA e anti-HLA entre os dois grupos ($p=0,10$ e $p=0,07$, respectivamente). Quando a análise foi estratificada, incluindo apenas mulheres multíparas (duas ou mais gestações), a prevalência de aloimunização HNA foi significativamente maior no grupo de mulheres com aloimunização eritrocitária: 9/82 (11%) *versus* 23/493 (4,7%), $p=0,02$, OR=2,52 (IC 95%=1,15-3,79). Do mesmo modo, observou-se também uma maior prevalência de anticorpos HLA no grupo das mulheres multíparas com aloimunização eritrocitária: 51/82 (62,2%) *versus* 224/493 (45,4%), $p=0,004$, OR = 1,97 (IC 95%=1,18- 2,71).

Conclusões: Os dados mostram que a aloimunização eritrocitária foi significativamente associada ao desenvolvimento de anticorpos leucocitários (anti-HNA e anti-HLA). Uma maior frequência de aloimunização neutrofílica (11%) foi observada no grupo das mulheres multíparas com aloimunização eritrocitária em relação ao grupo controle (4,7%), sugerindo que mulheres com anticorpos eritrocitários são melhores respondoras imunológicas e que reagem fortemente à exposição alôgena. Anticorpos anti-HLA são encontrados no plasma de doadoras de sangue do sudeste brasileiro (42,3%) em uma frequência maior que a observada em caucasóides, e se correlacionam estatisticamente com o maior número de gestações.

1 INTRODUÇÃO

Anticorpos eritrocitários são formados após a exposição alogênica, por meio de transfusão sanguínea ou gestação, e podem ser clinicamente significativos em ambos os eventos, levando a reações transfusionais hemolíticas tardias, reações sorológicas ou doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHFRN). As complicações da aloimunização eritrocitária são consideradas uma das principais causas de morbidade e mortalidade associadas à transfusão e têm incidência considerável ⁽¹⁾.

Os fatores que influenciam a aloimunização eritrocitária nos seres humanos são inerentemente limitados pelo grande número de variáveis envolvidas ⁽²⁾. Estudos sugerem que indivíduos que formam aloanticorpos eritrocitários podem mais facilmente desenvolver anticorpos contra outras células do sangue ^(3, 4). Por conseguinte, a hipótese de que a formação de aloanticorpos eritrocitários tem alguma influência na formação de anticorpos granulocitários deve ser considerada.

Anticorpos granulocitários são dirigidos contra antígenos de neutrófilos humanos (HNA) ou contra antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I. Tais anticorpos estão envolvidos em complicações transfusionais, como: reações transfusionais febris não hemolíticas (RTFNH), ineficácia da transfusão de granulócitos e lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI) ⁽⁵⁾. Além disso, os anticorpos anti-HNA podem provocar neutropenia aloimune neonatal (NAN), com maior incidência em mulheres multíparas, devido a sua associação entre a presença de anticorpos e o número de gestações prévias ⁽⁶⁾. A associação entre anticorpos e número de gestações deve-se ao transporte de sangue feto-materna via placenta, que permite a sensibilização da mãe pelos antígenos paternos presentes no feto, principalmente antígenos HLA, cuja frequência em gestantes tem variado de 7 a 39% ^(7, 8), enquanto a aloimunização HNA varia de 0,3 a 1,3% ⁽⁹⁾.

Estudos anteriores relataram que anticorpos eritrocitários irregulares também são associados com a aloimunização HLA em grupos específicos de pacientes previamente transfundidos. Por conseguinte, pacientes que receberam múltiplas transfusões possuem um risco aumentado em desenvolver anticorpos anti-HLA além dos anticorpos eritrocitários ^(3, 10). Os pacientes que desenvolvem

anticorpos anti-HLA estão sujeitos a RTFNH e podem tornar-se difíceis para realização de transplante de órgãos sólidos ^(11, 12).

Em 2014, Schonbacher e colaboradores realizaram um estudo com mulheres múltiparas com aloimunização eritrocitária, mostrando que anticorpos eritrocitários estão associados com a presença de anticorpos leucocitários, incluindo anti-HNA, bem como anticorpos granulocitários inespecíficos. Esse fato pode ser explicado tanto por fatores subjacentes, como um aumento da exposição à aloantígenos no grupo dos indivíduos com aloimunização eritrocitária, quanto por interações moleculares específicas em respondedores imunológicos que reagem fortemente à exposição alogênica ⁽⁴⁾.

1.1 Objetivos

1. Investigar se a aloimunização eritrocitária induzida por gestações prévias está associada com a formação de anticorpos neutrofílicos;
 2. Determinar a frequência de anticorpos leucocitários e neutrofílicos em doadoras de sangue;
 3. Identificar a especificidade dos anticorpos neutrofílicos.
-

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Antígenos Eritrocitários

Os antígenos eritrocitários são estruturas localizadas na membrana dos glóbulos vermelhos, cuja natureza pode ser proteica, glicoproteica ou glicolípida. São detectados por aloanticorpos, sejam eles anticorpos monoclonais produzidos artificialmente ou anticorpos produzidos naturalmente através de estímulos ambientais (principalmente microbianos) ou por exposição a eritrócitos estranhos através da gestação ou transfusão sanguínea ⁽¹³⁾. A descoberta desses antígenos foi considerada um dos avanços mais importantes nas pesquisas da área médica na primeira metade do século XX ⁽¹⁴⁾.

Já foram descritos mais de 330 antígenos eritrocitários organizados em sistemas, séries e coleções, cujas expressões variam entre os indivíduos. Tais descobertas contribuem para melhorar ainda mais a segurança transfusional, pois uma unidade de sangue não autóloga representa uma dose significativa de aloantígenos transfundidos ⁽¹⁴⁾. Quando se formam aloanticorpos eritrocitários, em muitos casos, os glóbulos vermelhos que expressam o antígeno correspondente não podem mais ser transfundidos no mesmo indivíduo com segurança ⁽¹⁵⁾.

Os antígenos de grupos sanguíneos são estruturas macromoleculares, localizados na superfície extracelular da membrana dos eritrócitos, podendo ser carboidratos, proteínas ou glicoproteínas, que muitas vezes diferem por um único aminoácido ⁽¹⁶⁾. Cada um desses antígenos possui uma ou várias funções biológicas, que podem ser: estrutural, transporte, recepção/adesão, enzimática ou complemento ⁽¹⁷⁾. Na Figura 1, temos uma representação esquemática de diferentes antígenos eritrocitários, de acordo com suas respectivas funções.

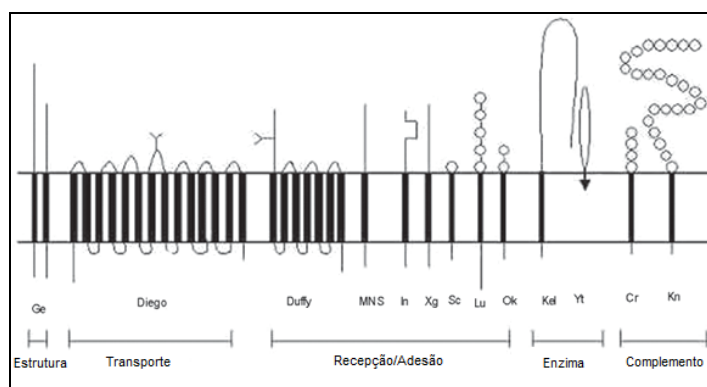


Figura 1. Funções biológicas dos principais antígenos eritrocitários.

2.2 Aloimunização Eritrocitária

Atualmente as taxas de aloimunização eritrocitária descritas na literatura variam de 3 a 10% nos receptores de sangue. Em pacientes cronicamente transfundidos, portadores de condições clínicas como a doença falciforme, as taxas de aloimunização são muito maiores, podendo variar entre 35 a 40% ⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

Para pacientes que se tornam aloimunizados por múltiplos antígenos, a terapia de transfusão contínua torna-se cada vez mais difícil. Embora os aloanticorpos sejam os efetores imunes da aloimunização humoral, os fundamentos celulares do sistema imunológico que conduzem à produção final de aloanticorpos são complexos, incluindo o consumo, processo e apresentação de antígenos, resposta imune dos linfócitos T e B. Além disso, esses processos celulares diferem em relação aos concentrados de hemácias transfundidos em comparação com outras barreiras imunes melhores estudadas (por exemplo, doenças infecciosas, vacinas e transplantes de órgãos sólidos) ⁽²¹⁾.

Fatores que influenciam a aloimunização eritrocitária

A aloimunização eritrocitária ocorre quando uma pessoa que não possui um antígeno particular é exposta a este antígeno durante a transfusão ou a gravidez. Os anticorpos imunes mais comumente encontrados são contra os antígenos D > K > E > Fya > Jka ^(22, 23), e são consideradas clinicamente significativas dependendo da especificidade, classe de imunoglobulinas e contexto clínico. Tais anticorpos podem provocar não somente reações transfusionais hemolíticas, mas também a DHFRN ⁽²⁴⁻²⁷⁾.

As complicações da aloimunização eritrocitária são consideradas uma das principais causas de morbidade e mortalidade associadas à transfusão e têm incidência considerável ⁽¹⁾. Embora a exposição a um antígeno seja necessária para que a aloimunização ocorra, esse evento sozinho não é suficiente para a formação de anticorpos. São vários os fatores desencadeantes da aloimunização:

- ✓ *Estrutura antigênica:* Os antígenos dos grupos sanguíneos são diversos em estrutura, função e imunogenicidade. Um total de 35 sistemas de grupos sanguíneos e mais de 330 antígenos de grupos sanguíneos diferentes são

responsáveis pela enorme diversidade de especificidades de glóbulos vermelhos ⁽²⁸⁾. Devido a grande diversidade estrutural dos antígenos eritrocitários, uma única unidade de concentrado de hemácias pode conter muitos antígenos que estão ausentes no receptor da transfusão. A grande variabilidade estrutural se deve a alguns desses antígenos serem formados por um polimorfismo de um único nucleotídeo, como por exemplo, o antígeno antitético expresso nos próprios glóbulos vermelhos do receptor (K vs. k). Outros antígenos estão localizados em estruturas que são inteiramente estranhas ao destinatário da transfusão (por exemplo, RhD). Alguns antígenos do grupo sanguíneo são proteínas e outros são carboidratos, alguns são expressos unicamente sobre glóbulos vermelhos, enquanto outros também são expressos em órgãos ou tecidos ⁽²⁸⁾.

- ✓ O fenótipo D-negativo do sistema Rh resulta de uma ausência da proteína RhD, consequentemente, D é o antígeno do grupo sanguíneo mais imunogênico e clinicamente importante após os antígenos do sistema ABO. Em estudos com voluntários saudáveis RhD-negativos, foram infundidos com 200 mL ou mais de células vermelhas RhD-positivas, 85% dos indivíduos formaram anti-D ⁽²²⁾. Um outro estudo relatou que a formação de anticorpos anti-D em transfusão de concentrado de hemácias RhD positivo em pacientes RhD negativos foi menor do que encontrado no estudo de Klein, estimada em 30,4% ⁽²⁹⁾. Entretanto com o advento da administração da imunoglobulina anti-D em mulheres grávidas RhD negativas, a prevalência de anti-D foi reduzida dramaticamente nas últimas 3 décadas, com isso foi possível prevenir a sensibilização pela gestação de fetos RhD positivos ⁽³⁰⁾.
- ✓ *Fatores genéticos:* Embora existam estratégias de prevenção para minimizar a aloimunização eritrocitária em pacientes com maior risco para esta complicação, a assinatura genética ou imunológica que diferencia um "respondedor" de um "não respondedor" está relacionada com a variabilidade no HLA, o que afeta a capacidade dos receptores em processar e apresentar peptídeos de antígenos eritrocitários. Como é de

conhecimento, a exposição a antígenos eritrocitários ausentes no receptor é um dos requisitos fundamentais para a formação de aloanticorpos. Porém, a exposição sozinha não é suficiente para levar à aloimunização, caso isso fosse condizente, cada receptor seria altamente aloimunizado e a taxa de aloimunização chegaria perto de 100% por transfusão. Já foram relatados em estudos de trombocitopenia aloimune neonatal que a capacidade de apresentar um antígeno é necessária para gerar uma resposta formando um aloanticorpo, mas esse mecanismo não é único no processo de aloimunização. Supõe-se que a maioria dos antígenos eritrocitários humanos clinicamente significativos são dependentes de células T ⁽⁷⁾. Antígenos como RhD são grandes e diversos o suficiente para que praticamente qualquer receptor HLA seja capaz de apresentar uma porção do antígeno, enquanto outros antígenos como Fy^a ⁽³¹⁾ e K ⁽³²⁾ demonstraram ter uma apresentação HLA mais restrita. Além dos estudos de restrição de HLA, outro estudo sugeriu que o *HLA-DRB1*15* pode predispor os receptores transfundidos à formação de múltiplos aloanticorpos eritrocitários diferentes ⁽³³⁾.

Embora a predisposição genética à aloimunização seja bastante importante, vários estudos emergentes em modelos animais e humanos ressaltaram a relevância de um "sinal de perigo" na formação de anticorpos eritrocitários. Este sinal de perigo pode estar na forma de agonistas exógenos de receptores de tipo *Toll-like*, os quais podem cursar com dois eventos: transformam os "não respondedores" em "respondedores" ou aumentar a magnitude da resposta imune. A transfusão na presença de um sinal de perigo como o ácido polycytidylic (geralmente abreviado: poli i:C) é conhecida por aumentar o consumo de glóbulos vermelhos por receptores de células dendríticas e aumentar os sinais coestimulantes nas células apresentadoras de antígenos ^(15, 34).

Além das diferenças de HLA, há uma infinidade de variantes genéticas em genes imunorreguladores que, em teoria, podem afetar as respostas aloimunes eritrocitárias. Os polimorfismos no TRIM 21 (Ro52) ⁽³⁵⁾ e CD81 (*Cluster* de diferenciação) ⁽³⁶⁾ foram implicados nas respostas aloimunes

eritrocitárias de receptores em seres humanos.

- ✓ *Fatores clínicos associados ao receptor de sangue:* Estudos em humanos descobriram que pacientes com doença falciforme, transfundidos durante a doença aguda (com síndrome torácica aguda ou crise vaso-oclusiva) são mais propensos a aloimunizar do que os pacientes transfundidos em seu estado de saúde basal ⁽³⁷⁾. Além disso, os pacientes com doença inflamatória intestinal, outros distúrbios inflamatórios, ou doenças autoimunes crônicas foram descritos como maiores potenciais para aloimunização do que no grupo controle ⁽³⁸⁾. Por outro lado, os pacientes que receberam medicamentos imunossupressores foram descritos por terem taxas mais baixas de aloimunização do que no grupo controle ⁽³⁹⁾. Menos que 0,3% dos doadores de sangue saudáveis possuem anticorpos eritrocitários no seu plasma ^(22, 25), em comparação com 1 a 2% da coorte de doentes mistos ^(22, 40, 41). A taxa de aloimunização pós-transfusão de pacientes de cirurgia é na faixa de 2,5 a 3,3% ⁽²²⁾ e pacientes com leucemia mielóide aguda possuem uma taxa de 2,8% de aloimunização eritrocitária após a transfusão ⁽⁴²⁾. Porém pacientes cronicamente transfundidos possuem a maior taxa de aloiminuzação, 30% ou mais. Essa taxa é vista principalmente em pacientes que possuem síndrome mielodisplásica (15%), talassemia (23,5%), anemia falciforme (40%), ou doença hemolítica autoimune (11%) ⁽⁴³⁻⁴⁶⁾. Algumas outras patologias também podem influenciar na formação de anticorpos eritrocitários, como por exemplo: diabetes mellitus, doença maligna de órgãos sólidos, bem como o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas. Alguns fatores também podem contribuir para a imunossupressão e consequente diminuição da taxa de aloimunização. Receptores de transplantes de órgãos sólidos, especialmente os pacientes que são submetidos a protocolos de imunossupresão com quimioterapia ou e/ou radioterapia com o objetivo de evitar ou tratar a rejeição do enxerto. O mesmo pode ser visto em pacientes renais crônicos que precisam de suporte de hemodiálise ⁽¹²⁾. É pouco provável que pacientes com síndrome da imunodeficiência

adquirida (AIDS) formem anticorpos eritrocitários, possivelmente atribuíveis ao seu sistema imunológico comprometido com deficiência de células T CD4-positivo ⁽⁴⁷⁾. Da mesma forma, bebês prematuros conhecidos por terem um sistema imunológico imaturo não são susceptíveis de formar anticorpos eritrocitários. Pode-se dizer também que pacientes idosos têm uma resposta imune reduzida, diminuindo assim as chances de formarem anticorpos eritrocitários ⁽⁴⁸⁾.

- ✓ *Fatores ambientais*: também podem ter uma contribuição na formação do aloanticorpo, visto que semelhanças antigênicas de substâncias ambientais ou microbianas com antígenos de glóbulos vermelhos podem dar origem à produção de anticorpos ⁽¹⁾.

 - ✓ *Características do receptor*: A aloimunização por transfusão sanguínea não depende apenas da dose e da imunogenicidade do antígeno, mas também de fatores inerentes ligados ao receptor ⁽⁴⁹⁾. Em nossa literatura já foi relatado que indivíduos do sexo feminino possuem uma taxa superior de aloimunização ⁽⁴⁶⁾. No entanto, esse dado não pode ser confirmado em uma recente meta-análise, pois a taxa elevada foi devidamente atribuída à gravidez ⁽⁵⁰⁾.

 - ✓ *Características dos hemocomponentes*: Há também algumas variáveis de aloimunização que podem estar envolvidas na coleta, processamento, modificação e principalmente armazenamento do concentrado de hemácias, esse último podendo afetar diretamente a imunogenicidade dos antígenos presentes na bolsa a ser transfundida. A leucorredução é feita mediante um filtro especial que reduz o número de leucócitos em 99,9%. É utilizada para concentrado de hemácias e plaquetas e tem como objetivo evitar complicações decorrentes da transfusão de leucócitos, incluindo reações febris não hemolíticas, refratariedade plaquetária e transmissão de citomegalovírus (CMV). Entretanto os filtros de leucorredução também possuem diferentes graus de eficiência na transfusão de plaquetas. Assim, mesmo em uma unidade leucorreduzida, as plaquetas remanescentes ou
-

seus produtos de degradação, incluindo citocinas pró-inflamatórias, micropartículas ou padrões moleculares associados ao dano celular, podem ter potencial de impactar a resposta imune do receptor aos antígenos eritrocitários transfundidos. Além disso, o tempo de processamento pode afetar o número de glóbulos brancos, citocinas e micropartículas presentes na bolsa transfundida, consequentemente com um maior tempo de processamento, maior o potencial contaminante de resíduos biologicamente ativos do que os processados logo após a coleta (51, 52).

2.3. Aloimunização Materna

A aloimunização materna é definida como a formação de aloanticorpos eritrocitários irregulares em uma gestante, através do transporte de sangue feto-materna via placenta, que permite a sensibilização da mãe pelos antígenos paternos presentes no feto, podendo causar DHFRN. Ainda assim, grande parte das mulheres não se aloimunizam após esta exposição, pois a imunogenicidade do antígeno eritrocitário é um fator crítico para esse evento ocorrer. A mais conhecida e comum causa da DHFRN é pela aloimunização contra o antígeno D. A sensibilização contra o antígeno RhD (Rhesus) foi relatada pela primeira vez em africanos por Zoutendyk em 1947, quando descreveu três casos em Bantu na África do Sul (53, 54). Nos caucasianos, o antígeno D representa cerca de 50% dos casos de imunização materna. O restante é principalmente devido à incompatibilidade com antígenos K, c, C/G, E e Fy^a e a antígenos de baixa incidência nos sistemas do grupo sanguíneo Rh, MNS e Diego (55-57). Antes da introdução da imunoprofilaxia com a imunoglobulina anti-D, DHFRN devido ao anticorpo anti-D afetou cerca de 1% de todos os recém-nascidos e foi responsável pela morte de um bebê em cada 2.200 nascimentos em países desenvolvidos (58, 59). A prevalência do fenótipo D negativo varia em diferentes grupos étnicos com aproximadamente 15% de caucasianos, 8% de negros e 1% de asiáticos (60).

A incompatibilidade do sistema ABO entre mãe e feto desempenha um papel protetor contra a aloimunização eritrocitária, devido a isohemaglutininas maternas que eliminam rapidamente os glóbulos vermelhos do feto da circulação

materna. Além dos sangramentos do feto para a mãe, outro fator que leva a aloimunização eritrocitária na gravidez é a transfusão intrauterina (TIU) ⁽⁶¹⁾. Dado que a DHFRN é secundária à aloimunização materna, as mulheres grávidas já provaram ser "respondedoras" aos antígenos eritrocitários, pois já formaram anticorpos previamente à TIU, sendo assim, a alta taxa de aloimunização nessas mulheres que formaram anticorpos eritrocitários adicionais em resposta a TIU é de 25%. Nessas mulheres, o risco é alto de formar anticorpos eritrocitários e leucocitários concomitantemente ^(55, 62-64).

2.4 Aloimunização HLA

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC), localizado no cromossomo 6, é composto por genes HLA classe I altamente polimórficos (HLA-A, -B e -C), genes HLA de classe II (HLA-DR, -DQ e -DP), genes de classe I não clássicos (HLA-E, -F e -G). As moléculas HLA de classe I têm a função de apresentar o peptídeo derivado de antígenos intracelulares para linfócitos T CD8-positivos e servem como ligantes para receptores em células *natural killer* (NK). As moléculas HLA de classe II apresentam antígenos do espaço extracelular para células T CD4-positivas ^(65, 66). Os genes do antígeno leucocitário humano são os mais polimórficos do genoma humano e até momento, aproximadamente 14.473 HLA e alelos relacionados foram submetidos à versão do banco de dados IMGT/HLA 3.24.0 (IPD-IMGT/HLA, disponível em <<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>>).

A resposta imune é projetada para reconhecer antígenos autodenominados "*self*" ou "*non-self*", sejam eles proteínas, lipídeos ou carboidratos. Essa resposta envolve a ativação do sistema imune adaptativo ao HLA alogênico, resultando na geração de aloanticorpos ⁽⁶⁷⁾. Por ser altamente polimórfico, as taxas de aloimunização são elevadas após o transplante, transfusão sanguínea ou gravidez, resultando na formação de células B de memória que produzem aloanticorpos de longa duração ⁽⁶⁸⁾. Grande parte das mulheres que estão na lista de espera por um transplante tiveram histórico gestacional, o que caracteriza um primeiro evento para a sensibilização, aumentando a dificuldade em encontrar um doador compatível ⁽¹²⁾. Mulheres com

histórico de duas ou mais gestações aumentam ainda mais as chances de terem formado anticorpos anti-HLA. Conforme demonstrado em um estudo brasileiro em doadoras de sangue, 22,9% possuíam anticorpos anti-HLA, sendo que 37% eram multíparas, 17% tiveram apenas uma gestação, enquanto 26% das mulheres tiveram duas ou mais gestações ⁽⁶⁹⁾.

2.5 Aloimunização leucocitária em indivíduos com anticorpos eritrocitários

Na resposta imune contra os antígenos proteicos, os eritrócitos são fagocitados por macrófagos, monócitos ou células dendríticas e as proteínas que transportam os epítomos aloantigênicos são processadas, montadas no sulco das moléculas HLA de classe II e apresentadas por essas células aos receptores de células T CD4-positivas. Essas células T ativam os linfócitos B que também são capazes de reconhecer os epítomos antigênicos; As células B ativadas subsequentemente produzem anticorpos contra os epítomos correspondentes. Em contraste com os peptídeos apresentados por moléculas HLA de classe I que englobam 8 a 10 aminoácidos, os peptídeos apresentados por moléculas HLA de classe II são mais longos. Uma associação entre as especificidades de HLA e a aloimunização contra antígenos eritrocitários pode ser apenas observada se a molécula de HLA for capaz de apresentar peptídeos portadores de epítomos aloantigênicos ⁽⁶⁸⁾.

Além da RTFNH, o paciente que forma anticorpos eritrocitários após a transfusão sanguínea pode desenvolver refratariedade plaquetária, levando a consequências clínicas graves. Os pacientes aloimunizados com anticorpos anti-HLA também podem se tornar difíceis candidatos para transplantes de órgãos sólidos ou hematopoiéticos ^(70, 71). Em 2006 foi realizado um estudo em indivíduos com anticorpos eritrocitários com o objetivo de avaliar a hipótese de que os pacientes com aloanticorpos eritrocitários poderiam ser mais propensos a formar anticorpos anti-HLA do que os pacientes previamente transfundidos sem anticorpos eritrocitários, os resultados do estudo demonstraram que há uma diferença significativa na taxa de aloimunização HLA em pacientes do sexo masculino com aloanticorpos eritrocitários em comparação com pacientes politransfundidos sem aloanticorpos eritrocitários ⁽³⁾. Embora outros fatores

possam contribuir para o risco de aloimunização, pacientes que desenvolveram aloanticorpos eritrocitário podem ser bons respondedores imunológicos que são mais propensos a formar aloanticorpos adicionais relacionados à transfusão, como anti-HLA.

Existem diversas associações entre HLA e a aloimunização eritrocitária, algumas dessas associações relacionam a frequência de alguns alelos HLA-DRB1 em indivíduos que formaram anticorpos contra antígenos eritrocitários específicos. A frequência dos alelos *DRB1*01:01*, **01:02* ou **10:01* foi significativamente aumentada em pessoas imunizadas com o anticorpos anti-Jk^a em comparação com o grupo controle (65,0% vs. 19,5%) ⁽⁷²⁾. Indivíduos com anticorpos anti-Fy^a expressam mais frequentemente alelo *DRB1*04* e na população do sul da Europa também expressam o alelo *DRB1*15* ^(31, 73). Outras associações entre HLA-DRB1 e aloimunização eritrocitária também foram encontradas, como o anticorpo anti-D e *HLA-DRB1*15*, K e *DRB1*13* ⁽⁷⁴⁾. Essas associações são corroboradas pela análise dos peptídeos obtidos dos aloantígenos imunizantes que podem ser apresentados pelas moléculas HLA classe II relevantes ⁽⁷⁵⁾. Além dessas associações específicas, algumas investigações indicam que os genes HLA de classe II podem influenciar a capacidade de resposta geral aos aloantígenos: *HLA-DRB1*15* parece ser um marcador para múltiplos respondedores de anticorpos ^(33, 76), enquanto outros genes HLA parecem ter uma função de proteção à aloimunização ⁽⁷⁷⁾.

2.6 Antígenos de Neutrófilos Humanos

Antígenos de neutrófilos humanos (HNAs) são moléculas de superfície de neutrófilos imunogênicas, polimórficas e geneticamente determinadas. Embora estes "grupos sanguíneos" estejam principalmente restritos a neutrófilos, alguns também são expressos em outras células. A nomenclatura dos antígenos neutrofílicos baseia-se na glicoproteína em que está localizado. Diferentes polimorfismos da mesma glicoproteína são designados alfabeticamente, em uma ordem sequencial de detecção (HNA-1a, -1b, -1c) e a nomenclatura dos alelos denominados de acordo com as Diretrizes do Workshop Internacional sobre Mapeamento do Genoma Humano. Atualmente são descritos cinco sistemas de

HNA: HNA-1, -2, -3, -4 e -5 que compreendem 10 antígenos ⁽⁷⁸⁾, sendo o HNA-1d o mais recentemente descrito ⁽⁷⁹⁾. As principais características dos antígenos neutrofílicos estão descritas no quadro 1.

Quadro 1. Relação dos antígenos neutrofílicos e suas principais funções.

Sistema	Antígenos	Glicoproteína	CD	Alelos	Principais funções
HNA-1	HNA-1a	FcγRIIIb	CD16b	<i>FCGR3B*01</i>	Fagocitose e remoção de imunocomplexos
	HNA-1b			<i>FCGR3B*02/*03</i>	
	HNA-1c			<i>FCGR3B*03</i>	
	HNA-1d			<i>FCGR3B*02</i>	
HNA-2	HNA-2	NB1	CD177	<i>CD177</i>	Ligante para PECAM-1 Adesão às células endoteliais
HNA-3	HNA-3a	CTL-2	-	<i>SLC44A2*01/461G</i>	Transportador de colina
	HNA-3b			<i>SLC44A2*02/461A</i>	
HNA-4	HNA-4a	MAC-1; CR3; αMβ2-integrina	CD11b	<i>ITGAM*01/230G</i>	Adesão dos leucócitos às células endoteliais
	HNA-4b			<i>ITGAM*02/230A</i>	
HNA-5	HNA-5a	LFA-1; αLβ2-integrina	CD11a	<i>ITGAL*01/2372G</i>	Fagocitose e remoção de imunocomplexos
				<i>ITGAL*02/2372C</i>	

O sistema HNA-1, está localizado no receptor FcγRIIIb que transporta quatro epítomos, decorrentes de múltiplas substituições de aminoácidos reconhecidas por aloanticorpos contra HNA-1a, -1b, -1c e -1d. HNA-1c e recentemente descrito o HNA-1d são expressos em neutrófilos de indivíduos HNA-1b positivos, ou seja, HNA-1b1d expressa o alelo *FCγR3B*02* e HNA-1b1c expressa o alelo *FCγR3B*03* ^(79, 80). A deficiência do gene *FCγRIIIB* em neutrófilos resultando no fenótipo HNA-1 *null*, essa deleção está presente em aproximadamente 0,1% de caucasianos, e causa a formação de aloanticorpo pan-reactivo anti-FCγR3B nos indivíduos classificados como HNA-1 *null* ⁽⁸¹⁾.

O antígeno HNA-2 reside na glicoproteína (GP) CD177, codificada pelo gene *CD177*, encontrada em membranas plasmáticas de neutrófilos e grânulos secundários ⁽⁸²⁾. Os indivíduos que são HNA-2 positivos são capazes de expressar a GP CD177 em neutrófilos, entretanto devido a uma falha de transcrição do gene em um subconjunto de células, indivíduos classificados como

HNA-2 positivos podem ter uma subpopulação de neutrófilos negativa para a GP CD177⁽⁸³⁾. Apenas 3% da população não expressa CD177 nos neutrófilos, resultado de um processo de *splicing* incorreto gerando *stop códons* prematuros^(84, 85).

O sistema bialélico HNA-3 está localizado na proteína transportadora de colina CTL2 e inclui os antígenos HNA-3a e HNA-3b^(86, 87). CTL2 é uma glicoproteína multi-transmembranar expressa em neutrófilos, linfócitos, plaquetas, rim, baço, células placentárias e células do ouvido interno⁽⁸⁸⁾. Aloanticorpos contra HNA-3a são frequentemente implicados em casos graves e fatais de TRALI⁽⁸⁹⁻⁹²⁾, são ocasionalmente associados com NAN⁽⁹³⁾ e relacionados com RTFNH⁽⁹⁴⁾.

O sistema HNA-4 está localizado no complexo CD11b/CD18, também conhecido como integrina Mac-1, CR3 ou $\alpha M\beta 2$, e compreende os antígenos HNA-4a e -4b. É expresso em neutrófilos, monócitos e células NK e desempenha um papel importante na adesão de leucócitos às células endoteliais e plaquetas, bem como à fagocitose⁽⁹⁵⁾. Aloanticorpos anti-HNA-4a podem causar NAN⁽⁹⁶⁾. O CD11b/CD18 também é o alvo de autoanticorpos relatados não apenas por causar neutropenia, mas também por prejudicar a adesão de neutrófilos⁽⁹⁷⁾.

O HNA-5a está localizado no complexo CD11a/CD18, também conhecido como LFA-1 ou $\alpha M\beta 2$ -integrina, é expresso em neutrófilos, monócitos e células T, mas não em plaquetas e glóbulos vermelhos. CD11a/CD18 funciona como uma molécula de adesão de leucócitos. É desconhecida se a função da integrina é influenciada pelo polimorfismo HNA-5a⁽⁹⁸⁾. Relatos de casos de NAN envolvendo o HNA-5a já foram reportados⁽⁹⁹⁾.

Indivíduos podem desenvolver anticorpos anti-HNA se o seu sistema imunológico entrar em contato com antígenos neutrofílicos que não possui (durante a gravidez ou a transfusão sanguínea). Anticorpos neutrofílicos podem ser específicos, quando dirigidos contra antígenos dos sistemas HNA-1 e -2 ou inespecíficos, quando dirigidos contra HNA-3, -4 e -5 e HLA de classe I. Tais anticorpos estão implicados em uma variedade de doenças aloimunes e autoimunes^(5, 97, 99, 100).

TRALI é uma complicação da hemoterapia caracterizada por insuficiência respiratória aguda, edema pulmonar bilateral e severa hipoxemia, sem comprometimento cardíaco, ocorrendo dentro de 6 horas de completada a transfusão ou durante a mesma. TRALI é tipicamente associado ao plasma fresco congelado, embora os casos TRALI causados por células sanguíneas (plaquetas, glóbulos vermelhos) tenham sido reportados ⁽¹⁰¹⁾. Além dos aloanticorpos contra HNAs, os anticorpos contra os antígenos HLA Classe I e II estão implicados no TRALI ^(88, 102).

Anticorpos anti-HNA podem provocar NAN, com maior incidência em mulheres multíparas, devido a sua associação entre a presença de anticorpos e o número de gestações prévias ⁽⁶⁾. A frequência de anticorpos anti-HLA em gestantes tem variado de 7% a 39% ⁽⁷⁾. Já foi demonstrado em estudo americano que a frequência de anticorpos HNA em doadoras de sangue é de 0,7%, sendo que 65,6% das doadoras com anticorpos anti-HNA eram mulheres com antecedente gestacional, e 80% dessas mulheres também possuíam anticorpos anti-HLA ⁽⁹⁾.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal, que foi desenvolvido no laboratório de pesquisa em Imunohematologia e Laboratório de biologia celular e citometria de fluxo do Hemocentro da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Foram incluídas no trabalho 710 amostras de sangue de mulheres com histórico gestacional, sendo 147 mulheres saudáveis com aloimunização eritrocitária apenas pela gestação (Grupo 1), que estiveram internadas no Hospital São Paulo e Hospital Geral de Guarulhos. Já no grupo controle (Grupo 2) foram incluídas 563 doadoras de sangue do Hemocentro da UNIFESP e do Hemocentro da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo com história gestacional, mas sem aloimunização eritrocitária. Todas as amostras foram coletadas no período de agosto de 2015 a junho de 2017.

Para a realização da análise estatística, os indivíduos foram distribuídos em dois grupos, de acordo com o histórico gestacional: uníparas (uma gestação) e múltiparas (duas ou mais gestações).

As mulheres incluídas na pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 1) e responderam a um questionário para compor um Banco de Dados (anexos 3 e 4) cujas informações auxiliaram na interpretação dos resultados. Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da UNIFESP (anexo 2).

Foram coletados 4,0 mL de sangue periférico de cada participante, em tubo vacutainer estéril (13x75mm) contendo o anticoagulante EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*). Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. Para a pesquisa de anticorpos na amostra, o plasma obtido foi aliquotado em tubos de 0,5 mL e 2,0 mL. Para estudos moleculares, a amostra foi homogeneizada e aliquotado 200 µL em um tubo estéril de 1,5 mL, o restante foi aliquota em um tubo estéril de 2,0 mL, livres de DNases e RNases. As alíquotas foram armazenadas em freezer com temperatura de -30°C.

Todas as amostras foram testadas pelo teste de aglutinação de granulócitos (GAT) e Labscreen Multi (LSM). As mulheres com resultados positivos para anticorpos anti-HNA foram testadas no teste Flow-WIFT e também foi realizada a genotipagem do antígeno HNA correspondente, conforme fluxograma apresentado na figura 2.

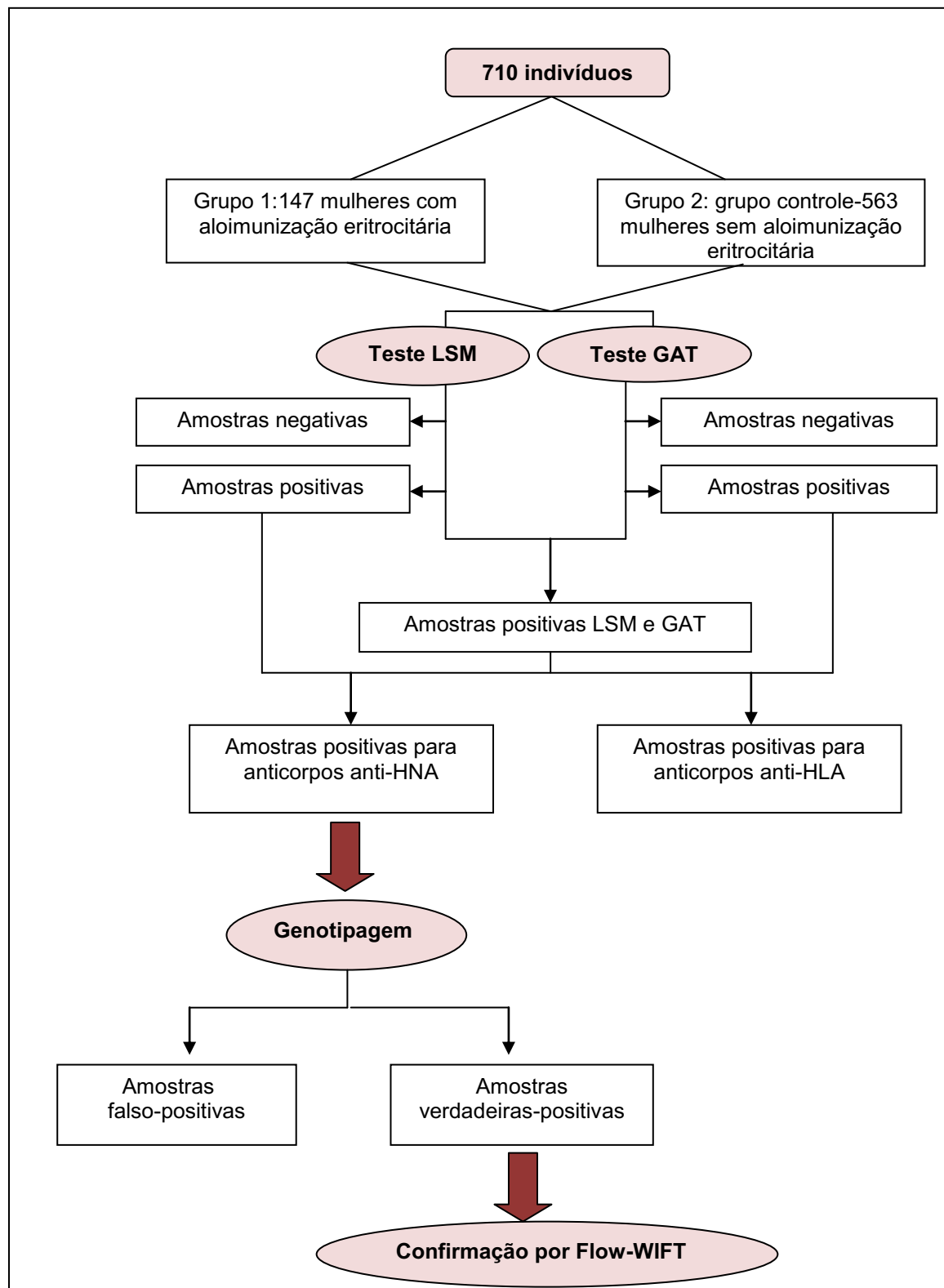


Figura 2. Fluxograma do estudo.

3.1 Técnicas para Pesquisa e Identificação de Anticorpos Eritrocitários

✓ Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI)

O teste PAI consiste na determinação da ausência ou a presença de anticorpos eritrocitários livres no soro ou plasma. Os testes foram processados na matriz gel da Grifols (Grifols Brasil, Ltda) e foram realizados seguindo as orientações do fabricante.

✓ Identificação de Anticorpos Eritrocitários Irregulares

A Identificação dos Anticorpos Eritrocitários Irregulares (IAI) consiste na determinação da especificidade do anticorpo eritrocitário. Os testes foram processados na matriz gel da Grifols (Grifols Brasil, Ltda) e foram realizados seguindo as orientações do fabricante.

✓ Titulação do anticorpo anti-D

Foi realizada a titulação do anticorpo anti-D com o objetivo de excluir os indivíduos que receberam a imunoglobulina “roghan” ou “matergam” durante o pré-natal. Foram considerados anticorpos formados pela gestação aqueles que possuíam título igual ou superior a 16 (1:16) ⁽¹⁰³⁾. Os testes foram realizados utilizando o reagente soro de Coombs anti-IgG (Bio-Rad-DIAMED®) seguindo as orientações do fabricante.

3.2. Técnicas para Pesquisa e Identificação de Anticorpos Granulocitários

Teste de Aglutinação de Granulócitos (GAT)

O teste GAT baseia-se na incubação de um painel granulócitos frescos de fenótipo conhecido com os soros dos indivíduos a serem testados. Os resultados são considerados positivos na presença de aglutinação celular, observada em microscópio de fase invertida. Para compor o painel de neutrófilos do GAT são necessárias células de três doadores com genotipagem HNA prévia (Quadro 2), ou seja, para cada amostra, o teste GAT foi realizado três vezes, cada vez com uma célula diferente.

Quadro 2. Perfil dos antígenos de neutrófilos dos indivíduos utilizados na pesquisa.

Células	Tipagem Sanguínea	HNA-1			HNA-2 (%)	HNA-3		HNA-4 -4 ^a	HNA-5 -5 ^a
		-1a	-1b	-1c		-3a	-3b		
1	O+	+	-	-	62	+	-	a/b	a/b
2	O+	+	+	-	74	-	+	a/a	b/b
3	O-	-	+	-	91	-	+	a/a	a/a

✓ Soluções

Dextran (Mr 450,00 – 650,000)

A separação celular foi realizada por Dextran 5% (Dextran from Leuconostoc spp., Sigma-Aldrich, EUA), essa solução tem a função de sedimentar hemácias, separando-as dos granulócitos que permanecem no sobrenadante da solução.

Ficoll Paque

A solução de Ficoll (Ficoll-Paque™ PLUS; d=1.077g/ML, GE Healthcare, UK), aplicada ao sobrenadante da solução com dextran, tem a função de separar os linfócitos dos granulócitos por gradiente de concentração.

Cloreto de Amônia

Para lisar as hemácias que ainda permaneceram na suspensão celular, utilizou-se uma solução de lise de cloreto de amônia obtida pela pesagem de:

- ✓ 1,66g de NH₄Cl (Peso Molecular: 53,49 g/ mL) e 0,2g de KHCO₃ (Peso Molecular: 100,12 g/mL), em água destilada suficiente para uma solução de 100 mL (pH: 7,4).

Tampão Salina Fosfato (PBS)

Utilizou-se PBS (DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10x) comercial da marca GIBCO – life Technologies. O PBS é comercializado na concentração de 10x, para a utilização do mesmo, deve-se diluir o reagente com água destilada até obter a concentração de 1x.

Pool de Plasma AB

O pool de plasma AB foi feito com a mistura de plasma de 10 doadores de sangue do sexo masculino do tipo sanguíneo AB que nunca foram transfundidos. Os plasmas são misturados em um único tubo de plástico seco e centrifugado por 3 minutos a 13,000 rpm. O plasma da região central do tubo foi aliquoteado e armazenado em *freezer* -20°C.

Plasma Controle Positivo

Anti-soro de indivíduos previamente testados e que contenham anticorpos para os antígenos neutrofílicos.

Plasma Controle Negativo

Anti-soro de indivíduos previamente testados e que não possuam anticorpos para antígenos leucocitários.

Óleo Mineral

O óleo mineral (Sigma Aldrich, M-3516, *EUA*) é utilizado com o objetivo de evitar a evaporação da amostra, ele é aplicado na placa de Terasaki durante o período de incubação.

Preparo da suspensão de granulócitos

1. Transferir 8,0 mL de sangue total para um tubo Falcon de 15 mL;
 2. Acrescentar 2,0 mL de Dextran 5% e homogeneizar;
 3. Incubar em banho-maria a 37°C por 30 minutos;
 4. Após a incubação, o sobrenadante deverá ser transferido cuidadosamente para tubo Falcon de 15 mL contendo 2,5 mL de Ficoll-Paque;
 5. Centrifugar por 20 minutos a 1700 rpm com o breque 2;
 6. Desprezar o sobrenadante por inversão;
 7. Ressuspender o botão celular e adicionar 2,0 mL de solução de lise;
 8. Homogeneizar com pipeta Pasteur;
 9. Incubar a solução em gelo por 5 minutos na posição horizontal;
-

10. Após a incubação, acrescentar 8,0 mL de PBS 1x, homogeneizar e descartar o sobrenadante por inversão;
11. Centrifugar por 5 minutos a 1100 rpm com o breque 6;
12. Desprezar o sobrenadante por inversão;
13. Repetir mais uma vez as etapas de lavagem 11, 12 e 13;
14. Ressuspender as células com 160 μL do pool de plasma AB;
15. Com base na contagem celular, ajustar a concentração da suspensão de células em 5×10^3 neutrófilos/ μL .

✓ **Procedimentos do GAT**

1. Em placa de Terazaki, dispensar 2,0 μL da suspensão de granulócitos em cada poço;
2. Acrescentar 6,0 μL do plasma controle positivo nos dois primeiros poços e homogeneizar com a pipeta;
3. Acrescentar 6,0 μL do plasma controle negativo no terceiro e quarto poços e homogeneizar com a pipeta;
4. Acrescentar 6,0 μL do plasma teste nos poços seguintes e homogeneizar com a pipeta;
5. Acrescentar 6,0 μL de óleo mineral em todos os poços;
6. Incubar a placa em banho seco por 2 horas a 37°C;
7. Fazer a leitura em microscópio de fase invertida por dois observadores. Conforme ilustrado na figura 3, são consideradas positivas as amostras que apresentarem aglutinação em pelo menos 20% do total de células adquiridas;

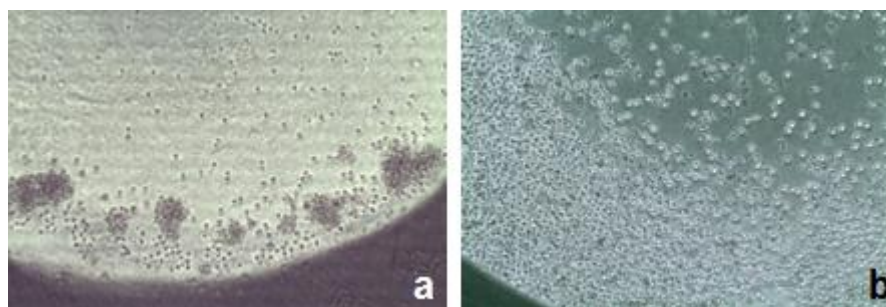


Figura 3. Resultado obtido no teste GAT. Figura 3a: resultado positivo, figura 3b: resultado negativo. Acervo próprio.

✓ **Teste de Imunofluorescência de Granulócitos – Flow-WIFT**

O teste de Flow-WIFT consiste na incubação dos granulócitos com soro teste, seguido de marcação com anticorpo secundário FITC - Goat F(ab')₂ Anti-Human IgG, fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EUA). A leitura do teste é realizada no Citômetro de Fluxo e os resultados são considerados positivos quando a porcentagem de células positivas atinge um valor duas vezes maior que o valor obtido no soro controle negativo.

Para a realização do painel de neutrófilos são necessárias células de três doadoras com genotipagem HNA prévia.

Soluções

PBS BSA 0,2%

1,0 mL de BSA 100% (*Bovine serum albumin*, Sigma Aldrich, EUA) em 499 mL de PBS 1x (descrito anteriormente).

Solução de Lise

A solução de lise comercial (FACS Lysing solution, BD) é concentrada 10x e precisa ser diluída para 1x em água ultrapura Milli-Q.

✓ **Imunofluorescência de Granulócitos**

Procedimentos:

1. Dispensar 100 µL de sangue total no tubo de citometria;
 2. Adicionar 2,0 mL de solução de lise e homogeneizar;
 3. Deixar hemolisar em temperatura ambiente por 10 minutos;
 4. Centrifugar imediatamente por 5 minutos a 1800 rpm;
 5. Inverter o sobrenadante por inversão;
 6. Ressuspender o botão celular e adicionar 3 mL de PBS BSA 0,2%;
 7. Centrifugar por 5 minutos a 1800 rpm;
 8. Inverter o sobrenadante por inversão;
 9. Repetir uma vez os passos de lavagem 6, 7 e 8;
 10. Adicionar 50 µL do plasma a ser testado e homogeneizar com a pipeta;
-

11. Incubar em banho-maria por 30 minutos a 37°C;
12. Repetir duas vezes os passos de lavagem 6, 7 e 8;
13. Preparar o anticorpo secundário, diluindo-o em PBS BSA 0,2% na concentração 1:200;
14. Adicionar 50 µL do anticorpo secundário e homogeneizar com a pipeta;
15. Incubar por 20 minutos no escuro em temperatura ambiente;
16. Repetir duas vezes os passos de lavagem 6, 7 e 8;
17. Ressuspender o botão celular com 500 µL de PBS BSA 0,2%;
1. Fazer a leitura no citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson).

LabScreen Multi (LSM)

A técnica do teste LSM identifica anticorpos contra antígenos HLA e HNA através de microesferas revestidas com antígenos purificados com HLA de classe I e II, antígenos HNA e reagentes pré-otimizados para detecção de anticorpos HLA/HNA. Os testes foram realizados seguindo as orientações do fabricante.

Após o término da técnica, realizou-se aquisição dos dados na plataforma LABScan™ 100 (Luminex, EUA) e a análise dos resultados foi realizada pelo “Software Fusion 4.1” (One Lambda, Inc, EUA).

Os valores de *cutoff* estabelecidos para análise dos dados foram de 5 para anticorpos dirigidos contra os sistema HNA-1, 3, 4 e 5, e valores superiores a 20 para anticorpos anti-HNA-2. Para os anticorpos anti-HLA foram considerados resultados positivos quando o *cutoff* foi superior a 10. A figura 4 apresenta a captura de imagem de um resultado positivo para anticorpo anti-HNA-1a.

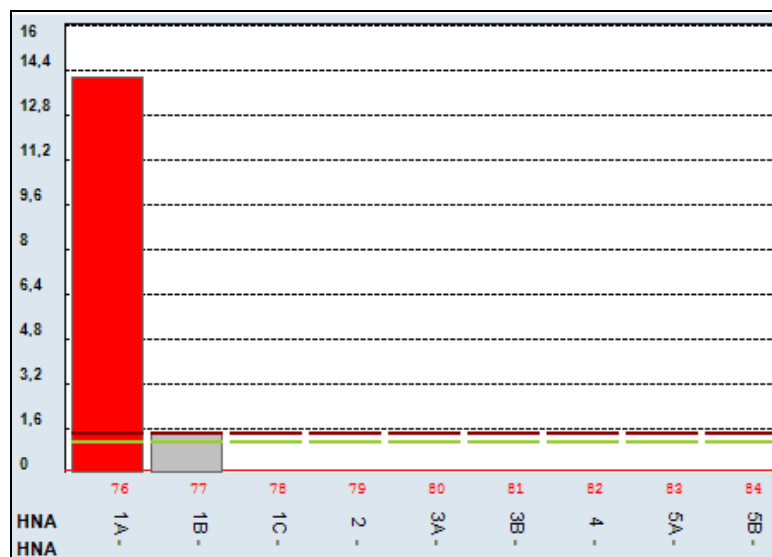


Figura 4: Foto obtida do programa HLA Fusion 4.1. A imagem apresenta uma amostra com resultado positivo para anticorpo anti-HNA-1a (NBG:14,1 e RAW:2365).

3.3 Técnicas moleculares

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de 200 µL de sangue total previamente aliquotados em tubos estéreis de 2,0 mL e armazenados em freezer com temperatura de -30°C. O procedimento foi realizado pelo kit comercial QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as orientações do fabricante.

Para a análise da integridade do DNA, o material foi quantificado pelo espectrofotômetro Nano Drop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)

Genotipagem dos antígenos de neutrófilos humanos

A genotipagem dos antígenos neutrofílicos foi realizada apenas nos indivíduos que apresentaram resultado positivo no teste LSM. Após a extração do DNA, o material foi congelado para posterior realização da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

Os oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* foram desenhados para abranger as regiões polimórficas dos genes *FCGR3B*, *SLC44A2*, *ITGAM* e *ITGAL* responsáveis por codificar os antígenos dos sistemas HNA-1, HNA-3, HNA-4 e HNA-5, respectivamente. Em paralelo, *primers* direcionados às sequências do

gene do Hormônio de Crescimento Humano (HGH) foram usados como controle interno. As sequências de *primers forward* e *reverse* utilizadas em todas as reações de PCR estão descritas no quadro 3.

Quadro 3. Sequência dos *primers* dos antígenos HNA.

Sistema	Antígeno	Sequência	Primers 5' – 3'
HGH	-	<i>Forward</i>	TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTTA
HGH	-	<i>Reverse</i>	CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC
HNA-1	1a	<i>Forward</i>	CTC AAT GGT ACA GGC G TG C TC
		<i>Reverse</i>	GGC CTG GCT TGA GAT GAG GT
	1b	<i>Forward</i>	CTC AAT GGT ACA GCG TGC TT
		<i>Reverse</i>	ACT GTC GTT GAC TGT GGC AG
	1c	<i>Forward</i>	AAG ATC TCC CAA AGG CTG TGG
		<i>Reverse</i>	ACT GTC GTT GAC TGT GGC AT
HNA-3	-	<i>Forward</i>	AGT GGC TGA GGT GCT TCG
		<i>Reverse</i>	GTG CGC CAA TAT CCT CAC TTG
HNA-4	-	<i>Forward</i>	CTC CCC ACA GGG TGG TG
		<i>Reverse</i>	
		Positivo	AGT GAC TCA CCC TGC ATG C
		Reverse Negativo	AGT GAC TCA CCC TGC ATG T
HNA-5	-	<i>Forward</i>	CTT CAG CAT CTC CAC CTT GC
		<i>Reverse</i>	TTC TGA TAT TCC CCA CCC TG

Reações de PCR

HNA-1a/b

A genotipagem dos antígenos do sistema 1, foi realizada por PCR–SSP (Amplificação sequência-específica).

A reação foi realizada com, 10 µL de Master Mix (HotStart Taq Master Mix - DNA polymerase, Qiagen), 1,0 µL de *primer-F*, 1,0 µL de *primer-R*, 0,3 µL de HGH-F, 0,3 de HGH-R e 2,0 µL do DNA previamente extraído e 5,4 µL de água ultra-pura (RNase – Free Water, Qiagen Quality), totalizando em 20 µL de volume final por amostra. Condições para a reação de PCR em termociclador (Veriti 96 Weel, Thermal Cycler): 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95°C; anelamento por 30 segundos a 54°C; extensão por 30 segundos a 72°C, seguido de um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C.

HNA-1c

A genotipagem do antígeno 1c foi realizada com 10 µL de Master Mix, 1,0 µL de *primer-F*, 1,0 µL de *primer-R* positivo, 1,0 µL de *primer-R* negativo, 0,3 µL de HGH-F e 0,3 µL de HGH-R, 2,0 µL do DNA previamente extraído e 5,4 µL de água ultra-pura totalizando em 20 µL de volume final por amostra. Condições para a reação de PCR em termociclador: 1 ciclo de desnaturação a 95 ° C por 15 minutos, 30 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95°C; anelamento por 30 segundos a 60°C; extensão por 30 segundos a 72°C seguido de um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C.

HNA-3

Para a genotipagem dos antígenos do sistema 3, foi realizado a genotipagem por PCR–RFLP (Polimorfismo no comprimento do Fragmento de Restrição).

Em um tubo de 200 µL foi adicionado, 10 µL de Master Mix, 1,0 µL de *primer-F*, 1,0 µL de *primer-R*, 2,0 µL do DNA previamente extraído e 6,0 µL de água ultra pura, totalizando em 20 µL de volume final por amostra. Condições para a reação de PCR em termociclador: 1 ciclo de desnaturação a 95 ° C por 15 minutos, 35 ciclos de desnaturação por 20 segundos a 94°C; anelamento por 20 segundos a 52°C; extensão por 20 segundos a 72°C seguido de um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Digestão do produto do PCR: realizada com, 1,0 µL de buffer 4 (NEBuffer 4, #B70045, New England-Biolabs), 0,2 µL de enzima Taqα-I (Taq α-I, #R01495, New England - Biolabs), 5,0 µL do produto do PCR e 3,8 µL de água ultra pura, totalizando 10 µL de volume final por amostra. A reação foi realizada em termociclador a 60°C durante 4 horas.

HNA-4

A genotipagem dos antígenos do sistema 4 foi realizada por PCR–SSP, nas seguintes condições:

10 µL de Master Mix, 1,0 µL de *primer -F*, 1,0 µL de *primer -R* positivo, 1,0 µL de *primer-R* negativo, 0,5 µL de HGH-F, 0,5 µL de HGH-R, 1,0 µL do DNA

previamente extraído e 6,0 µL de água ultra-pura, totalizando em 20 µL de volume final por amostra. Condições para a reação de PCR em termociclador: 1 ciclo de desnaturação a 95 ° C por 15 minutos, 30 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94°C; anelamento por 60 segundos a 58°C para reação com *primer-R* positivo e anelamento por 60 segundos a 56°C para reação com *primer-R* negativo; extensão por 60 segundos a 72°C seguido de um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C.

HNA-5

A genotipagem dos antígenos do sistema 5 foi realizada por PCR–RFLP, nas seguintes condições:

Em um tubo de 200 µL foi adicionado, 15 µL de Master Mix, 3,0 µL de *primer-F*, 3,0 µL de *primer-R*, 3,0 µL do DNA previamente extraído e 6,0 µL de água ultra-pura, totalizando em 30 µL de volume final por amostra. Condições para a reação de PCR em termociclador: 1 ciclo de desnaturação a 95 ° C por 15 minutos, 30 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94°C; anelamento por 30 segundos a 60°C; extensão por 60 segundos a 72°C seguido de um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Digestão do produto do PCR: foi realizada com, 3,0 µL de buffer 4 (10x), 0,3 µL de BSA (Purified BSA 100x, B90015, New England - Biolabs), 0,5 µL da enzima BSP 1286I (BSP 1286I, #R01205, New England-Biolabs), 15,0 µL do produto do PCR e 11,2 µL de água ultra pura, totalizando 30 µL de volume final por amostra. A reação foi realizada em termociclador a 37°C durante 4 horas.

Eletroforese em Gel de Agarose

Para todas as reações de PCR, a análise dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2%, com 2 µl do corante GelRed (*GelRed Nucleic Acid Stain, Biotium*) Foi adicionado Marcador de Peso Molecular (DNA Ladder, Invitrogen E-Gel) em todos os géis.

A leitura do resultado do gel foi realizada no fotodocumentador (Bio-Rad Gel DocTMEZ Images, Bio-Rad).

Fenotipagem HNA-2

A região do gene CD 177 que codifica o antígeno HNA-2 apresenta um pseudogene altamente homólogo, o que impossibilita o uso do DNA para genotipagem deste antígeno. Sendo assim, a fenotipagem foi realizada por citometria de fluxo com o anticorpo monoclonal MEM-166 conjugado com ficoeritrina (PE) (Abcam - Cambridge, UK).

A análise da expressão do HNA-2 na superfície dos neutrófilos foi realizada por citometria de fluxo. A porcentagem de neutrófilos positivos para o HNA-2 foi medida a partir de valores de *cutoff* gerados pelo controle negativo (Mouse IgG1 como anticorpo primário). Indivíduos foram considerados HNA-2-positivos quando mais que 5% dos neutrófilos reagiram com o anticorpo monoclonal.

Procedimentos:

2. Preparar dois tubos para cada amostra (teste e controle);
 - A) No tubo teste dispensar 100 µL de sangue total;
Adicionar 2,0 µL de anticorpo monoclonal MEM166/PE;
Homogeneizar com a pipeta;
 - B) No tubo controle, dispensar 100 µL de sangue total;
 3. Incubar por 15 minutos no escuro em temperatura ambiente;
 4. Após a incubação, homogeneizar em agitador;
 5. Adicionar 1,0 mL de solução de lise FACSlysing (BD);
 6. Incubar por 10 minutos no escuro em TA;
 7. Homogeneizar em agitador e centrifugar por 5 minutos a 1800 rpm;
 8. Descartar o sobrenadante por inversão;
 9. Homogeneizar em agitador e adicionar 4 mL de PBS 1X;
 10. Centrifugar por 5 minutos a 1800 rpm;
 11. Descartar o sobrenadante por inversão e secar o excesso com gaze;
 12. Ressuspender o botão celular com 500 µL de PBS 1X;
 13. Analisar em citômetro de fluxo.
-

3.4 Análise Estatística

A análise estatística foi feita pelo *software* “GraphPad”, que mostra diferença significativa em resultados associados pelo Teste Qui-quadrado, (sem correção e com correção de Yates). Nos casos em que os valores encontrados eram menores que “5”, a estatística foi feita pelo “teste Exato de Fisher”. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Todos os cálculos foram feitos com Intervalo de Confiança de 95% (Ic 95%).

Para amostras multivariadas (número de gestações), a análise estatística foi realizada pelo programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). O teste de Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum test) também foi utilizado.

A análise estatística considerou as associações feitas entre a presença de anticorpos eritrocitários, leucocitários, neutrofílicos, número de gestações, resultados obtidos nos testes GAT, Flow-WIFT e LSM

3.5 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado em 27/09/2015 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo como projeto de tese de mestrado (CEP 0846/2015). Todos os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram o TCLE aprovado pelo CEP (Anexos 1 e 2).

4 RESULTADOS

Foram analisadas amostras de sangue de 147 mulheres com aloimunização eritrocitária apenas pela gestação (Grupo 1) e no grupo controle (grupo 2) foram analisadas 563 doadoras de sangue, com história gestacional e sem aloimunização eritrocitária. De acordo com a tabela 1, os indivíduos foram distribuídos em dois grupos de acordo com o histórico gestacional: uníparas (uma gestação) e múltiparas (duas ou mais gestações).

Tabela 1. Distribuição dos grupos estudados conforme o número de gestações.

	Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	Total N (%)
Uníparas	65 (44,2)	70 (12,4)	135 (19,0)
Múltiparas	82 (55,8)	493 (87,6)	575 (81,0)
Total	147 (100)	563 (100)	710 (100)

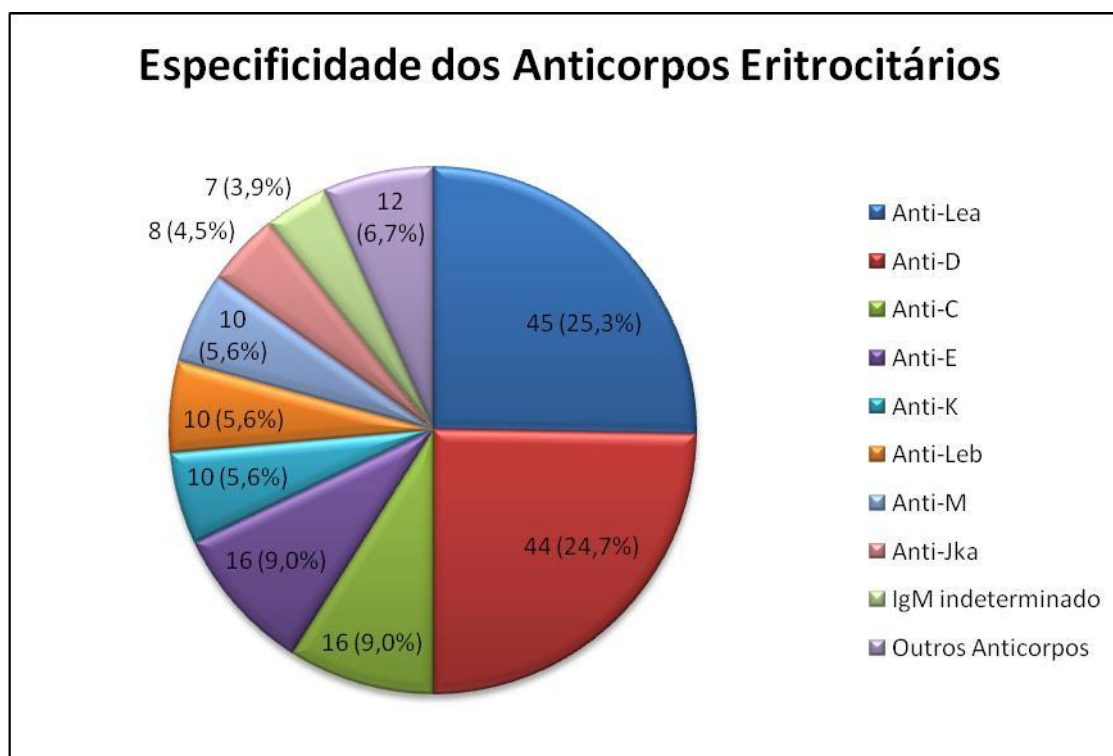
4.1 Aloimunização Eritrocitária

No grupo 1 (mulheres com aloimunização eritrocitária) (n=147) foram encontrados 178 anticorpos eritrocitários, sendo que 125 (70,2%) eram anticorpos únicos e 53 (28,8%) estavam associados à formação de outros anticorpos eritrocitários.

Considerando que alguns indivíduos formaram mais de um anticorpo eritrocitária, as mulheres foram subdivididas em dois grupos: unialoimunização (formação de apenas um anticorpo eritrocitário) e multialoimunização (formação de dois ou mais anticorpos eritrocitários). O anti-Le^a foi o anticorpo eritrocitário de maior frequência tanto na unialoimunização (31,2%) quanto no total de anticorpos formados (unialoimunização e multialoimuização) com 25,3% de casos. O anticorpo anti-D foi o segundo mais frequente na unialoimunização com 20,8% e 24,7% no total de anticorpos formados, entretanto foi o anticorpo mais frequente na multialoimunização (34,0%). A tabela 2 e figura 5 apresentam a distribuição de todos os anticorpos eritrocitários encontrados.

Tabela 2. Relação da especificidade dos anticorpos eritrocitários encontrados nos 147 indivíduos estudados (Grupo 1)

Anticorpos eritrocitários identificados (N=178)	Unialoimunização N (%)	Multialoimunização N (%)	Total de Anticorpos N (%)
Anti-Le ^a	39 (31,2)	6 (11,3)	45 (25,3)
Anti-D	26 (20,8)	18 (34,0)	44 (24,7)
Anti-C	1 (0,8)	15 (28,3)	16 (9,0)
Anti-E	14 (11,2)	2 (3,8)	16 (9,0)
Anti-K	7 (5,6)	3 (5,7)	10 (5,6)
Anti-Le ^b	7 (5,6)	3 (5,7)	10 (5,6)
Anti-M	9 (7,2)	1 (1,9)	10 (5,6)
Anti-Jk ^a	6 (4,8)	2 (3,8)	8 (4,5)
IgM indeterminado	7 (5,6)	0	7 (3,9)
IgG indeterminado	4 (3,2)	0	4 (2,2)
Anti-S	2 (1,6)	1 (1,9)	3 (1,7)
Anti-c	1 (0,8)	0	1 (0,6)
Anti-N	1 (0,8)	0	1 (0,6)
Anti-P1	1 (0,8)	0	1 (0,6)
Anti-e	0	1 (1,9)	1 (0,6)
Anti-Jk ^b	0	1 (1,9)	1 (0,6)
Total	125 (100)	53 (100)	178 (100)

**Figura 5.** Relação da especificidade dos anticorpos eritrocitários.

4.2 Aloimunização leucocitária nos indivíduos com anticorpos eritrocitários

Foram encontrados 25 tipos de associações nos 178 anticorpos eritrocitários. Destes, 14/25 (56%) incluíam indivíduos unialoimunizados e 11/25 (44%) incluíam indivíduos multialoimunizados (Tabela 3). O anticorpo anti-D esteve presente em 8/11 (72,7%) das associações de múltiplos anticorpos eritrocitários, ou seja, o anti-D foi o anticorpo de maior frequência quando associado à formação de outros anticorpos eritrocitários.

No grupo das mulheres com aloimunização eritrocitária (Grupo 1) foram encontrados 11/147 (7,5%) mulheres com anticorpos anti-HNA e 75/147 (51,0%) mulheres com anticorpos anti-HLA (Tabela 3).

Devido ao baixo número de anticorpos neutrofílicos encontrados, não foi possível fazer associações das especificidades dos anticorpos eritrocitários e anti-HNA. Entretanto a associação dos anticorpos eritrocitários com anticorpos anti-HLA foi realizada. Foi encontrada uma frequência elevada de anticorpos anti-HLA nos indivíduos que possuíam anticorpo anti-D tanto no grupo de indivíduos unialoimunizados por anticorpos anti-D (24%), quanto na contagem total da aloimunização com anti-D (unialoimunização e multialoimunização), com 38,7% de anti-HLA nesse último grupo (resultado não mostrado).

Dos 74 anticorpos anti-HLA encontrados nos indivíduos com aloimunização eritrocitária, 47,3% foram destinados à classe I, 45,9% classe I e II e apenas 6,8% de classe II.

Tabela 3. Especificidade dos anticorpos eritrocitários em relação aos anticorpos leucocitários.

Anticorpos Eritrocitários		Total N(%)	Anti-HNA N (%)	Anti-HLA N (%)	Classe anti-HLA		
					I	II	I e II
1	Anti-Le ^a	39 (26.5)	4 (36.4)	14 (18.7)	6	1	7
2	Anti-D	26 (17.7)	0	18 (24.0)	10	2	6
3	Anti-E	14 (9.5)	1 (9.1)	8 (10.7)	4	0	4
4	Anti-D + C	11 (7.5)	2 (18,1)	5 (6.7)	1	0	4
5	Anti-Le ^b	9 (4.8)	0	3 (4.0)	1	0	1
6	Anti-M	9 (6.1)	0	4 (5.3)	2	1	1
7	Anti-K	8 (4.8)	0	3 (4.0)	1	0	2
8	IgM indeterminada	7 (4.8)	1 (9.1)	1 (1.3)	1	0	0
9	Anti-Jk ^a	6 (4.1)	1 (9.1)	5 (6.7)	2	0	3
10	IgG indeterminada	4 (2.7)	0	3 (4.0)	2	0	1
11	Anti-Le ^a + Le ^b	2 (1.4)	0	1 (1.3)	0	0	1
12	Anti-S	2 (1.4)	0	1 (1.3)	1	0	0
13	Anti-D + C + K	1 (0.7)	1 (9.1)	1 (1.3)	1	0	0
14	Anti-D + M + Le ^a	1 (0.7)	1 (9.1)	1 (1.3)	1	0	0
15	Anti-c	1 (0.7)	0	1 (1.3)	0	0	1
16	Anti-C	1 (0.7)	0	1 (1.3)	1	0	0
17	Anti-N	1 (0.7)	0	1 (1.3)	0	1	0
18	Anti-D + Jk ^a	1 (0.7)	0	1 (1.3)	0	0	1
19	Anti-D + C + Jk ^a	1 (0.7)	0	1 (1.3)	1	0	0
20	Anti-D + E + Le ^a	1 (0.7)	0	1 (1.3)	0	0	1
21	Anti-D + C + E + K + Le ^a + Le ^b	1 (0.7)	0	1 (1.3)	0	0	1
22	Anti-P1	1 (0.7)	0	0	0	0	0
23	Anti-C + e	1 (0.7)	0	0	0	0	0
24	Anti-D + Le ^a	1 (0.7)	0	0	0	0	0
25	Anti-S + Jk ^b + K	1 (0.7)	0	0	0	0	0
	Total	147 (100)	11 (100)	75 (100)	35	5	34

4.3 Aloimunização Neutrofílica

Conforme apresentado na tabela 4, das 710 mulheres estudadas, foram encontrados 35 (4,9%) anticorpos anti-HNA, sendo 11/147 (7,5%) no grupo da aloimunização eritrocitária (grupo 1) e 24/563 (4,3%) no grupo controle (grupo 2).

A confirmação da especificidade do anticorpo anti-HNA foi realizada pela genotipagem do antígeno HNA correspondente. Além disso, foi realizado o teste Flow-WIFT em todos os casos positivos para anticorpos anti-HNA.

A relação dos resultados obtidos nos 35 indivíduos com anticorpos neutrofílicos pode ser encontrada no Anexo 5.

Tabela 4. Frequência de anticorpos neutrofílicos nos grupos 1, 2 e total, conforme o número de gestação.

	Número de Gestações	Número de Indivíduos	Anti-HNA N (%)
Grupo 1			
	Uníparas	65	2 (3,1)
	Múltiparas	82	9 (11,0)
	Total	147	11 (7,5)
Grupo 2			
	Uníparas	70	1 (1,4)
	Múltiparas	493	23 (4,7)
	Total	563	24 (4,3)
Total			
	Uníparas	135	3 (2,2)
	Múltiparas	575	32 (5,6)
	Total	710	35 (4,9)

Resultados obtidos no teste LSM

✓ Reações inespecíficas no teste LSM

O teste LSM foi realizado em todos os indivíduos estudados (n=710), totalizando 102 (14,4%) amostras liberadas pelo *software* como resultado positivo para anticorpos anti-HNA, entretanto apenas 35/102 (34,3%) foram confirmados por GAT, Flow-WIFT e pela genotipagem do antígeno neutrofílico correspondente. Esses 67/710 (9,4%) casos foram classificados como reação inespecífica, e para a realização da análise estatística do presente trabalho, eles foram considerados como negativos para anticorpos anti-HNA. O teste LSM foi realizado em duplicada em todos os casos que apresentaram reação inespecífica para anticorpos anti-HNA.

A tabela 5 apresenta a relação de todos os casos com reação inespecífica no teste LSM. Do total dos casos com esse tipo de reação (n=67), destacam-se os anticorpos contra o sistema HNA-5, com 33 (49,3%) casos, seguido dos anticorpos contra o sistema HNA-3, com 17 (25,4%) casos.

Tabela 5. Distribuição dos 67 indivíduos conforme a inespecificidade do anticorpo anti-HNA identificado no teste LSM..

Anticorpos anti-HNA	Quantidade N (%)	Genotipagem
Anti-1a	2 (0,3)	F γ R3B*01/FC γ R3B*01
Anti-1b	6 (0,8)	FC γ R3B*02/FC γ R3B*02
Anti-1c	1 (0,1)	FC γ R3B*02/FC γ R3B*03
Anti-2	3 (0,4)	CD177+
Anti-3a	8 (1,1)	HNA-3aa
Anti-3b	9 (1,3)	HNA-3bb
Anti-4a	5 (0,7)	HNA-4aa
Anti-5a	26 (3,7)	HNA-5aa
Anti-5b	7 (1,0)	HNA-5bb
Total	67 (9,4)	-

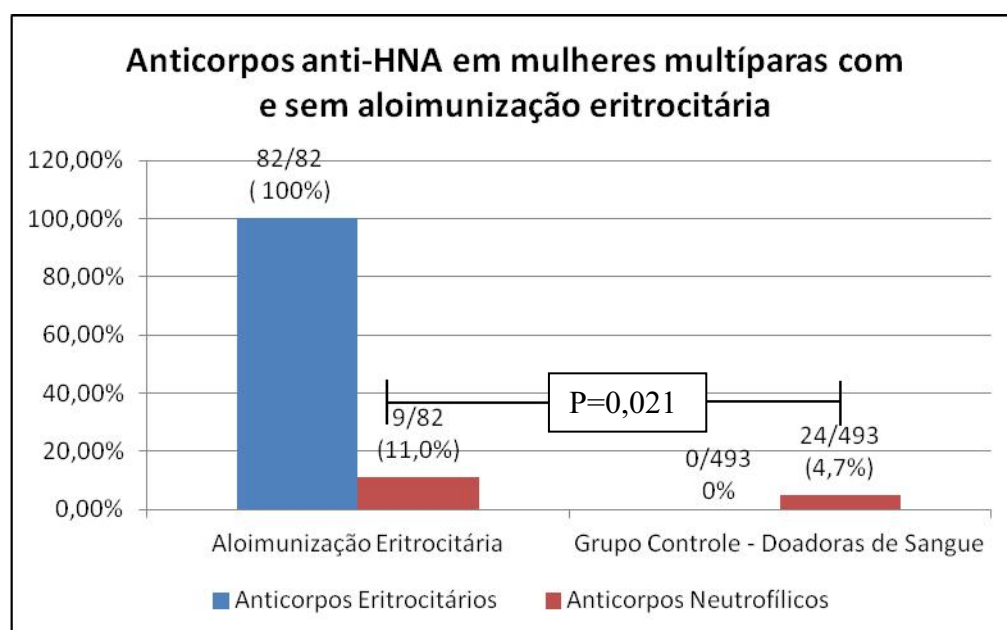
✓ **Anticorpos Neutrofílicos relacionados com a aloimunização eritrocitária**

A análise estatística conforme o número de gestações (uníparas ou múltiparas) para a variável presença de anticorpos anti-neutrofílicos está esquematizada na tabela 6. Não foi possível realizar análise estatística da especificidade dos anticorpos neutrofílicos nos grupos estudados devido à baixa quantidade de anticorpos neutrofílicos encontrados (n=35).

Conforme a tabela 6 e a figura 6, diferença estatística significativa foi observada apenas nas mulheres múltiparas em ambos os grupos. Mulheres múltiparas com anticorpos eritrocitários (Grupo 1) apresentaram maior frequência de aloimunização de anticorpos anti-HNA (11,0%) quando comparado com o grupo das mulheres sem aloimunização eritrocitária (Grupo 2) (4,7%) ($p=0,02$).

Tabela 6. Distribuição dos indivíduos nos grupos 1, 2 e total, por presença de anticorpos anti-HNA.

Número de gestações	Anticorpos Leucocitários	Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	P
Uníparas (N= 135)	HNA Positivo	2 (3,1)	1 (1,4)	0,108
	HNA Negativo	63 (96,9)	69 (98,6)	
	Total	65 (100)	70 (100)	
Múltiparas (N=575)	HNA Positivo	9 (11,0)	23 (4,7)	0,021
	HNA Negativo	73 (89,0)	470 (95,3)	
	Total	82 (100)	493 (100)	
Total (N= 710)	HNA Positivo	11 (7,5)	24 (4,3)	0,608
	HNA Negativo	136 (92,5)	539 (95,7)	
	Total	147 (100)	563 (100)	

**Figura 6.** Frequência de anticorpos anti-HNA em mulheres múltiparas

Dos 35 anticorpos neutrofílicos encontrados, 16 (45,7%) são do sistema HNA-1, 2 (5,7%) são do sistema HNA-2, 12 (34,3%) do sistema HNA-3 e 5 (14,3%) são do sistema HNA-5.

O fenótipo HNA-1 *null* é resultado de uma deleção do gene *FCGR3B*, que codifica o receptor $Fc\gamma RIIIb$ de neutrófilos e os epítomos do sistema HNA-1 (1a,

1b, 1c e 1d). Indivíduos HNA-1 *null* podem formar anticorpos anti-Fc γ RIIIb. No presente estudo foram identificados 2/710 (0,3%) casos com esse fenótipo raro e que formaram anticorpos anti-Fc γ RIIIb.

A figura 7 ilustra a especificidade dos anticorpos anti-HNA encontrados em ambos os grupos estudados.

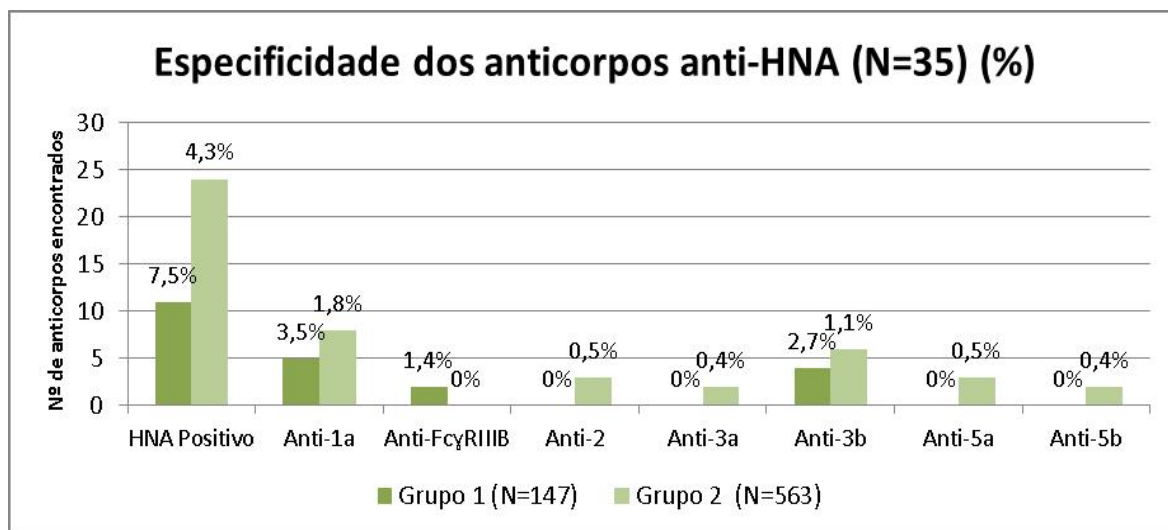


Figura 7. Especificidade de anticorpos anti-HNA nos grupos 1 e 2, segundo o teste LSM.

✓ Comparação entre os testes LSM e GAT

A tabela 7 apresenta o resultado do teste GAT conforme a especificidade do anticorpo anti-HNA identificado pelo teste LSM. A análise da comparação entre as duas técnicas mencionadas revelou que dos 35 anticorpos anti-HNA encontrados pelo teste LSM, apenas 23 (65,7%) seriam detectados pelo teste GAT.

O sistema HNA-1 foi o que mais apresentou resultado positivo no teste GAT, com 14/35 (40,0%) casos, enquanto o antígeno HNA-3b foi o que resultou em maior número de casos negativos no teste GAT, com 6/35 (17,2%) casos.

Tabela 7. Distribuição dos indivíduos com anticorpos neutrofílicos, segundo resultados dos testes GAT e LSM.

Especificidade anti-HNA	GAT		LSM
	Positivo N (%)	Negativo N (%)	Total (%)
Anti-1a	12 (34,3)	1 (2,9)	13 (37,1)
Anti-FcγRIIIb	2 (5,7)	0	2 (5,7)
Anti-2	0	3 (8,5)	3 (8,6)
Anti-3a	2 (5,7)	0	2 (5,7)
Anti-3b	4 (11,4)	6 (17,2)	10 (28,6)
Anti-5a	1 (2,9)	2 (5,7)	3 (8,6)
Anti-5b	2 (5,7)	0	2 (5,7)
Total	23 (65,7)	12 (34,3)	35 (100)

Considerando apenas a aloimunização neutrofílica e desconsiderando a presença de anticorpos anti-HLA, conforme a tabela 7 pode-se ainda observar a sensibilidade do teste GAT para cada tipo específico de anticorpo anti-HNA. O teste GAT mostrou ser uma técnica sensível para detectar anticorpos contra antígenos HNA-1a, FcγRIIIB, HNA-3a e HNA-5b, porém em nosso estudo a técnica se mostrou ser pouco sensível para detectar anticorpos anti-HNA-3b e HNA-5a e não detectou nenhum dos três casos com anticorpos anti-HNA-2.

✓ Comparação entre os testes LSM e Flow-WIFT

O teste Flow-WIFT foi realizado apenas nos casos com anticorpos anti-HNA detectados pela tecnologia LSM, ou seja, 35 casos foram testados pelo teste mencionado. A tabela 8 apresenta o resultado do teste Flow-WIFT conforme a especificidade do anticorpo anti-HNA identificado pelo teste LSM.

A análise da comparação entre as duas técnicas mencionadas revelou que dos 35 anticorpos anti-HNA encontrados pelo teste LSM, 27 (77,2%) seriam detectados pelo teste Flow-WIFT, enquanto 8 (22,9%) seriam determinados como negativos para a presença de anticorpos granulocitários.

Tabela 8. Distribuição dos indivíduos com anticorpos neutrofílicos, segundo testes Flow-WIFT e LSM.

Especificidade anti-HNA	Flow-WIFT		LSM
	Positivo N (%)	Negativo N (%)	Total (%)
Anti-1a	9 (25,7)	4 (11,4)	13 (37,1)
Anti-FcγRIIIb	2 (5,7)	0	2 (5,7)
Anti-2	3 (8,6)	0	3 (8,6)
Anti-3a	2 (5,7)	0	2 (5,7)
Anti-3b	6 (17,2)	4 (11,4)	10 (28,6)
Anti-5a	3 (8,6)	0	3 (8,6)
Anti-5b	2 (5,7)	0	2 (5,7)
Total	27 (77,2)	8 (22,8)	35 (100)

Considerando apenas a aloimunização neutrofílica e desconsiderando a presença de anticorpos anti-HLA, conforme apresentado na tabela 8, pode-se ainda observar a sensibilidade do teste Flow-WIFT para cada tipo específico de anticorpo anti-HNA formado. O teste Flow-WIFT mostrou ser uma técnica sensível para detectar anticorpos anti-FcγRIIIB, HNA-2, HNA-3a, HNA-5a e -5b, porém em nosso estudo a técnica não conseguiu detectar 4/13 (30,8%) dos anticorpos anti-HNA-1a formados e 4/10 (40,0%) dos anticorpos anti-HNA-3b.

✓ Comparação entre os testes GAT e Flow-WIFT

O teste Flow-WIFT revelou ser uma técnica mais sensível para detectar anticorpos anti-HNA quando comparada com o teste GAT, 65,7% dos anticorpos seriam detectados apenas pelo GAT, enquanto 77,2% seriam detectados pelo teste Flow-WIFT.

Tabela 9. Relação dos resultados obtidos nos testes GAT e Flow-WIFT nos casos com anticorpos anti-HNA identificados pelo teste LSM.

Teste	Resultado		Total (%)
	Positivo N (%)	Negativo N (%)	
GAT	23 (65,7)	12 (34,3)	35 (100)
Flow-WIFT	27 (77,2)	8 (22,9)	

4.4 Aloimunização Leucocitária

Conforme apresentado na tabela 10, foram encontrados 312/710 (43,9%) anticorpos anti-HLA, sendo 74/147 (50,3%) anticorpos no grupo 1 e 238/563 (42,3%) no grupo 2.

Tabela 10. Frequência de anticorpos leucocitários nos grupos estudados conforme o número de gestação.

	Número de Gestações	Número de Indivíduos	Anti-HLA (%)
Grupo 1			
	Uníparas	65	23 (35,4)
	Múltiparas	82	51 (62,2)
	Total	147	74 (50,3)
Grupo 2			
	Uníparas	70	14 (20,0)
	Múltiparas	493	224 (45,4)
	Total	563	238 (42,3)
Total			
	Uníparas	135	37 (27,4)
	Múltiparas	575	275 (47,8)
	Total	710	312 (43,9)

A pesquisa e identificação das classes dos anticorpos leucocitários encontrados foram realizadas pelo teste LSM. Os grupos foram separados conforme o histórico gestacional (uníparas e múltiparas) e foram analisadas as variáveis: presença ou ausência de anticorpos anti-HLA, anti-HLA classe I, anti-HLA classe II, anti-HLA classe I e II. As análises estatísticas destas variáveis encontram-se nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Resultados obtidos no teste LSM, distribuídos pelo número de gestações em ambos os grupos estudados.

Número de gestações	Anticorpos Leucocitários	Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	P
Uníparas (N=135)	HLA Positivo	23 (35,4)	14 (20,0)	0,045
	HLA Negativo	42 (64,6)	56 (80,0)	
	Total	65 (100)	70 (100)	
Multíparas (N= 575)	HLA Positivo	51 (62,2)	224 (45,4)	0,004
	HLA Negativo	31 (37,8)	269 (54,6)	
	Total	82 (100)	493 (100)	
Total (N=710)	HLA Positivo	74 (50,3)	238 (42,3)	0,079
	HLA Negativo	73 (49,7)	325 (57,7)	
	Total	147 (100)	563 (100)	

A aloimunização leucocitária foi relacionada com mulheres uníparas e multíparas nos dois grupos estudados. Mulheres multíparas do grupo 1 têm uma maior frequência de aloimunização tanto de anticorpos anti-HNA (11,0%, $p=0,02$) quanto de anticorpos anti-HLA (62,2%, $p=0,004$) quando comparado com o grupo 2. Também foi observado do grupo 1 ($p=0,045$). Em ambos os grupos estudados a taxa de aloimunização leucocitária cresce conforme o número de gestações aumenta, ou seja, mulheres com duas ou mais gestações possuem mais chances de formar anticorpos leucocitários quando comparadas com mulheres que possuem apenas uma gestação.

Embora não tenhamos obtido um valor significativo com os dados não estratificados por número de gestações, encontramos uma maior frequência de anticorpos anti-HLA no grupo 1 (50,3%) quando comparado com o grupo 2 (42,3%).

A tabela 12 apresenta as classes dos anticorpos anti-HLA detectados, conforme o número de gestações em ambos os grupos estudados.

Tabela 12. Resultados obtidos no teste LSM conforme a classe do anticorpo anti-HLA, distribuídos pelo número de gestações em ambos os grupos estudados.

Número de gestações	Anticorpos Leucocitários	Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	P
Uníparas (N=37)				
	HLA Classe I	14 (60,9)	7 (50,0)	0,517
	HLA Classe II	3 (13,0)	4 (28,6)	0,389
	HLA Classe I e II	6 (26,1)	3 (21,4)	1,000
	Total	23 (100)	14 (100)	
Múltiparas (N=275)				
	HLA Classe I	21 (41,2)	100 (44,6)	0,652
	HLA Classe II	2 (3,9)	46 (20,5)	0,004
	HLA Classe I e II	28 (54,9)	78 (34,8)	0,007
	Total	51 (100)	224 (100)	
Total (N=312)				
	HLA Classe I	35 (47,3)	107 (45,0)	0,724
	HLA Classe II	5 (6,8)	50 (21,0)	0,005
	HLA Classe I e II	34 (45,9)	81 (34,0)	0,063
	Total	74 (100)	238 (100)	

O anticorpo anti-HLA classe I não teve relação significativa com nenhuma das análises realizadas, entretanto diferenças significativas foram encontradas na presença de anticorpos anti-HLA classe II no grupo 2, tanto em mulheres múltiparas ($p=0,004$) quanto no total de indivíduos estudados ($p=0,005$), ou seja, mulheres sem aloimunização eritrocitária mostraram uma maior tendência em formar anticorpos anti-HLA classe II.

Resultado significativo também foi encontrado quando comparamos a presença de anticorpos anti-HLA classe I e II no grupo 1 e 2 das mulheres múltiparas, onde o grupo 1 apresentou maior frequência de anticorpos anti-HLA classe I e II quando comparado com o grupo 2 ($p=0,007$).

A figura 8 apresenta a porcentagem de indivíduos com anticorpos anti-HLA conforme a sua classe, distribuídos em ambos os grupos de estudo.

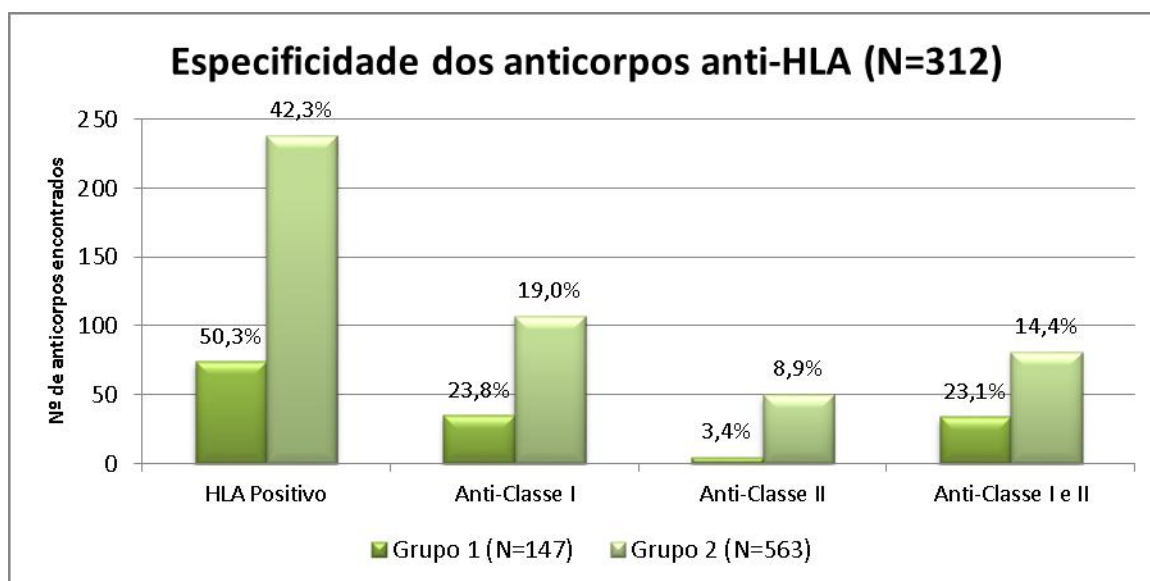


Figura 8. Classes dos anticorpos anti-HLA nos grupos 1, 2 e total.

✓ Resultados obtidos no teste GAT

O teste GAT foi realizado em todos os 710 indivíduos inseridos no estudo. A tabela 13 apresenta a distribuição dos grupos conforme o número de gestações (uníparas e múltiparas) e foi analisado o resultado obtido no teste GAT.

Tabela 13. Distribuição dos indivíduos nos grupos 1 e 2, segundo o resultado do teste GAT.

Número de gestações	Teste GAT	Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	P
Uníparas (N=135)				
	GAT Positivo	26 (40,0)	12 (17,1)	0,001
	GAT Negativo	39 (60,0)	58 (82,9)	
	Total	65 (100)	70 (100)	
Múltiparas (N=575)				
	GAT Positivo	43 (52,4)	84 (17,0)	<0,0001
	GAT Negativo	39 (47,6)	409 (83,0)	
	Total	82 (100)	493 (100)	
Total (N=710)				
	GAT Positivo	69 (46,9)	96 (17,1)	<0,0001
	GAT Negativo	78 (53,1)	467 (82,9)	
	Total	147 (100)	563 (100)	

Resultados estatisticamente significantes foram encontrados em todas as análises realizadas com o resultado do teste GAT. Indivíduos com aloimunização eritrocitária (grupo 1) possuem maior positividade no teste mencionado quando comparado com o indivíduos sem aloimunização eritrocitária (grupo 2).

A figura 9 apresenta o resultado obtido no teste GAT, no total 165/710 (23,2%) casos foram positivos para o teste e 545/710 (76,8%) foram negativos.

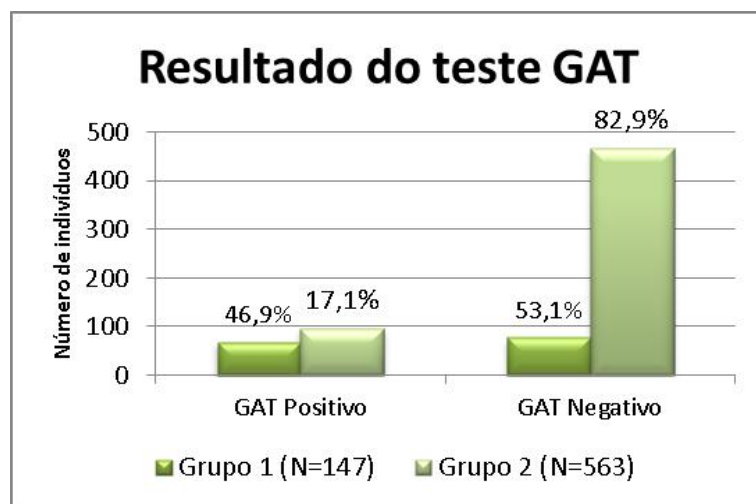


Figura 9. Porcentagem dos resultados obtidos no teste GAT nos grupos 1, 2 e total.

✓ Comparação entre os resultados obtidos nos testes LSM e GAT

O teste LSM detectou 312/710 (44,0%) indivíduos com anticorpos anti-HLA comparado com 166/710 (23,4%) casos positivos pelo teste GAT e 114/710 (16,1%) casos foram positivos nas duas técnicas concomitantemente. 52 casos foram positivos apenas no teste GAT e 198 casos foram positivos apenas no teste LSM. (Tabela 14).

Tabela 14. Comparação entre as técnicas LSM e GAT por presença ou ausência de anticorpos anti-HLA.

LSM – anti-HLA N (%)		GAT N=710	
		Positivo N (%)	Negativo N (%)
Positivo	312 (43,9)	114 (68,7)	198 (36,4)
Negativo	398 (56,1)	52 (31,3)	346 (63,6)
Total	710 (100)	166 (100)	544 (100)

Com o objetivo de saber se a classe do anticorpo HLA influencia no resultado do teste GAT, foram feitas as comparações das técnicas realizadas segundo a classe dos anticorpos anti-HLA e o resultado obtido no teste GAT. As análises dessas comparações podem ser encontradas na tabela 15.

Tabela 15. Distribuição dos indivíduos nos grupos 1 e 2, conforme a classe dos anticorpos anti-HLA segundo testes GAT e LSM.

LSM – Classe do anticorpo anti-HLA N (%)		GAT (N=312)		P
		Positivo N (%)	Negativo N (%)	
HLA Classe I	142 (45,5)	52 (45,6)	90 (45,4)	NS
HLA Classe II	55 (17,6)	6 (5,3)	49 (24,7)	<0,0001
HLA Classe I e II	115 (36,9)	56 (49,1)	59 (29,8)	0,005
Total	312 (100)	114 (100)	198 (100)	

Resultado significativo foi observado nos indivíduos com teste GAT negativo com anticorpos anti-HLA classe II ($p < 0,0001$), entretanto anticorpos anti-HLA classe II estão envolvidos em 6 (5,3%) casos com resultado positivo no teste GAT. Esse resultado apenas se justifica em 1 caso que possui concomitantemente anticorpo anti-HNA-1a, os outros 5 casos foram considerados como reação inespecífica no teste GAT.

4.5 Aloimunização eritrocitária relacionada com anticorpos anti-HNA e HLA

As análises dos resultados obtidos no teste LSM, segundo a presença ou ausência de anticorpos eritrocitários, podem ser encontradas na tabela 16. Os resultados nos mostram que mulheres multíparas com anticorpos eritrocitários (grupo 1) possuem maior frequência de anticorpos anti-HNA e HLA ($p = 0,023$) simultaneamente quando comparado com mulheres multíparas sem anticorpos eritrocitários (grupo 2). Valor significativo também foi encontrado ao fazer a mesma análise no total de mulheres testadas ($p = 0,019$).

Tabela 16. Distribuição dos indivíduos nos grupos 1, 2 e total, por presença de anticorpos anti-HNA e anti-HLA, segundo o teste LSM.

	Resultados do teste LSM	Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	P
Uníparas (N=135)				
	HNA e HLA positivos	2 (3,1)	0	0,230
	HNA e HLA negativos	42 (64,6)	55 (78,6)	0,071
	HLA positivo	21 (32,3)	14 (20,0)	0,103
	HNA positivo	0	1 (1,4)	1
	Total	65 (100)	70 (100)	
Multíparas (N= 575)				
	HNA e HLA positivos	6 (7,3)	11 (2,2)	0,023
	HNA e HLA negativos	28 (34,1)	257 (52,1)	0,002
	HLA positivo	45 (54,9)	213 (43,3)	0,049
	HNA positivo	3 (3,7)	12 (2,4)	0,519
	Total	82 (100)	493 (100)	
Total (N=710)				
	HNA e HLA positivos	8 (5,4)	11 (2,0)	0,019
	HNA e HLA negativos	70 (47,6)	312 (55,4)	0,091
	HLA positivo	66 (44,9)	227 (40,3)	0,315
	HNA positivo	3 (2,0)	13 (2,3)	0,845
	Total	147 (100)	563 (100)	

Ainda com o objetivo de relacionar a formação de anticorpos anti-HLA e HNA, a tabela 17 apresenta a relação de todos os indivíduos que possuem anticorpos anti-HNA (35) e a classe do anticorpo anti-HLA a ele associado.

Tabela 17. Comparação dos indivíduos com anticorpos anti-HNA e HLA, segundo teste LSM.

Especificidade HNA	Anti-HNA N (%)	HLA negativo	Anti-HLA Classe I	Anti-HLA Classe II	Anti-HLA Classe I e II
Anti-HNA-1a	13 (37,1)	8	2	1	2
Anti-HNA-FCγRIIIb	2 (5,7)	0	1	0	1
Anti-HNA-2	3 (8,6)	2	1	0	0
Anti-HNA-3a	2 (5,7)	1	1	0	0
Anti-HNA-3b	10 (28,6)	6	1	0	3
Anti-HNA-5a	3 (8,6)	2	1	0	0
Anti-HNA-5b	2 (5,7)	0	1	0	1
Total	35 (100)	17	10	1	7

Dos 35 casos com anticorpos anti-HNA, 18 (51,4%) possuem anticorpos anti-HLA concomitantemente. O anticorpo anti-HLA classe I foi o mais frequente encontrado, presente em 10/18 (55,6%) indivíduos, seguido do anti-HLA classe I e II com 7/18 (38,9%) casos e por último o anti-HLA classe II com apenas 1/18 (5,5%) caso encontrando com associação com anticorpo anti-HNA.

Conforme já mencionado, 312 indivíduos apresentaram anticorpos anti-HLA, desses 18/312 (5,8%) possuem anticorpos anti-HNA concomitantemente.

4.6 Persistência de Anticorpos Leucocitários

A persistência dos anticorpos anti-HNA na circulação sanguínea foi avaliada levando em consideração o questionário aplicado a cada participante do estudo (anexos 3 e 4) em que foram levantadas questões referentes ao histórico gestacional. Foram analisadas amostras de sangue de 24 mulheres doadoras de sangue e com histórico gestacional, sem transfusão sanguínea e com anticorpos anti-HNA (grupo 2). As 11 mulheres com anticorpos eritrocitários e anti-HNA não foram incluídas nessa análise (grupo 1), pois as mesmas estavam gestantes no momento da coleta da amostra. Foram consideradas gestações a termo ou não, entretanto a última gestação relatada deveria ter atingido no mínimo 25 semanas. A tabela 18 apresenta as características dos indivíduos estudados, conforme a presença e a classe dos anticorpos leucocitários e o número de gestações.

Das 24 amostras estudadas, 11 (45,8%) também apresentavam anticorpos anti-HLA. Quanto ao histórico gestacional, apenas uma mulher relatou ter tido única gestação (4,2%), enquanto 50% das mulheres relataram ter duas gestações e 45,8% possuíam três ou mais gestações. A idade média das mulheres estudadas foi de 49,8 anos, sendo que a idade média no momento da gestação foi de 19 anos.

Tabela 18. Relação das 24 mulheres com anticorpos anti-HNA, segundo a classe dos anticorpos HLA.

LSM	N (%)	Anticorpos anti-HLA		Anti-HLA (N=11)		
		Positivo (%)	Negativo (%)	I (%)	II (%)	I e II (%)
Anti-1a	8 (33,3)	3 (12,5)	5 (20,8)	1	1	1
Anti-2	3 (12,5)	1 (4,2)	2 (8,3)	1	0	0
Anti-3a	2 (8,3)	2 (8,3)	0,0	2	0	0
Anti-3b	6 (25,0)	2 (8,3)	4 (16,7)	2	0	0
Anti-5a	3 (12,5)	1 (4,2)	2 (8,3)	1	0	0
Anti-5b	2 (8,3)	2 (8,3)	0,0	1	0	1
Total	24 (100)	11 (45,8)	13 (54,2)	8 (72,7)	1 (9,1)	2 (18,2)

Das 24 mulheres analisadas, 11 (45,8%) possuíam anticorpos anti-HLA, destas, 8 (72,7%) possuíam especificidade para anticorpos anti-HLA classe I.

Conforme dito anteriormente, a persistência dos anticorpos neutrofílicos foi medida com base no relato das mulheres quanto a sua última gestação, ou seja, a sua última exposição alogênica. A persistência dos anticorpos foi calculada em anos e foi analisado o período mínimo e máximo (anos) em que os anticorpos continuaram detectáveis na circulação sanguínea.

Tabela 19. Relação da persistência (anos) dos anticorpos neutrofílicos conforme o número de gestações.

LSM	N (%)	Persistência (anos)		Número de Gestações		
		Mínimo	Máximo	1 (%)	2 (%)	≥ 3 (%)
Anti-1a	8 (33,3)	1	29	1	4	3
Anti-2	3 (12,5)	29	43	0	0	3
Anti-3a	2 (8,3)	8	15	0	1	1
Anti-3b	6 (25,0)	1	35	0	5	1
Anti-5a	3 (12,5)	6	25	0	2	1
Anti-5b	2 (8,3)	14	30	0	0	2
Total	24 (100)	1	43	1 (4,2)	12 (50,0)	11 (45,8)

A tabela 19 demonstra que o anti-HNA-2 foi o anticorpo que possui maior tempo (anos) na circulação sanguínea, foi encontrado um caso com persistência máxima de 43 anos, seguido do anticorpo anti-3b com persistência máxima de 35 anos na circulação. 23 (95,8%) das mulheres possuíam duas ou mais gestações

4.7 Histórico Gestacional

No grupo 1 (n=147) foram relatadas 326 gestações, sendo a média de 2,2 gestações, com variação de 1 a 9 gestações por indivíduo. Das 326 gestações, 46 (14,1%) foram relatadas como abortos.

No grupo 2 (n=563) foram relatadas 1.562 gestações, sendo a média de 2,2 gestações, com variação de 1 a 11 gestações por indivíduo. Das 1.562 gestações, 228 (14,6%) foram relatadas como abortos (Figura 10).

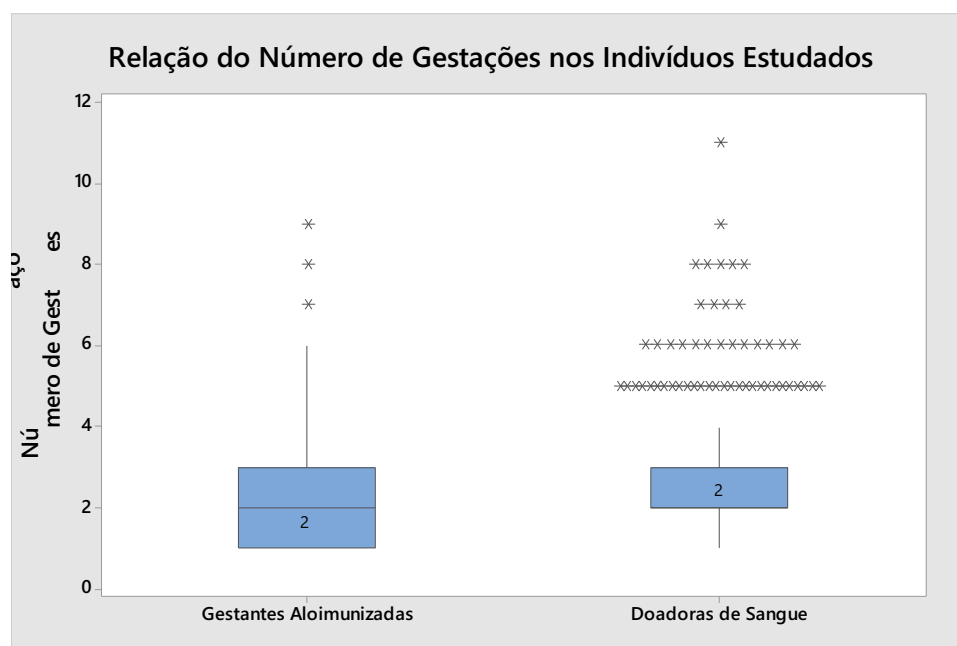


Figura 10. Distribuição dos indivíduos estudados conforme o número de gestações.

O estudo da associação do histórico gestacional com a presença de anticorpos HNA, HLA e a classe dos anticorpos anti-HLA pode ser encontrado na tabela 20. A análise estatística dessas variáveis foi realizada pelo programa SPSS.

A análise estratificada pelo número de gestações revelou que as mulheres do grupo 1 com uma única gestação apresentaram maior frequência de anticorpos anti-HLA, quando comparadas com o grupo 2 (31,1% vs. 5,9% respectivamente, $p < 0,0001$). Embora não tenhamos encontrado valor significativo, observamos que o grupo das mulheres uníparas do grupo 1 possuem maior frequência de anticorpos anti-HNA (18,1 vs. 4,1%), HNA e HLA

concomitantemente (25,0% *versus* 8,3%) quando comparado com o grupo 2 (tabela 20).

Tabela 20. Distribuição dos grupos estudados de acordo com a presença de anticorpos leucocitários, segundo o número de gestações.

	Número de Gestações	Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	P
HNA Positivo (N=35)				
	Uníparas	2 (18,1)	1 (4,1)	0,226
	Múltiparas	9 (81,9)	23 (95,9)	
	Total	11 (100)	24 (100)	
HNA e HLA Positivo (N=20)				
	Uníparas	2 (25,0)	1 (8,3)	0,536
	Múltiparas	6 (75,0)	11 (91,7)	
	Total	8 (100)	12 (100)	
HLA Positivo (N=312)				
	Uníparas	23 (31,1)	14 (5,9)	<0,0001
	Múltiparas	51 (68,9)	224 (94,1)	
	Total	74 (100)	238 (100)	
HLA Classe I (N=142)				
	Uníparas	14 (40,0)	7 (6,5)	<0,0001
	Múltiparas	21 (60,0)	100 (93,5)	
	Total	35 (100)	107 (100)	
HLA Classe II (N=55)				
	Uníparas	3 (60,0)	4 (8,0)	0,011
	Múltiparas	2 (40,0)	46 (92,0)	
	Total	5 (100)	50 (100)	
HLA Classe I e II (N=115)				
	Uníparas	6 (17,6)	3 (3,7)	0,011
	Múltiparas	28 (82,4)	78 (96,3)	
	Total	34 (100)	81 (100)	

A análise dos resultados independente da presença ou ausência de anticorpos eritrocitários pode ser encontrada nas tabelas 21, 22 e 23, onde os grupos 1 e 2 foram analisados conforme o número de gestações, sem a necessidade de relacionar com a aloimunização eritrocitária. Não foi encontrada diferença estatística significativa na análise da presença de anticorpos anti-HNA conforme o número de gestações, entretanto pode-se observar que as mulheres de ambos os grupos com mais de uma gestação possuem maior frequência de

anticorpos anti-HNA quando comparadas com mulheres que possuem uma única gestação (tabela 21).

Tabela 21. Distribuição dos grupos estudados de acordo com a presença ou ausência de anticorpos anti-HNA, segundo o número de gestações.

	Anticorpos Leucocitários	Mulheres Uníparas (%)	Mulheres Múltiparas (%)	P
Grupo 1 (N=147)				
	HNA Positivo	2 (3,1)	9 (11,0)	0,112
	HNA Negativo	63 (96,9)	73 (89,0)	
	Total	65 (100)	82 (100)	
Grupo 2 (N=563)				
	HNA Positivo	1 (1,4)	23 (4,7)	0,341
	HNA Negativo	69 (98,6)	470 (95,3)	
	Total	70 (100)	493 (100)	
Total (N=710)				
	HNA Positivo	3 (2,2)	32 (5,6)	0,124
	HNA Negativo	132 (97,8)	543 (94,4)	
	Total	135 (100)	575 (100)	

Resultados significantes foram encontrados na tabela 22, onde observamos que mulheres múltiparas possuem maior frequência de anticorpos anti-HLA quando comparadas com mulheres uníparas do mesmo grupo.

Tabela 22. Distribuição dos grupos estudados de acordo com a presença ou ausência de anticorpos anti-HLA, segundo o número de gestações.

	Anticorpos Leucocitários	Mulheres Uníparas N (%)	Mulheres Múltiparas N (%)	P
Grupo 1 (N=147)				
	HLA Positivo	23 (35,4)	51 (62,2)	0,001
	HLA Negativo	42 (64,6)	31 (37,8)	
	Total	65 (100)	82 (100)	
Grupo 2 (N=563)				
	HLA Positivo	14 (20,0)	224 (45,4)	<0,0001
	HLA Negativo	56 (80,0)	269 (54,6)	
	Total	70 (100)	493 (100)	
Total (N= 710)				
	HLA Positivo	37 (27,4)	275 (47,8)	0,645
	HLA Negativo	98 (72,6)	300 (52,2)	
	Total	135 (100)	575 (100)	

Por fim, a análise das classes dos anticorpos anti-HLA revelou apenas que mulheres múltiparas tendem a formar mais anticorpos anti-HLA classe I e II quando comparadas com mulheres uníparas ($p=0,021$).

Tabela 23. Distribuição dos grupos estudados de acordo com a classe dos anticorpos anti-HLA, segundo o número de gestações.

	Anticorpos Leucocitários	Mulheres Uníparas N (%)	Mulheres Múltiparas N (%)	P
Grupo 1 (N=74)				
	HLA Classe I	14 (60,9)	21 (41,2)	0,116
	HLA Classe II	3 (13,0)	2 (3,9)	0,170
	HLA Classe I e II	6 (26,1)	28 (54,9)	0,021
	Total	23 (100)	51 (100)	
Grupo 2 (N= 238)				
	HLA Classe I	7 (50,0)	100 (44,6)	0,517
	HLA Classe II	4 (28,6)	46 (20,5)	0,389
	HLA Classe I e II	3 (21,4)	78 (34,8)	1,000
	Total	14 (100)	224 (100)	
Total (N= 312)				
	HLA Classe I	21 (56,8)	121 (44,0)	0,143
	HLA Classe II	7 (18,9)	48 (17,5)	0,826
	HLA Classe I e II	9 (24,3)	106 (38,5)	0,092
	Total	37 (100)	275 (100)	

5 DISCUSSÃO

A aloimunização eritrocitária é uma causa bem conhecida da doença DHFRN, que resulta da passagem de anticorpos IgG materno através da placenta, direcionados contra antígenos eritrocitários fetais (sistemas mais comuns: Rhesus, ABO e Kell), causando hemólise ⁽¹⁰⁴⁾. A aloimunização materna pode resultar de transfusões sanguíneas ou de gestações anteriores por um feto que transporta antígenos herdados do pai e que são estranhos para a mãe.

A frequência geral de aloimunização eritrocitária materna varia entre 0,04% a 2,7% ⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾. A variabilidade nas taxas de aloimunização está relacionada com diferenças geográficas, expressão antigênica do grupo sanguíneo, práticas nacionais de transfusão sanguínea, taxas de nascimentos e abortos, bem como a sensibilidade dos métodos laboratoriais utilizados na triagem pré-natal de anticorpos eritrocitários. No presente trabalho foram encontrados 178 anticorpos eritrocitários distribuídos em 147 mulheres com aloimunização materna. O anti-Le^a foi o anticorpo mais frequente, encontrado em 45/178 (25,3%) indivíduos, seguido do anti-D com 44/178 (24,7%) casos. As frequências relativas de anticorpos em nosso estudo são diferentes de alguns estudos publicados anteriormente. Um estudo do Canadá descreveu que o anti-E foi o anticorpo mais comumente encontrado no pré-natal, representando 48% dos casos ⁽⁶²⁾. Nordvall e colaboradores (2009) estudaram 455 casos ao longo de sete anos na Dinamarca e descobriu que o anti-D constituía quase metade da população estudada ⁽²⁶⁾. Em um estudo realizado na Islândia com 87.437 nascimentos, 1,0% das mães formaram anticorpos eritrocitários, sendo o anti-M (19,4%) o mais frequente, seguido do anti-E (19,0%) e anti-D (12,5%) ⁽¹⁰⁹⁾. Finalmente, um estudo recente também identificou uma elevada taxa de aloimunização anti-D, representando cerca de 20% de todos os aloanticorpos de glóbulos vermelhos identificados ⁽¹¹⁰⁾.

O presente trabalho demonstra que, apesar do uso profilático da imunoglobulina Rhesus, anti-D ainda é um anticorpo comum identificado em mulheres grávidas que se apresentam em centros hospitalares. Uma possível explicação pode estar relacionada a gestante não realizar o pré-natal ou até mesmo a falha profilática com a imunoglobulina anti-Rh (D) ⁽¹¹¹⁾. Todas as mulheres grávidas com tipo sanguíneo RhD negativo devem receber a

imunoprofilaxia, porém, é provável que a aloimunização materna tenha ocorrido antes das gestantes se dirigirem ao hospital para o parto. Todas as mulheres estudadas foram atendidas em hospitais públicos, sendo a grande maioria com baixo poder aquisitivo. Muitas vezes relatavam dificuldade para se descolarem até o hospital, não faziam o acompanhamento pré-natal e consequentemente não realizaram a profilaxia com a imunoglobulina. Além disso, a dose da imunoglobulina anti-D dada às mulheres D-negativas na maioria dos hospitais não é calculada com base na hemorragia feto-materna, portanto, pode ser inadequada⁽¹¹¹⁾ e uma das razões da sensibilização em algumas mulheres que desenvolvem anticorpo anti-D apesar da profilaxia. As variações das frequências dos aloanticorpos encontrados em mulheres gestantes também poderiam ser explicadas em parte, por variações étnicas na prevalência de antígenos e por diferenças regionais em práticas de transfusão e protocolos de triagem pré-natal⁽¹¹²⁾.

Na coorte de indivíduos aloimunizados, a incidência de anticorpos não anti-D em nosso estudo foi de 75,3%. Em um estudo paquistanês recente, a incidência de anticorpos não anti-D foi relatada como 88,9%⁽¹¹⁰⁾, enquanto na Turquia foi de 18,8%⁽¹¹²⁾. Quando comparamos esses resultados com nossos próprios dados, concluímos que a variabilidade na formação de anticorpos pode variar entre os países. A frequência relativa dos anticorpos não anti-D aumentou nas últimas décadas, o que pode estar relacionado com a melhor detecção de anticorpos através de melhores técnicas empregadas nos bancos de sangue. As variações na frequência de genes para diferentes países e práticas nacionais específicas de transfusão também podem influenciar⁽¹¹³⁾.

Conforme dito anteriormente, o anticorpo anti-Le^a foi o anticorpo mais frequente encontrado, com uma frequência de 25,3% (n=45/178) de todos os anticorpos identificados. Uma frequência de 20,0% também foi recentemente relatada por Karim e colaboradores (2015). A alta frequência desse tipo de anticorpo é suportada pelo fato de que há uma diminuição na expressão de antígenos *Lewis* na gravidez e que algumas mulheres podem produzir anticorpos anti-Lewis, mesmo que sejam positivas para esse antígeno. Esses tipos de anticorpos geralmente não são considerados clinicamente importantes, pois os

antígenos Lewis não são intrínsecos aos eritrócitos, sendo glicoesfingolipídeos tipo 1 que são passivamente adsorvidos na membrana eritrocitária a partir do plasma ⁽¹¹⁴⁾.

A presença de múltiplos anticorpos eritrocitários pode ser clinicamente significativa, pois essas combinações são mais frequentemente associadas a intervenções terapêuticas para o recém-nascido, especialmente a combinação de anticorpos anti-D+C ⁽²⁶⁾. Das 147 mulheres, 12,2% possuíam anticorpos anti-D associados a outros anticorpos, sendo a combinação anti-D+C a mais frequente (7,5%). Estudos demonstraram que a combinação de anti-D com outro anticorpo pode ter um efeito sinérgico e causar uma forma mais severa de DHFRN ⁽²⁶⁾.

Um dos objetivos desse trabalho foi estudar a frequência de anticorpos anti-HLA nas doadoras de sangue e os associar ao número de gestações prévias. Foram analisadas 563 doadoras de sangue, 238 (42,3%) indivíduos apresentaram anticorpos anti-HLA na circulação sanguínea, 14/70 (20,0%) mulheres eram uníparas e 224/493 (45,4%) eram mulheres multíparas. Resultados similares foram encontrados em um estudo realizado em 2007 com 5.700 doadoras de sangue, onde foi encontrada uma taxa de aloimunização HLA em 42,5% das mulheres com três ou mais gestações ⁽¹¹⁵⁾. Outro estudo brasileiro também encontrou uma taxa de aloimunização HLA em 37% das doadoras de sangue com três ou mais gestações ⁽⁶⁹⁾.

A frequência de anticorpos anti-HLA em mulheres com aloimunização eritrocitária (n=147) também foi estudada, e 74/147 (50,3%) possuíam anticorpos anti-HLA concomitantemente, sendo 23/65 (35,4%) casos com uma gestação e 51/82 (62,2%) casos com duas ou mais gestações. Pesquisadores demonstraram que pacientes com aloimunização eritrocitária estão mais propensos a desenvolver anticorpos anti-HLA ^(3, 116), aumentando assim o impacto clínico nestes casos, já que os pacientes podem desenvolver refratariedade plaquetária e se tornarem difíceis para transplantes de órgãos sólidos ou hematopoiéticos ^(117, 118). Brantley e Ramsey (1988) descobriram que os pacientes com transplante de órgãos sólidos com aloanticorpos eritrocitários apresentaram níveis mais elevados de anticorpos anti-HLA do que pacientes que não possuíam anticorpos eritrocitários. Buetens e colaboradores (2006) relataram que pacientes com

anticorpos eritrocitários têm um risco aumentado de aloimunização HLA, onde 12 (22,6%) indivíduos também apresentaram anticorpos HLA, enquanto que apenas 7 (10,1%) dos 69 pacientes no grupo controle apresentaram anticorpos HLA ⁽³⁾.

Diferença estatística foi encontrada quando comparado os grupos 1 e 2 de acordo com o histórico gestacional. Mulheres uníparas e múltiparas do grupo 1 apresentaram maior frequência de anticorpos anti-HLA quando comparado com o grupo 2 ($p=0,04$ e $0,004$ respectivamente). Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que mulheres com mais estímulos antigênicos tendem a formar mais anticorpos leucocitários ^(69, 119, 120).

Conforme já mencionado, 50,3% mulheres apresentaram anticorpos anti-HLA e antieritrocitários concomitantemente, desses, 5,4% também apresentaram anticorpos anti-HNA, sendo a maior frequência de anticorpos anti-HNA encontrada até o momento. A taxa elevada de aloimunização contra múltiplas células sanguíneas nessa população pode estar relacionada ao perfil dos indivíduos incluídos na pesquisa, apenas mulheres que tiveram estímulo gestacional, ou seja, não receberam transfusão sanguínea e não fizeram nenhum tipo de transplante. Durante a gestação, embora frequente, a quantidade de hemorragia feto-materna é usualmente pequena, volumes menores que 0,1ml durante a gestação em 90,0% das ocorrências ⁽¹⁰⁵⁾. Quanto maiores os volumes transferidos, maior o risco de aloimunização ^(121, 122), entretanto um volume tão pequeno como 0,1ml de glóbulos vermelhos, foi capaz de aloimunizar 5,4% das mulheres contra os três tipos celulares (eritrócitos, leucócitos e neutrófilos), indicando tratar-se de bons respondedores imunológicos ⁽¹²³⁾.

Além da elevada taxa de anticorpos anti-HLA, também foi observada uma alta frequência de anticorpos anti-HNA nas duas populações estudadas: 7,5% nas mulheres com aloimunização eritrocitária e 4,3% no grupo controle. Resultado estatisticamente significativo só foi encontrado ao separar os grupos conforme o número de gestações. Mulheres múltiparas com anticorpos eritrocitários possuem maior frequência de aloimunização neutrofílica (11,0%) quando comparado com o grupo controle, que é composto por mulheres múltiparas que não possuem anticorpos eritrocitários (4,7%) ($p=0,02$). Não foi encontrada diferença significativa ao comparar a presença de anticorpos anti-HNA nas mulheres uníparas,

entretanto esse resultado pode estar associado à quantidade de indivíduos com uma única gestação incluídas no trabalho, visto que o número de casos controle foi significativamente menor nesse grupo quando comparado com o grupo controle das mulheres multíparas.

O grupo 2 foi composto por doadoras de sangue sem aloimunização eritrocitária. Mesmo sem a presença do anticorpo eritrocitário, foi encontrada uma taxa elevada de anticorpos anti-HNA nessa população (4,3%) quando comparado com os resultados da literatura. Essa taxa elevada pode estar relacionada à grande mistura de raças encontrada no Brasil. Segundo dados do IBGE, indígenas, africanos e europeus compõem os diferentes grupos étnico-raciais, a mistura dessas grandes composições étnicas dão origem a grande miscigenação brasileira.

São poucos os trabalhos que objetivam estudar a frequência de anticorpos anti-HNA em doadores de sangue. Recentemente, um estudo chinês encontrou 3/778 mães (0,4%) com anticorpos específicos de neutrófilos, dois anti-HNA-2 e um anticorpo autoreativo ⁽¹²⁴⁾. Anticorpos anti-HNA também foram detectados em 0,7% de doadores de sangue caucasiano (n=1171) ⁽¹²⁵⁾. Reil e colaboradores (2008) realizaram um trabalho em que avaliaram 229 homens e 5332 doadoras de sangue para anticorpos anti-HLA e HNA, porém não foram encontrados anticorpos anti-HNA em doadores do sexo masculino e foram detectados 33 (0,6%) anticorpos de anti-HNA nas doadoras de sangue com histórico gestacional, 10 (30,3%) anticorpos com especificidade anti-HNA-3a, sendo que 6/10 anticorpos estavam relacionados a casos fatais de TRALI ⁽¹⁰¹⁾.

Uma vez presentes nos receptores, os anticorpos podem causar efeitos imunológicos adversos, entre eles o TRALI, considerado uma das principais causas de mortalidade e morbidade relacionada à transfusão de sangue. Os mecanismos por trás da doença ainda não são totalmente compreendidos, mas parecem envolver diferentes vias de ativação, fatores relacionados aos doadores em sinergia com a susceptibilidade do paciente ^(126, 127). Os estudos se concentraram principalmente na ativação de neutrófilos, pois agregados de neutrófilos e edema pulmonar são encontrados em seções histológicas *post-mortem* ^(101, 128). Diante das evidências, estudos que determinam a frequência de

anticorpos leucocitários em doadores de sangue são importantes para a prevenção de casos de TRALI.

A importância de determinadas especificidades HNA no desenvolvimento do TRALI precisa ser esclarecida, sabe-se que anticorpos dirigidos contra antígenos HNA-3a estão envolvidos em casos graves e fatais de TRALI ⁽¹⁰¹⁾. No presente trabalho foram encontrados 2/710 (0,3%) mulheres com anticorpos com especificidade HNA-3a, ambas tinham anticorpos anti-HLA classe I e também foram classificadas como doadoras múltiparas. Os dados foram comparáveis com os resultados de Reil e colaboradores (2008) que identificaram anticorpos anti-HNA-3a a uma taxa de pouco menos de 1 em 500 doadores de sangue (0,2%).

Embora o sistema HNA-3 tenha sido descoberto há 45 anos, apenas recentemente esse sistema foi caracterizado de forma molecular ⁽⁸⁶⁾. Dois alelos designados como HNA-3a e HNA-3b resultam de um único polimorfismo de nucleotídeos na posição 154 no primeiro domínio extracelular da proteína CTL2, dando origem aos aminoácidos arginina em HNA-3a e glutamina em HNA-3b ^(86, 87). A elucidação da estrutura molecular da HNA-3 foi impulsionada pela esperança de permitir o desenvolvimento de ensaios em fase sólida, para futuros testes de triagem de doadores de alto rendimento usando antígenos recombinantes ⁽⁸⁶⁾. Infelizmente, o epítipo HNA-3 se perde quando a proteína é separada da membrana celular. Os anticorpos humanos contra o epítipo HNA-3 apenas se ligam a CTL2 em sua conformação natural e, devido a essa característica é um grande desafio imitar esta conformação natural na proteína recombinante.

A aloimunização contra o sistema HNA-1, é a causa principal de NAN em populações caucasianas ^(80, 129). O anticorpo anti-HNA-1a foi o mais frequente encontrado, com uma taxa de 40% (14/35) de todos os casos com anti-HNA encontrados e com uma frequência de 1,6% (9/563) nas doadoras de sangue. Um estudo brasileiro do mesmo grupo de pesquisa determinou que as frequências fenotípicas de HNA-1a (65%) e -1b (83%) em brasileiros são bastante semelhantes às relatadas em americanos negros, africanos e caucasianos, além disso, relatou que dos casos de aloimunização contra o sistema HNA-1, o anti-1a representa 17% das aloimunizações neutrofílicas ⁽¹³⁰⁾. Um recente estudo europeu

detectou anticorpos neutrofílicos anti-Fc γ RIIIb e anti-HNA-1a em 0,8% (80), e outro estudo encontrou uma taxa de 0,7% de aloimunização neutrofílica, onde 37,5% (3/8) das mulheres possuíam anticorpos anti-HNA-1a ⁽⁹⁾. Esse último autor defende a hipótese de que a alta taxa de anticorpos anti-HNA-1a possa ser devido à predominância de autoanticorpos. Mas também é possível que a aloimunização possa ocorrer sem a exposição alogênica, estes anticorpos poder ser formados por agentes patogênicos, os chamados anticorpos de ocorrência natural ⁽¹³¹⁾.

No presente estudo foram identificados e descritos dois casos (0,3%) em que as mães possuíam anti-Fc γ RIIIb com genótipo HNA-1 *null*. O receptor Fc γ RIIIb de neutrófilos carrega os epítomos do sistema HNA-1 (1a, 1b, 1c e 1d) codificados pelo gene *FCGR3B*. O fenótipo HNA-1 *null* é resultado de uma deleção do gene *FCGR3B* e mulheres com Fc γ RIIIb ausente podem formar anticorpos contra os epítomos do HNA-1 ⁽⁸¹⁾. Apesar de raros, os anti-Fc γ RIIIb já foram associados com casos graves de NAN ^(81, 132). A frequência de indivíduos HNA-1 *null* é baixa, variando de 0,1% em caucasianos a 2,4% em africanos ^(133, 134). Mulheres grávidas com essa deficiência podem desenvolver aloanticorpos específicos anti-Fc γ RIIIB que podem causar NAN ⁽¹³⁴⁾ e grande parte dos indivíduos deficientes de Fc γ RIIIB podem sofrer infecções bacterianas e doenças autoimunes ⁽⁸¹⁾.

A identificação dos anticorpos neutrofílicos foi realizada pelo teste LSM, e as confirmações foram feitas pelos testes Flow-WIFT, GAT e genotipagem do antígeno HNA correspondente. O teste LSM identificou 102/710 (14,5%) amostras positivas para anticorpos anti-HNA, porém apenas 35/102 (34,3%) foram confirmados pela genotipagem do antígeno neutrofílico correspondente, os outros 67/102 (65,7%) casos não concordaram com os resultados da genotipagem, e foram classificados como reação inespecífica no teste LSM. Esses tipos de reações foram principalmente direcionadas contra o sistema HNA-5, com 33 (49,3%) casos discordantes, seguido do sistema HNA-3, com 17 (25,4%) casos. Para a realização da análise estatística do presente trabalho, os casos com reação inespecífica foram considerados como negativos para anticorpos anti-HNA. Resultados falso-positivos no teste LSM já haviam sido reportados em

trabalhos recentes, onde Schulz U e colaboradores encontraram uma taxa de 6,5% de reações falso-positivas, sendo o sistema HNA-3 responsável por mais da metade dos resultados divergentes.

Em nosso estudo, testamos a nova geração do LSM, que incluiu *beads* especiais com peptídeos recombinantes de HNA-3a e HNA-3b. Nossos resultados indicam que 50% (12/24) dos anticorpos contra antígenos neutrofílicos do sistema 3 foram detectados de forma confiável, claramente positivas (NBG *radio* > 5.0). Porém a outra metade (12/24) dos soros apresentaram reações discordantes (falso-positivas) para anticorpos anti-HNA-3 (resultados não mostrados), pois nenhum dos testes confirmatórios constatou a presença do anticorpo ou a ausência do antígeno correspondente. Uma característica especial notada é que os dois soros com anticorpos anti-HNA-3a verdadeiros positivos também reagiram com a *bead* do anticorpo anti-HNA-3b (resultado não mostrado). Uma possível explicação para esse evento é que pode haver mais locais de ligação ao anticorpo além da troca de aminoácidos. Estes outros locais de ligações podem estar próximos da mesma zona “estérica”, mas distantes em relação à posição da proteína na sequência primária. Portanto, algumas modificações químicas são necessárias para estabilizar as proteínas recombinantes de HNA-3 de uma forma que imita sua conformação tridimensional natural ⁽¹³⁵⁾.

O sistema HNA-5 é formado pelo complexo CD11a/CD18, também conhecido como LFA-1 ou α L β 2-integrina, é expresso em todos os leucócitos e funciona como molécula de adesão leucocitária. É desconhecido se a função da integrina é influenciada pelo polimorfismo do HNA-5a ^(97, 136). O teste LSM detectou 38 anticorpos destinados contra esse sistema, entretanto apenas 5 (13,2%) foram confirmados por testes complementares. Três anticorpos eram destinados contra o antígeno HNA-5a e dois contra o antígeno HNA-5b. Até o momento nenhum caso com anticorpos anti-5b havia sido relatado na literatura. A frequência do antígeno HNA-5bb na população brasileira é desconhecida, entretanto em um estudo recente do nordeste asiático encontrou que 0,08-0,1% da população possui o genótipo HNA-5bb ⁽¹³⁷⁾, e um estudo brasileiro encontrou uma frequência de 96% do genótipo HNA-5aa em doadores de sangue ⁽¹³⁸⁾.

A maior frequência de casos falso-positivos foram de anticorpos contra o sistema HNA-5. Essa alta taxa relatada poderia estar associada com a presença de anticorpos anti-leucocitários, 71,2% dos casos com reações inespecíficas para o HNA-5 também tinham anticorpos anti-HLA, podendo haver alguma ligação cruzada entre os anticorpos anti-HLA e HNA desse sistema. Essa inespecificidade também pode ser atribuída ao lote do kit LSM, pois com o objetivo de aprimorar a especificidade e sensibilidade do sistema HNA-1 e 3, o fabricante do teste precisou fazer alterações nas conformações das *beads* desses sistemas, entretanto essas modificações podem ter resultado em alterações nas *beads* dos antígenos HNA-5.

Resultados divergentes também foram encontrados entre os testes GAT e LSM, 52/710 (7,3%) indivíduos apresentaram resultado positivo no teste GAT, porém possuíam resultado negativo para anticorpos anti-HLA e HNA no teste LSM. Esses 52 casos foram classificados como reação indeterminada no teste GAT, portanto não foram concluídos como sendo casos com anticorpos anti-leucocitários. Também não foi possível determinar se a positividade no teste GAT era devido a anticorpos anti-neutrofílicos, pois o painel de doadores do teste GAT precisaria contemplar mais de três perfis celulares para podermos concluir que eram anticorpos anti-HNA. Ainda assim, como o teste GAT é um teste considerado fundamental para identificar anticorpos anti-HNA-3 e como não foi possível confirmar se essas amostras positivas eram atribuídas a esses tipos de anticorpos, esses casos foram genotipados e as amostras foram armazenadas para testes futuros. Os indivíduos que eram do grupo 2 (doadoras de sangue) foram excluídos da lista de doadores de sangue do hemocentro da UNIFESP.

Um estudo recente mostrou que o teste GIFT por citometria de fluxo (semelhante ao utilizado no estudo) possui alta sensibilidade para detecção de anticorpos anti-HNA-3a ⁽¹³⁹⁾. Os dois casos que tivemos de anti-HNA-3a foram confirmados tanto pela metodologia GAT quanto Flow-WIFT. Dez casos foram positivos para anticorpos anti-3b, entretanto 6/10 (60,0%) não foram detectados pelo GAT, e 4/10 (40,0%) também não foram identificados pelo Flow-WIFT, ou seja, 40% de todos os casos com anti-HNA-3b foram detectados apenas pelo teste LSM e confirmados pela genotipagem. Conforme já mencionado, a

identificação dos anticorpos anti-HNA-3 é desafiadora, por isso é fundamental utilizar técnicas complementares ao LSM. GAT e Flow-WIFT continuam sendo os métodos de referência para a triagem e diferenciação de especificidades raras e atualmente desconhecidas de HNA, pois os granulócitos são as fontes ideais de estruturas nativas, não modificadas dos antígenos ⁽⁵⁾. Isto significa que, até a presente data, para garantir maior confiabilidade na detecção de anticorpos neutrofílicos, os testes GAT, Flow-WIFT e genotipagem devem ser associados nas pesquisas de anticorpos para prevenir reações transfusionais. Em conjunto, os resultados atuais indicam que o ensaio LSM de nova geração possibilita um grande avanço em direção ao teste de alto rendimento para detecção dos anticorpos anti-HNA.

O teste GAT apresentou resultado positivo para anticorpos anti-HNA em 65,7% dos casos, mostrando ser uma técnica sensível para detectar anticorpos contra os antígenos HNA-1a, FcγRIIIb, HNA-3a e HNA-5b, porém demonstrou ser uma técnica pouco sensível para detectar anticorpos contra antígenos-HNA-3b e HNA-5a e não detectou nenhum dos 3 casos com anticorpos anti-HNA-2. Ainda é desconhecido o grau de sensibilidade do teste GAT para os sistemas de neutrófilos 2, 4 e 5, entretanto sabe-se que esse teste é considerado padrão ouro para detectar anticorpos do sistema 3. De todos os casos com anti-HNA-3b, 60% não foram identificados pelo teste GAT, tal resultado poderia ser explicado pelo perfil antigênico escolhido para compor o painel de neutrófilos, dos 3 perfis necessários, apenas 1 perfil era positivo em homozigose para o antígeno HNA-3b, o que dificulta a identificação do referido anticorpo.

O teste Flow-WIFT foi realizado apenas nos casos com resultados positivos para anticorpos anti-neutrofílicos, 77,2% dos indivíduos obtiveram resultados positivos para anticorpos anti-HNA pela técnica mencionada. O teste Flow-WIFT mostrou ser uma técnica sensível para detectar anticorpos anti-FcγRIIIb, HNA-2, HNA-3a, HNA-5a e -5b, porém em nosso estudo, a técnica não conseguiu detectar 4 (30,8%) dos anticorpos anti-HNA-1a e 4 (40,0%) dos anticorpos anti-HNA-3b. O teste mostrou ser uma técnica mais sensível para detectar anticorpos neutrofílicos quando comparado com o teste GAT. 65,7% dos anticorpos seriam detectados apenas pelo GAT, enquanto 77,2% seriam

detectados pelo teste Flow-WIFT. Entretanto não podemos concluir que a positividade nos testes GAT e Flow-WIFT seja pela presença exclusiva de anticorpos anti-HNA, pois 18/35 (51,4%) casos possuíam anticorpos anti-HLA e HNA concomitantemente, e o resultado positivo pode estar relacionado à interferência da presença do anticorpo anti-HLA.

Foram identificados pelo teste LSM 257/312 (82,4%) anticorpos anti-HLA classe I e/ou I e II, entretanto 147/257 (57,2%) apresentaram resultado negativo no teste GAT. Apesar do antígeno HLA classe I ser expresso na membrana dos neutrófilos, o teste GAT não é a metodologia ideal para detectar anticorpos anti-HLA, existem técnicas mais sensíveis e específicas para detectar esse tipo de anticorpo.

O anticorpo anti-HLA classe I não teve relação significativa com nenhuma das análises realizadas, entretanto resultados significativos foram encontrados quando observamos a presença de anticorpos anti-HLA classe II nos grupos estudados. Do total de anticorpos anti-HLA detectados (312), anticorpos anti-HLA classe II foram encontrados em 5/74 (6,8%) mulheres com aloimunização eritrocitária, enquanto o grupo controle contou com 50/238 (21,0%) casos com a mesma especificidade. O grupo controle com anticorpo anti-HLA classe II obteve resultado significativo tanto no grupo das mulheres múltiparas ($p=0,004$) quanto na contagem total de indivíduos estudados ($p=0,005$). Em um estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa foi encontrado que os anticorpos de classe II possuem um número ligeiramente maior de casos (10,3%) em mulheres múltiparas⁽⁶⁹⁾. A hipótese relacionada a esse achado é que anticorpos anti-HLA classe II poderiam servir como um fator de proteção para a produção de anticorpos eritrocitários, o que explicaria a inexistência de aloimunização eritrocitária neste grupo. Entretanto há a necessidade de mais estudos na área para embasar tal afirmativa.

Vários estudos já relataram que as transfusões sanguíneas podem levar ao desenvolvimento de aloanticorpos contra os antígenos plaquetários e leucocitários além daqueles para diferentes sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários^(117, 140). O trabalho de Younesi (2016) mostrou que anticorpos contra leucócitos polimorfonucleados e plaquetas são mais frequentes em pacientes

transfundidos e que a aloimunização eritrocitária e leucocitária é comum em pacientes multitransfundidos e mulheres com múltiplas gestações. Os resultados obtidos no presente trabalho são condizentes com o trabalho mencionado ⁽¹⁴¹⁾. Os achados nos mostram que mulheres multíparas com anticorpos eritrocitários possuem maior frequência de anti-HNA e HLA ($p=0,02$) simultaneamente. Valor significativo também foi encontrado ao fazer a mesma análise no total de mulheres testadas (uníparas e multíparas) ($p=0,01$), ou seja, a aloimunização eritrocitária também está associada à formação de anticorpos leucocitários, além dos anticorpos neutrofílicos, suportando a hipótese de indivíduos classificados como “bons” respondedores. Vários elementos podem ter contribuído para esse resultado, como a heterogeneidade da população, as diferenças antigênicas entre a mãe e o bebê e efeitos imunomoduladores da gestação.

Além da frequência dos anticorpos leucocitários e neutrofílicos, também foi avaliada a persistência desses anticorpos na circulação sanguínea. Para a análise da persistência, foram estudadas 24 amostras com anticorpo anti-HNA do grupo 2, sendo que 11 (45,8%) casos também apresentavam anticorpos anti-HLA, 72,7% destinados ao anticorpo HLA classe I. O anti-HNA-2 foi o anticorpo que apresentou maior tempo (anos) na circulação sanguínea, tendo sido encontrado um caso com persistência de 43 anos.

Segundo o histórico relatado pelas mulheres estudadas, a aloimunização ocorreu na vida adulta (média: 19 anos de idade no momento da aloimunização/gestação), esse dado sustenta a hipótese de que a persistência do anticorpo pode estar relacionada com a idade do indivíduo no momento da aloimunização. A imunossenescência está relacionada com alterações na imunidade humoral, o envelhecimento prejudica as respostas de linfócitos T e B em patógenos, reduzindo assim a duração da imunidade protetora ⁽¹⁴²⁾.

Alguns tipos de reações transfusionais podem acontecer quando os títulos dos anticorpos eritrocitários diminuem ou desaparecem ao longo do tempo, pois os pacientes correm o risco de receber transfusões de concentrados de hemácias incompatíveis e desenvolver reação transfusional hemolítica ⁽¹⁴³⁾. Esse evento pode acontecer em situações em que o anticorpo formado não é mais detectado nos testes convencionais devido ao longo tempo que passou desde a sua

formação (evanescência). Estudos anteriores relataram taxas de evanescência de anticorpos eritrocitários entre 27% e 41% após períodos medianos de acompanhamento que variam de menos de um até oito anos ^(40, 116, 142). Após a estimulação antigênica, as células B *naïves* produzem células plasmáticas que secretam anticorpos de curta e longa duração.

Embora as células de curta duração tenham uma vida útil de alguns dias, as células plasmáticas de longa duração podem sobreviver por décadas e manter o potencial de auto-renovação replicativo através da divisão celular ⁽¹⁴⁴⁾. Essas células plasmáticas de vida longa são responsáveis por uma produção de anticorpos IgG sem estimulação antigênica ao longo da vida ⁽¹⁴⁵⁾. A questão permanece se tal *pool* de células plasmáticas é capaz de manter os títulos de anticorpos altos à longo prazo. Dos estudos de acompanhamento de vacina, tornou-se claro que, após a imunização primária, a maioria dos anticorpos recuou para níveis indetectáveis sem novas imunizações de reforço, enquanto a imunização secundária demonstrou níveis detectáveis de anticorpos por um longo período. Os fatores que estão envolvidos na persistência de anticorpos virais e bacterianos, com meia-idade até 20 anos, são a via de exposição ao antígeno (vacina *versus* infecção natural), dose e estrutura dos antígenos, idade durante a vacinação, resposta inicial forte e presença de impulso "natural" (por exemplo, patógeno não replicante latente, reatividade cruzada ou antígeno de vacina persistente) ^(146, 147).

A persistência de anticorpos encontrada no estudo pode ser explicada pelo fato de que 95,8% (23/24) de todos os indivíduos estudados tiveram duas ou mais gestações, sustentando o fundamento da produção de anticorpos IgG de longa duração após a segunda exposição ao antígeno ^(146, 147). Apenas um caso foi relatado com uma gestação (1/24), e ainda assim, essa única gestação ocorreu há um período curto de tempo (três anos). Ter conhecimento de quanto tempo após a aloimunização esses anticorpos ainda podem ser detectados nos testes disponíveis é de grande importância para prevenir complicações transfusionais, tendo em vista que as mulheres sensibilizadas são potenciais doadoras de sangue, e podem transmitir esses anticorpos passivamente durante a transfusão sanguínea.

Os anticorpos anti-HLA são frequentemente encontrados no plasma de doadoras de sangue do sudeste brasileiro, somando 20,0% das doadoras de sangue uníparas e 45,4% nas doadoras múltiparas e se correlacionam estatisticamente com o maior número de gestações ($p < 0,0001$).

Utilizar componentes plasmáticos apenas de doadores do sexo masculino e doadoras com uma única gestação é uma medida de prevenção de reações como TRALI. Mesmo a frequência de anticorpos anti-HLA e HNA nas doadoras de sangue uníparas (20,0%) ser menor do que o resultado encontrado nas doadoras múltiparas (45,4%), os dados sugerem que a atual política de redução de risco de TRALI de não utilizar plasma de mulheres múltiparas com o objetivo de reduzir o número de transfusões com anticorpos anti-HLA, poderia se estender também para mulheres com uma única gestação. No entanto, os estudos que comparam a relação custo-benefício dessa estratégia estão em curso.

Atualmente a legislação não solicita na rotina pré-transfusional a realização de testes que pesquisem a presença de anticorpos anti-HLA e HNA antes de uma transfusão sanguínea. Entretanto o rastreio de anticorpos leucocitários pode ser realizado em pacientes com aloanticorpos eritrocitários, principalmente aquelas que necessitem de suporte transfusional de concentrado de plaquetas. Ao detectar os anticorpos eritrocitários, o laboratório poderá realizar testes de rastreio de anticorpos leucocitários ou provas de compatibilidade antes da transfusão de concentrado de plaquetas. Portanto, a determinação de quais pacientes são mais propensos a produzir anticorpos HLA e HNA pode ter um papel vital para otimizar transfusões sanguíneas.

Para que se dê segmento ao atual estudo, sugere-se acompanhar as doações sanguíneas de mulheres com histórico gestacional, independente da quantidade gestações, para verificar qual a porcentagem das doadoras com anticorpos leucocitários foram capazes de desencadear TRALI em receptores sanguíneos através de outros componentes sanguíneos, não apenas o plasma. Também sugere-se acompanhar pacientes com aloimunização eritrocitária pela transfusão sanguínea, para verificar qual a porcentagem de pacientes que formam anticorpos eritrocitários e neutrofílicos concomitantemente.

Seguindo o raciocínio que indivíduos são considerados bons respondedores quando formam anticorpos contra múltiplas células sanguíneas, trabalhos futuros também podem investigar a presença de anticorpos plaquetários nas amostras positivas para anticorpos leucocitários e investigar a frequência desses anticorpos nas doadoras de sangue.

6 CONCLUSÕES

1. A aloimunização eritrocitária foi significativamente associada ao desenvolvimento de anticorpos leucocitários (anti-HNA e anti-HLA) em mulheres múltiparas. Uma maior frequência de aloimunização HNA (11%) foi observada no grupo das mulheres múltiparas com aloimunização eritrocitária em relação ao grupo controle (4,7%), sugerindo que são melhores respondentes imunológicos e que reagem fortemente à exposição alogênica ($p=0,02$).
 2. A prevalência de anticorpos anti-HNA na população de doadoras de sangue múltiparas da região sudeste do Brasil é até dezesseis vezes maiores que a observada em estudos europeus (4,9% em brasileiros versus 0,3% em alemães).
 3. Os anticorpos anti-HNA-1a foram os mais frequentemente encontrados na população estudada (37,1%), seguido do anti-HNA-3b com 28,6% de todos os casos com anticorpos neutrofílicos.
 4. Os anticorpos anti-HLA são frequentemente encontrados no plasma de doadoras de sangue do sudeste brasileiro. Esse tipo de anticorpo foi detectado em 20,0% das doadoras de sangue uníparas e 45,4% nas doadoras múltiparas e se correlaciona estatisticamente com o maior número de gestações ($p<0,001$).
 5. As mulheres que formaram exclusivamente anticorpos anti-HLA classe II apresentaram uma menor frequência de anticorpos eritrocitários.
 6. Embora o teste LSM tenha detectado anticorpos anti-HNA em 102 amostras, observamos que 67 (65,7%) dos anticorpos não foram confirmados por testes complementares. Isto significa que, até a presente data, para garantir maior confiabilidade na detecção de anticorpos neutrofílicos, os testes GAT, Flow-WIFT e genotipagem devem ser associados nas pesquisas de anticorpos quando a sua identificação se fizer necessária. Em conjunto, os resultados atuais indicam que o ensaio LSM de nova geração possibilita um grande avanço em direção ao teste de alto rendimento para detecção dos anticorpos anti-HNA.
-

Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**

Nome: _____ **Idade:** ____ **RG:** _____

Título do projeto: “ASSOCIAÇÃO DE ANTICORPOS ERITROCITÁRIOS EM MULHERES COM ALOIMUNIZAÇÃO NEUTROFÍLICA”.

- 1- Objetivo do estudo: “O presente projeto visa estudar as nossas células de defesa (anticorpos) em indivíduos com histórico gestacional, pois a gestação pode desencadear a formação de anticorpos durante a gravidez, sendo assim, visamos determinar a especificidade e a frequência desses anticorpos no sangue das mulheres do sudoeste brasileiro”.
 - 2-
 - 3- Para participar deste estudo o indivíduo não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. A pessoa será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Também poderá retirar o consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador
 - 4- Descrição dos procedimentos que serão realizados: “O participante será submetido à coleta de aproximadamente 6 ml de sangue, para realização de testes laboratoriais, sem que isto cause nenhum problema geral ou relacionado ao estado de saúde”.
 - 5- Relação dos procedimentos rotineiros: A coleta de sangue será feita por punção periférica da veia do antebraço.
 - 6- Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 3 e 4: O possível desconforto poderá ser relacionado com a punção venosa, podendo sentir pequena sensação de dor imediata local. O risco relacionado com a punção venosa restringe-se à possível extravasamento de sangue para fora da veia.
 - 7- Benefícios para o participante: Não há benefício direto para o participante, pois trata-se de estudo de frequência de anticorpos formados após a gravidez ou transfusão sanguínea. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício
 - 8- Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, o participante terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento sobre eventuais dúvidas. O principal investigador é Juliana Oliveira Martins, que poderá ser encontrada na Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, à Rua Diogo de Faria, 824, telefones: 5576-4240/5579-1550. Caso ocorram dúvidas sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Rua Botucatu, 572 - 1º andar – cj 14. Telefone: 5571-1062. Fax: 5539-1062. E-mail: cepunifesp@epm.br
-

-
- 9- Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não será divulgada a identificação de nenhum paciente.
- 10- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudo aberto, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.
- 11- Despesas e compensações: Não há despesas para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- 12- Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos proposto neste estudo (nexo causal comprovado), o participante terá direito a tratamento médico na Instituição, bem como indenizações legalmente estabelecidas. Associação de Anticorpos Eritrocitários em indivíduos com aloimunização eritrocitária.
- 13- Compromisso da pesquisa de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o projeto “1”.

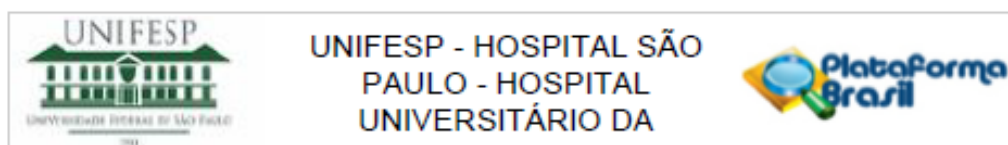
Eu discuti com Juliana Oliveira Martins, sobre a minha decisão em participar deste estudo.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou clara também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Data: ____/____/____
Assinatura do paciente/representante legal/participante da pesquisa

Data: ____/____/____
Juliana Oliveira Martins (Pesquisador Principal)

Observação: Todas as páginas do TCLE devem ser rubricadas pelo pesquisador principal e pelo participante da pesquisa no momento da aplicação do TCLE.

Anexo 2 . Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DE ANTICORPOS LEUCOCITÁRIOS EM INDIVÍDUOS COM ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA

Pesquisador: Juliana Oliveira Martins

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 47067015.8.0000.5505

Instituição Proponente: Disciplinas de Hematologia e Hemoterapia do Departamento de Oncologia

Patrocinador Principal: Disciplinas de Hematologia e Hemoterapia do Departamento de Oncologia Clínica

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.903.056

Apresentação do Projeto:

EMENDA 3 ao protocolo original

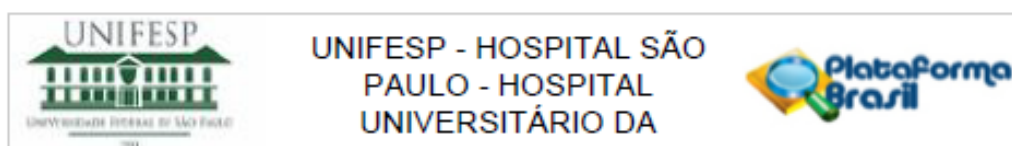
Nº CEP: 0846/2015

Introdução

Os aloanticorpos eritrocitários irregulares são formados após transfusões sanguíneas ou gestações incompatíveis e têm grande importância na prática transfusional, pois podem trazer complicações clínicas, como reações transfusionais hemolíticas agudas ou tardias. Além dos anticorpos eritrocitários, após a transfusão sanguínea ou gestação incompatível, nosso sistema imune também pode responder contra determinantes antigênicos presentes em outras células do sangue, como leucócitos e granulócitos, considerados fundamentais na patogênese da lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI).

Devido à importância clínica desses anticorpos, pretende-se investigar se existe associação entre a formação dos anticorpos eritrocitários com formação de anticorpos leucocitários e granulocitários

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.903.056

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo do estudo

Investigar se os indivíduos com aloimunização eritrocitária estão mais propensos a desenvolver anticorpos leucocitários e granulocitários.

Objetivo Secundário: 1. Identificar a especificidade dos anticorpos anti-HLA e anti-HNA no grupo com triagem positiva para anticorpos granulocitários.

2. Avaliar a relação dos alelos HLADRB1 com a susceptibilidade à aloimunização no grupo de indivíduos com anticorpos anti-HNA

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios descritos no parecer original aprovado

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de emenda 3 ao protocolo original, com a seguinte justificativa:

Exclusão do centro participante e coparticipante "Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo", pois as amostras do presente projeto já estão sendo coletadas atualmente nos hospitais: São Paulo e Geral de Guarulhos, não sendo necessária a participação de mais um centro participante.

Essa mudança não acarretará em nenhum impacto no presente projeto, visto que as amostras já estão sendo coletadas nos hospitais acima referidos e que nenhuma amostra foi coletada no hospital Irmandade Santa Casa de São Paulo, pois a pesquisa nesse hospital não foi iniciada. Gostaria de lembrar que não foi efetivada a parceria com a Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, visto que os documentos necessários não foram entregues.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Emenda com exclusão de centro participante e co-participante

Recomendações:

Nada consta

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda apresentada adequadamente

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



UNIFESP - HOSPITAL SÃO
PAULO - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DA



Continuação do Parecer: 1.903.056

Considerações Finais a critério do CEP:

parecer revisado e acatado pelo coordenador

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_852078 E3.pdf	09/01/2017 14:46:45		Aceito
Outros	Justificativa_de_emenda.jpg	09/01/2017 14:45:29	Juliana Oliveira Martins	Aceito
Outros	Justificativa_Emenda.docx	19/07/2016 15:13:33	Juliana Oliveira Martins	Aceito
Outros	Justificativa_Emenda.jpg	11/07/2016 14:09:56	Juliana Oliveira Martins	Aceito
Outros	Pedido_de_autorizacao_HGG.pdf	22/09/2015 12:33:25	Juliana Oliveira Martins	Aceito
Outros	Declaracao_de_concordancia_HGG.pdf	22/09/2015 12:32:56	Juliana Oliveira Martins	Aceito
Outros	Solicitacao_de_inclusao_hospital_geral_de_guarulhos.docx	22/09/2015 12:31:44	Juliana Oliveira Martins	Aceito
Orçamento	Planilha_Orcamentariaassinada.pdf	02/09/2015 10:38:11	Juliana Oliveira Martins	Aceito
Outros	Declaração de Concordância - Hospital Geral de Guarulhos.pdf	17/08/2015 11:07:27		Aceito
Outros	Pedido de Autorização - Hospital Geral de Guarulhos.pdf	17/08/2015 11:07:05		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Corrigido.pdf	17/08/2015 11:06:33		Aceito
Outros	Solicitação de inclusão do Hospital Geral de Guarulhos no projeto de pesquisa.pdf	17/08/2015 11:06:01		Aceito
Outros	Resolução das Pendências.pdf	17/08/2015 11:05:38		Aceito
Outros	Justificativa gastos.pdf	17/08/2015 08:59:58		Aceito
Outros	Carta de autorização da Coordenadoria de Ensino e Pesquisa HU.pdf	17/08/2015 08:59:34		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto - Juliana Oliveira Martins.pdf	03/07/2015 16:12:58		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	03/07/2015		Aceito

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.903.056

Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	16:04:49		Aceito
----------------	--------------------	----------	--	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 31 de Janeiro de 2017

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com

Anexo 3. Questionário 1 – Doadoras de sangue**Título do projeto: “ASSOCIAÇÃO DE ANTICORPOS ERITROCITÁRIOS EM MULHERES COM ALOIMUNIZAÇÃO NEUTROFÍLICA”.**

Nome: _____ Idade: _____
Telefone: _____ Número da Doação: _____

O presente projeto visa estudar as nossas células de defesa (anticorpos) em mulheres com histórico gestacional, pois alguns desses anticorpos podem causar complicações durante a gravidez ou em futuras gestações.

- 1) Você já teve alguma gestação? Se sim, quantas?
 - 2) Em qual ano foi a sua última gestação?
 - 3) Você já teve algum aborto? Se sim, quantos e em qual ano foi o último aborto?
Quantos meses o feto tinha no momento do aborto?
 - 4) Você já recebeu transfusão sanguínea? Se sim, quando foi a última transfusão?
Qual o tipo do hemocomponente recebido?
 - 5) Possui alguma doença?
-

Anexo 4. Questionário 2 – Gestantes com aloimunização eritrocitária**Título do projeto: “ASSOCIAÇÃO DE ANTICORPOS ERITROCITÁRIOS EM MULHERES COM ALOIMUNIZAÇÃO NEUTROFÍLICA”.**

Nome: _____ Idade: _____

Telefone: _____ RH: _____

O presente projeto visa estudar as nossas células de defesa (anticorpos) em mulheres gestantes, pois alguns desses anticorpos podem causar complicações durante a gravidez ou em futuras gestações.

- 1) Qual a sua idade gestacional?
 - 2) Quantas gestações você já teve?
 - 3) Você já teve algum aborto? Se sim, quantos e em qual ano foi o último aborto? Quantos meses o feto tinha no momento do aborto?
 - 4) Já recebeu transfusão sanguínea? Se sim, quando foi a última transfusão? Qual o tipo do hemocomponente recebido?
-

Anexo 5. Relação de todos os indivíduos com anticorpos anti-HNA e o resultado obtidos em todos os testes realizados.

Amostra	Grupo	Genotipagem	Flow-WIFT		GAT	Anti-HLA	Anti-HNA	Ac. Eritrocitários
			L	G				
12	AE	1a- 1b+ 1c-	-	+	+	-	Anti-1a	Anti-D
47	AE	1a-1b+ 1c-	+	+	+	Classe I e II	Anti-1a	Anti-D + C
56	AE	1a- 1b+ 1c-	-	+	+	-	Anti-1a	Anti-M+ D + Le ^a
93	AE	1a- 1b+ 1c-	+	-	+	Classe I	Anti-1a	Anti-D + C + K
74	AE	1a- 1b- 1c-	+	+	+	Classe I	Anti-FCγRIIIb	Anti-Le ^a
76	AE	1a- 1b- 1c-	+	+	+	Classe I e II	Anti-FCγRIIIb	Anti-D + C
17	AE	3a+ 3b-	+	+	+	Classe I e II	Anti-3b	Anti-Le ^a
84	AE	3a+3b-	+	-	-	-	Anti-3b	Anti-Le ^a
110	AE	3a+3b-	+	-	+	Classe I e II	Anti-3b	Alo anti-E
138	AE	3a+3b-	+	+	+	Classe I e II	Anti-3b	Anti-Jk ^a
105	AE	1a-1b+ 1c-	-	+	+	-	Anti-1a	IgM ind.
11	MP	3a-3b+	+	+	+	Classe I	Anti-3a	-
18	MP	1a-1b-1c+	-	-	+	Classe II	Anti-1a	-
32	MP	1a-1b-1c+	+	+	+	Classe I e II	Anti-1a	-
33	MP	NR	-	+	-	-	Anti-2	-
60	MP	NR	+	+	-	Classe I	Anti-2	-
81	MP	1a-1b-1c+	+	-	+	Classe I	Anti-1a	-
100	MP	3a+3b-	+	-	-	-	Anti-3b	-
130	MP	5a-5b+	+	+	-	Classe I	Anti-5a	-
198	MP	1a-	+	+	+	-	Anti-1a	-
208	MP	3a-3b+	+	+	+	Classe I	Anti-3a	-
255	MP	NR	+	+	-	-	Anti-2	-
257	MP	5a+5b-	+	+	+	Classe I	Anti-5b	-
313	MP	3a+3b-	+	+	-	Classe I	Anti-3b	-
322	MP	3a+3b-	+	+	-	-	Anti-3b	-
342	MP	3a+3b-	+	+	-	-	Anti-3b	-
357	MP	1a-	-	+	+	-	Anti-1a	-
381	MP	1a-	+	+	+	-	Anti-1a	-
399	MP	5a+5b-	+	+	+	Classe I e II	Anti-5b	-
403	MP	5a-5b+	-	+	+	-	Anti-5a	-
404	MP	1a-	-	+	-	-	Anti-1a	-
458	MP	5a-5b+	-	+	-	-	Anti-5a	-
459	MP	3a+3b-	-	-	+	-	Anti-3b	-
82	MP	3a+ 3b-	+	+	-	Classe I	Anti-3b	-
39	MP	1a-	-	-	+	-	Anti-1a	-

Legenda:

AE= Aloimunização Eritrocitária, MP= Doadoras Multíparas; +=positivo; -= negativo; NR= Não realizado; L= Linfócitos; N= Neutrófilos

8 REFERÊNCIAS

1. Hendrickson JE, Tormey CA, Shaz BH. Red blood cell alloimmunization mitigation strategies. *Transfus Med Rev*. 2014;28(3):137-44.
2. Shirey RS, Cai W, Montgomery RA, Chhibber V, Ness PM, King KE. Streamlining ABO antibody titrations for monitoring ABO-incompatible kidney transplants. *Transfusion*. 2010;50(3):631-4.
3. Buetens O, Shirey RS, Goble-Lee M, Houp J, Zachary A, King KE, et al. Prevalence of HLA antibodies in transfused patients with and without red cell antibodies. *Transfusion*. 2006;46(5):754-6.
4. Schonbacher M, Heinzl MW, Dauber EM, Mayr WR, Panzer S, Kormoczi GF. Granulocyte-reactive antibodies are associated with red blood cell alloimmunization. *Vox Sang*. 2014;107(2):200-3.
5. Bux J. Human neutrophil alloantigens. *Vox Sang*. 2008;94(4):277-85.
6. Insunza A, Romon I, Gonzalez-Ponte ML, Hoyos A, Pastor JM, Iriando A, et al. Implementation of a strategy to prevent TRALI in a regional blood centre. *Transfus Med*. 2004;14(2):157-64.
7. Marin L, Torio A, Muro M, Fernandez-Parra R, Minguela A, Bosch V, et al. Alloimmune neonatal neutropenia and thrombocytopenia associated with maternal anti HNA-1a, HPA-3b and HLA antibodies. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16(3):279-82.
8. Ober C. HLA and pregnancy: the paradox of the fetal allograft. *Am J Hum Genet*. 1998;62(1):1-5.
9. Gottschall JL, Triulzi DJ, Curtis B, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, et al. The frequency and specificity of human neutrophil antigen antibodies in a blood donor population. *Transfusion*. 2011;51(4):820-7.
10. van de Watering LM, Brand A, Houbiers JG, Klein Kranenburg WM, Hermans J, van de Velde C, et al. Perioperative blood transfusions, with or without allogeneic leucocytes, relate to survival, not to cancer recurrence. *Br J Surg*. 2001;88(2):267-72.
11. Bux J. Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sang*. 2005;89(1):1-10.
12. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Meurette A, et al. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(9):2804-
13. Zalpuri S, Middelburg RA, Schonewille H, de Vooght KM, le Cessie S, van der Bom JG, et al. Intensive red blood cell transfusions and risk of alloimmunization. *Transfusion*. 2014;54(2):278-84.
14. Hendrickson JE, Eisenbarth SC, Tormey CA. Red blood cell alloimmunization: new findings at the bench and new recommendations for the bedside. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(6):543-9.
15. Ryder AB, Zimring JC, Hendrickson JE. Factors Influencing RBC Alloimmunization: Lessons Learned from Murine Models. *Transfus Med Hemother*. 2014;41(6):406-19.
16. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum Genet*. 2009;126(6):729-42.
17. Daniels G. Functions of red cell surface proteins. *Vox Sang*. 2007;93(4):331-40.

-
18. Coles SM, Klein HG, Holland PV. Alloimmunization in two multitransfused patient populations. *Transfusion*. 1981;21(4):462-6.
 19. Vichinsky EP, Earles A, Johnson RA, Hoag MS, Williams A, Lubin B. Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. *N Engl J Med*. 1990;322(23):1617-21.
 20. Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, Castro O, Dosik H, Moohr J, et al. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*. 1990;76(7):1431-7.
 21. Zimring JC, Hudson KE. Cellular immune responses in red blood cell alloimmunization. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016;2016(1):452-6.
 22. Klein HG. Blood substitutes: how close to a solution? *Dev Biol (Basel)*. 2005;120:45-52.
 23. Issitt PD. Antibody screening: elimination of another piece of the test. *Transfusion*. 1999;39(3):229-30.
 24. Eder AF, Dy BA, Kennedy JM, Notari IV EP, Strupp A, Wissel ME, et al. The American Red Cross donor hemovigilance program: complications of blood donation reported in 2006. *Transfusion*. 2008;48(9):1809-19.
 25. Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfus Med Rev*. 2007;21(1):58-71.
 26. Nordvall M, Dziegiel M, Hegaard HK, Bidstrup M, Jonsbo F, Christensen B, et al. Red blood cell antibodies in pregnancy and their clinical consequences: synergistic effects of multiple specificities. *Transfusion*. 2009;49(10):2070-5.
 27. Reid ME, Hipsky CH, Velliquette RW, Lomas-Francis C, Larimore K, Olsen C. Molecular background of RH in Bastiaan, the RH:-31,-34 index case, and two novel RHD alleles. *Immunohematology*. 2012;28(3):97-103.
 28. Daniels G, Reid ME. Blood groups: the past 50 years. *Transfusion*. 2010;50(2):281-9.
 29. Frohn C, Dumbgen L, Brand JM, Gorg S, Luhm J, Kirchner H. Probability of anti-D development in D- patients receiving D+ RBCs. *Transfusion*. 2003;43(7):893-8.
 30. Davies J, Chant R, Simpson S, Powell R. Routine antenatal anti-D prophylaxis--is the protection adequate? *Transfus Med*. 2011;21(6):421-6.
 31. Noizat-Pirenne F, Tournamille C, Bierling P, Roudot-Thoraval F, Le Pennec PY, Rouger P, et al. Relative immunogenicity of Fya and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. *Transfusion*. 2006;46(8):1328-33.
 32. Stephen J, Cairns LS, Pickford WJ, Vickers MA, Urbaniak SJ, Barker RN. Identification, immunomodulatory activity, and immunogenicity of the major helper T-cell epitope on the K blood group antigen. *Blood*. 2012;119(23):5563-74.
 33. Schonewille H, Doxiadis II, Levering WH, Roelen DL, Claas FH, Brand A. HLA-DRB1 associations in individuals with single and multiple clinically relevant red blood cell antibodies. *Transfusion*. 2014;54(8):1971-80.
 34. Hendrickson JE, Chadwick TE, Roback JD, Hillyer CD, Zimring JC. Inflammation enhances consumption and presentation of transfused RBC antigens by dendritic cells. *Blood*. 2007;110(7):2736-43.
 35. Tatari-Calderone Z, Minniti CP, Kratovil T, Stojakovic M, Vollmer A, Barjaktarevic I, et al. rs660 polymorphism in Ro52 (SSA1; TRIM21) is a marker for
-

age-dependent tolerance induction and efficiency of alloimmunization in sickle cell disease. *Mol Immunol*. 2009;47(1):64-70.

36. Tatari-Calderone Z, Tamouza R, Le Boudier GP, Dewan R, Luban NL, Lasserre J, et al. The association of CD81 polymorphisms with alloimmunization in sickle cell disease. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:937846.

37. Fasano RM, Booth GS, Miles M, Du L, Koyama T, Meier ER, et al. Red blood cell alloimmunization is influenced by recipient inflammatory state at time of transfusion in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2015;168(2):291-300.

38. Papay P, Hackner K, Vogelsang H, Novacek G, Primas C, Reinisch W, et al. High risk of transfusion-induced alloimmunization of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Med*. 2012;125(7):717 e1-8.

39. Zalpuri S, Evers D, Zwaginga JJ, Schonewille H, de Vooght KM, le Cessie S, et al. Immunosuppressants and alloimmunization against red blood cell transfusions. *Transfusion*. 2014;54(8):1981-7.

40. Tormey CA, Stack G. The persistence and evanescence of blood group alloantibodies in men. *Transfusion*. 2009;49(3):505-12.

41. Winters JL, Pineda AA, Gorden LD, Bryant SC, Melton LJ, 3rd, Vamvakas EC, et al. RBC alloantibody specificity and antigen potency in Olmsted County, Minnesota. *Transfusion*. 2001;41(11):1413-20.

42. Blumberg N, Heal JM, Gettings KF. WBC reduction of RBC transfusions is associated with a decreased incidence of RBC alloimmunization. *Transfusion*. 2003;43(7):945-52.

43. Matteocci A, Pierelli L. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease and in thalassaemia: current status, future perspectives and potential role of molecular typing. *Vox Sang*. 2014;106(3):197-208.

44. Klein HG. Transfusion-associated graft-versus-host disease: less fresh blood and more gray (Gy) for an aging population. *Transfusion*. 2006;46(6):878-80.

45. Ameen R, Al-Shemmari S, Al-Humood S, Chowdhury RI, Al-Eyaadi O, Al-Bashir A. RBC alloimmunization and autoimmunization among transfusion-dependent Arab thalassemia patients. *Transfusion*. 2003;43(11):1604-10.

46. Bauer MP, Wiersum-Osselton J, Schipperus M, Vandenbroucke JP, Briet E. Clinical predictors of alloimmunization after red blood cell transfusion. *Transfusion*. 2007;47(11):2066-71.

47. Boctor FN, Ali NM, Mohandas K, Uehlinger J. Absence of D-alloimmunization in AIDS patients receiving D-mismatched RBCs. *Transfusion*. 2003;43(2):173-6.

48. Strauss RG, Cordle DG, Quijana J, Goeken NE. Comparing alloimmunization in preterm infants after transfusion of fresh unmodified versus stored leukocyte-reduced red blood cells. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1999;21(3):224-30.

49. Hendrickson JE, Saakadze N, Cadwell CM, Upton JW, Mocarski ES, Hillyer CD, et al. The spleen plays a central role in primary humoral alloimmunization to transfused mHEL red blood cells. *Transfusion*. 2009;49(8):1678-84.

50. Verduin EP, Brand A, Schonewille H. Is female sex a risk factor for red blood cell alloimmunization after transfusion? A systematic review. *Transfus Med Rev*. 2012;26(4):342-53, 53 e1-5.

-
51. Radwanski K, Garraud O, Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Payrat JM, Min K. The effects of red blood cell preparation method on in vitro markers of red blood cell aging and inflammatory response. *Transfusion*. 2013;53(12):3128-38.
 52. Thibault L, Beausejour A, de Grandmont MJ, Lemieux R, Leblanc JF. Characterization of blood components prepared from whole-blood donations after a 24-hour hold with the platelet-rich plasma method. *Transfusion*. 2006;46(8):1292-9.
 53. Jacob G, Macdougall LG, Davies P. Rhesus sensitization in Kenya Africans. *J Trop Pediatr (Lond)*. 1959;5(1):22-6.
 54. Zoutendyk A, Gordon N, Lawrence G. Haemolytic disease of the newborn; a report on a series of seventeen consecutive cases. *S Afr Med J*. 1947;21(3):97-100.
 55. Hoch J, Giers G, Bald R, Hansmann M, Hanfland P. [Antibody induction after intrauterine interventions]. *Infusionsther Transfusionsmed*. 1993;20 Suppl 2:70-3.
 56. Koelewijn JM, Vrijkotte TG, van der Schoot CE, Bonsel GJ, de Haas M. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands. *Transfusion*. 2008;48(5):941-52.
 57. Moise KJ. Fetal anemia due to non-Rhesus-D red-cell alloimmunization. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2008;13(4):207-14.
 58. Kumar S, Regan F. Management of pregnancies with RhD alloimmunisation. *BMJ*. 2005;330(7502):1255-8.
 59. Johnstone-Ayliffe C, Prior T, Ong C, Regan F, Kumar S. Early procedure-related complications of fetal blood sampling and intrauterine transfusion for fetal anemia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2012;91(4):458-62.
 60. Reid ME, Mohandas N. Red blood cell blood group antigens: structure and function. *Semin Hematol*. 2004;41(2):93-117.
 61. Schonewille H, Prinsen-Zander KJ, Reijnart M, van de Watering L, Zwaginga JJ, Meerman RH, et al. Extended matched intrauterine transfusions reduce maternal Duffy, Kidd, and S antibody formation. *Transfusion*. 2015;55(12):2912-9; quiz 1.
 62. Schonewille H, Klumper FJ, van de Watering LM, Kanhai HH, Brand A. High additional maternal red cell alloimmunization after Rhesus- and K-matched intrauterine intravascular transfusions for hemolytic disease of the fetus. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(2):143 e1-6.
 63. Vietor HE, Kanhai HH, Brand A. Induction of additional red cell alloantibodies after intrauterine transfusions. *Transfusion*. 1994;34(11):970-4.
 64. Watson WJ, Wax JR, Miller RC, Brost BC. Prevalence of new maternal alloantibodies after intrauterine transfusion for severe Rhesus disease. *Am J Perinatol*. 2006;23(3):189-92.
 65. Yang JZ, Zhang JQ, Sun LX. Mechanisms for T cell tolerance induced with granulocyte colony-stimulating factor. *Mol Immunol*. 2016;70:56-62.
 66. Taylor AL, Negus SL, Negus M, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Pathways of helper CD4 T cell allorecognition in generating alloantibody and CD8 T cell alloimmunity. *Transplantation*. 2007;83(7):931-7.
 67. Steele DJ, Laufer TM, Smiley ST, Ando Y, Grusby MJ, Glimcher LH, et al. Two levels of help for B cell alloantibody production. *J Exp Med*. 1996;183(2):699-703.
-

-
68. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI. Pathways of major histocompatibility complex allorecognition. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008;13(4):438-44.
 69. Lopes LB, Fabron-Jr A, Chiba AK, Ruiz MO, Bordin JO. Impact of using different laboratory assays to detect human leukocyte antigen antibodies in female blood donors. *Transfusion*. 2010;50(4):902-8.
 70. Devine SM, Geller RB, Lin LB, Dix SP, Holland HK, Maurer D, et al. The outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in patients with hematologic malignancies using tacrolimus (FK506) and low dose methotrexate for graft-versus-host disease prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1997;3(1):25-33.
 71. Fuller TC, Fuller AA, Golden M, Rodey GE. HLA alloantibodies and the mechanism of the antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity procedure. *Hum Immunol*. 1997;56(1-2):94-105.
 72. Reviron D, Dettori I, Ferrera V, Legrand D, Touinssi M, Mercier P, et al. HLA-DRB1 alleles and Jk(a) immunization. *Transfusion*. 2005;45(6):956-9.
 73. Picard C, Frassati C, Basire A, Buhler S, Galicher V, Ferrera V, et al. Positive association of DRB1 04 and DRB1 15 alleles with Fya immunization in a Southern European population. *Transfusion*. 2009;49(11):2412-7.
 74. Hall AM, Cairns LS, Altmann DM, Barker RN, Urbaniak SJ. Immune responses and tolerance to the RhD blood group protein in HLA-transgenic mice. *Blood*. 2005;105(5):2175-9.
 75. Kormoczi GF, Mayr WR. Responder individuality in red blood cell alloimmunization. *Transfus Med Hemother*. 2014;41(6):446-51.
 76. Verduin EP, Brand A, van de Watering LM, Roelen DL, Kanhai HH, Doxiadis, II, et al. The HLA-DRB1*15 phenotype is associated with multiple red blood cell and HLA antibody responsiveness. *Transfusion*. 2016;56(7):1849-56.
 77. Sippert EA, Visentainer JE, Alves HV, Rodrigues C, Gilli SC, Addas-Carvalho M, et al. Red blood cell alloimmunization in patients with sickle cell disease: correlation with HLA and cytokine gene polymorphisms. *Transfusion*. 2017;57(2):379-89.
 78. Stroncek DF, Fadeyi E, Adams S. Leukocyte antigen and antibody detection assays: tools for assessing and preventing pulmonary transfusion reactions. *Transfus Med Rev*. 2007;21(4):273-86.
 79. Reil A, Sachs UJ, Siahianidou T, Flesch BK, Bux J. HNA-1d: a new human neutrophil antigen located on Fc gamma receptor IIIb associated with neonatal immune neutropenia. *Transfusion*. 2013;53(10):2145-51.
 80. van den Tooren-de Groot R, Ottink M, Huiskes E, van Rossum A, van der Voorn B, Slomp J, et al. Management and outcome of 35 cases with foetal/neonatal alloimmune neutropenia. *Acta Paediatr*. 2014;103(11):e467-74.
 81. de Haas M, Kleijer M, van Zwieten R, Roos D, von dem Borne AE. Neutrophil Fc gamma RIIIb deficiency, nature, and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families. *Blood*. 1995;86(6):2403-13.
 82. Stroncek DF, Skubitz KM, McCullough JJ. Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1. *Blood*. 1990;75(3):744-55.
 83. Lalezari P, Murphy GB, Allen FH, Jr. NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *J Clin Invest*. 1971;50(5):1108-15.
 84. Wolff J, Brendel C, Fink L, Bohle RM, Kissel K, Bux J. Lack of NB1 GP (CD177/HNA-2a) gene transcription in NB1 GP- neutrophils from NB1 GP-
-

- expressing individuals and association of low expression with NB1 gene polymorphisms. *Blood*. 2003;102(2):731-3.
85. Moritz E, Chiba AK, Kimura EY, Albuquerque D, Guirao FP, Yamamoto M, et al. Molecular studies reveal that A134T, G156A and G1333A SNPs in the CD177 gene are associated with atypical expression of human neutrophil antigen-2. *Vox Sang*. 2010;98(2):160-6.
86. Greinacher A, Wesche J, Hammer E, Furll B, Volker U, Reil A, et al. Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a. *Nat Med*. 2010;16(1):45-8.
87. Curtis BR, Cox NJ, Sullivan MJ, Konkashbaev A, Bowens K, Hansen K, et al. The neutrophil alloantigen HNA-3a (5b) is located on choline transporter-like protein 2 and appears to be encoded by an R>Q154 amino acid substitution. *Blood*. 2010;115(10):2073-6.
88. Davoren A, Curtis BR, Shulman IA, Mohrbacher AF, Bux J, Kwiatkowska BJ, et al. TRALI due to granulocyte-agglutinating human neutrophil antigen-3a (5b) alloantibodies in donor plasma: a report of 2 fatalities. *Transfusion*. 2003;43(5):641-5.
89. Bux J, Sachs UJ. Pulmonary transfusion reactions. *Transfus Med Hemother*. 2008;35(5):337-45.
90. Barnard RD. Indiscriminate transfusion: a critique of case reports illustrating hypersensitivity reactions. *N Y State J Med*. 1951;51(20):2399-402.
91. Popovsky MA, Moore SB. Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*. 1985;25(6):573-7.
92. Webert KE. Splitting versus lumping: reconsidering the definition of transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*. 2015;55(5):927-9.
93. de Haas M, Muniz-Diaz E, Alonso LG, van der Kolk K, Kos M, Buddelmeijer L, et al. Neutrophil antigen 5b is carried by a protein, migrating from 70 to 95 kDa, and may be involved in neonatal alloimmune neutropenia. *Transfusion*. 2000;40(2):222-7.
94. Lalezari P, Bernard GE. Identification of a Specific Leukocyte Antigen: Another Presumed Example of 5b. *Transfusion*. 1965;5:135-42.
95. Sachs UJ, Chavakis T, Fung L, Lohrenz A, Bux J, Reil A, et al. Human alloantibody anti-Mart interferes with Mac-1-dependent leukocyte adhesion. *Blood*. 2004;104(3):727-34.
96. Fung YL, Pitcher LA, Willett JE, Reed C, Mison L, Bux J, et al. Alloimmune neonatal neutropenia linked to anti-HNA-4a. *Transfus Med*. 2003;13(1):49-52.
97. Hartman KR, Wright DG. Identification of autoantibodies specific for the neutrophil adhesion glycoproteins CD11b/CD18 in patients with autoimmune neutropenia. *Blood*. 1991;78(4):1096-104.
98. Sachs UJ, Reil A, Bauer C, Bux J, Bein G, Santoso S. Genotyping of human neutrophil antigen-5a (Ond). *Transfus Med*. 2005;15(2):115-7.
99. Porcelijn L, Abbink F, Terraneo L, Onderwater-vd Hoogen L, Huiskes E, de Haas M. Neonatal alloimmune neutropenia due to immunoglobulin G antibodies against human neutrophil antigen-5a. *Transfusion*. 2011;51(3):574-7.
100. Bux J, Chapman J. Report on the second international granulocyte serology workshop. *Transfusion*. 1997;37(9):977-83.
101. Reil A, Keller-Stanislawski B, Gunay S, Bux J. Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors. *Vox Sang*. 2008;95(4):313-7.

-
102. Silliman CC, Curtis BR, Kopko PM, Khan SY, Kelher MR, Schuller RM, et al. Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event in vitro model. *Blood*. 2007;109(4):1752-5.
 103. Freda VJ. The Rh Problem in Obstetrics and a New Concept of Its Management Using Amniocentesis and Spectrophotometric Scanning of Amniotic Fluid. *Am J Obstet Gynecol*. 1965;92:341-74.
 104. Baiochi E, Nardozza LM. [Alloimmunization]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;31(6):311-9.
 105. Sebring ES, Polesky HF. Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects. *Transfusion*. 1990;30(4):344-57.
 106. Solola A, Sibai B, Mason JM. Irregular antibodies: an assessment of routine prenatal screening. *Obstet Gynecol*. 1983;61(1):25-30.
 107. Lee CK, Ma ES, Tang M, Lam CC, Lin CK, Chan LC. Prevalence and specificity of clinically significant red cell alloantibodies in Chinese women during pregnancy--a review of cases from 1997 to 2001. *Transfus Med*. 2003;13(4):227-31.
 108. Polesky HF. Blood group antibodies in prenatal sera. Results of screening 43,000 individuals. *Minn Med*. 1967;50(4):601-3.
 109. Bollason G, Hjartardottir H, Jonsson T, Gudmundsson S, Kjartansson S, Halldorsdottir AM. Red blood cell alloimmunization in pregnancy during the years 1996-2015 in Iceland: a nation-wide population study. *Transfusion*. 2017.
 110. Karim F, Moiz B, Kamran N. Risk of maternal alloimmunization in Southern Pakistan - a study in a cohort of 1000 pregnant women. *Transfus Apher Sci*. 2015;52(1):99-102.
 111. Starcevic M, Mataija M, Sovic D, Dodig J, Matijevic R, Kukuruzovic M. [The importance of antenatal immunoprophylaxis for prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn]. *Acta Med Croatica*. 2011;65(1):49-54.
 112. Gunduz E, Meltem Akay O, Teke HU, Gulbas Z. Incidence of red-cell alloimmunization due to non-anti-D antibodies during pregnancy: an experience from Turkey. *Transfus Apher Sci*. 2010;43(3):261-3.
 113. Geifman-Holtzman O, Wojtowycz M, Kosmas E, Artal R. Female alloimmunization with antibodies known to cause hemolytic disease. *Obstet Gynecol*. 1997;89(2):272-5.
 114. Chen C, Tan J, Wang L, Han B, Sun W, Zhao L, et al. Unexpected red blood cell antibody distributions in Chinese people by a systematic literature review. *Transfusion*. 2016;56(4):975-9.
 115. Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, Steele WR, et al. The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion*. 2009;49(9):1825-35.
 116. Brantley SG, Ramsey G. Red cell alloimmunization in multitransfused HLA-typed patients. *Transfusion*. 1988;28(5):463-6.
 117. Takanashi M, Atsuta Y, Fujiwara K, Kodo H, Kai S, Sato H, et al. The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood*. 2010;116(15):2839-46.
 118. Yoshihara S, Maruya E, Taniguchi K, Kaida K, Kato R, Inoue T, et al. Risk and prevention of graft failure in patients with preexisting donor-specific HLA
-

- antibodies undergoing unmanipulated haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(4):508-15.
119. Densmore TL, Goodnough LT, Ali S, Dynis M, Chaplin H. Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. *Transfusion*. 1999;39(1):103-6.
120. Powers A, Stowell CP, Dzik WH, Saidman SL, Lee H, Makar RS. Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost-effective transfusion-related acute lung injury prevention strategy. *Transfusion*. 2008;48(12):2549-58.
121. Pollack W, Ascari WQ, Crispen JF, O'Connor RR, Ho TY. Studies on Rh prophylaxis. II. Rh immune prophylaxis after transfusion with Rh-positive blood. *Transfusion*. 1971;11(6):340-4.
122. Pollack W, Ascari WQ, Kochesky RJ, O'Connor RR, Ho TY, Tripodi D. Studies on Rh prophylaxis. 1. Relationship between doses of anti-Rh and size of antigenic stimulus. *Transfusion*. 1971;11(6):333-9.
123. Jakobowicz R, Williams L, Silberman F. Immunization of Rh-negative volunteers by repeated injections of very small amounts of Rh-positive blood. *Vox Sang*. 1972;23(4):376-81.
124. Xia W, Ye X, Xu X, Chen D, Deng J, Chen Y, et al. The prevalence of leucocyte alloantibodies in blood donors from South China. *Transfus Med*. 2015;25(6):385-92.
125. Murphy MF. Surveillance of transfusion errors: putting data to use in the U.K. *Dev Biol (Basel)*. 2005;120:179-87.
126. Bux J, Cassens U, Dielschneider T, Duchscherer M, Edel E, Eichler H, et al. Tolerance of granulocyte donors towards granulocyte colony-stimulating factor stimulation and of patients towards granulocyte transfusions: results of a multicentre study. *Vox Sang*. 2003;85(4):322-5.
127. van Stein D, Beckers EA, Peters AL, Porcelijn L, Middelburg RA, Lardy NM, et al. Underdiagnosing of antibody-mediated transfusion-related acute lung injury: evaluation of cellular-based versus bead-based techniques. *Vox Sang*. 2016;111(1):71-8.
128. Warkentin TE, Greinacher A, Bux J. The transfusion-related acute lung injury controversy: lessons from heparin-induced thrombocytopenia. *Transfusion*. 2015;55(5):1128-34.
129. Curtis BR, Reno C, Aster RH. Neonatal alloimmune neutropenia attributed to maternal immunoglobulin G antibodies against the neutrophil alloantigen HNA-1c (SH): a report of five cases. *Transfusion*. 2005;45(8):1308-13.
130. Norcia AM, Sugano EY, Chiba AK, Moritz E, Guirao FP, Yamamoto M, et al. Human neutrophil alloantigen-1a, -1b, -2, -3a and -4a frequencies in Brazilians. *Tissue Antigens*. 2009;74(5):404-7.
131. Calhoun DA, Christensen RD, Edstrom CS, Juul SE, Ohls RK, Schibler KR, et al. Consistent approaches to procedures and practices in neonatal hematology. *Clin Perinatol*. 2000;27(3):733-53.
132. Bux J, Kissel K, Nowak K, Spengel U, Mueller-Eckhardt C. [Clinical importance of granulocyte-specific antibodies]. *Beitr Infusionsther*. 1992;30:420-4.
133. Fromont P, Bettaieb A, Skouri H, Floch C, Poulet E, Duedari N, et al. Frequency of the polymorphonuclear neutrophil Fc gamma receptor III deficiency in the French population and its involvement in the development of neonatal alloimmune neutropenia. *Blood*. 1992;79(8):2131-4.

-
134. Kissel K, Hofmann C, Gittinger FS, Daniels G, Bux J. HNA-1a, HNA-1b, and HNA-1c (NA1, NA2, SH) frequencies in African and American Blacks and in Chinese. *Tissue Antigens*. 2000;56(2):143-8.
 135. Schulz U, Reil A, Kiefel V, Bux J, Moog R. Evaluation of a new microbeads assay for granulocyte antibody detection. *Transfusion*. 2017;57(1):70-81.
 136. Bayat B, Tjahjono Y, Berghofer H, Werth S, Deckmyn H, De Meyer SF, et al. Choline Transporter-Like Protein-2: New von Willebrand Factor-Binding Partner Involved in Antibody-Mediated Neutrophil Activation and Transfusion-Related Acute Lung Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(7):1616-22.
 137. Simtong P, Puapairoj C, Leelayuwat C, Santoso S, Romphruk AV. Assessment of HNA alloimmunisation risk in Northeastern Thais, Burmese and Karen. *Transfus Med*. 2017.
 138. Cardone JD, Bordin JO, Chiba AK, Norcia AM, Vieira-Filho JP. Gene frequencies of the HNA-4a and -5a neutrophil antigens in Brazilian persons and a new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for HNA-5a genotyping. *Transfusion*. 2006;46(9):1515-20.
 139. Nguyen XD, Flesch B, Sachs UJ, Kroll H, Kluter H, Muller-Steinhardt M. Rapid screening of granulocyte antibodies with a novel assay: flow cytometric granulocyte immunofluorescence test. *Transfusion*. 2009;49(12):2700-8.
 140. McPherson ME, Anderson AR, Castillejo MI, Hillyer CD, Bray RA, Gebel HM, et al. HLA alloimmunization is associated with RBC antibodies in multiply transfused patients with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(4):552-8.
 141. Younesi MR, Louni Aligoudarzi S, Bigdeli R, Lashgari M, Mazaheri H, Asgari V. Alloimmunization against platelets, granulocytes and erythrocytes in multi-transfused patients in Iranian population. *Transfus Apher Sci*. 2016;55(2):205-11.
 142. Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM. RBC antibody persistence. *Transfusion*. 2000;40(9):1127-31.
 143. Davenport RD, Patel NC. Zonisamide as treatment for seizures. *Nurse Pract*. 2007;32(4):15-7.
 144. Chu VT, Berek C. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol Rev*. 2013;251(1):177-88.
 145. Tangye SG. Staying alive: regulation of plasma cell survival. *Trends Immunol*. 2011;32(12):595-602.
 146. Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med*. 2007;357(19):1903-15.
 147. Ekstrom N, Ahman H, Palmu A, Gronholm S, Kilpi T, Kayhty H, et al. Concentration and high avidity of pneumococcal antibodies persist at least 4 years after immunization with pneumococcal conjugate vaccine in infancy. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(7):1034-40.
-

Abstract

Background: Leukocyte antibodies against HLA class I, class II and human neutrophil antigens (HNA) are formed from exposure to these antigens by transfusion, pregnancy or transplant, and may be associated with transfusion-related acute lung injury (TRALI) and immune neutropenias. Risk factors for acquisition of leukocyte antibodies are yet to be determined and present great importance for the prevention of severe and fatal transfusion reactions. Aims: To compare the prevalence of leukocyte antibodies in women with or without red blood cell (RBC) alloimmunization.

Methods: This transversal study included women whose only stimulus to alloimmunization was pregnancy, with no transfusion history. We analyzed 147 blood samples from women with RBC alloimmunization, confirmed by the investigation and identification of RBC antibodies by the DG Gel-Card technique (Grifols-Spain). The control group consisted of 563 blood donors women with pregnancy history but without RBC alloimmunization. The identification of leukocyte antibodies was performed by: 1) granulocyte agglutination test (GAT), 2) white cell immunofluorescence test (Flow-WIFT), both tests using a panel of neutrophils obtained from three donors with previous HNA genotyping, and 3) bead-based assay - LABScreen Multi (LSM) (One Lambda), capable of detecting antibodies against HNA-1a, -1b, -1c, -2, -3a, -3b, -4a, -5a, -5b and HLA class I and II antigens. The identified HNA antibodies were confirmed by genotyping the corresponding antigen.

Results: In the cohort of women with RBC alloimmunization we found 178 RBC antibodies: anti-D (anti-Le^a (25.3%), anti-D (24.7%), anti-C (9.0%), anti-E (9.0%), anti-K (5.6%) and other antibodies (26.4%). We identified 74/147 (50.3%) samples with anti-HLA antibodies and 11/147 (7.5%) samples with anti-HNA antibodies with the following specificities: 5/11 anti-HNA-1a, 2/11 anti-FCRγIIIb and 4/11 anti-HNA-3b. In the control group, we found 238/563 (42.3%) samples with anti-HLA and 24/563 (4.3%) samples with anti-HNA: 8/24 anti-HNA-1a, 1/24 anti-HNA-1c, 3/24 anti-HNA-2, 2/24 anti-HNA-3a, 5/24 anti-HNA-3b, 3/24 anti-HNA-5a and 2/24 anti-HNA-5b. Regarding the gestational history, 82/147 (55.8%) women in the group with RBC alloimmunization and 493/563 (87.6%) in control group had two or more pregnancies. The statistical analysis was performed in total samples, regardless the number of pregnancies, however no significant difference was observed in the prevalence rate of anti-HNA and anti-HLA between the two groups ($p=0.10$ and $p=0.07$, respectively). When the analysis was stratified including only multiparous women (two or more pregnancies) the prevalence of HNA alloimmunization was statistically significant in the group of women with RBC alloimmunization: 9/82 (11%) versus 23/493 (4.7%) blood donors, $p=0.02$, OR=2.52 (95% CI=1.15-3.79). Similarly a higher prevalence of HLA antibodies in the group of multiparous women with RBC alloimmunization was also observed: 51/82 (62.2%) versus 224/493 (45.4%), $p=0.004$, OR=1.97 (95% CI=1.18-2.71).

Conclusions: The data show that RBC alloimmunization was significantly associated with the development of antibodies against leukocytes (anti-HNA and anti-HLA). A higher frequency of HNA alloimmunization (11%) observed in the group of multiparous women with RBC alloimmunization compared to the control group (4.7%), suggest that they are better immune responders and that they react strongly to allogeneic exposure. Anti-HLA antibodies have often been found in plasma in southeastern Brazil female blood donors (42.3%), and are statistically associated with the number of pregnancy ($p<0.001$).

TRABALHOS APRESENTADOS

Trabalho 1. Martins JO, Moritz E, Abbas S, Chiba AK, Lopes LB, Barros MMO, Costa SSM, Barbosa ES, Bordin JO. Frequência de anticorpos granulocitários em gestantes com aloimunização eritrocitária. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2016, Florianópolis. HEMO 2016, 2016. p. 326-326

OBJETIVO: Investigar a frequência de anticorpos granulocitários em gestantes com aloimunização eritrocitária. **METODOLOGIA:** Foram analisadas 55 amostras de sangue de gestantes sem histórico transfusional e com aloimunização eritrocitária. As técnicas utilizadas para a pesquisa e identificação de anticorpos granulocitários foram: Teste de Imunofluorescência de Granulócitos (Flow-GIFT), usando neutrófilos de amostras recém-coletadas de três doadores genotipados para compor o painel de antígenos HNA; Ensaio com microesferas contendo antígenos purificados - LabScreen Multi (One Lambda), capaz de investigar a presença de anticorpos contra antígenos HNA-1a, -1b, -1c, -2, -3a, -3b, -4a, -5a, -5b, HLA classe I e II. Os resultados da identificação dos anticorpos granulocitários foram confirmados pela genotipagem da amostra correspondente. Para a pesquisa e identificação de anticorpos eritrocitários foi utilizada a técnica de gel Liss Coombs. **RESULTADOS:** Foram analisadas 55 amostras de sangue de gestantes sem antecedente transfusional e com aloimunização eritrocitária. A média de idade foi de 29 ± 8 anos. Das 55 gestantes, foram encontrados 67 anticorpos eritrocitários, sendo: anti-D (28,3%), anti-Lea (29,3%), anti-M (8,9%), Anti-C (8,9%) e outros anticorpos (24,5%). Em relação ao histórico gestacional, 39 (71%) gestantes tinham mais de uma gestação, e 20 (40%) relataram ter tido no mínimo 1 aborto. Foram encontradas 33 (60%) amostras positivas contra anticorpos anti-HLA e 5 (9,0%) amostras positivas contra anticorpos anti-HNA. Com relação à especificidade dos anticorpos granulocitários, 3/5 foram identificados como anticorpo anti-HNA 1a, 1/5 anti-HNA 3b e 1/5 anti-HNA 5b. **DISCUSSÃO:** Aloimunização eritrocitária é descrita como uma reação do sistema imune do paciente a antígenos estranhos presentes principalmente durante a gestação e transfusões sanguíneas. Os indivíduos que formam aloanticorpos eritrocitários podem mais facilmente desenvolver anticorpos contra outras células sanguíneas, como leucócitos e granulócitos, considerados fundamentais na patogênese da lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI). Em 2014, Heinzl e colaboradores realizaram um estudo com mulheres multíparas com aloimunização eritrocitária, mostrando que a presença de anticorpos granulocitários também está significativamente associada com a presença de anticorpos eritrocitários em mulheres com história de gravidez, observando uma frequência de 2,1% de anticorpos anti-HNA contra 0,5% no grupo controle. O presente estudo confirma os resultados encontrados no trabalho mencionado, porém com uma frequência maior (9,0%), o que pode ser explicado pelo fato de que as mulheres foram aloimunizadas apenas pela gestação, indicando que elas são melhores respondedoras imunológicas e que reagem fortemente à exposição alogênica. No momento da coleta da amostra de sangue, as mulheres estavam gestantes, indicando que o título dos anticorpos poderia estar elevado, auxiliando a detecção do aloanticorpos formado. **CONCLUSÃO:** A frequência de anticorpos granulocitários em gestantes não transfundidas e com aloimunização eritrocitária é de 9% (contra 1% na população geral) sugerindo que a formação de aloanticorpos pode estar relacionada a respondedores imunológicos que reagem fortemente à exposição alogênica.

Trabalho 2. Martins JO, Moritz E, Abbas S, Lopes LB, Chiba AK, Barros MMO, Bordin JO. Leukocyte antibodies in pregnant women with red blood cell alloimmunization. In: 27th Regional Congress of the ISBT, 2017, Copenhagen. Vox Sanguinis, 2017. v. 112. p. 559-559.

Background: Leukocyte antibodies against human leukocyte antigens (HLA) class I, class II and human neutrophil antigens (HNA) are formed from exposure to these antigens by transfusion, gestation or transplant, and are associated with transfusion-related acute lung injury (TRALI) and neonatal alloimmune neutropenia (NAN). Besides the antibody prevalence, also risk factors for acquisition of leukocyte antibodies are yet to be determined and present great importance for the prevention of severe and fatal transfusion reactions. **Aims:** To compare the prevalence of leukocyte antibodies in pregnant women with red blood cells (RBC) alloimmunization and in multiparous blood donors without RBC alloimmunization. **Methods:** We analyzed 141 blood samples from pregnant women with RBC alloimmunization and no transfusion history. In this cohort, the investigation and identification of RBC antibodies were performed by the DG Gel-Card technique (Grifols-Spain). For the control group, 467 multiparous blood donors (2 or more pregnancies) without RBC alloimmunization were included. The techniques used for the investigation and identification of leukocyte antibodies were: 1) granulocyte agglutination test (GAT), 2) white cell immunofluorescence test (Flow-WIFT), both tests using a panel of neutrophils obtained from three donors with HNA genotyping, and 3) bead-based assay - LABScreen Multi (LSM) (One Lambda), capable of detecting antibodies against HNA-1a, -1b, -1c, -2, -3a, -3b, -4a, -5a, -5b and HLA class I and II antigens. The identified HNA antibodies were confirmed by genotyping of the corresponding antigen. **Results:** In the cohort of alloimmunized pregnant women, we found 175 RBC antibodies: anti-D (32.4%), anti-Lea (21.7%), anti-C (9.1%), anti-E (8.5%), and other antibodies (28.3%). Regarding the gestational history, 74 (52.4%) women had two or more pregnancies. We identified 70/141 (49.6%) samples with anti-HLA antibodies and 10/141 (7.0%) samples with anti-HNA antibodies with the following specificities: 4/10 anti-HNA-1a, 2/10 anti-FCγRIIIb and 4/10 anti-HNA-3b. In the control group, we found 199/467 (42.6%) samples with anti-HLA and 23/467 (4.9%) samples with anti-HNA: 7/23 anti-HNA-1a, 1/23 anti-HNA-1c, 3/23 anti-HNA-2, 2/23 anti-HNA-3a, 5/23 anti-HNA-3b, 3/23 anti-HNA-5a and 2/23 anti-HNA-5b. Statistical analysis was performed with paired samples, and only multiparous women in both groups were selected. 9/74 (12.1%) multiparous pregnant women with RBC and HNA alloimmunization were compared with 23/467 (4.9%) multiparous blood donors with HNA alloimmunization only, and a significant difference was observed between the two groups [$p=0.02$, $OR=2.673$ (95% CI, 1,185-6,030)]. **Summary / Conclusions:** RBC alloimmunization was shown to be a significant risk factor ($p=0.02$, $OR=2.7$) for the development of antibodies against other blood cells, such as leukocytes and granulocytes, considered to be fundamental in the pathogenesis of TRALI. A high frequency of HNA alloimmunization (12.1%) was observed in RBC alloimmunized group versus 4.9% in the control group, suggesting that they are better immune responders and that they react strongly to allogeneic exposure.

Trabalhos aceitos para apresentação

Trabalho 3. Martins JO, Moritz E, Abbas SA, Lopes LB, Chiba A, Langhi D, Barros MMO, Bordin JO. HLA and HNA antibodies are more prevalent in multiparous women with red blood cell alloimmunization. ASH, 2017.

Background: Leukocyte antibodies against HLA class I, class II and human neutrophil antigens (HNA) are formed from exposure to these antigens by transfusion, pregnancy or transplant, and may be associated with transfusion-related acute lung injury (TRALI) and immune neutropenias. Risk factors for acquisition of leukocyte antibodies are yet to be determined and present great importance for the prevention of severe and fatal transfusion reactions. **Aims:** To compare the prevalence of leukocyte antibodies in women with or without red blood cell (RBC) alloimmunization. **Methods:** This transversal study included women whose only stimulus to alloimmunization was pregnancy, with no transfusion history. We analyzed 147 blood samples from women with RBC alloimmunization, confirmed by the investigation and identification of RBC antibodies by the DG Gel-Card technique (Grifols-Spain). The control group consisted of 563 blood donors women with pregnancy history but without RBC alloimmunization. The identification of leukocyte antibodies was performed by: 1) granulocyte agglutination test (GAT), 2) white cell immunofluorescence test (Flow-WIFT), both tests using a panel of neutrophils obtained from three donors with previous HNA genotyping, and 3) bead-based assay - LABScreen Multi (LSM) (One Lambda), capable of detecting antibodies against HNA-1a, -1b, -1c, -2, -3a, -3b, -4a, -5a, -5b and HLA class I and II antigens. The identified HNA antibodies were confirmed by genotyping the corresponding antigen. **Results:** In the cohort of women with RBC alloimmunization we found 179 RBC antibodies: anti-D (30.7%), anti-Lea (21.2%), anti-C (15.1%), anti-E (8.9%), anti-K (5.6%), anti-M (5.6%) and other antibodies (12.8%). We identified 74/147 (50.3%) samples with anti-HLA antibodies and 11/147 (7.5%) samples with anti-HNA antibodies with the following specificities: 5/11 anti-HNA-1a, 2/11 anti-FCyRIIb and 4/11 anti-HNA-3b. In the control group, we found 238/563 (42.3%) samples with anti-HLA and 24/563 (4.3%) samples with anti-HNA: 8/24 anti-HNA-1a, 1/24 anti-HNA-1c, 3/24 anti-HNA-2, 2/24 anti-HNA-3a, 5/24 anti-HNA-3b, 3/24 anti-HNA-5a and 2/24 anti-HNA-5b. Regarding the gestational history, 82/147 (55.8%) women in the group with RBC alloimmunization and 493/563 (87.6%) in control group had two or more pregnancies. The statistical analysis was performed in total samples, regardless the number of pregnancies, however no significant difference was observed in the prevalence rate of anti-HNA and anti-HLA between the two groups ($p=0.10$ and $p=0.07$, respectively). When the analysis was stratified including only multiparous women (two or more pregnancies) the prevalence of HNA alloimmunization was statistically significant in the group of women with RBC alloimmunization: 9/82 (11%) *versus* 23/493 (4.7%) blood donors, $p=0.02$, OR=2.52 (95% CI=1.15-3.79). Similarly a higher prevalence of HLA antibodies in the group of multiparous women with RBC alloimmunization was also observed: 51/82 (62.2%) *versus* 224/493 (45.4%), $p=0.004$, OR=1.97 (95% CI=1.18-2.71).

Conclusions: The data show that RBC alloimmunization was significantly associated with the development of antibodies against leukocytes (anti-HNA and anti-HLA). A higher frequency of HNA alloimmunization (11%) observed in the group of multiparous women with RBC alloimmunization compared to the control group (4.7%), suggest that they are better immune responders and that they react strongly to allogeneic exposure.

Trabalho 4. Martins JO, Moritz E, Abbas SA, Lopes LB, Chiba A, Langhi D, Barros MMO, Bordin JO. HLA and HNA antibodies are more prevalent in multiparous women with red blood cell alloimmunization. HEMO, 2017.

Background: Leukocyte antibodies against HLA class I, class II and human neutrophil antigens (HNA) are formed from exposure to these antigens by transfusion, pregnancy or transplant, and may be associated with transfusion-related acute lung injury (TRALI) and immune neutropenias. Risk factors for acquisition of leukocyte antibodies are yet to be determined and present great importance for the prevention of severe and fatal transfusion reactions. **Aims:** To compare the prevalence of leukocyte antibodies in women with or without red blood cell (RBC) alloimmunization. **Methods:** This transversal study included women whose only stimulus to alloimmunization was pregnancy, with no transfusion history. We analyzed 147 blood samples from women with RBC alloimmunization, confirmed by the investigation and identification of RBC antibodies by the DG Gel-Card technique (Grifols-Spain). The control group consisted of 563 blood donors women with pregnancy history but without RBC alloimmunization. The identification of leukocyte antibodies was performed by: 1) granulocyte agglutination test (GAT), 2) white cell immunofluorescence test (Flow-WIFT), both tests using a panel of neutrophils obtained from three donors with previous HNA genotyping, and 3) bead-based assay - LABScreen Multi (LSM) (One Lambda), capable of detecting antibodies against HNA-1a, -1b, -1c, -2, -3a, -3b, -4a, -5a, -5b and HLA class I and II antigens. The identified HNA antibodies were confirmed by genotyping the corresponding antigen. **Results:** In the cohort of women with RBC alloimmunization we found 179 RBC antibodies: anti-D (30.7%), anti-Lea (21.2%), anti-C (15.1%), anti-E (8.9%), anti-K (5.6%), anti-M (5.6%) and other antibodies (12.8%). We identified 74/147 (50.3%) samples with anti-HLA antibodies and 11/147 (7.5%) samples with anti-HNA antibodies with the following specificities: 5/11 anti-HNA-1a, 2/11 anti-FCγRIIIb and 4/11 anti-HNA-3b. In the control group, we found 238/563 (42.3%) samples with anti-HLA and 24/563 (4.3%) samples with anti-HNA: 8/24 anti-HNA-1a, 1/24 anti-HNA-1c, 3/24 anti-HNA-2, 2/24 anti-HNA-3a, 5/24 anti-HNA-3b, 3/24 anti-HNA-5a and 2/24 anti-HNA-5b. Regarding the gestational history, 82/147 (55.8%) women in the group with RBC alloimmunization and 493/563 (87.6%) in control group had two or more pregnancies. The statistical analysis was performed in total samples, regardless the number of pregnancies, however no significant difference was observed in the prevalence rate of anti-HNA and anti-HLA between the two groups ($p=0.10$ and $p=0.07$, respectively). When the analysis was stratified including only multiparous women (two or more pregnancies) the prevalence of HNA alloimmunization was statistically significant in the group of women with RBC alloimmunization: 9/82 (11%) *versus* 23/493 (4.7%) blood donors, $p=0.02$, OR=2.52 (95% CI=1.15-3.79). Similarly a higher prevalence of HLA antibodies in the group of multiparous women with RBC alloimmunization was also observed: 51/82 (62.2%) *versus* 224/493 (45.4%), $p=0.004$, OR=1.97 (95% CI=1.18-2.71).

Conclusions: The data show that RBC alloimmunization was significantly associated with the development of antibodies against leukocytes (anti-HNA and anti-HLA). A higher frequency of HNA alloimmunization (11%) observed in the group of multiparous women with RBC alloimmunization compared to the control group (4.7%), suggest that they are better immune responders and that they react strongly to allogeneic exposure.

Trabalho 5. Martins JO, Moritz E, Abbas SA, Lopes LB, Chiba A, Langhi

D, Bordin JO. Fenótipo HNA-1 *null*: Formação de anticorpos anti-FcγRIIIB e envolvimento em neutropenia neonatal. HEMO, 2017.

O fenótipo HNA-1 *null* é resultado de uma deleção do gene FCGR3B, que codifica o receptor FcRIIb de neutrófilos e os epítomos do sistema HNA-1 (1a, 1b, 1c e 1d). Indivíduos HNA-1 *null* podem formar anticorpos anti-FcRIIb, que apesar de raros, foram associados com neutropenia aloimune neonatal (NAN) grave. NAN resulta da aloimunização materna contra antígenos HNA, ocorrendo ao nascimento ou em até 3 dias de vida, e apresenta contagem de neutrófilos $<1500 \times 10^6/L$. **Objetivos:** Relatar 2 casos de HNA-1 *null* com formação de anti-FcRIIb e sua associação com NAN. **Métodos:** Os indivíduos HNA-1 *null* foram provenientes de estudo prévio que investigou aloimunização HNA em 147 gestantes com aloimunização eritrocitária. A identificação dos anticorpos HNA foi realizada pelos testes: LABScreen Multi (One Lambda), que utiliza microesferas revestidas com antígenos HNA e HLA purificados; e Testes de Aglutinação e Imunofluorescência de Granulócitos (GAT e GIFT), que usam neutrófilos frescos para compor o painel de antígenos HNA. Os anti-HNA identificados foram confirmados por genotipagem HNA-1 por PCR-SSP. Os 2 casos de HNA-1 *null* encontrados, cujas gestantes apresentavam anti-FcRIIb, foram submetidos à estudo familiar, após o nascimento, com genotipagem HNA-1 do pai e RN. **Resultados:** Caso 1 : Mãe primigesta, brasileira, sem histórico de abortos e transfusão, apresentou anti-FcRIIb e anti-HLA I na triagem de anticorpos leucocitários. A genotipagem do pai e RN confirmaram a presença do antígeno HNA-1b/1b justificando a aloimunização materna. A mãe não apresentou complicações na gestação e o RN evoluiu bem. Não foi realizado hemograma ao nascimento, e após 4 meses, o bebê não apresentava neutropenia. Caso 2 : Mãe na quarta gestação, natural de Gana, sem histórico de abortos, recebeu transfusão nas duas últimas gestações, e apresentou anti-FcRIIb e anti-HLA I e II na triagem de anticorpos leucocitários. A genotipagem do pai e RN confirmaram a presença do antígeno HNA-1b/1c justificando a aloimunização materna. Nesta última gestação, a mãe apresentou Síndrome HELLP e o RN nasceu com icterícia grave devido aos anticorpos maternos anti-D e anti-C. As contagens de neutrófilos realizadas no RN foram: 2ºdia de vida – $4020 \times 10^6/L$; 3ºdia – $1860 \times 10^6/L$; 7ºdia – $5092 \times 10^6/L$; 8º- $6792 \times 10^6/L$; e 4 meses – $6270 \times 10^6/L$. O RN ficou internado por 26 dias e não apresentou sequelas. **Conclusão:** O HNA-1 (FcRIIb) é altamente imunogênico, estando envolvido com neutropenia imunes e TRALI. Apesar da frequência de indivíduos HNA-1 *null* ser baixa (variando de 0,1% em caucasianos a 2,4% em africanos), mulheres aloimunizadas pelo HNA-1 podem causar NAN em seus RNs. No caso 1, a neutropenia não pode ser confirmada, por não ter sido requerido hemograma ao nascimento, entretanto, no caso 2, o RN apresentou neutropenia no terceiro dia de vida ($1860 \times 10^6/L$), com queda de neutrófilos considerável devido ao anti-FcRIIb materno. Como o RN precisou de uma exsanguinotransfusão, por ter tido hemólise, a neutropenia foi tratada junto com outras complicações do RN, e por isso, nesse caso de NAN, os neutrófilos não atingiram valores inferiores a $1500 \times 10^6/L$. Assim, apesar de raro, mães HNA-1 *null* podem formar anti-FcRIIb com risco de NAN em seus RNs. Os casos devem ser orientados para prevenir o desenvolvimento da NAN em futuras gestações.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2a ed. São Paulo: Revista e ampliada; 2005.

Stroncek D. Granulocyte antigen and antibody detection. Vox Sanguinis. 2004;87(Suppl. 1):S91-S94.

Harmening D. Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão. 6ª ed. São Paulo; 2015.