



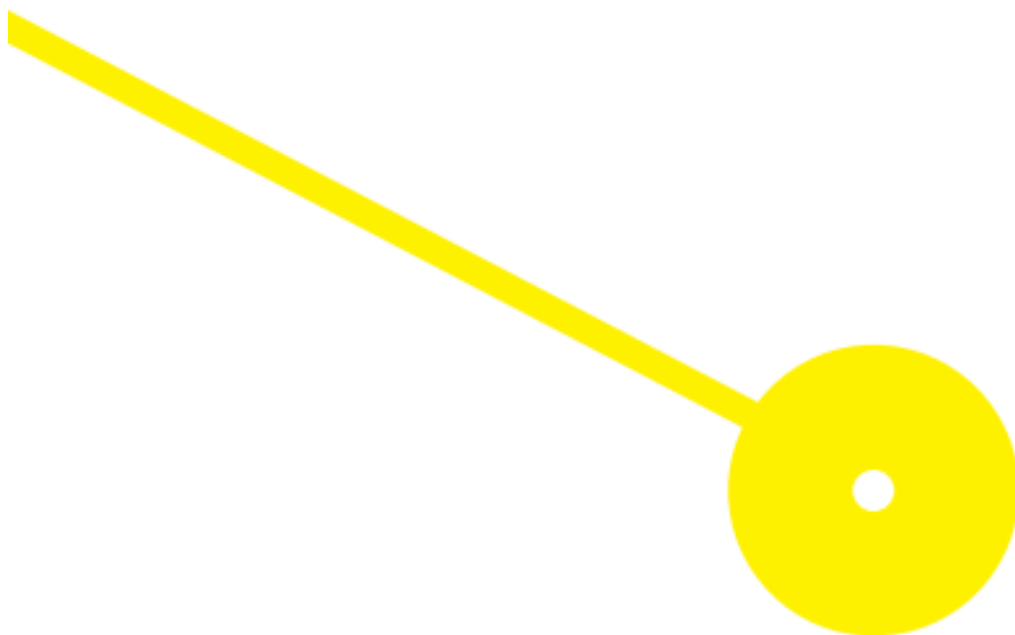
MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICA E SAÚDE PÚBLICA

# Aloanticorpos relacionados com a transfusão de componentes sanguíneos

Clementina Rosa Campos Ferreira

12/2020





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**

## **Aloanticorpos relacionados com a transfusão de componentes sanguíneos**

**Autor**

Clementina Rosa Campos Ferreira

**Orientador**

Professor Doutor Jorge Manuel Condeço Ribeiro

Professor Adjunto Convidado da Escola Superior Saúde do Porto do IPP

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública, Ramo Imunohemoterapia e Transplantação, pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

If you can dream it, you can do it.

Walt Disney

## **Agradecimentos**

Uma tese de mestrado, apesar de ser um processo solitário, integra, contudo, o contributo de várias pessoas. Sem elas, não teria sido possível a sua concretização.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que, ao longo deste mestrado, me ajudaram a completar esta etapa no meu percurso académico.

Aos colegas e professores do mestrado agradeço o convívio e aprendizagens que me proporcionaram.

Às (aos) colegas de trabalho um agradecimento muito especial, por toda a colaboração dada.

À Dr<sup>a</sup> Maria João Santos e Dr<sup>a</sup> Joana Martins, médicas especialistas de Hematologia Clínica no Hospital Pedro Hispano, pelo apoio na seleção e caracterização do grupo de doentes relacionados.

À Dr<sup>a</sup> Sílvia Sousa, Diretora do Serviço de hemoterapia do Hospital Pedro Hispano, o meu agradecimento pela motivação, apoio e disponibilidade permanentes que permitiram a elaboração deste trabalho.

Ao meu orientador, Dr Jorge Condeço agradeço a orientação, os conselhos e disponibilidade na elaboração deste trabalho.

À minha família, por todo o apoio incondicional e dedicação, por acreditarem em mim e incentivarem as minhas escolhas.

A todos, o meu muito obrigada.

E o caminho faz-se, caminhando...

## RESUMO

O sangue foi desde sempre associado ao conceito de vida. Em muitas civilizações era utilizado em sacrifícios para agradar aos deuses. No Egito antigo era utilizado para banhos. Fascinou autores. Na verdade, o sangue é um tecido muito particular que possui numerosas propriedades como o transporte de oxigênio e nutrientes indispensáveis para o metabolismo celular, proteção, defesa e manutenção da integridade e fluidez dos vasos sanguíneos.

Na nossa sociedade a transfusão sanguínea é fundamental na prática médica, sendo indiscutível a sua importância no desenvolvimento da cirurgia em geral, sem a qual muitos procedimentos cirúrgicos não poderiam ser realizados com êxito.

O desenvolvimento tecnológico e científico crescente na área da saúde não descobriu ainda um substituto para o sangue, o que se deve, em parte, à complexidade dos seus elementos constituintes. A transfusão sanguínea, necessária para salvar vidas, pode, no entanto, como a maioria dos tratamentos, provocar efeitos adversos. Uma das maiores preocupações da Medicina Transfusional é evitar reações transfusionais e a aloimunização eritrocitária após exposição a um antigénio desconhecido. Transfusões repetidas de componentes sanguíneos podem resultar na produção de aloanticorpos, contra um ou mais antigénios dos glóbulos rubros e dar origem a uma reação transfusional hemolítica.

Este estudo retrospectivo teve como objetivo a determinação da taxa e especificidade dos aloanticorpos relacionados com a transfusão de componentes sanguíneos nos doentes transfundidos no Hospital Pedro Hispano no período de 1 de janeiro de 2015 a 31 dezembro de 2019. Pretendeu-se averiguar as diferenças na aloimunização entre a população de doentes politransfundidos de Hematologia Clínica e a população pontualmente transfundida.

Foi encontrada aloimunização em 14,9% dos doentes de Hematologia Clínica, e 0,9% na população pontualmente transfundida, sendo os anticorpos dos Sistemas Rh e Kell os mais frequentes.

Foi possível inferir da relevância da fenotipagem alargada para os antigénios clinicamente significativos dos Sistemas Rh e Kell, nos doentes em que se prevê a necessidade de múltiplas transfusões.

**Palavras-chave:** Grupo sanguíneo, Antígenos eritrocitários, Aloimunização, Reação transfusional

## **ABSTRACT**

Blood has always been associated with the concept of life. In many civilizations it was used in sacrifices to please the gods. In ancient Egypt it was used for bathing. Fascinated authors. In fact, blood is a very particular tissue that has numerous properties such as the transport of oxygen and nutrients essential for cellular metabolism, protection, defense and maintenance of the integrity and fluidity of blood vessels.

In our society, blood transfusion is essential in medical practice, and its importance in the development of surgery in general is indisputable, without which many surgical procedures could not be successfully performed.

The growing technological and scientific development in the health area has not yet discovered a substitute for blood, which is partly due to the complexity of its constituent elements. Blood transfusion, necessary to save lives, can, however, like most treatments, cause adverse effects. One of the major concerns of transfusion medicine is to avoid transfusion reactions and alloimmunization of red blood cells after exposure to an unknown Atg. Repeated transfusions of blood components can result in the production of alloantibodies against one or more red blood cell antigens and give rise to a hemolytic transfusion reaction.

This retrospective study aimed to determine the rate and specificity of alloantibodies related to the transfusion of blood components of patients transfused at the Pedro Hispano Hospital from January 1, 2015 to December 31, 2019. It was intended to investigate the differences in alloimmunization between the population of polytransfused patients from Clinical Hematology and the population occasionally transfused. Alloimmunization was found in 14.9% of patients with Clinical Hematology, and 0.9% in the population occasionally transfused, with antibodies from Rh and Kell Systems being the most frequent.

It was possible to infer the relevance of extended phenotyping for the clinically significant antigens of the Rh and Kell Systems, in patients who anticipate the need for multiple transfusions.

**Keywords:** Blood group, Erythrocyte antigens, Alloimmunization, Transfusion Reaction

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
Breve História Da Transfusão De Sangue .....	12
Grupos Sanguíneos.....	14
Sistema ABO (ISBT 001).....	18
Sistema MNS (ISBT 002).....	19
Sistema P1PK (ISBT 003).....	20
Sistema Rh (ISBT 004).....	20
Sistema Lutheran (ISBT 005).....	21
Sistema Kell (ISBT 006).....	22
Sistema Lewis (ISBT 007).....	22
Sistema Duffy (ISBT 008).....	23
Sistema Kidd (ISBT 009).....	23
Sistema Diego (ISBT 010).....	23
Metodologias para identificação de antigénios de Grupo Sanguíneo.....	24
Funções dos Grupos Sanguíneos.....	25
Sangue – Constituintes e sua Função.....	26
Glóbulos Rubros.....	27
Glóbulos Brancos.....	27
Plaquetas.....	28
Plasma.....	29
Componentes sanguíneos.....	29
Patologias Hematológicas e Hemato-Oncológicas.....	30
Neoplasias Hematológicas .....	31
Leucemia .....	32
Mieloma múltiplo .....	32
Síndrome Mielodisplásico.....	32

Linfoma .....	33
Complexo Principal de Histocompatibilidade .....	33
Sistema Imune e pesquisa de Aloanticorpos.....	35
<b>2. OBJETIVO</b> .....	46
<b>3. POPULAÇÃO E MÉTODOS</b> .....	46
<b>4. RESULTADOS</b> .....	48
População de doentes de Hematologia Clínica.....	49
População de doentes com pedidos pontuais.....	53
<b>5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....	56
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	60
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	62
ANEXOS.....	67

## **Lista de Abreviaturas:**

ACD: Ácido cítrico-citrato de sódio e dextrose

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AGH: Antiglobulina humana

APCs: Células apresentadoras de antígeno

Atc: Anticorpo

Atg: Antígeno

CE: Concentrado de eritrócitos

CPP: Pool de Concentrados Plaquetários

CUP: Concentrado unitário de Plaquetas

DHRN: Doença Hemolítica do Recém-nascido

AHTR: Acute Hemolytic Transfusion Reaction

DHTR: Delayed Hemolytic Transfusion Reaction

DSTR: Delayed Serologic Transfusion Reaction

EH: Esferocitose Hereditaria

GR: Glóbulo rubro

GRs: Glóbulos rubros

GS: Grupo sanguíneo

GSs: Grupos sanguíneos

HLA: Antígenos Leucocitários Humanos

HC: Hematologia Clínica

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

ISBT: Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue

LISS: Low ionic strength solution

LMA: Leucemia Mielóide Aguda

LLC: Leucemia linfocítica Crónica

LMMC: Leucemia Mielomonocítica Crónica

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

MO: Medula óssea

MW: Macroglobulinémia de Waldenström

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAI: Pesquisa de anticorpos irregulares

RTH: Reação transfusional hemolítica

SMD: Síndrome Mielodisplásico

SMP: Síndrome Mieloproliferativo

SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms

SP: Sangue periférico

TAI: Teste de antiglobulina indireto

## Lista de figuras:

Figura 1: descoberta dos GSS e a sua constituição.....	15
Figura 2: modelo da membrana eritrocitária.....	16
Figura 3: modelo dos antigénios de GS na membrana do GR.....	16
Figura 4: representação esquemática da estrutura dos antigénios dos GSS.....	17
Figura 5: o complexo Banda 3 e os polipeptídeos Rh (D/CE), RhAG, e Glicoforinas A e B estão ligados à membrana via Anquirina. O Complexo Banda 3/Glicoforina C liga-se à membrana via Aducina e Proteína 4,1.....	21
Figura 6: localização dos genes dos GSS.....	25
Figura 7: função dos antigénios dos GSS, podem ter mais de uma função, alguns com função biológica desconhecida, outros redundante.....	26
Figura 8: Loci do MHC humano.....	34
Figura 9: células envolvidas na resposta imune.....	36
Figura 10: modelo para definir o fenótipo "respondedor", os ícones de sacos vermelhos representam transfusões, YYY representam aloanticorpos, as cores representam as especificidades.....	38
Figura 11: resposta imune celular na aloimunização eritrocitária.....	39
Figura 12: aloanticorpos: indução, evanescência, resposta anamnésica.....	42
Figura 13: TAI, envolve uma mistura do plasma do doente com eritrócitos-teste (que expressam uma variedade conhecida de Atg de GSS), seguido da adição da AGH.....	44
Figura 14: fluxograma ilustrativo dos pedidos de componentes ao serviço Hemoterapia e do estudo.....	48
Figura 15: fluxograma ilustrativo da população estudada.....	49
Figura 16: comparação das populações HC e pontuais em relação ao número de doentes e ao nº de CE transfundido.....	50
Figura 17: representação do gasto de componentes por patologia.....	50
Figura 18: distribuição do perfil de anticorpos detetados por sexo feminino e masculino (N-negativo, Nid-não identificável).....	51
Figura 19: representação das patologias de HC incluídas neste estudo.....	52

Figura 20: representação gráfica do sexo e da idade dos doentes de HC.....	52
Figura 21: gráfico representativo da distribuição do grupo ABO/Rh por patologia de HC.....	52
Figura 22: representação do grupo ABO e fenótipo Rh dos doentes de HC.....	53
Figura 23: representação gráfica das diversas patologias por sexo.....	53
Figura 24: fluxograma representativo da população pontual com PAI+ .....	54
Figura 25: representação gráfica dos anticorpos identificados após transfusão de componentes.....	55

**Lista de tabelas:**

Tabela 1: representação da especificidade e frequência dos aloanticorpos detetados .....	55
--	----

## 1. INTRODUÇÃO

### Breve História Da Transfusão De Sangue

A transfusão sanguínea é uma das práticas médicas mais antigas do mundo. O sangue sempre teve um caráter extraordinário ao longo da história das civilizações. Desde tempos imemoriáveis que se identificou o sangue com a vida ou com algo de mais imaterial e indefinível que constituía a sua misteriosa essência. A evolução da transfusão de sangue é uma história fascinante, desde o misticismo e pseudociência à terapia racional atualmente existente. Identificava-se o sangue com o próprio pulsar da vida, condição indispensável da saúde, fluído misterioso que transportava vitalidade e eterna juventude.

Os primeiros caçadores acreditavam que a alma dos animais estava no seu sangue. Este era visto como possuidor de numerosas propriedades misteriosas, sendo vitalizante, rejuvenescedor e incluindo os caracteres físicos e mentais do seu dono, tais como a agilidade da lebre, a força do touro, a ferocidade do leão e a docilidade do carneiro.

Uma das referências históricas mais antigas de transfusão sanguínea é descrita no sétimo livro de **Ovidio "Metamorphoses"**, em que **Jason** pediu a **Medea** para restituir a juventude de seu pai, o rei **Aeson**. Também um antigo manuscrito hebreu refere: "*Naam, chefe dos exércitos de Bem Adad, rei da Síria, doente com lepra, consultou médicos que...retiraram o sangue das suas veias e lhe administraram outro*".

O reconhecimento do perigo do costume de ingestão de sangue, bem como a descrição do que poderia ser uma reação adversa, encontra-se registado nas obras do século XIII do escritor **Petro de Abano** (1).

Em 1628 **William Harvey** publicava o tratado "*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*", em que descreve a anatomia e movimentação do coração e a conseqüente circulação do sangue pelo corpo. Foi o primeiro e muito importante passo na história da transfusão, surgindo a ideia de que o sangue podia ser veículo de princípios ativos ou medicamentos que aí poderiam ser injetados. O seu trabalho assinala o início da *cirurgia infusória*, e despertou interesse na *cirurgia transfusória*, que consiste em injetar sangue nas veias com finalidades terapêuticas. Estavam dados os primeiros (e significantes) passos para a utilização terapêutica do sangue heterólogo (1,2,3).

**Giovanni Colle** (1628), após conhecimento do trabalho de **Harvey** publica uma obra intitulada «*Methodus facile parandi jucunda tua eí nova medicamenta*» em que sugere a transfusão como meio de prolongar a vida.

**Frances Potter** (1639) foi provavelmente o pioneiro da prática transfusional fundamentada na circulação sanguínea descoberta por **Harvey**. Aparentemente **Potter** idealizou a transfusão sanguínea desenvolvendo instrumentos necessários para tal. Em 1649, relatou uma tentativa de transfusão num frango, contudo, provavelmente por causa do tamanho da ave, a sua tentativa fracassou.

**Sir Cristopher Wren** (1656), pioneiro da cirurgia infusória, propôs a administração intravenosa de líquidos nas veias de cães dando-lhe o nome de infusão (3).

**Francesco Colli** (1660), descreveu técnicas para a transfusão usando tubos de prata inseridos na veia do recetor e conectados com a artéria de um animal.

**Richard Lower**, em 1665, deu início à época experimental e registou a primeira demonstração pública de transfusão animal bem-sucedida, o médico manteve cães vivos com a transfusão de sangue de outros cães. A técnica de **Lower** consistia em ligar a carótida do animal dador à veia jugular do animal recetor, por meio dum tubo de pena de ave (1).

**JeanBaptiste Denis** em 1667 publicou no "*Philosophical Transactions*" a sua experiência ao transfundir com sucesso um rapaz de 15 anos, com uma doença febril de origem desconhecida, com sangue de carneiro. Repetiu a experiência transfundindo um homem agitado de 34 anos. São os primeiros registos para tratar o sofrimento e a doença, em humanos, através da transfusão sanguínea heteróloga, numa época em que se acreditava que o sangue de carneiro tinha qualidades calmantes. Nesta sequência, **Denis** relatou a primeira reação transfusional hemolítica severa e fatal (1).

Por volta de 1678 as transfusões foram consideradas um ato criminoso acabando o parlamento francês, a Royal Society de Londres e o Papa por proibir a transfusão, prática que ficou adormecida durante um século e meio.

Em 1818, **James Blundell** grande defensor da utilização de sangue humano no tratamento de doentes, foi o primeiro médico a transfundir com sucesso uma doente numa hemorragia pós-parto, com o sangue do próprio marido. **Blundell** defendia e aconselhava o uso de sangue humano, só mesmo quando necessário, e para substituir o volume sanguíneo perdido. Inventou instrumentos para transfundir o sangue, demonstrou eficácia da seringa, e desenvolveu novas e revolucionárias técnicas cirúrgicas (1,2).

**Pontick** por volta de 1875 demonstrou que quando eram postos em contacto sangues de diferentes espécies "*in vitro*" muitas vezes os seus glóbulos rubros aglutinavam e eram maciçamente destruídos, postulando que o mesmo se passaria "*in vivo*" (3).

A taxa de insucessos verificada na transfusão levantou muita polémica, surgindo a opinião de que a técnica era perigosa e com pouco interesse. A maioria dos médicos tinha dificuldades na execução da técnica e tornou-se refratária à sua utilização. A crescente utilização do soro fisiológico foi um forte contributo para o declínio da prática transfusional.

Nas várias tentativas e experiências transfusionais que ocorreram um pouco por todo mundo houve muitos sucessos, mas também fatalidades, que na época não eram compreendidas.

Sabemos hoje que se deviam fundamentalmente a acidentes imunológicos, acidentes infecciosos ou embolias relacionadas quer com a coagulação do sangue a transfundir, quer com a introdução acidental de ar.

Até ao final do século XIX foi pouca a evolução na prática transfusional, com exceção do reconhecimento da inadequada utilização de sangue animal para transfusões humanas.

A identificação dos grupos de sangue em 1901, a descoberta e utilização do citrato de sódio como anticoagulante a partir de 1918, a introdução da dextrose (ACD) em 1943 como fonte energética indispensável à conservação do sangue colhido (durante maiores períodos nos frigoríficos), assim como o advento de equipamentos em plástico e não reutilizáveis em 1949, puseram termo à crise de desprestígio na prática transfusional, conferindo-lhe uma segurança até aí impensável.

Até atingir a atual simplicidade técnica, a transfusão sanguínea sofreu uma profunda evolução. Foram muitos séculos de avanços e recuos, sucessão alternada de crises e vitórias, paralelas à própria evolução do conhecimento médico e científico. A preocupação com a qualidade sempre existiu e é de certo modo intrínseca à natureza humana, não havendo atualmente intervenção na área da saúde que sobre ela não incida. Com o advento das novas tecnologias, essa evolução prossegue e a Medicina Transfusional tende a ser cada vez mais personalizada, segura e de acordo com os consensos estabelecidos internacionalmente.

## **Grupos Sanguíneos**

A descoberta dos grupos sanguíneos (GSs) abriu uma nova era para a segurança da transfusão sanguínea.

Em 1901, o médico austríaco **Karl Landsteiner** demonstrou experimentalmente que o plasma de certos indivíduos aglutinava os glóbulos rubros (GRs) de outros. A essas substâncias chamou aglutininas, e com os padrões de aglutinação dividiu-os nas classes A, B e C (posteriormente designado de **O** do alemão "Ohne"-sem). Os resultados dos seus trabalhos não tiveram a merecida divulgação na época. Em 1902, **De Castello e Struli** colaboradores de **Landsteiner**, descobriram o quarto tipo sanguíneo, o tipo AB. Paralelamente e sem conhecimento dos outros trabalhos, em 1907, o médico checo **Jan Jansky**, e o americano **Moss** em 1910 descrevem a descoberta de quatro GSs, mas em numeração Romana e invertida (o grupo I de **Jansky**, o **IV** de **Moss** ou o **O** de **Landsteiner** correspondiam ao mesmo grupo sanguíneo) (4).

Em 1927, a Associação americana de Imunologistas propôs a classificação ABO para evitar equívocos potencialmente letais.

**Reuben Ottenberg** foi o primeiro a fazer a tipificação ABO de doentes e dadores, e em 1907 realizou a primeira transfusão precedida de provas de compatibilidade. Também lhe é atribuída a criação do termo "dador universal" para o grupo **O**.

**Hirszfeld e von Dungern** em 1910 demonstraram a hereditariedade dos GSs segundo as leis de Mendel, com a presença do Atg A e do Atg B como dominantes (4,5).

Em 1945, **Coombs, Mourant e Race** descrevem o uso do soro antiglobulina (também designado soro de Coombs) para a detecção de anticorpos não aglutinantes (fracos ou incompletos).

Em 1947, **Morton e Pickles** reportam que o tratamento dos GRs com a enzima proteolítica tripsina ocasionava aglutinação dos GRs sensibilizados por anticorpos.

A estrutura e a biossíntese dos antígenos começaram a ser compreendidas, e a partir daqui o conhecimento sobre os aspectos serológicos dos GSs teve um crescimento exponencial (Figura 1).

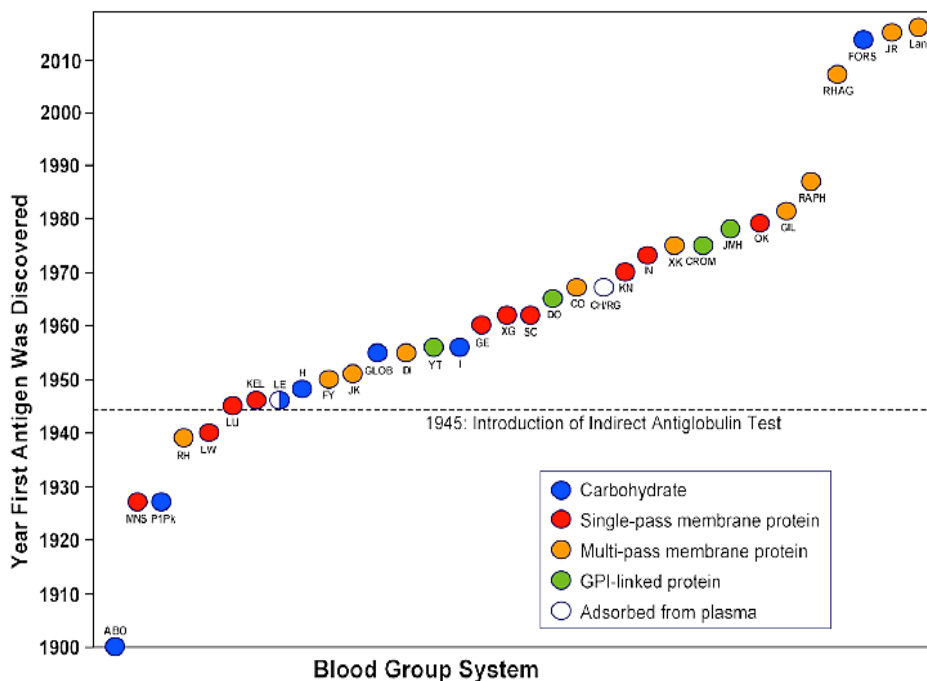


Figura 1: descoberta dos GSs e a sua constituição. Fonte: Daniels(5)

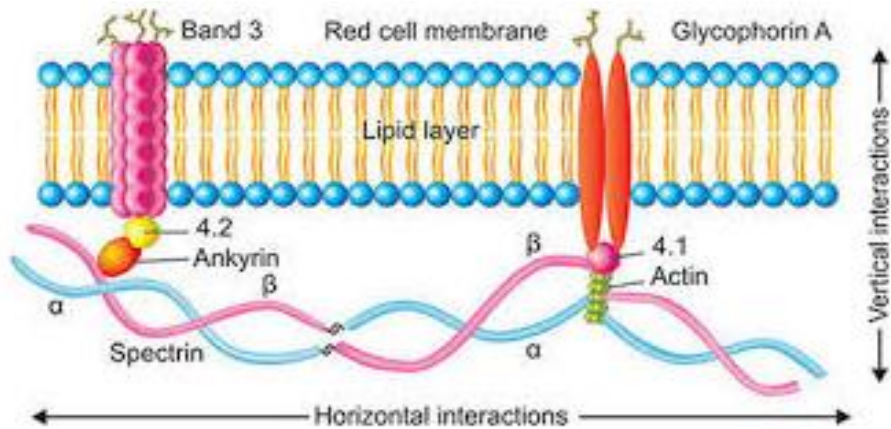
O Tipo de Sangue corresponde a um padrão específico de reação, e é um dos resultados laboratoriais que a maioria das pessoas conhece.

Os GSs correspondem à presença ou ausência de antígenos, localizados na superfície dos GRs, cuja especificidade é controlada por genes. Estes antígenos, constituídos por estruturas de carboidratos ou por estruturas polipeptídicas, estão localizados nas estruturas da membrana eritrocitária, possuem a capacidade de desencadear resposta imune e a produção de anticorpos específicos.

A membrana eritrocitária é essencial para a normal atividade do eritrócito ou glóbulo rubro (GR), sendo responsável pelas suas características antigénicas, de transporte, físicas e mecânicas (6).

Com funções de separação dos meios intra e extracelular, bem como a seleção de nutrientes, iões ou gases, a membrana celular do GR é constituída por uma dupla camada lipídica (colesterol e fosfolípidos), e por um conjunto de proteínas periféricas, integrais, ou transmembranares, de que se destacam as glicoforinas e a proteína Banda 3, que interagem com as proteínas do citoesqueleto através do complexo Banda 3, anquirina, proteínas 4.1 e 4.2. O citoesqueleto é formado maioritariamente por espectrina  $\alpha$  e  $\beta$ , e a complexa interação entre as proteínas da membrana e do citoesqueleto permite ao GR a deformabilidade e a resistência que este necessita para conseguir fluir na corrente sanguínea e passar através de pequenos capilares, cujas dimensões são menores que o seu diâmetro (Figura2).

Figura 2: modelo da membrana eritrocitária. Fonte: jaypeedigital.com



Os antígenios de GSs constituídos por estruturas de carboidratos estão ligados a lipídios ou a proteínas, e encontram-se apenas na superfície externa da membrana eritrocitária.

As estruturas polipeptídicas ou proteínas, que exprimem os antígenios eritrocitários, inserem-se na membrana através das seguintes opções: como proteínas de passagem única, como proteínas de passagem múltipla ou como proteínas ancoradas à membrana por ligações da molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Figura 3).

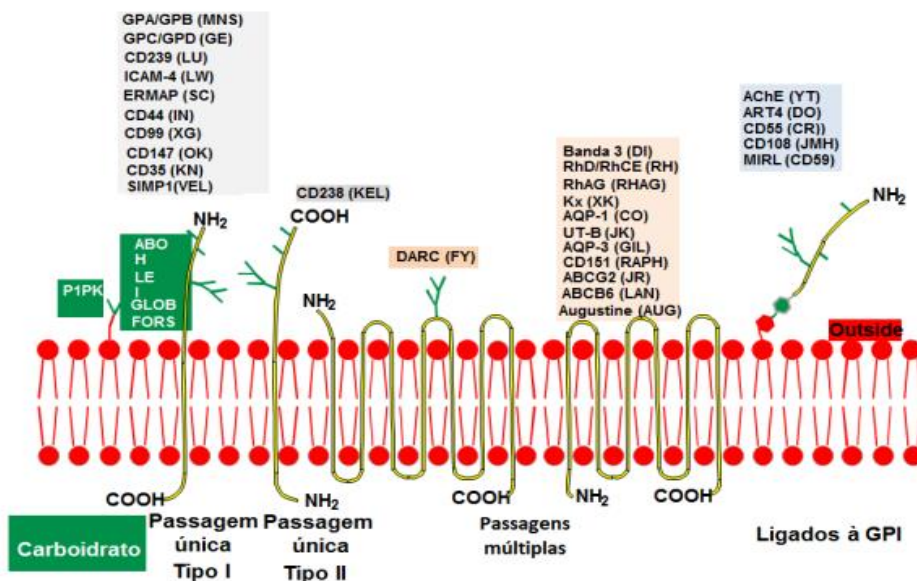


Figura 3: modelo dos antígenios de GSs na membrana do GR. Fonte: adaptado de Reid (6)

Um sistema de grupo sanguíneo consiste em um ou mais antígenios regulados quer por um único *locus* genético, ou por um conjunto de dois ou mais genes homólogos, intimamente ligados, e sem que ocorra entre eles pouca ou nenhuma recombinação. Cada sistema é geneticamente distinto de todos os outros sistemas de GSs (7).

A maioria dos antígenios eritrocitários é um produto direto do gene que os codifica, e estão localizados nas proteínas, glicoproteínas e glicolipídios da membrana eritrocitária (Figura 4).

Os antígenos dos sistemas ABO, H, Lewis, I e P1PK são uma exceção, porque os genes correspondentes codificam uma enzima (glicosiltransferase), responsável por catalisar a reação para constituir uma certa estrutura antigénica. São definidos por epítipo de carboidratos em glicoproteínas ou glicolipídeos e as suas estruturas bioquímicas estão intimamente relacionadas.

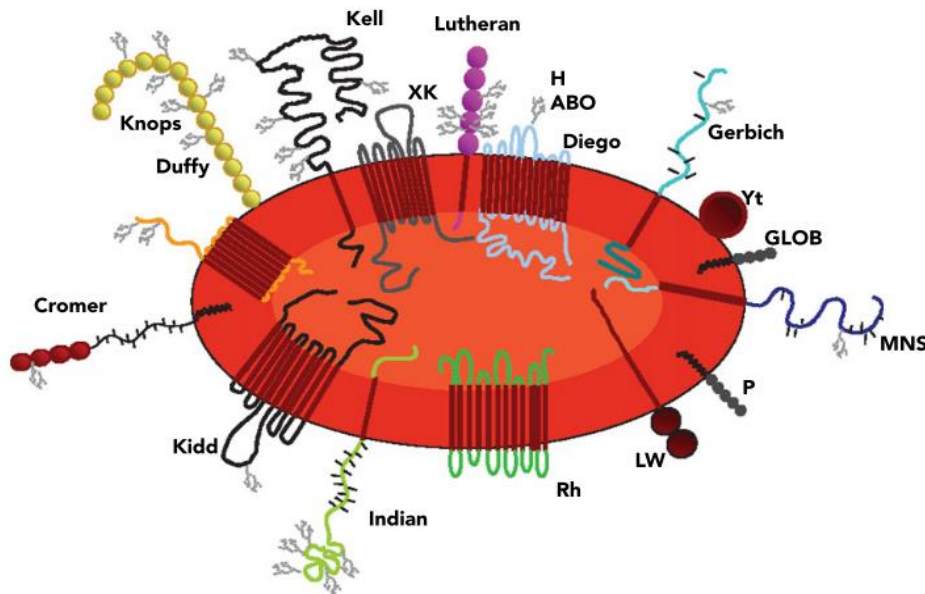


Figura 4: representação esquemática da estrutura dos antígenos dos GSs. Fonte: Tormey (35)

Cada antígeno (Atg) de grupo sanguíneo (GS) está definido por um anticorpo (Atc) específico, que reage com ele.

Tradicionalmente, os antígenos de GS eram nomeados por ordem alfabética (ABO, D, MNS, P), ou com o nome da primeira pessoa em que foi detetado o Atc, relacionados com doença hemolítica do recém-nascido (Kell, Kidd, Diego), ou induzidos por transfusão (Duffy). Inclusive, dentro do mesmo sistema os antígenos foram identificados segundo diferentes procedimentos.

Dada a importância destes antígenos em Medicina Transfusional, houve a necessidade de um acordo internacional sobre a sua nomenclatura. Em 1980, o Grupo de Trabalho da Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (ISBT) foi formado para criar um padrão para a terminologia de GS, o que foi concretizado pela primeira vez em 1995.

Sob esta terminologia, cada Atg de GS tem um número e pertence a um sistema de GS, coleção ou série. Designam-se como coleção os antígenos que estão relacionados de forma genética ou bioquímica, mas que não reúnem os critérios para formar um GS. Séries correspondem aos antígenos eritrocitários que não se enquadram nem num GS nem numa coleção, os quais são classificados do seguinte modo: se forem raros (frequência menor que 1%), são classificados na série 700, se forem comuns (frequência maior que 90%), são classificados na série 901 (8).

Na nomenclatura do ISBT todo o Atg de GS possui uma identificação numérica de 6 dígitos. Os primeiros três representam o sistema, coleção ou série, e os segundos três dígitos identificam o Atg. Cada sistema, coleção e série, além do número e da designação, possui também um símbolo alfabético.

Este formato permite o uso em bases de dados informáticas, e admite a sua expansão. Antígenos de GS clinicamente significativos continuam a ser descobertos, e as tabelas referentes aos GSs, coleções e séries, são regularmente revistas e atualizadas pelo Grupo de Trabalho da ISBT.

Os anexos I–II–III representam as tabelas ISBT referentes aos antígenos atualmente reconhecidos e incluídos nos sistemas de GSs, coleções e as séries de antígenos de alta e baixa frequência (**Anexos I, II, III**).

Os genes que codificam os sistemas de grupos sanguíneos foram sequenciados e as bases moleculares da maioria dos antígenos e fenótipos são conhecidas. Os antígenos de GS diferem não apenas na estrutura e função, mas também na densidade do Atg na membrana do GR.

Na Medicina Transfusional, o aspeto mais importante relativo aos sistemas de GSs, é saber se os anticorpos correspondentes aos seus antígenos são hemolíticos e/ou têm potencial para induzir uma Reação Transfusional Hemolítica (RTH) ou estar na origem da Doença Hemolítica do Recém-nascido (DHRN).

### **Sistema ABO (ISBT 001)**

A expressão dos antígenos ABO é controlada a partir de três *loci* genéticos independentes: o gene *ABO*, o gene *FUT1 (H)* e o gene *FUT2 (Se)*. Cada um desses genes codifica diferentes enzimas (glicosiltransferases) responsáveis pela ligação de monossacarídeos específicos às cadeias precursoras de dissacarídeos na membrana do GR.

O gene Secretor (*Se*) localizado no cromossoma 19 é necessário para a expressão dos antígenos ABO nos fluidos biológicos.

O gene *H* igualmente localizado no cromossoma 19 produz uma  $\alpha$ -2-fucosiltransferase e adiciona L-fucose ao precursor, posteriormente os produtos dos genes *A* e *B* levam à produção de N-acetilgalactosamina e D-galactose, respetivamente, que são adicionadas nessa estrutura. O gene *O* codifica uma enzima sem atividade que deixa o precursor inalterado. Na ausência do gene *H* os antígenos **A** e ou **B** não são expressos. O raro fenótipo Bombay é caracterizado pela ausência do Atg H na membrana eritrocitária (9,10).

O gene humano do grupo ABO situado no cromossoma 9 (9q34.2) tem três formas de alelos principais **A**, **B** e **O**, codifica 4 antígenos A, B, AB e A<sub>1</sub>, e apresenta 4 fenótipos major A, B, AB e O. Como estes antígenos também são expressos em células, tecidos e fluidos do organismo, são por isso igualmente designados antígenos de Histocompatibilidade. Os subgrupos ABO são fenótipos que diferem na quantidade do Atg presente na membrana eritrocitária. Em geral, os subgrupos **A** são mais comuns, em relação ao fenótipo **B**. Estão também já identificados mais de 50 alelos que codificam o Atg **O** (11,12).

Os grupos sanguíneos ABO têm também influência na hemóstase relacionada com os diferentes níveis plasmáticos de von Willebrand e do fator VIII, de acordo com o grupo ABO (9).

É provável que o alelo **O** derive do alelo **A**, pois só diferem num nucleótido. Esta deleção resulta na tradução de uma proteína inteiramente diferente e sem atividade enzimática. Apesar de algumas aparentes discrepâncias e contradições, indivíduos do grupo **O** são resistentes à malária por *Plasmodium falciparum*. A distribuição geográfica do grupo **O** é consistente com a seleção por *Plasmodium falciparum* a favor do grupo **O** em regiões endêmicas de malária (9).

O sistema ABO permanece o mais importante dos GSs na prática transfusional, sendo o único que não se enquadra na aloimunização. É caracterizado pela presença de anticorpos naturais e regulares, dado que o seu aparecimento não necessita de estímulo prévio com o Atg. São isohemaglutininas dirigidas contra o Atg em falta, predominantemente da classe IgM, fortemente reativas, que ativam o sistema de complemento provocando hemólise intravascular dos GRs. A tipagem do grupo ABO requer em simultâneo a determinação do Atg nos GRs, e a pesquisa das isoaglutininas no plasma. Qualquer discrepância encontrada requer estudos adicionais para esclarecimento. Todas as unidades de componentes eritrocitários transfundidas têm de ser compatíveis com o doente para o sistema ABO.

Apesar da sua vital importância a nível clínico, ainda não se encontra plenamente conhecida a função fisiológica dos antigénios do sistema ABO. São frequentes os estudos para determinar a existência de uma relação direta entre o desenvolvimento de várias doenças e o grupo ABO (9,13).

### **Sistema MNS (ISBT 002)**

O sistema MNS é depois do sistema Rh, o mais complexo. Foi descoberto em 1927 e atualmente são conhecidos 49 antigénios que se localizam nas glicoforinas A e B, glicoproteínas transmembranares da superfície membranar dos GRs. Estes antigénios são codificados pelos genes *GYPA*, *GYPB* que se localizam no cromossoma 4(4q31.21). O gene *GYPA* apresenta os alelos codominantes M e N, e os antigénios M e N transportados na glicoforina A, o gene *GYPB* codifica os antigénios S e s que estão inseridos na glicoproteína B. Um terceiro gene, *GYPE* localizado junto ao *GYPB*, pensa-se estar relacionado com variantes de antigénios MNS. A glicoforina A, exclusiva da membrana do GR, tem elevado conteúdo em ácido siálico que contribui a carga negativa da superfície do eritrócito, impedindo a aglutinação. Por este motivo, desempenha um papel importante na interação entre os GRs e o endotélio vascular.

As glicoforinas A e B para além de transportar os antigénios MNS também podem servir como recetores para citocinas e microrganismos como o parasita da malária, *Plasmodium falciparum*.

Os anticorpos anti-M e anti-N podem ser de ocorrência natural, IgM ou IgG, e só são considerados clinicamente significativos se reagirem a 37° C. Os anticorpos anti-S e anti-s geralmente são imunoglobulinas IgG, ativas a 37° C e implicadas em RTH e DHRN, raras, mas potencialmente severas.

### **Sistema P1PK (ISBT 003)**

O primeiro Atg do sistema P foi descoberto em 1927 por **Landsteiner e Levine** no decorrer de experiências que levaram à descoberta dos antigénios M e N. O gene *A4GALT*, situado no braço longo do cromossoma 22(22q13.2), codifica os 3 antigénios deste sistema, P1, P<sup>K</sup> e NOR. O Atg P1 é de alta frequência na população e é expresso unicamente nos GRs. O Atc P1 é da classe IgM, de ocorrência natural e habitualmente sem significado clínico. Só muito raramente reage a 37° C, e tem sido envolvido em RTH.

### **Sistema Rh (ISBT 004)**

Em 1939, **Levine e Stetson** descreveram uma reacção pós-transfusional numa puérpera transfundida com o sangue do marido. Verificaram que tinha um Atc que aglutinava os GRs do marido, concluindo que a gestante tinha sido sensibilizada durante a gravidez com um Atg que o feto herdara do pai. Em 1940, **Landsteiner e Wiener** realizaram experiências nas quais inocularam coelhos com eritrócitos de macacos da espécie Rhesus e verificaram que o soro, proveniente destes coelhos, apresentava um Atc que aglutinava 85% dos eritrócitos de indivíduos de etnia caucasiana, os quais designou por Rh positivos. Paralelamente, os outros 15% representavam os indivíduos que não apresentavam aglutinação no contacto com aquele soro, e foram designados por Rh negativos.

No cromossoma 1(1p36,11) estão caracterizados 55 antigénios ligados ao sistema Rh, os quais são codificados por 2 genes *RHD* e *RHCE*, intimamente ligados, de orientação oposta e separados pelo gene *SMP1*. O gene *RHD* não possui alelos e codifica o Atg D, o gene *RHCE* possui vários alelos, em várias combinações, sendo os alelos C, c, E, e, codominantes. Os cinco principais antigénios D, C, c, E, e são responsáveis pela maioria dos anticorpos clinicamente significativos relacionados com este sistema sanguíneo.

A presença do Atg D no GR classifica as células como Rh positivas e a sua ausência caracteriza-as como Rh negativas. O Atg D pode apresentar expressões mais fracas de natureza quantitativa (D fraco) e/ou de natureza qualitativa (D parcial), podendo ocorrer nestas situações a produção de aloanticorpos, quando há exposição ao Atg D completo. A grande proximidade e homologia entre os genes *RHD* e *RHCE*, permite a formação de alelos *RHD* híbridos, levando à produção de antigénios D diversificados e com diferentes frequências em vários grupos étnicos. A expressão dos antigénios Rh na superfície dos GRs depende da glicoproteína RhAG (Rh-associated glycoprotein funcional), localizada no cromossoma 6(6p12.3) e a sua ausência dá origem ao raro fenótipo Rh null.

A presença das proteínas Rh (RhD, RhCE e RhAG) é restrita à membrana eritrocitária, na forma de um complexo não-covalente com outras proteínas incluindo a Banda 3, glicoforinas (GPA e GPB), LW e CD47 (Figura 5).

O sistema Rhesus é dos mais imunogénicos, o mais polimórfico e o que tem o maior número de antigénios. É o mais complexo dos sistemas de GSs. Após os antigénios do sistema ABO, o Atg D é considerado o mais imunogénico e importante em Medicina Transfusional.

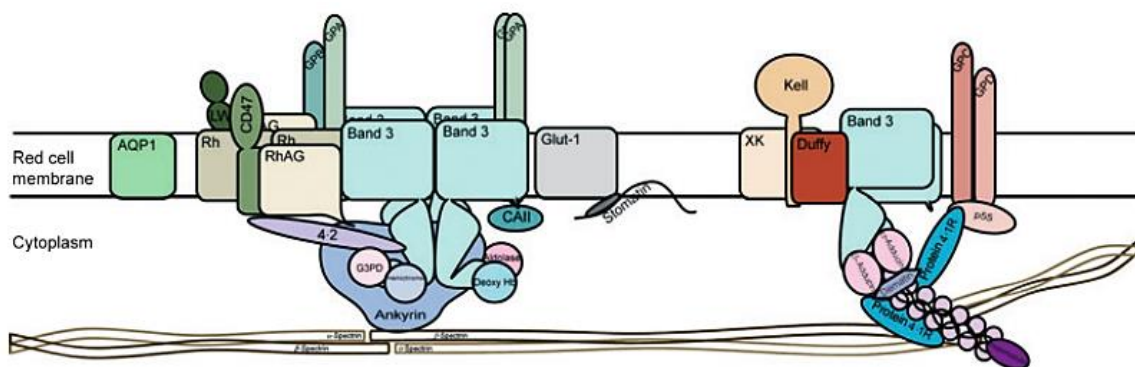


Figura 5: o complexo Banda 3 e os Polipeptídeos Rh (D/CE), RhAG, e Glicoforinas A e B estão ligados à membrana via Anquirina. O Complexo Banda 3/Glicoforina C liga-se à membrana via Aducina e Proteína 4,1. Fonte: Anstee (22)

A maioria dos anticorpos do sistema Rh são IgG, clinicamente significativos e estão envolvidos em reações transfusionais hemolíticas (RTH) e doença hemolítica do Recém-nascido (DHRN). São os aloanticorpos imunes identificados com maior frequência.

Estudos que expuseram deliberadamente voluntários D-negativos saudáveis a sangue D-positivo, para obter IgG anti-D para fins de imunoprofilaxia, demonstraram a produção de anti-D em 80% dos indivíduos. É também comum, encontrar a associação de dois ou mais anticorpos do sistema Rh.

É também consensual que doentes jovens ou com probabilidade de se tornarem dependentes de transfusão, recebam componentes sanguíneos compatíveis para os antígenos C, E, c, e, numa tentativa de prevenir a aloimunização.

Apresenta também uma grande relevância em obstetrícia, pela elevada incidência de complicações, relacionadas com os respetivos anticorpos.

A aloimunização anti-D está frequentemente associada com a gravidez de mulheres RhD negativo em que o feto é RhD positivo. Esta imunização resulta da passagem de células fetais (por hemorragia feto materna), que expressam à sua superfície o Atg D, para a circulação materna cujas células sanguíneas não possuem esse Atg. Atualmente a administração de Imunoglobulina anti-D em mulheres Rh negativo é uma intervenção eficaz na prevenção da doença hemolítica perinatal, reduzindo o risco de Isoimunização.

### Sistema Lutheran (ISBT 005)

O Sistema Lutheran é complexo, composto por 25 antígenos codificados pelo gene *BCAM* localizado no cromossoma 19(19q13.2). Inclui quatro pares de antígenos antitéticos - LU<sup>a</sup>/LU<sup>b</sup>, LU6/LU9, LU8/LU14 e Au<sup>a</sup>/Au<sup>b</sup>, sendo os restantes de alta prevalência em todas as populações.

Os anticorpos contra este sistema de GS são raros, habitualmente IgG, e geralmente não são considerados clinicamente significativos. Os anticorpos Lu<sup>a</sup> podem ser de ocorrência natural ou imune, de tipo IgM, IgA ou IgG.

## **Sistema Kell (ISBT 006)**

Descoberto em 1945 por **Coombs**, o sistema Kell apresenta 36 antígenos altamente imunogênicos e polimórficos, frequentemente responsáveis por reações hemolíticas e DHRN, sendo o Atg **K** o clinicamente mais relevante.

O gene *KEL*, situado no cromossoma 7(7q33) apresenta dois alelos codominantes, K e k, que codificam os antígenos antitéticos **K** (frequentemente designado Kell) e **k** (também designado por celano), respetivamente. O Atg **K** é de baixa frequência(≈9% na população europeia), o Atg **k** tem uma alta frequência em todas as populações, e diferem apenas num aminoácido (9).

A glicoproteína Kell é uma proteína transmembranar de passagem única que transporta os antígenos do sistema Kell, e que se encontra ligada por uma ponte dissulfeto com a proteína de membrana XK. Pensa-se que a glicoproteína Kell se encontra envolvida na regulação do tónus vascular, pois é uma enzima conversora da endotelina-3, um potente vasoconstritor.

Existem fenótipos de baixa expressão antigénica, mas que são raríssimos: KELmod, McLeod. O fenótipo KO(Kell null) com rara incidência traduz-se na ausência de qualquer Atg deste sistema, e pode induzir a produção do Atc **Ku** (anti-Kell "total").

Os anticorpos formados contra os antígenos do sistema Kell são maioritariamente do tipo IgG, clinicamente significativos, estando envolvidos em reações transfusionais hemolíticas e DHRN (14).

É também consensual que doentes jovens, ou doentes com probabilidade de se tornarem dependentes de transfusão, recebam componentes sanguíneos compatíveis para o Atg Kell para prevenir a aloimunização. O Atg Kell é potencialmente imunogénico dado que um terço de todos os anticorpos imunes não Rh são anti-K (9).

## **Sistema Lewis (ISBT 007)**

Os 6 antígenos codificados pelo gene *FUT3* situado no braço curto do cromossoma 19(19p13.3), não são produzidos pelos GRs, sendo adsorvidos para a sua membrana a partir dos glicolípídeos situados nas substâncias precursoras H tipo 1, solúveis, presentes no plasma. Os dois principais antígenos, Le<sup>a</sup> (LE1) e Le<sup>b</sup> (LE2) e os três fenótipos comuns – Le (a+b-), Le (a-b+) Le (a-b-), indicam a presença ou ausência do Lewis e de enzimas secretoras produzidas pelo gene *FUT2(Se)*.

Os anticorpos do sistema Lewis são de ocorrência natural e quase exclusivamente encontrados no fenótipo Le(a-b-). Na sua maioria são da classe IgM, não são reativos a 37°C, e facilmente adsorvidos. Dado os antígenos serem extrínsecos, e não atravessam a barreira placentária, geralmente os anticorpos não são clinicamente significativos. Contudo, estão descritos casos de anticorpos clinicamente significativos deste sistema sanguíneo, implicados em reações transfusionais, caso ocorram na classe IgG, e/ou se ativarem o sistema de complemento (9).

### **Sistema Duffy (ISBT 008)**

O sistema Duffy consiste em 5 antígenos, codificados pelo gene *ACKR1* situado no cromossoma 1 (1q21-q22), que se localizam na glicoproteína Fy também denominada DARC (**Duffy Antigen Receptor for Chemokines**). A glicoproteína Fy com 7 domínios transmembranares é um recetor não específico de diversas citocinas e atua como um recetor para o parasita da malária, *Plasmodium vivax*, pelo que os eritrócitos que não apresentam os antígenos Fya e Fyb são resistentes à infeção pelo mesmo. Além da membrana do GR, os antígenos podem ser encontrados em várias outras células do organismo (rim, pulmão).

Destes 5 antígenos, destacam-se dois, Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>, codificados por dois alelos codominantes, *FY\*A* e *FY\*B*, sendo que diferem apenas num nucleótido.

Os anticorpos produzidos contra os antígenos do Sistema Duffy são maioritariamente do tipo IgG e têm sido relacionados com reações tardias na transfusão (habitualmente os anticorpos anti-Fy<sup>a</sup> e anti-Fy<sup>b</sup>) e doença hemolítica do recém-nascido (geralmente os anticorpos anti-Fy<sup>a</sup>).

### **Sistema Kidd (ISBT 009)**

O sistema Kidd é composto por 3 antígenos, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup> (que diferem entre si num único nucleótido) e o Jk<sup>c</sup>, que se localizam na glicoproteína Kidd, que têm como função transportar ureia nas células endoteliais dos vasos renais e nos eritrócitos. O gene que codifica esta glicoproteína, *SLC14A1* (ou *JK*), encontra-se localizado no cromossoma 18 (18q11-q12).

Os anticorpos produzidos contra os antígenos do sistema Kidd, anti-Jk<sup>a</sup> e anti-Jk<sup>b</sup>, podem ser do tipo IgG (maioritariamente) ou IgM, e ligam-se ao complemento, podendo culminar em hemólise. Estes anticorpos apresentam a particularidade de serem de difícil deteção nos testes de rotina (pois habitualmente o título do Atc decresce com o decorrer do tempo), pelo que são uma causa comum de reações transfusionais tardias. Na doença hemolítica do recém-nascido moderada, o anti-Jk<sup>a</sup> é o Atc deste sistema sanguíneo mais frequentemente envolvido.

### **Sistema Diego (ISBT 010)**

Descoberto em 1955 em descendentes de índios venezuelanos, o locus do gene *SLC4A1* encontra-se no cromossoma 17(17q21.31). Os 22 antígenos do sistema Diego estão localizados na Banda 3, uma importante e abundante glicoproteína transmembranar com aproximadamente 10<sup>6</sup> cópias por GR.

O Atg Di<sup>a</sup> é muito raro na população europeia, mas tem uma maior prevalência nos povos indígenas das Américas do Norte e do Sul, já o Atg Di<sup>b</sup> é um Atg de alta prevalência em todas as populações (9).

Os anticorpos anti-Di<sup>a</sup> e anti-Di<sup>b</sup> do sistema Diego, normalmente da classe IgG, ativam o complemento e estão associados a DHRN.

## Metodologias para identificação de antígenos de Grupo Sanguíneo

O método clássico para a identificação dos GSs é a fenotipagem eritrocitária que deteta o produto do gene através da ligação de antissoros aos antígenos específicos. No entanto, esta metodologia tem algumas limitações relacionadas quer com a disponibilidade de anticorpos específicos para deteção de antígenos eritrocitários raros, quer pela falta de reagentes policlonais ou monoclonais, quer pela variabilidade de reatividade. Além disso, nem sempre é possível determinar o fenótipo correto, devido à menor expressão de antígeno na superfície dos GRs, ou pela existência de transfusões recentes (<3 meses)(15).

As limitações dos testes de hemaglutinação na determinação de antígenos de fraca expressão, na identificação de antígenos raros, nas alterações relacionadas com a presença de alo e/ou autoanticorpos, nas interferências medicamentosas (daratumumab), ou após transfusões múltiplas, podem ser esclarecidas com técnicas de biologia molecular que identificam genótipos eritrocitários. Através desta metodologia é possível identificar com segurança o fenótipo inferido do genótipo, sem interferência dos eritrócitos transfundidos nem de autoanticorpos (15,16).

Nos últimos anos as bases moleculares dos principais antígenos dos GSs foram identificadas e sequenciadas, e torna-se agora possível a previsão de fenótipos de GSs a partir dos testes realizados em ADN genómico. Estão disponíveis vários métodos para identificar genótipos eritrocitários, os quais incluem o PCR em tempo real, sequenciação e piro Sequenciação-de ADN e sistemas baseados em Microarrays (17,18)(Anexo IV).

A era da biologia molecular teve início com **Watson** e **Crick** e a definição da estrutura química da molécula de ADN. Os ácidos nucleicos são moléculas de maior importância para os seres vivos, dado que controlam os processos vitais de todo o organismo. O ADN é individualizante, perene e todas as células nucleadas contêm a mesma informação genética, altamente condensada e enrolada nos cromossomas, em regiões codificantes (exões) e não codificantes ou estruturais (intrões).

Os genes, segmentos de ADN que codificam proteínas, ocupam apenas 5% do genoma humano e à sua posição no cromossoma dá-se o nome de *locus*. As diferenças na sequência dos nucleótidos do ADN por recombinações génicas, deleções, inserções, são conhecidas como mutações, e resultam em formas diferentes do gene afetado, tais como a alteração numa das bases nucleotídica, de uma das cadeias do duplex ou da perda de segmentos extensos de ADN (9).

O mundo da genética molecular foi revolucionado em 1983 com o advento de uma metodologia laboratorial – PCR (*Polimerase Chain Reaction*). A Polimerase é a enzima que catalisa a síntese (replicação e reparação) do ADN e permite a amplificação de ADN e análise de genes.

A identificação e caracterização molecular de genes dos GSs revelou que a maioria dos antígenos clinicamente significativos são codificados por SNPs (*single nucleotide polymorphisms*). Mais de 2 000 alelos foram identificados e associados a diferenças no fenótipo de GSs, ou à produção de anticorpos.

Os SNPs são os polimorfismos mais frequentes no genoma humano, a forma mais simples de variação de ADN entre os indivíduos. Consistem na alteração de um único nucleótido, que codificam substituições de aminoácidos na glicosiltransferase ou no domínio extracelular de uma proteína da membrana dos GRs. É transmitida de geração em geração, dando origem à diversidade genética da população humana, afetando a evolução do genoma humano. Quando os SNPs estão presentes numa frequência superior a 1% numa determinada população, constituem as formas alternativas do gene, denominados alelos.

Estas variações moleculares podem afetar as propriedades intrínsecas, diferenças estruturais e a função da proteína codificada. Os polimorfismos do gene podem representar uma vantagem para a evolução de uma determinada população, capaz de se adaptar mais rapidamente a uma mudança evolucionária do que uma população geneticamente uniforme. A literatura associa polimorfismos dos genes de GSs a resistência ou suscetibilidade a determinadas doenças (9).

O genótipo é a constituição genética de uma célula, organismo ou indivíduo, e corresponde ao conjunto de genes herdados, localizados num único e determinado *locus* (19)(Figura 6).

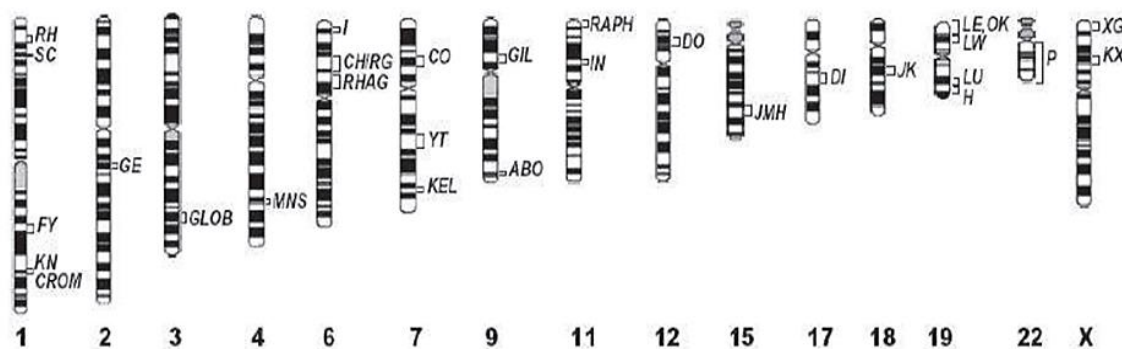


Figura 6: localização dos genes dos GSs. Fonte: Daniels (5)

O fenótipo reflete a atividade biológica do gene, traduzido nas características observadas. Por vezes o genótipo pode ser previsto pelo fenótipo como se verifica no sistema Kidd (são alelos codominantes), mas frequentemente só fornece uma indicação parcial como no sistema ABO (o fenótipo do grupo A pode ser homocigótico-AA ou heterocigótico- AO, o alelo O é recessivo).

Embora muito raro, a maioria dos sistemas de GSs tem um fenótipo nulo. A ausência do Atg pertencente a esse sistema, está frequentemente associada a alterações na morfologia e na função dos GRs (5).

A grande variedade de genes e os polimorfismos associados, refletem-se em infinitas combinações de antígenos nas células. A distribuição dos GSs na população humana não é uniforme, varia significativamente em diferentes populações e grupos étnicos (9).

### Funções dos Grupos Sanguíneos

Os antígenos de GSs estão localizados em moléculas funcionais. Atualmente, apesar de toda a informação sobre a estrutura e a genética dos GSs, ainda pouco se conhece das suas funções.

A maior parte destes sistemas antigénicos, para além de serem detetados serologicamente na superfície do GR, também são expressos noutras células e órgãos, como o pulmão, intestino, rim, o que é indicativo da importância e da transversalidade das suas funções fisiológicas. É conhecido o seu envolvimento em processos fisiológicos e patológicos do organismo.

Estes antigénios possuem uma grande diversidade estrutural e também funcional, e têm sido classificados em grandes grupos. Alguns destacam-se como moléculas com funções de transporte e canais, como recetores e ligandos de agentes patogénicos (vírus, bactérias e parasitas), como moléculas de adesão, moléculas com funções enzimáticas e proteínas com funções estruturais.

Alguns antigénios de GSs podem exibir mais de uma função (20,21)(Figura 7).

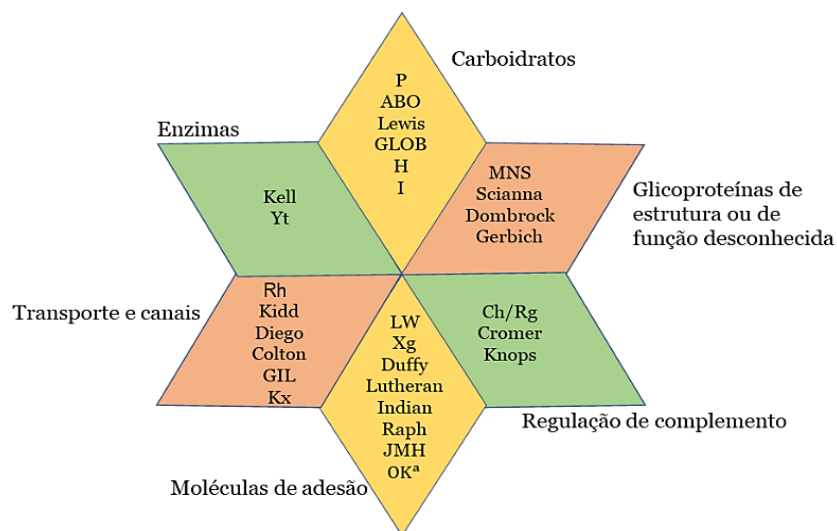


Figura 7: função dos antigénios dos GSs, podem ter mais de uma função, alguns com função biológica desconhecida, outros redundante. Fonte: adaptado de diaMed.com.br

## Sangue – Constituintes e sua Função

O sistema hematopoiético é composto pelo sangue, pelos locais onde este é produzido, ou seja, a medula óssea (MO), e os gânglios linfáticos.

A hematopoiese é um processo celular e molecular complexo, delicadamente regulado, que resulta na produção das diferentes linhas celulares do sangue. A célula precursora é a célula estaminal hematopoiética, que se divide e diferencia em células estaminais progenitoras de linhagem linfóide e mieloide, que proliferam e se diferenciam em células sanguíneas maduras funcionais, na presença de fatores de crescimento e do microambiente envolvente (**Anexo V**).

O sangue é um tecido conjuntivo, existente em estado líquido, constituído por componentes celulares que estão suspensos no plasma sanguíneo. Tem como funções o transporte de oxigénio e nutrientes para as células corporais e dióxido de carbono para os pulmões, a manutenção da hemóstase, pH do sangue, temperatura corporal e a proteção contra substâncias estranhas.

Caracteriza-se por um constante *turnover* de células, no sentido de, por um lado, manter constante na circulação periférica a população de células, e por outro lado, perante um estímulo apropriado aumentar a produção das células necessárias nesse momento.

Todos os elementos celulares são produzidos a partir de uma célula hematopoiética pluripotencial comum. A maturação e amplificação está dependente dos fatores de crescimento e de diferenciação específicos.

### **Glóbulos Rubros**

O eritrócito ou glóbulo rubro, a mais numerosa das células sanguíneas, possui uma forma, dimensões, ausência de núcleo, um citoplasma abundante em hemoglobina e elasticidade características que o tornam ideal para as funções que tem a desempenhar: absorver rapidamente o oxigénio dos pulmões, passar através dos mais finos capilares (com um lúmen inferior ao seu próprio diâmetro) e libertar o oxigénio em contacto com os tecidos. Nos pulmões, onde a pressão de oxigénio é elevada, cada molécula de hemoglobina conjuga-se com quatro moléculas de oxigénio, formando-se a oxihemoglobina. Esta ligação é reversível pelo que o oxigénio transportado pela hemoglobina é transferido para os tecidos, onde a pressão de oxigénio é baixa.

A conjugação da hemoglobina com o dióxido de carbono (normalmente produzido nos tecidos), origina a carboxihemoglobina, conjugação também facilmente reversível.

Os GRs levam em média 60 segundos para completar um ciclo de circulação, e a sua sobrevivência média em circulação é de 100 a 120 dias.

A eritropoietina estimula a proliferação e diferenciação eritroide nas células progenitoras e induz a libertação de reticulócitos da MO (22).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define anemia como um valor de Hb <13gr/dl no homem adulto e valor de Hb <12 gr/dl na mulher não grávida. A anemia é geralmente causada por uma diminuição da produção de eritrócitos, pelo aumento da destruição de eritrócitos por defeito na sua maturação, ou pela perda de sangue, aguda ou crónica.

A Anemia Ferropénica, causada pela deficiência de ferro é a forma mais comum, e calcula-se que 90% das anemias têm origem na carência deste nutriente essencial (23).

### **Glóbulos Brancos**

Os glóbulos brancos ou leucócitos representam cerca de 1% do volume sanguíneo. São células nucleadas, responsáveis pela proteção do organismo contra agentes agressores, como bactérias, vírus e fungos, sendo atraídos para o local lesado (quimiotaxia). Para além disso, têm a capacidade de remover células mortas e corpos estranhos ao organismo e de se movimentar através de projeções irregulares do citoplasma, e a acumular-se nos locais de infeção, fagocitando bactérias e corpos estranhos (diapedese).

Existem cinco tipos de leucócitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos, cada um responsável por uma função específica de defesa e proteção. Os linfócitos são a linhagem com mais relevância na resposta imunológica uma vez que conferem respostas mais específicas, e dividem-se em três grupos, os linfócitos B, os T, e os NK.

O número de leucócitos por microlitro de sangue no adulto saudável varia de 4 000 a 11 000, apresentam um diâmetro médio de 7,5 a 22  $\mu\text{m}$ , e o seu tempo de vida pode ser muito variável, podendo ir de apenas algumas horas a mais de um ano.

São as células maioritariamente implicadas em doenças hemato-oncológicas, originando leucopenia, leucocitose ou hiperleucocitose, se o seu número for superior a  $100\,000 \times 10^9/\text{L}$ , situação que pode evoluir para a síndrome de leucostase, por obstrução e invasão da microcirculação por microagregados de células leucémicas (22).

Ao nível da Medicina Transfusional, os antigénios leucocitários (HLA) são o maior obstáculo na transfusão e transplantação, a seguir aos antigénios do sistema ABO e Rh.

### **Plaquetas**

As plaquetas são os elementos sanguíneos mais pequenos, incolores, anucleadas, com um diâmetro de 1 a 4  $\mu\text{m}$  e em forma esférica ou de bastonete. São ativadas quando ocorre dano no endotélio vascular, dado a sua principal função ser a formação de um agregado plaquetário para ocluir ruturas nos vasos, impedir o fluxo de sangue e auxiliar nos processos de reparação das paredes dos vasos sanguíneos. O processo de paragem de uma hemorragia é bastante complexo e envolve a libertação dos constituintes dos grânulos alfa e grânulos densos e ativação dos fatores de coagulação, existentes no plasma, que interagem com as plaquetas. Outra das funções das plaquetas é a estimulação do sistema imunitário.

As plaquetas são formadas a partir da fragmentação do citoplasma de megacariócitos, a sua célula precursora, que reside na MO. Cada megacariócito produz cerca de 2 000 plaquetas e estima-se que a produção diária de plaquetas seja de  $100 \times 10^9/\text{L}$ , as quais permanecem em circulação no sangue periférico (SP) cerca de 10 dias. O intervalo de referência para a contagem plaquetária corresponde a valores entre 150 e  $300 \times 10^9/\text{L}$ .

Não há reserva de plaquetas na MO, aproximadamente 80% encontram-se em circulação e os outros 20% na polpa vermelha do baço (22).

A trombopoietina é o fator de crescimento responsável por estimular a maturação e libertação das plaquetas.

As plaquetas expressam uma variedade de marcadores imunogénicos à sua superfície, contra os quais o sistema imunitário do recetor induz a produção de anticorpos.

Os HPA (*Human Platelet Antigens*) existentes nas Glicoproteínas da membrana plaquetária, são capazes de produzir uma aloimunização em indivíduos expostos por gravidez, transfusão sanguínea ou por transplante.

Os anticorpos resultantes da aloimunização levam à destruição plaquetária e conseqüentemente a uma trombocitopenia, que pode resultar em doenças hemorrágicas graves como a Púrpura Trombocitopénica Aloimune Neonatal e a Refratariedade Plaquetária.

A aloimunização contra os antígenos dos grupos sanguíneos, os antígenos específicos das plaquetas (HPA- Human Platelet Antigen) e os antígenos HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) classe I (A e B), embora com diferentes implicações clínicas, podem culminar em hemorragias graves.

Aproximadamente 10% dos pacientes politransfundidos desenvolvem um Atc e suspeita-se sempre de aloimunização HPA (cl clinicamente semelhante à aloimunização HLA), se as contagens plaquetárias são inadequadas uma hora após a transfusão dos componentes plaquetários.

## **Plasma**

O plasma representa cerca de 55% do volume sanguíneo. É uma solução complexa composta por mais de 90% de água, onde as células sanguíneas se encontram dispersas. Dos restantes 10% das substâncias que constituem o plasma, as proteínas são as mais abundantes. A albumina, sintetizada no fígado constitui 58% das proteínas encontradas no plasma e desempenha um papel importante na regulação do movimento da água entre os tecidos e o sangue. As globulinas tais como anticorpos, substâncias reguladoras como enzimas e hormonas e o sistema do complemento representam 38% das proteínas. O fibrinogénio constitui cerca de 4% das proteínas. Para além das proteínas, o plasma é (também) constituído por lípidos, açúcares, vitaminas, minerais e compostos azotados e de excreção como a ureia, o ácido úrico e a creatinina, e ainda sais inorgânicos.

## **Componentes sanguíneos**

A transfusão de componentes sanguíneos é uma terapêutica de suporte vital e essencial para vários tratamentos médicos e cirúrgicos.

Deve ter como pilar uma estratégia global de boas práticas de transfusão, que permita a melhor utilização dos componentes sanguíneos, de acordo com as necessidades específicas.

Os potenciais benefícios das transfusões de concentrado de eritrócitos (CE) são a otimização da reologia da circulação capilar e o fornecimento de oxigénio, principal efeito terapêutico procurado, principalmente para os tecidos cardíaco e neurológico que toleram mal a menor oxigenação.

Cada unidade de CE transfundida, proveniente de uma dádiva de sangue total, tem um volume que se situa entre 200 a 300ml, contém um mínimo de 40gr de hemoglobina e prevê-se que aumente 1gr a 1,5gr de hemoglobina no doente. Os GRs armazenados para transfusão de CE mantêm-se viáveis a uma temperatura de 2-6°C, por um período de 35 dias se conservados em citrato, fosfato, dextrose e adenina (CPDA) ou durante 42 dias se é adicionado SAGM (salino, adenina, glucose e manitol).

Em pessoas adultas, os concentrados de plaquetas são utilizados para prevenir e/ou tratar hemorragias em pacientes com defeitos quantitativos e/ou qualitativos das plaquetas.

Um Concentrado Plaquetário é obtido a partir do plasma rico em plaquetas ou da camada leucoplaquetária de uma única dádiva de sangue total. Um Concentrado de Pool de Plaquetas (CPP) é obtido a partir da junção de 4 a 6 concentrados plaquetários. Contém um mínimo de  $2,5 \times 10^{11}$  plaquetas num volume total de 250–300 mL. É considerada a “dose adulta normalizada”.

Um Concentrado Unitário de Plaquetas (CUP) é obtido a partir de um único dador por plaquetafereze. Contém mais de  $2,5 \times 10^{11}$  plaquetas, suspensas num volume aproximado de 250 ml de plasma.

As plaquetas armazenadas mantêm-se viáveis a  $22^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) em agitação contínua, por um período de 5 dias, o qual pode prolongar-se até 7 dias nos componentes submetidos a metodologias de redução patogénica(24).

## **Patologias Hematológicas e Hemato-Oncológicas**

São numerosas as patologias que envolvem as diferentes células sanguíneas. Fatores hereditários ou ambientais estão na origem destas doenças hematológicas, e alteram os mecanismos envolvidos na produção de uma ou mais células, resultando em patologias do GR, alterações hemostáticas e hemopatias malignas.

### **Patologias do Glóbulo Rubro**

Os GRs podem apresentar alterações no tamanho, forma, estrutura e coloração. Alterações intrínsecas do GR a nível estrutural e fisiológico nomeadamente a membrana, a molécula da hemoglobina e o sistema enzimático, podem dar origem a anemia.

A esferocitose hereditária (EH) é uma causa comum de hemólise e anemia hemolítica e resulta de alterações quantitativas e/ou qualitativas das proteínas da membrana do GR. Mutações nos vários genes que codificam proteínas estruturais da membrana do GR, nomeadamente a espectrina, anquirina, proteína 4.2 e proteína Banda 3, vão traduzir-se numa alteração da forma do eritrócito, com perda de área de superfície, mas sem qualquer redução substancial de volume celular. O GR fica mais pequeno e denso, adquirindo a forma esférica (esferócito), característico, mas não específico, desta patologia.

A expressão da EH é muito heterogénea, podendo variar de formas assintomáticas até situações clínicas de anemia grave, dependentes de transfusões.

As hemoglobinopatias são doenças hereditárias que resultam de mutações que afetam os genes responsáveis pela síntese das cadeias de globina da hemoglobina. Os genes responsáveis pela codificação das globinas, estão localizados nos cromossomas 11 (cluster das globinas  $\beta$ ) e 16 (cluster das globinas  $\alpha$ ).

As alterações podem conduzir a défices quantitativos ( $\alpha$ -talassémia/ $\beta$ -talassémia) ou qualitativos nos quais se verifica uma alteração estrutural da cadeia de globina, resultando numa hemoglobina estruturalmente anormal (HbS, HbD, etc). A sobrevivência destes doentes (nas formas mais graves de doença) fica dependente da administração de concentrado de eritrócitos.

### **Neoplasias Hematológicas**

A classificação das neoplasias do foro hematológico sofreu uma grande alteração nos últimos 50 anos. Em 1982, o grupo FAB (French-American-British classification) apresentou uma classificação baseada em aspetos morfológicos, bastante sólida e credível, e que nas duas décadas seguintes foi utilizada em conjunto com estudos clínicos, morfológicos e genéticos.

Em 2001, a OMS introduziu uma nova classificação, revista em 2016. A classificação da OMS mantém a estrutura e filosofia da classificação FAB, mas evoluiu até uma abordagem que incorpora agora conhecimentos fornecidos pelas mais recentes tecnologias de biologia molecular e genética. Esta, integra os novos conhecimentos adquiridos, como os de carácter morfológico, de imunofenotipagem, patologia molecular, bem como clínica e alguns aspetos de etiologia, sublinhando a importância dos critérios genéticos e de biologia molecular.

A classificação da OMS baseia-se em critérios morfológicos, imunofenotípicos, genéticos e clínicos (16,17).

Apesar de ainda se utilizar a classificação FAB, a classificação da OMS é mundialmente aceite e uma referência incontornável em investigações científicas e clínicas (15,16).

A anemia crónica é frequente nas doenças hemato-oncológicas. Muitos doentes com anemia tornam-se dependentes de transfusões de glóbulos rubros, mas outras citopenias periféricas também podem ocorrer, como a diminuição acentuada de plaquetas por falência medular.

O risco de hemorragias aumenta e as transfusões de plaquetas são parte importante do tratamento para corrigir anomalias na Hemóstase primária (adesão, agregação e ativação).

As neoplasias hematológicas são doenças clonais derivadas duma única célula da MO ou tecido linfóide periférico que sofreu alteração genética. Verifica-se uma maior incidência nos países com índice de desenvolvimento elevado. Ocorrem no contexto de mutações que ativam oncogenes ou inativam genes supressores tumorais.

A origem destas neoplasias pode estar relacionada com agentes externos, como a radiação ionizante, benzenos, tratamentos longos e exaustivos de quimioterapia, agentes Infeciosos, assim como predisposição familiar.

A doença hemato-oncológica comporta-se cada vez mais como uma doença crónica.

## **Leucemia**

A leucemia é uma doença neoplásica com uma incidência relevante a nível mundial, especialmente no sexo masculino. Existem quatro tipos fundamentais de leucemia: a leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda e leucemia linfocítica crónica, de acordo com o tipo de células afetadas. Todos estes tipos de leucemia diferem entre si na etiologia, epidemiologia e tratamento.

A leucemia caracteriza-se pela acumulação de leucócitos malignos no SP e MO, e a falência medular. A normal produção, desenvolvimento e diferenciação das células sanguíneas é substituída pela acumulação de blastos na MO, um estado imaturo de formação e desenvolvimento, o que se traduz por um crescimento anormal e descontrolado destes precursores na MO. A acumulação destas células imaturas na MO impede a formação das células sanguíneas normais, tais como os glóbulos brancos, glóbulos rubros e as plaquetas.

## **Mieloma múltiplo**

O mieloma múltiplo é uma neoplasia da MO, em que a célula alterada é o plasmócito, uma célula terminal de diferenciação da linhagem dos linfócitos B, que tem a seu cargo, a produção de anticorpos que desempenham uma função vital na defesa do organismo contra agentes infecciosos externos. Os plasmócitos malignos multiplicam-se descontroladamente na MO e impedem a produção das células sanguíneas normais.

## **Síndrome Mielodisplásico**

É a mais comum das neoplasias mieloides, inclui diversos subtipos de gravidade variável, necessidade de terapêuticas diversas e esperança de vida diferentes. Os Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são neoplasias medulares em que a desregulação da maturação resulta em hematopoiese ineficaz devido ao aumento da apoptose, proliferação anormal de blastos e displasia. Os SMD constituem um grupo heterogéneo de doenças hematopoiéticas clonais com citopenias no SP, em que os doentes tendem a desenvolver anemia, neutropenia, trombocitopenia ou uma combinação dos três. A MO hiper proliferativa, leva a um potencial risco de evolução para leucemia mieloide aguda (LMA).

Os mecanismos envolvidos na patogénese desta doença são múltiplos e complexos, afetando a célula pluripotencial (stem cell) em várias etapas, originando alterações na proliferação, diferenciação e apoptose das células do sistema hematopoiético.

Neste grupo de patologias as células estaminais passam por um processo de maturação anormal e podem acumular-se na MO, passando esta a ser rica em células progenitoras, tornando-se hiper celular. Uma sequência de alterações genéticas adquiridas resulta no desenvolvimento de um clone anómalo e geneticamente instável de células estaminais. Este clone anómalo apresenta alterações na proliferação e maturação, como o aumento da apoptose, responsável pelas citopenias nos estádios iniciais da doença. A apoptose decresce e a proliferação aumenta à medida que o SMD evolui para fases mais avançadas até progredir para LMA.

O estudo das alterações cromossômicas é importante para diagnóstico, prognóstico, decisão terapêutica e seguimento. As anomalias cromossômicas são observadas em 15 a 60% dos casos de SMD primários. Em geral, as alterações citogenéticas observadas nos SMD, são perdas ou ganhos de material genético. Isso sugere tanto alteração na função de genes supressores tumorais, como haploinsuficiência, que exerce um papel na gênese da doença.

O SMD é uma das doenças hematológicas malignas mais comuns na população idosa, especialmente a partir dos 70 anos de idade, e tem maior incidência no sexo masculino.

## **Linfoma**

Os linfomas são um grupo heterogêneo de neoplasias resultantes da acumulação de linfócitos malignos nos gânglios linfáticos, podendo atingir o sangue (fase leucêmica) ou infiltrar outros órgãos para além dos do tecido linfoide. Têm origem nas células do sistema linfoide em diferentes estádios de diferenciação devido a alterações nos genes que controlam o desenvolvimento das células. A maioria tem origem em células B e os restantes em células T ou NK. Na generalidade não se conhece a origem dessas alterações, alguns linfomas encontram-se associados a infeções, noutros, como fatores de risco envolvidos destaca-se o contacto prolongado com substâncias tóxicas ou após tratamentos de radioterapia e quimioterapia. Existem dois grandes subtipos principais: os linfomas Hodgkin (LH) e os linfomas não-Hodgkin (LNH), separados com base na presença histológica de células de ReedSternberg (RS) características do LH.

Os LH apresentam uma distribuição etária bimodal com o primeiro pico em jovens adultos, e o segundo pico em idosos.

Os LNH são os tumores hematológicos mais comuns representando atualmente a quinta neoplasia mais frequente no mundo. São mais frequentes no idoso e no sexo masculino, tendo maior incidência na raça caucasiana, e nos países com alto índice de desenvolvimento.

A Macroglobulinémia de Waldenström (MW) é um linfoma não-Hodgkin de linfócitos B caracterizado pela proliferação de um clone com diferenciação para plasmócitos, e produzida apenas um tipo de imunoglobulina IgM (gamapatia monoclonal). A alta concentração sérica de IgM pode originar síndrome de Hiperviscosidade.

## **Complexo Principal de Histocompatibilidade**

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC-Major Histocompatibility Complex) existente em todos os animais vertebrados, foi caracterizado em 1948 por **George Snell**, enquanto realizava estudos de transplante em ratos. Na década de 50 **Jean Dausset** detetou no soro de doentes politransfundidos e de mulheres múltiparas, anticorpos que reagiam com antigénios dos leucócitos por aglutinação, os quais foram denominados HLA (**H**uman **L**eukocyte **A**ntigen).

O MHC é um cluster com mais de 200 genes, maioritariamente funcionais, situados no cromossoma 6(6p21.31), que codificam glicoproteínas expressas na superfície das células, e que participam ativamente no reconhecimento celular, apresentação de antígenos e resposta imunológica. Os loci HLA fazem parte dessa região genética.

Só aproximadamente 20% dos genes possuem funções relacionadas com o sistema imunitário (Figura 8).

Os antígenos HLA desempenham um papel imunológico primordial através do controlo da discriminação entre o *self* e o *non-self* da resposta imunitária a estímulos antigénicos, e pela coordenação da resposta imunitária celular e humoral. A capacidade das moléculas de MHC para controlar a resposta imune e estabelecer a comunicação entre todos os elementos clássicos de defesa, como anticorpos, linfócitos T, linfócitos B, e citocinas, fazem delas a base da ativação do sistema imunológico (9).

O sistema HLA além de poligénico e altamente polimórfico, tem como característica relevante os genes serem codominantes, herdados de cada progenitor como haplótipos, de forma Mendeliana. As recombinações ocorridas na transmissão dos haplótipos estão na base do aparecimento de novas combinações alélicas (25).

O MHC subdivide-se em 3 classes: I, II e III, com base na sua distribuição tecidual, estrutura e função:

- Classe I: moléculas expressas em todas as células nucleadas e nas plaquetas e codificadas por 6 genes: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F e HLA-G, sendo os HLA A, B e C os mais polimórficos. Reconhecem antígenos peptídicos intracelulares, incluindo componentes virais e tumorais que depois de processados são apresentados a linfócitos T citotóxicos (CD8+).

- Classe II: expressa-se apenas nas células dendríticas, macrófagos ou células B, são moléculas codificadas por 5 loci: HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DM, e HLA-DO, sendo os 3 primeiros os mais importantes e polimórficos. Esta classe desempenha um papel predominante na resposta imunitária inicial a antígenos extracelulares, nomeadamente bactérias, tecidos transplantados e componentes sanguíneos, ativando os linfócitos T helper (CD4+)(26).

- Classe III: codificam várias proteínas com funções imunológicas, nomeadamente moléculas envolvidas na inflamação, como as proteínas do sistema de complemento (C2, C4 e Fator B), proteínas de choque térmico e Fator de necrose tumoral (TNF). A função da maioria dos genes na região da classe III ainda está por determinar.

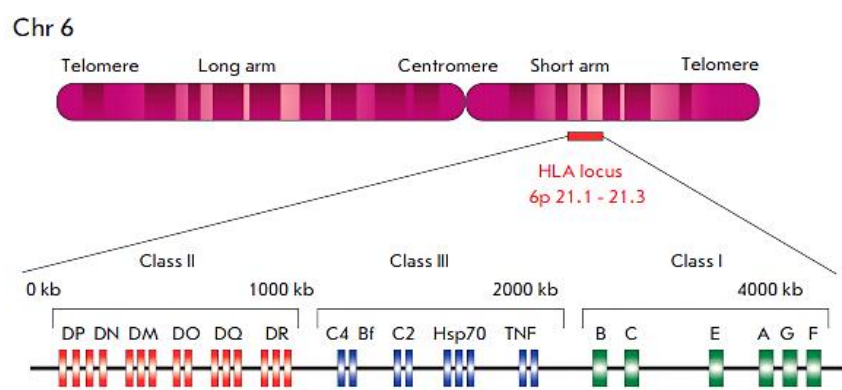


Figura 8: Loci do MHC humano.  
Fonte: Zakhrova(27)

A enorme diversidade do sistema HLA permite que estas moléculas se liguem a uma infinidade de péptidos que depois apresentam aos linfócitos T, por via endógena (HLA/CD8+) ou por via exógena (HLA/CD4+), formando um complexo ternário trimérico. A configuração resultante deste complexo determina a sua afinidade para com o conjunto de recetores dos linfócitos T e a subsequente ativação destas células de defesa. Induzem, também, a produção de citocinas reguladoras que ativam várias células e funções imunes, desempenhando um papel importante na ativação dos linfócitos B que quando estimulados evoluem para plasmócitos e produzem os aloanticorpos específicos. A quantidade e o tipo de Atc produzido resultam da interação de linfócitos T *helper* (que estimulam a produção de anticorpos) e linfócitos T supressores (que inibem a produção de anticorpos).

Os antígenos HLA são normalmente expressos de uma forma constitutiva nas membranas das células nucleadas (GRs imaturos expressam HLA) e plaquetas, e pode ocorrer sensibilização e produção de aloanticorpos sempre que existe contacto destas moléculas com o sistema imunitário de indivíduos geneticamente diferentes. Esta alo-sensibilização pode ocorrer por transfusão de sangue, por gravidez ou por transplantação.

Atualmente, é obrigatória a desleucocitação dos componentes sanguíneos (previamente ao armazenamento), o que contribui para prevenir a aloimunização (essencialmente no sistema HLA), e reduzir as reações transfusionais.

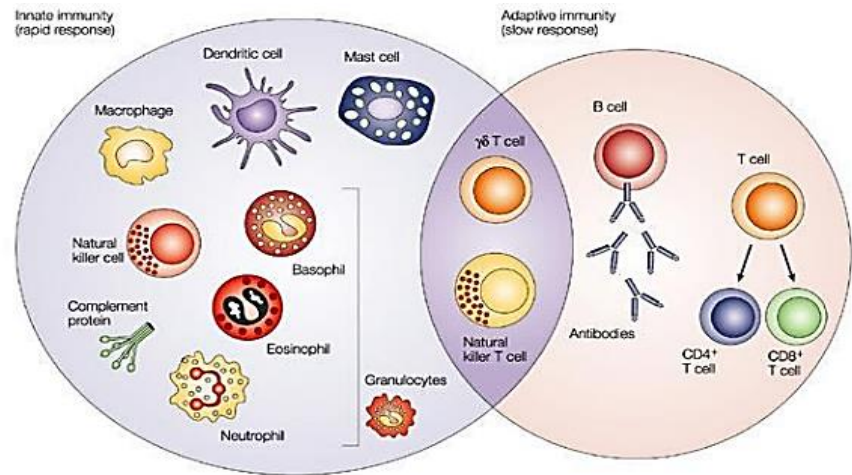
## **Sistema Imune e pesquisa de Aloanticorpos**

O sistema Imune é altamente evoluído e fundamental para a sobrevivência. É composto por uma complexa rede de órgãos, células e moléculas, distingue o próprio do não próprio e cria uma memória que permite uma resposta rápida a ameaças recorrentes.

É um sistema cooperativo que envolve complexas interações, e interligações específicas entre diferentes células e os mediadores solúveis como citocinas, quimiocinas, sistema de complemento e proteínas de fase aguda. Atuam conjuntamente num trabalho dinâmico, tornando-se capazes de reconhecer e eliminar moléculas estranhas ao organismo.

Como primeira linha de defesa, a imunidade inata é aquela que nasce com cada indivíduo, e tem a capacidade de destruir algumas substâncias estranhas ao organismo. É representada pela barreira mucocutânea, pelos fagócitos (macrófagos, monócitos e neutrófilos), pelas células auxiliares que medeiam a resposta inflamatória (basófilos, mastócitos, eosinófilos, células dendríticas, células *Natural Killer* e plaquetas), pelos mediadores libertados, e pelo complemento com funções de lise, ativação do processo inflamatório e opsonização imunológica (Figura 9).

Figura 9: Células envolvidas na resposta imune. Fonte: MicrobiologyInfo.com



A fagocitose é um dos principais mecanismos desempenhados pela imunidade inata. Estas células especializadas na deteção, captura e processamento do Atg são o estímulo para o início da resposta imune adaptativa. Cada uma destas células tem elevada capacidade de fagocitose e desempenha um papel importante na apresentação de antígenos às células do sistema imune adquirido.

A imunidade inata é imediata e não se altera com a exposição repetida ao mesmo Atg, pois é inespecífica.

Por outro lado, a imunidade adaptativa ou adquirida, que consiste na aptidão do organismo para identificar e destruir os antígenos estranhos, é altamente específica. É dotada de memória imunológica e uma diversidade de anticorpos, sendo a cada novo contacto com o Atg mais rápida e eficiente. As respostas adaptativas são mediadas por recetores específicos e restritos das células efectoras T e B, formados durante o desenvolvimento destes linfócitos.

Ao contrário dos recetores da resposta inata, o recetor de membrana da célula T (TCR) e da célula B (BCR) resultam da recombinação da linha germinativa, o que leva à produção de um repertório de recetores com enorme diversidade.

Quando os recetores específicos dos linfócitos encontram o Atg, mais exactamente uma pequena região do Atg designada de epítipo, acontece a expansão clonal das células efectoras específicas para esse Atg.

Na resposta imunitária adaptativa, as células B e T reconhecem o Atg através dos recetores específicos, imunoglobulinas (imunidade humoral) e complexos recetores de célula T (imunidade celular), respetivamente.

É nos órgãos linfoides primários que se desenvolvem os linfócitos no organismo. Nos mamíferos as células T amadurecem no timo e as células B, no fígado fetal e na MO. Nestes locais as células adquirem tolerância para os antígenos próprios do organismo, desenvolvendo a capacidade de reconhecimento de Atg não próprios.

No timo, durante a maturação dos linfócitos é feita a seleção do repertório final dos seus recetores, sendo destruídos os que possuem recetores sem afinidade, bem como aqueles que possuem elevada afinidade. Adquirem a competência de reconhecer as moléculas MHC autólogas que induzem à autotolerância.

Na MO, as células B passam por diversos estádios de desenvolvimento onde adquirem a sua especificidade antigénica. No seu processo de maturação, as células B imaturas começam por expressar inicialmente IgM, o primeiro Atc a ser produzido na resposta imune primária, gerado por um processo de recombinação somática. A célula B *naive*, após exposição a antígenos é estimulada, sofre transformação blástica, desloca-se para a zona de células T dos tecidos linfoides, onde vai ocorrer hipermutação somática e a troca de cadeias pesadas das imunoglobulinas. Esse clone vai proliferar, e diferenciar-se em plasmócitos produtores de anticorpos IgG ou em células B de memória. Cada célula B produz um tipo específico de anticorpo, capaz de reconhecer e de se ligar ao Atg correspondente.

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são proteínas glicosiladas compostas por duas cadeias leves e por duas cadeias pesadas idênticas, uma estrutura básica muito similar, comum a todos, e responsável pelas suas propriedades físico-químicas. Ao nível funcional possuem duas regiões principais, a variável e a constante, sendo a primeira a responsável pelo reconhecimento do Atg e possuindo, a segunda, propriedades efetoras. As porções constantes da cadeia pesada e da cadeia leve são responsáveis pelas atividades biológicas da Imunoglobulina (ativar linfócitos T, ativar o complemento e promover a fagocitose – porção Fc da Ig).

A diversa especificidade dos anticorpos na ligação aos antígenos é explicada pela diversidade nas sequências de aminoácidos da região variável das cadeias leves e das cadeias pesadas. Em cada região variável existem três sub-regiões denominadas de hipervariáveis, correspondentes às zonas da proteína que entram em contacto com o Atg. A IgM e a IgG são os anticorpos de maior importância clínica relacionados com os sistemas de GSs.

A primeira classe de imunoglobulinas, produzidas pelo linfócito B maduro na resposta imune primária são as IgM. Estruturalmente, são moléculas pentaméricas, constituídas por 5 monómeros ligados por pontes dissulfídicas e por uma cadeia J, que se ligam aos antígenos da superfície dos eritrócitos formando agregados, processo designado por aglutinação.

Na membrana dos linfócitos B como parte integrante do BCR está presente como monómero. O principal efeito biológico das IgM é a ativação do sistema de complemento, que potencia o processo inflamatório e fagocítico, podendo provocar lise eritrocitária, através do complexo de ataque à membrana (MAC).

As IgG são produzidas na resposta imune secundária e são considerados anticorpos imunes. É a imunoglobulina mais abundante em circulação, distribuída uniformemente entre os espaços intra e extravasculares. Estruturalmente, são moléculas monoméricas, que tendem a combinar-se e a permanecer ligadas a antígenos da superfície dos eritrócitos, sendo possível detetar a sua presença nos testes laboratoriais de antiglobulina. A este fenómeno designa-se sensibilização. Dependendo da subclasse da IgG também podem ativar o sistema de complemento.

O termo aloimunização refere-se à resposta imunitária dirigida para antígenos de indivíduos de uma mesma espécie, mas geneticamente diferentes, podendo envolver diferentes células e tecidos consoante o maior ou menor grau de polimorfismo de cada sistema antigénico. Indivíduos previamente expostos a um Atg dizem-se sensibilizados. Exposições repetidas ao mesmo Atg desencadeiam uma reação de hipersensibilidade (reação de tipo II), mediada por IgG ou IgM em que os antígenos de superfície estimulam uma resposta citotóxica com ativação de complemento e da fagocitose.

A aloimunização eritrocitária é a resposta imunológica pela exposição a aloantígenos de GSs, não-ABO, após transfusão de componentes sanguíneos, transplante ou gravidez (27).

Embora existam centenas de antígenos numa unidade de CE transfundida, apenas uma minoria dos recetores desenvolve anticorpos. A aloimunização é mais comum em certas circunstâncias clínicas, difere nas populações de doentes, e de acordo com a patologia (**Anexo VI**).

Um 'respondedor' é definido como um indivíduo que se tornou imunizado a pelo menos um antígeno não-ABO. Verifica-se também a existência dos 'Hiper respondedores', isto é, doentes eficientes a formar vários anticorpos após uma ou mais exposições aos aloantígenos (28).

Os doentes expostos sucessivamente aos diversos aloantígenos dos GRs transfundidos, quando o seu sistema imune não os reconhece como *non-self* e não estimula a produção de anticorpos detetáveis, são referidos como 'não respondedores' a formar aloanticorpos (Figura 10).

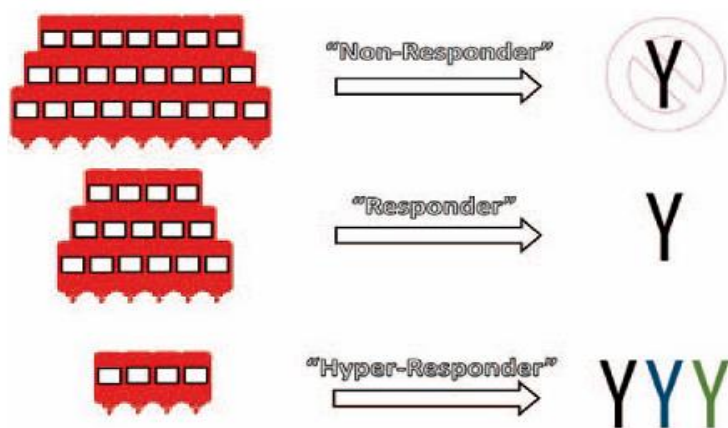


Figura 10: modelo para definir o fenótipo "respondedor", os ícones de sacos vermelhos representam transfusões, **YYY** representam aloanticorpos, as cores representam as especificidades. Fonte: Gehrie(28)

Fatores clínicos e biológicos, como o estado de doença, polimorfismos HLA, inflamação subjacente e a idade, podem contribuir para o fenótipo 'respondedor'. Outra hipótese relatada, confirmada em modelos murinos, considera que a exposição a microrganismos (com significativa homologia com os antígenos dos sistemas Kell, Kidd e Duffy), potenciam a aloimunização por pré-ativação das células T CD4+(29)(**Anexo VI, VII, VIII**). Estão ainda por esclarecer todas as variáveis que predisõem os recetores de componentes sanguíneos a desenvolver os aloanticorpos não-ABO (28,30).

A imunogenicidade é definida como a capacidade de um determinado Atg desencadear uma resposta imune específica de tipo humoral ou celular, e também a capacidade de produzir anticorpos e desencadear memória imunológica, num doente sem o respetivo Atg.

A imunogenicidade de um antígeno de GS é um importante fator para determinar se após uma transfusão de componentes sanguíneos o recetor irá desenvolver o anticorpo correspondente. É uma medida da probabilidade de induzir um aloanticorpo (30,31).

A especificidade é a característica de um Atc que lhe permite reconhecer e estabelecer ligações com antígenos individualizados e específicos.

Com exceção de alguns anticorpos de ocorrência natural, a maioria dos anticorpos contra antígenos de GSs constituem a resposta imune após o contacto com um Atg ausente no GR do doente. Muitos dos efeitos adversos das transfusões de sangue são mediados pelo sistema imunológico do recetor. O sistema imunológico deteta o antígeno, processa esse antígeno e organiza uma resposta para o eliminar.

A resposta imune contra aloantígenos eritrocitários envolve as APCs que podem influenciar tanto a especificidade quanto a magnitude de uma resposta imune. Quando um antígeno estranho é encontrado pelo sistema imunológico, pelo menos 2 eventos ocorrem simultaneamente. Por um lado, as APCs depois de reconhecer o Atg como *non-self* (de o fagocitar e processar as proteínas portadoras dos epítomos aloantigénicos em peptídeos), formam um complexo com as moléculas MHC II e são apresentadas ao TCR das células CD4+ (33)(Figura 11).

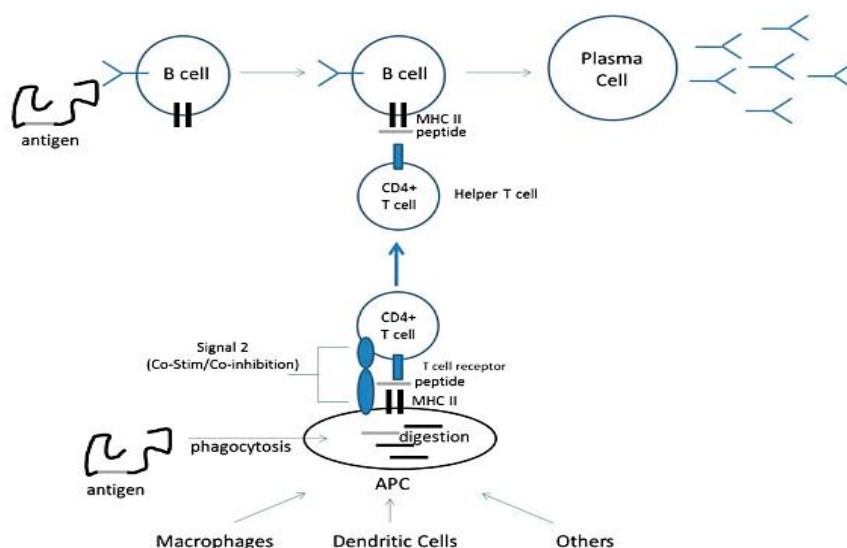


Figura 11: resposta imune celular na aloimunização eritrocitária. Fonte: Zimring JC (32)

Paralelamente as células B adsorvem o antígeno no seu recetor (BCR), reconhecido por uma imunoglobulina reorganizada. De modo idêntico às APCs, as células B processam o antígeno, e apresentam como peptídeos incorporados na molécula MHCII (em alguns casos, as próprias células B são classificadas como APCs por esse motivo).

Assim, durante a aloimunização de GRs transfundidos, as APCs adsorvem os GRs aleatoriamente e apresentam os peptídeos em MHCII, enquanto as células B, que têm um BCR específico para aloantígenos dos GRs, adsorvem o aloantígeno e, da mesma forma, apresentam os mesmos peptídeos ao linfócito T via MHCII. As células T ativam os linfócitos B a produzir anticorpos específicos contra os epítopos correspondentes.

A resposta imune primária tem início na primeira vez em que o antígeno é encontrado. As moléculas de IgM iniciais ligam-se fracamente ao antígeno, pois têm uma afinidade baixa para os antígenos, mas este facto é parcialmente compensado pela sua organização em pentâmeros, que lhe confere 10 regiões de reconhecimento antigénico e uma maior capacidade de ativação do sistema complemento. A grande dimensão dos pentâmeros de IgM promove ainda a agregação e aglutinação de partículas com uma baixa densidade de determinantes antigénicos e a ligação a antígenos com epítopos repetidos. A capacidade da aglutinação é uma componente importante da defesa, mediada pelas IgM. As moléculas de IgG subsequentes são muito mais direcionadas e continuam a ser produzidas muito tempo após o encontro com o antígeno.

Num posterior contacto com o Atg, a célula B vai reconhecer os antígenos através do BCR. Após internalizar o Atg, este é processado e forma um complexo com as moléculas de MHC de classe II. Este complexo permite a apresentação do Atg a um linfócito T CD4+, que ao ser ativado produzirá citocinas que funcionarão como fatores de estimulação para a célula B. De facto, estas citocinas produzidas pelas células T vão induzir a diferenciação das células B em células secretoras de anticorpos, os plasmócitos e em células B de memória.

Quando o Atg já é conhecido, é induzida uma resposta imune secundária, os linfócitos B de memória proliferam e aceleram a produção de imunoglobulinas com afinidade para o Atg. É mais rápida, mais específica e a produção deste Atc em particular pode permanecer elevada por anos, inclusivamente, pode proporcionar imunidade duradoura.

Células geneticamente incompatíveis são rapidamente destruídas por via intravascular ou extravascular, A interação Atg-Atc forma pontes moleculares que ligam os GRs (aglutinação ou sensibilização), originando reações transfusionais hemolíticas cuja gravidade fica dependente da classe e sub-classe do Atc e da expressão do Atg na membrana do GR.

Alguns tipos de anticorpos após ligação ao Atg ativam o sistema do complemento, uma série de reações induzidas por enzimas envolvendo fragmentos de proteínas. A cascata termina com a formação de um complexo de ataque à membrana, uma grande molécula com capacidades de originar um orifício na membrana celular do GR provocando a sua lise osmótica.

Outros anticorpos, ligam-se especificamente aos antígenos, mas não ativam eficientemente o complemento. As células são direcionadas para fagocitose extravascular e lise. Os macrófagos esplénicos possuem recetores que se ligam ao fragmento Fc da IgG e à fração C3b do complemento. Os GRs opsonizados também podem ser destruídos no fígado após a ligação do recetor CR1(recetor para a fração C3b) às células Kupffer.

Um aloanticorpo clinicamente significativo pode ser caracterizado, de forma abrangente, como um Atc frequentemente associado a RTH, DHRN, e a uma notável diminuição na sobrevivência das células transfundidas (9,34).

Fatores como a especificidade, a temperatura de reação, o número de determinantes antigénicas na membrana do GR, a classe e sub-classe da imunoglobulina, e a capacidade de ativar o complemento podem influenciar a significância de um Atc, e provocar hemólise "*in vivo*" (1). Alguns anticorpos destroem os GRs em poucos minutos, outros em alguns dias, e determinados anticorpos não provocam destruição notável dos GRs. Há anticorpos conhecidos por causar DHRN, enquanto outros causam sensibilização do GR sem sinais clínicos de DHRN.

Os aloanticorpos dirigidos contra antígenos dos sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd possuem importância clinicamente significativa, porque são frequentes, reagem a 37°C e podem fixar o complemento. Estão associados a reações transfusionais hemolíticas, causam diminuição da sobrevivência dos GRs transfundidos, e podem atravessar a barreira placentária provocando DHRN. Os anticorpos dos sistemas Lewis, MNS, P1PK e Lutheran são considerados clinicamente significativos quando reagem a 37 °C.

Já os anticorpos clinicamente insignificantes são na sua maioria da classe IgM (exceto os do Sistema ABO), reagem a temperaturas abaixo de 25°C e não causam destruição celular "*in vivo*", sendo os mais frequentes os dirigidos contra antígenos dos sistemas Lewis, Lutheran, P1PK, Diego e MNS. Alguns anticorpos IgM reagem melhor a frio (4°C) e, geralmente são de ocorrência natural.

A presença de anticorpos direcionados contra os antígenos de GSs no componente transfundido (incompatibilidade maior) ou anticorpos presentes no produto transfundido direcionados contra os antígenos dos GSs do receptor (incompatibilidade menor) pode levar a uma RTH, e dependendo do Atc, a destruição dos GRs por hemólise, que pode ser intravascular ou extravascular.

Um dos objetivos da Medicina Transfusional é assegurar através de boas práticas clínicas e laboratoriais, a minimização dos efeitos adversos da transfusão. As reações adversas observadas nos receptores, podem ser classificadas em reações transfusionais hemolíticas ou não hemolíticas, agudas ou tardias. A maioria dos eventos adversos relacionados com a transfusão de componentes envolvem o sistema imune e estão associadas a reações hemolíticas ou complicações não infecciosas. A lesão pulmonar aguda relacionada com transfusão (TRALI), sobrecarga volémica associada à transfusão (TACO), reações alérgicas/urticiformes, reações febris não hemolíticas, e as RTH são possíveis efeitos adversos relacionados com a transfusão de componentes sanguíneos (9,34).

Numa reação transfusional hemolítica ocorre um aumento da destruição celular, que se manifesta por sintomas e sinais clínicos e laboratoriais. A hemólise pode ocorrer intravascularmente ou extravascularmente e pode ser imediata (Acute Hemolytic Transfusion Reaction – AHTR), tardia (Delayed Hemolytic Transfusion Reaction – DHTR), ou pode ocorrer uma reação serológica retardada (Delayed Serologic Transfusion Reaction – DSTR).

A interação dos anticorpos preformados com os antígenos na membrana dos GRs é a base imunológica das reações transfusionais hemolíticas.

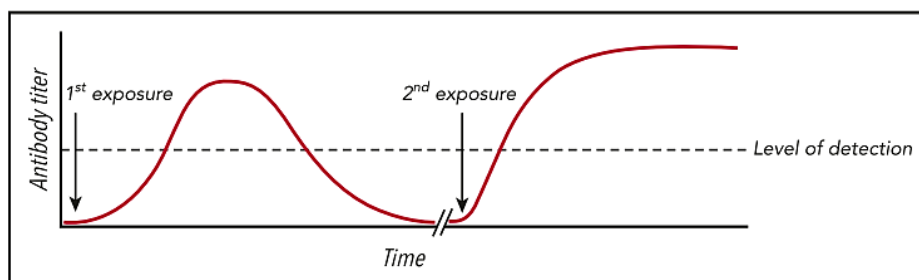
As AHTR ocorrem durante ou até 24 horas após a transfusão e apresentam as características clínicas e laboratoriais de hemólise, nomeadamente o aumento  $\geq 1^\circ\text{C}$  da temperatura corporal, arrepios/tremores, eritema facial, dor torácica, abdominal ou lombar, náuseas/vômitos, diarreia, hipotensão, palidez, icterícia, oligoanúria e urina escura. A ativação do sistema da coagulação sanguínea pode culminar em hemorragias incontroláveis. São frequentemente causadas pelo erro de identificação da amostra ou do doente, e são, portanto, na sua maior parte evitáveis.

As reações mais severas estão relacionadas com transfusão de células ABO incompatíveis, resultando numa hemólise intravascular das células transfundidas. A transfusão de Plasma ABO incompatível também pode causar hemólise dos GRs do recetor na presença de um alto título de anticorpos ABO. A circunstância mais comum acontece quando componentes plaquetários colhidos por aférese, provenientes de dador de grupo O com alto título Anti-A são transfundidos a doentes de grupo A.

As DHTR caracterizam-se pela apresentação de sinais clínicos ou biológicos de hemólise, similares à AHTR, mas normalmente menos severos, e ocorrem entre as 24 horas e os 28 dias após uma transfusão, ou mesmo meses e anos. Geralmente ocorrem devido a uma prévia Isoimunização por gravidez ou transfusão prévias.

A reação hemolítica tardia é geralmente devida a uma resposta imune anamnésica quando o recetor previamente sensibilizado, recebe uma unidade de CE que expressa o aloantígeno cognato. A reexposição ao Atg estranho causa um aumento nos títulos de anticorpos nas 24 horas a 28 dias após a transfusão, acompanhada por uma diminuição da hemoglobina, o teste de antiglobulina direto positivo e os testes laboratoriais subsequentes, como estudos de eluição, geralmente demonstram o aloanticorpo (36)(Figura 12).

Figura 12: aloanticorpos: indução, evanescência, resposta anamnésica.  
Fonte: Tormey(35)



As DHTR são semelhantes às DSTR em relação ao mecanismo e ao curso do tempo. Ambas compartilham resultados serológicos semelhantes, mas os doentes com reações serológicas tardias não apresentam evidências perceptíveis, nomeadamente, verifica-se a ausência de sinais clínicos e laboratoriais de hemólise.

Os doentes com maior risco de reações transfusionais hemolíticas tardias incluem aqueles com histórico de anticorpos, mas cujo título diminui para níveis indetectáveis nos testes de rotina implementados para a deteção de anticorpos.

Estudos comprovam que alguns aloanticorpos dirigidos para os antígenos dos GSs, tornam-se indetetáveis colocando os doentes em risco de reações transfusionais tardias, por estimulação das células B de memória, após reexposição antigénica. Mantém-se desconhecido o motivo pelo qual certas especificidades de anticorpos para os antígenos dos GSs persistem mais tempo em títulos detetáveis do que outros (37).

Os aloanticorpos não-ABO, que com maior frequência têm sido implicados em reações transfusionais, pertencem aos sistemas de grupos sanguíneos Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS e Diego (37,38).

Dependendo da especificidade em causa ou da mistura de anticorpos desenvolvidos pelo doente, a identificação de anticorpos anti-eritrocitários pode ser complexa. Por um lado, anticorpos dirigidos contra antígenos de alta incidência são problemáticos porque, mesmo podendo não ter significado clínico, podem esconder outros anticorpos de especificidade clinicamente significativa. Por outro lado, a identificação de misturas de anticorpos é laboriosa e pode tornar-se difícil encontrar fenótipos compatíveis, caso sejam raros.

A deteção de aloanticorpos na rotina dos Serviços de Medicina Transfusional é da máxima importância para fornecer componentes sanguíneos compatíveis. O propósito dos testes pré-transfusionais, é confirmar a compatibilidade entre recetor e componentes, detetar anticorpos inesperados e clinicamente significativos e prevenir a ocorrência de RTH. Os testes implementados devem ser específicos e sensíveis para garantir a eficácia transfusional, de modo que a seleção dos componentes sanguíneos seja a adequada, para que ao serem transfundidos sejam eficientes: não se verifique a diminuição da sobrevida eritrocitária pós-transfusional, nem contribuam para o agravamento da doença no recetor (9,39).

A PAI tem como objetivo pesquisar no doente a presença de anticorpos, para evitar que um recetor com a presença de um aloanticorpo clinicamente significativo e com relevância transfusional, seja transfundido com componentes que apresentam o antígeno correspondente. Aloanticorpos para antígenos de baixa incidência que não são detetados nos testes de *screening*, podem causar reações transfusionais hemolíticas. As provas de compatibilidade (PC) ou *cross-match*, podem permitir a deteção de aloanticorpos dirigidos a antígenos de baixa frequência que não foram detetados na PAI. É um método de confirmação da compatibilidade entre o doente e o dador. Neste processo, mistura-se o plasma do recetor com os eritrócitos do dador, e verifica-se se ocorrem sinais de aglutinação.

Nem todas as identificações de anticorpos são simples e permitem concluir facilmente a especificidade e significado clínico do aloanticorpo. São várias as metodologias utilizadas para a pesquisa, identificação e caracterização dos anticorpos irregulares, com a finalidade de aumentar a sensibilidade, avidéz, afinidade e especificidade do teste. A ligação do Atc ao respetivo Atg é refletida como hemaglutinação. Podem ser efetuadas em meios salino, albumina a 22%, enzimático (papaína ou bromelina), meio de baixa força iónica (LISS), polietilenoglicol (PEG) e de antiglobulina humana (AGH). Também podem ser executados a diferentes temperaturas, a 4° C, à temperatura ambiente e a 37° C, tendo em conta a temperatura ideal de reação daquele Atc específico. O tempo de incubação também varia de acordo com os procedimentos.

Todas estas técnicas promovem a proximidade entre as moléculas Atg-Atc, e podem ser realizadas em tubo (método de referência), microplaca, aglutinação em coluna com microesferas de vidro, microesferas de dextranos polimerizados ou coluna de gel.

Como vantagens das técnicas de aglutinação em coluna, quando comparadas com as técnicas de referência em tubo, destaca-se uma menor objetividade na leitura e interpretação dos resultados, e o facto de permitir automatização com arquivo de resultados.

A hemaglutinação é a base destes testes efetuados, e consiste em incubar a amostra do doente (plasma ou células) com um Atc específico, eritrócitos-teste ou os GRs do dador, e analisar a reação. Após centrifugação adequada, a intensidade da aglutinação é graduada, de acordo com padrões estabelecidos, numa escala de 0 a 4, com 0 indicando um teste negativo (ou seja, sem aglutinação) e 4 indicando uma reação fortemente positiva (uma linha compacta na superfície da coluna de gel).

O Teste de antiglobulina humana indireta (TAI) ou teste de Coombs indireta, é um dos testes de serologia eritrocitária fundamentais nos laboratórios de Imunohemoterapia, pois permite a deteção de anticorpos da classe IgG não aglutinantes. A antiglobulina humana ou soro de Coombs, é um Atc que quando se liga às cadeias pesadas das imunoglobulinas humanas, promove a aglutinação e permite revelar os anticorpos presentes, ligados aos respetivos antígenos na membrana do GR ou livres no plasma (Figura 13).

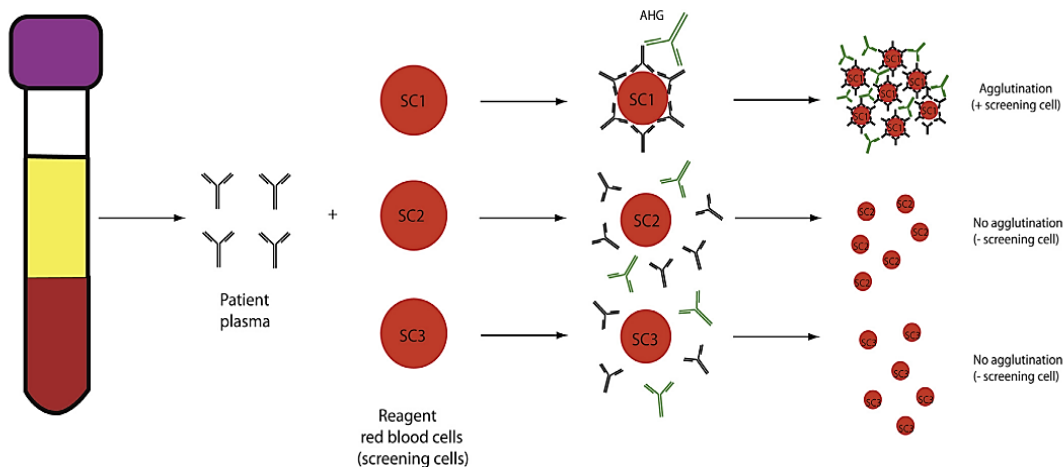


Figura 13: TAI, envolve uma mistura do plasma do doente com eritrócitos-teste (que expressam uma variedade conhecida de Atg de GSs), seguido da adição da AGH. Fonte: Hendrickson (39)

Atualmente, na PAI e nas PC é obrigatório executar o teste de Antiglobulina Humana (AGH), com a finalidade de detetar os anticorpos que não produzem aglutinação direta, da classe IgG que possam originar a diminuição da sobrevivência dos GRs transfundidos. A utilização do soro de Coombs e a incubação a 37°C permitem a deteção e dos anticorpos clinicamente significativos. A inclusão do anti-C3 no reagente dá informação se o Atc identificado fixa o complemento.

Nas metodologias para deteção e identificação de anticorpos, o plasma do doente é incubado com os eritrócitos-teste fenotipados para a maioria dos antigénios comuns, preparados comercialmente, e aprovadas pela Food and Drug Administration(FDA)(9). As suspensões eritrocitárias são de diferentes dadores, selecionados do grupo O, com fenótipo conhecido incluindo os antigénios que originam a formação de anticorpos com significado clínico, nomeadamente, o D, C, c, E, e, K, k, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, M, N, S, s, Le<sup>a</sup> e Le<sup>b</sup>. Estas suspensões devem incluir os fenótipos DCCee (R1R1) DccEE(R2R2) e ddccee (rr). É também recomendada a presença dos fenótipos Jk (a+b-), Jk (a-b+), S+s-, S-s+, Fy (a+b-), Fy (a-b+), para prevenir o efeito de dose do Atc. Os anticorpos dos sistemas Rh, Duffy, MNS e Kidd podem reagir melhor com células homocigóticas, em que se verifica a presença de um maior número de locais antigénicos. Para a PAI deve ser usado um painel de 2 a 3 células, e na identificação de anticorpos um painel de 8 a 14 células (9).

Na presença de uma PAI positiva procede-se à identificação do aloanticorpo. Os resultados obtidos na identificação de anticorpos devem ser concordantes com as hipóteses colocadas na PAI.

O procedimento utilizado na rotina transfusional inclui o grupo ABO (celular e reverso), Atg D, PAI, e PC entre o plasma do recetor e os GRs do dador. É sempre confirmado o grupo ABO e Rh(D) do dador. Nos doentes da consulta de Hematologia Clínica, doentes jovens, ou aqueles em que se prevê virem a ser politransfundidos é também efetuado o fenótipo Rh e Kell (40).

É também preciso efetuar, sempre que necessário a determinação do fenótipo Rh e Kell, e do fenótipo alargado quando justificável ou para confirmar o Atc identificado.

A identificação do Atc só se encontra completa após análise complementar, em que são testadas os GRs do recetor para o Atg homólogo do Atc previamente detetado, e se confirma a sua ausência (40).

A resposta do sistema imunológico do recetor aos aloantigénios de GS, depende de fatores genéticos ou adquiridos relacionados com o doente (nomeadamente o desencadear, ou não, a resposta imune após exposição ao Atg estranho), a dose, via de administração e imunogenicidade do Atg.

A frequência de aloimunização é extremamente variável, dependendo dos doentes ou dadores em estudo(9). Estima-se que os aloanticorpos ocorram aproximadamente até 2% na população, mas este número pode aumentar substancialmente até 56%, com o risco de anticorpos múltiplos nos doentes com SMD e hemoglobinopatias (39).

Por vezes, não é conhecido nem é possível identificar o evento que esteve na origem da aloimunização. Nessas situações, os anticorpos de ocorrência natural presumivelmente resultaram da exposição a antigénios ambientais, bacterianos ou virais que são semelhantes aos antigénios do grupo sanguíneo (9).

Com efeito, as taxas de aloimunização dos vários estudos publicados variam consoante o desenho do estudo e das populações estudadas (38,39,41,42,43,44,45,46,47,48) **(Anexo IX)**

## **2. OBJETIVO**

Este estudo teve como objetivo determinar a taxa e especificidade dos aloanticorpos eritrocitários identificados no Serviço de Hemoterapia do Hospital Pedro Hispano no período de 1 de janeiro de 2015 a 31 de dezembro de 2019.

Pretende-se comparar a resposta imune a aloantígenos eritrocitários, entre a população de doentes de Hematologia Clínica cronicamente transfundidos, e a população de doentes transfundidos pontualmente.

O protocolo do estudo foi autorizado pelo Conselho de Administração da Unidade Local de Saúde de Matosinhos (ULSM) a 27 de agosto de 2020, depois do parecer favorável da Comissão de Ética e Saúde da ULSM e da Comissão Local de Segurança da Informação.

## **3. POPULAÇÃO E MÉTODOS**

Estudo observacional, transversal, descritivo, realizado por consulta de registos do Serviço de Hemoterapia do Hospital Pedro Hispano no período de 1 de janeiro de 2015 a 31 de dezembro de 2019.

Os dados foram obtidos a partir da aplicação ASIS, Aplicativo de Sistema de Informação de Sangue que permite aos Serviços de Medicina Transfusional registar os dados da transfusão, visualizar os resultados laboratoriais do doente e os registos de transfusão de componentes e produtos sanguíneos. Os dados assim obtidos foram sistematizados e analisados no programa Excel® sendo apresentados na forma de tabela e gráficos conforme indicado.

A população em estudo foi definida como os registos de doentes com requisição de componentes sanguíneos. Desta mesma população foram identificados e selecionados os dois grupos a analisar: a população de doentes adultos (maiores de 18 anos) da consulta externa de Hematologia Clínica, em regime de hipertransfusão por anemia crónica, e a população com pedidos pontuais de transfusão.

Do grupo de Hematologia Clínica (HC) fizeram parte os doentes com requisição de componentes sanguíneos no decurso do controlo analítico efetuado na consulta de HC, durante o período definido. Foram excluídos todos os doentes com um número inferior a três episódios transfusionais no intervalo em que decorreu o estudo.

Para seleção do grupo de doentes com pedidos pontuais de transfusão, foi verificada a pesquisa de anticorpos positiva referente ao período definido. Após consulta dos registos foram excluídos aqueles que apresentavam registos de PAI+ por Isoimunização Rh, PAI+ em recém-nascidos e crianças até 4 meses, as PAI+ por autoanticorpos, PAI+ nos doentes de HC, e os resultados de PAI+ repetidas no mesmo doente e em diferentes ocasiões.

Na população de doentes adultos, da consulta de Hematologia Clínica foram registadas as seguintes variáveis: sexo, idade, grupo sanguíneo ABO, fenótipo Rh e Kell, a presença e identificação de anticorpos irregulares, o número de componentes sanguíneos recebidos por cada doente e a patologia concomitante.

Da população com pedidos pontuais de transfusão (PT), foram registados os dados dos anticorpos presentes, a sua especificidade, e averiguada se existia alguma relação com ato transfusional efetuado neste serviço.

Os registos resultaram dos testes laboratoriais em que foi utilizada a metodologia do sistema de gel da BIO-RAD (Micro Typing System®, DiaMED GmbH, Cressier, Suíça) para equipamentos e reagentes.

Os Cards são uma estrutura de plástico com seis microtubos e com duas zonas distintas, a mais estreita ou matriz onde está incorporado o gel, e na parte superior e mais larga, a câmara de incubação. As partículas de gel funcionam como material filtrante, e dependendo do teste a ser executado, contém incorporados os reagentes monoclonais ou policlonais específicos, a antiglobulina humana poliespecífica ou monoespecífica, ou somente o gel neutro para técnicas em meio salino.

Quando existe ligação entre os antigénios eritrocitários e os anticorpos correspondentes, após a centrifugação, os eritrócitos aglutinados não são capazes de migrar através do gel, e, dependendo da força de reação, formam uma camada na superfície da coluna, ou ficam dispersos ao longo do gel.

Se não houver esta ligação, os eritrócitos migram completamente através do gel até à base da coluna, formando um botão compacto. Para validar os resultados está incluído nos diferentes Cards, microtubos que correspondem ao controlo negativo da técnica.

Os registos do grupo ABO/Rh foram obtidos a partir de resultados em foi utilizado o Card DiaClon ABO/D. Na prova reversa foram usados os Cards NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins e suspensões comerciais das células A1, B e O (ID-Diacell A, B e O). Não foram detetadas discrepâncias na determinação do grupo ABO nestes dois grupos de doentes.

Os registos da pesquisa de aloanticorpos foram obtidos a partir de resultados executados com um painel de três células (ID-Diacell) nos Cards-ID Liss/Coombs. As suspensões eritrocitárias ID-DiaCell I, II, III, são de dadores seleccionados do grupo O, com perfil antigénico conhecido, e incluem os antigénios que originam a formação de anticorpos com significado clínico, nomeadamente, o D, C, c, E, e, C<sup>w</sup>, K, k, Kp<sup>a</sup>, Kp<sup>b</sup>, Js<sup>a</sup>, Js<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, P1, M, N, S, s, Lu<sup>a</sup>, Lu<sup>b</sup>, Le<sup>a</sup> e o Le<sup>b</sup>.

Perante uma PAI positiva prosseguimos com a identificação da especificidade do Atc, no plasma do doente. No meio AGH foram utilizados os Cards-ID Liss/Coombs e 1 painel de 11 células (ID-DiaPanel), em meio enzimático os Cards-ID NaCl e 1 painel de 11 células papaínizadas (ID-DiaPanelP). As 11 células com fenótipo conhecido utilizadas incluem os mesmos antigénios referidos na pesquisa de aloanticorpos, e associados à formação de anticorpos clinicamente significativos.

Nas provas de compatibilidade foram utilizados os Cards-ID Liss/Coombs, e as células dos doadores foram suspensas em meio Liss (ID-diluyente 2).

Todos os doentes foram transfundidos com unidades de CE compatíveis para os antigénios ABO e D.

Todas as técnicas foram executadas de acordo com as instruções do fabricante e dos procedimentos existentes no serviço. Durante o período em estudo não se realizaram alterações nas metodologias utilizadas.

#### 4. RESULTADOS

No período correspondente ao estudo registou-se um total de 19 178 pedidos de componentes sanguíneos requisitados ao serviço de Hemoterapia do Hospital Pedro Hispano.

Dos 11 078 episódios transfusionais efetuados (correspondente ao envio de um ou mais componentes, por doente e por pedido), foram transfundidos 4 511 doentes e disponibilizados um total de 16 626 componentes sanguíneos (15 834 unidades de CE e 792 componentes plaquetários-CPP) (Figura 14).

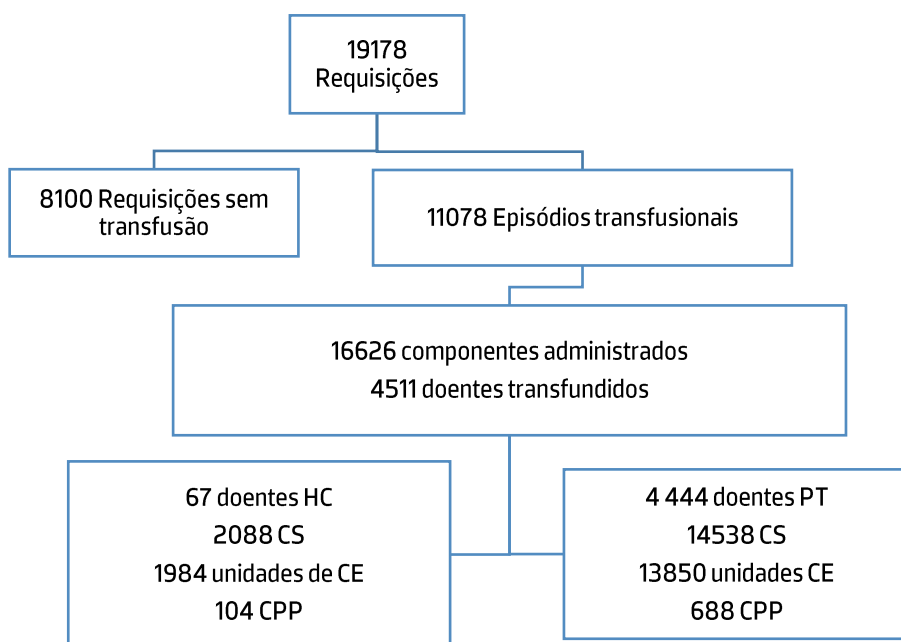


Figura 14: fluxograma ilustrativo dos pedidos de componentes ao serviço Hemoterapia e do estudo

Após consulta dos registos de pedidos de transfusão para os doentes da consulta externa de Hematologia Clínica, com necessidade de transfusão de componentes sanguíneos, durante o período estudado, foram referenciados e selecionados 67 doentes que completavam os critérios previamente definidos.

O grupo de doentes pontualmente transfundidos e com a PAI+ foi selecionado com base na análise documental da listagem dos doentes, com pesquisa de anticorpos positiva. Dos resultados iniciais que contabilizaram 390 PAI positivas, ficou confirmado que correspondiam a 215 doentes.

Esta diferença é justificada pela repetição da pesquisa de anticorpos irregulares no mesmo doente, e relacionada com novo pedido de componentes, em diferentes ocasiões e com diferentes amostras.

Após análise dos dados relacionados com as características dos anticorpos de acordo com os critérios de inclusão/exclusão definidos, ficaram elegíveis para incluir neste grupo 185 doentes (Figura 15).

Todos os aloanticorpos identificados e incluídos neste estudo reagiram e foram identificados em meio de AGH a 37° C, e foi confirmada a ausência do Atg correspondente no doente.

As variáveis não controladas neste estudo que condicionam estes resultados, incluem a falta de dados sobre uma transfusão anterior, antecedentes de gravidez, transfusão administrada noutras instituições de saúde, e a inexistência de uma transfusão subsequente.

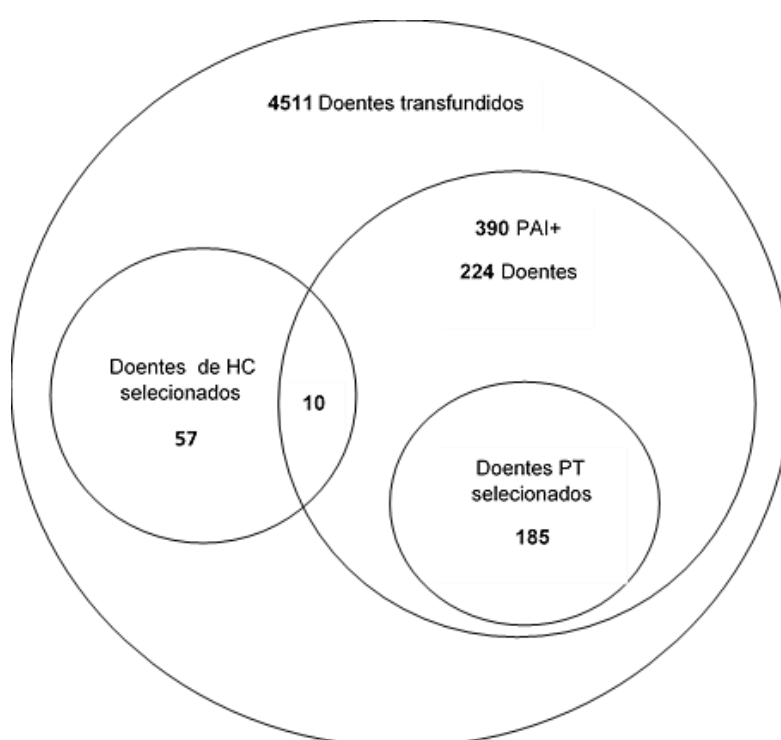


Figura 15: fluxograma ilustrativo da população estudada

### **População de doentes de Hematologia Clínica**

No total, os 67 doentes da consulta de HC incluídos ( $\approx 1,5\%$  da população incluída neste estudo), e com patologias do foro hematológico muito diversificadas (o único fator comum foi estarem relacionadas com alterações nas diferentes células sanguíneas), receberam 2 088 componentes sanguíneos, dos quais 1 984 unidades de CE e 104 componentes plaquetários, o que corresponde a uma média de 31,2 componentes sanguíneos necessários por doente. Nos 4 444 doentes da população com pedidos pontuais, proveniente dos vários serviços e especialidades do Hospital Pedro Hispano, essa média foi de 3,3 componentes sanguíneos transfundidos por doente (Figura 16).

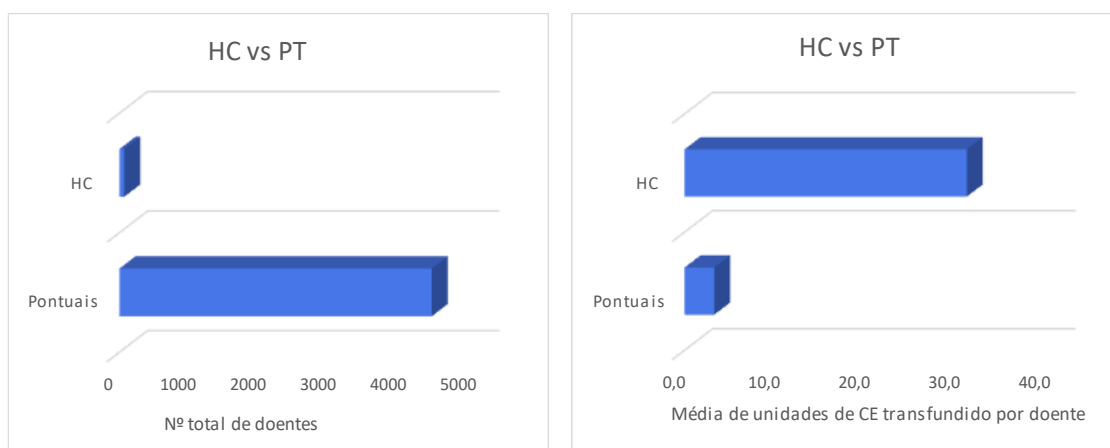


Figura 16: comparação das populações HC e pontuais em relação ao número de doentes e ao nº de CE transfundido

A patologia mais frequente neste grupo, e que motivou a necessidade de um maior suporte transfusional foi o SMD (26/67), mas foi a EH que motivou a necessidade de um maior número de CE por doente, com um número médio de 233 unidades de CE transfundidas por doente (Figura 17).

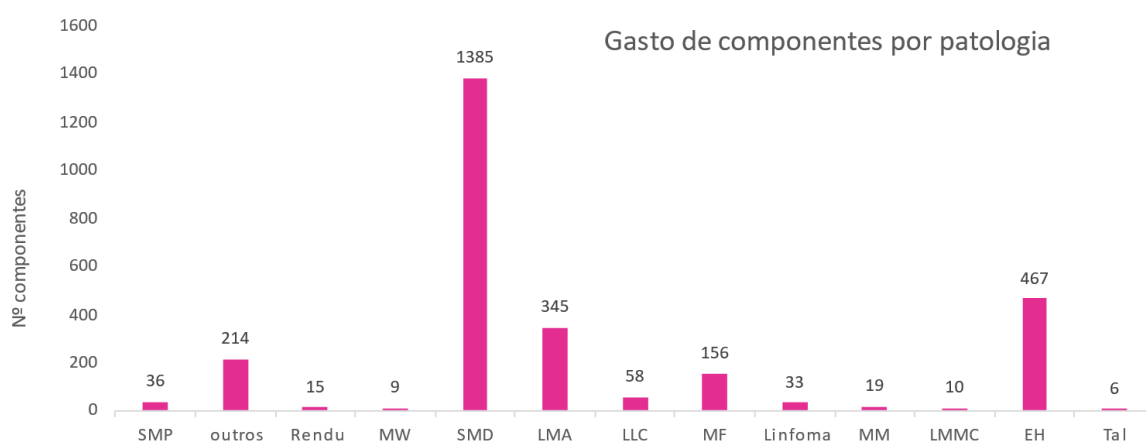


Figura 17: representação do gasto de componentes por patologia

Foi para os doentes com LMA que os componentes plaquetários foram maioritariamente necessários (49/104), para prevenir o risco hemorrágico acrescido por trombocitopenias graves, devido à sua hematopoiese ineficaz. Foi essencial a transfusão de concentrados de plaquetas nestes doentes.

Foram detetados anticorpos em 10 doentes, 6 do sexo feminino e 4 do sexo masculino. A taxa de aloimunização encontrada foi de 14,9% (10/67). Foram identificados 3 Atc do Sistema Rh (C, c, E) e 2 Atc do Sistema Kell (kp<sup>a</sup> Js<sup>a</sup>), 1 anti-P1, e 1 anti-Lu<sup>a</sup>. Em 3 doentes a identificação de anticorpos foi persistentemente inconclusiva.

Constatou-se que 24% (6/25) das mulheres apresentaram a PAI positiva, e nos homens a percentagem foi de 9,2% (4/42). Não foram encontradas associações de anticorpos nestes doentes politransfundidos (Figura 18).

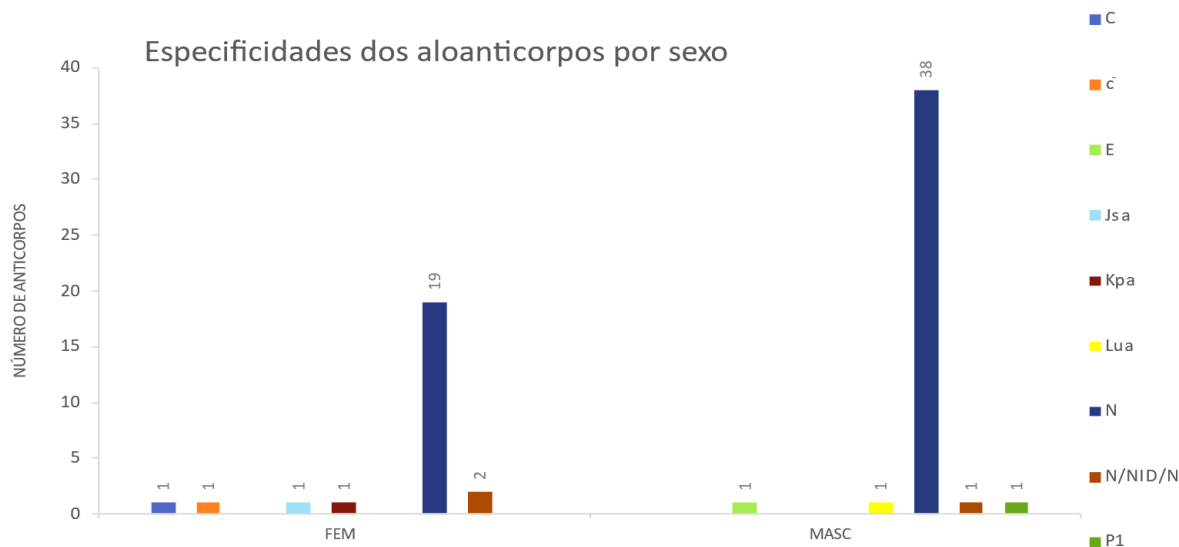


Figura 18: Distribuição do perfil de anticorpos detetados por sexo feminino e masculino (N-negativo, Nid-não identificável)

No grupo de doentes de HC, 43% (3 em 7) dos anticorpos identificados são dirigidos para os antigénios do sistema Rh. O sistema Kell está implicado em 29% (2/7) dos doentes de HC. Excetuando o Atc P1, detetado previamente aos atos transfusionais efetuados neste Serviço, os restantes estão relacionados com as transfusões efetuadas. No caso do Anti-E identificado, quando a PAI ficou positiva, o teste de Coombs direto também foi positivo, e no eluado foi possível identificar o Anti-E. Os restantes testes de eluado foram inconclusivos ou negativos.

Quando fomos verificar se a aloimunização é homogeneamente distribuída pelas doenças hematológicas incluídas, constatamos que os anticorpos do sistema Kell (Kp<sup>a</sup> e Js<sup>a</sup>) foram detetados nos doentes com EH após a administração de 60 e 70 unidades de CE respetivamente. Os anticorpos identificados do sistema Rh (C, c, E), o anti-P1 e o anti-Lu<sup>a</sup> foram identificados nos doentes com SMD. E como referido anteriormente, estas foram as patologias em que se verificou a maior necessidade de componentes sanguíneos. As PAI positivas sem identificação foram detetadas nos doentes com MF e LMA.

O perfil inconclusivo encontrado nestes 3 doentes tem alternado resultados de PAI+ e PAI-, e com o teste de Coombs direto com alguns resultados pontuais positivos, mas sem especificidade no eluado.

No decorrer deste intervalo do estudo, as PAI dos doentes de HC, inicialmente negativas, e que ficaram positivas após a transfusão dos componentes sanguíneos, voltaram a ficar novamente negativas, nas pesquisas subsequentes. Nas pesquisas posteriores não foi detetado novamente o Atc nem novos aloanticorpos. A única exceção, foi o anti-c que se manteve sempre detetável no decorrer deste estudo.

Em 62 doentes, as doenças hematológicas que estiveram origem da anemia crónica, foram SMD, LMA, LLC, SMP, LMMC, MF, MM, Linfoma, MW, EH, Talassemia, e Rendu-Osler-Weber. Nos restantes 5 doentes a anemia que motivou a necessidade da consulta de HC e as transfusões de componentes, ocorreu no decurso de outras doenças crónicas (Figura 19).

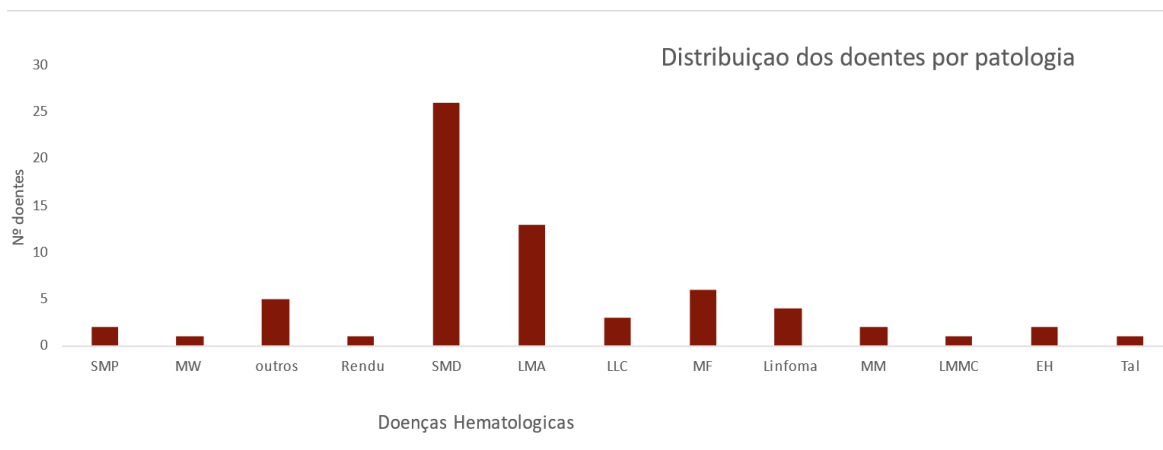


Figura 19: representação das patologias de HC incluídas neste estudo

A razão sexo masculino/feminino é de 42/25, o que corresponde a 63% de casos do sexo masculino e 37% do sexo feminino. A média de idades foi de  $76 \pm 11,7$ anos [mínimo 35; máximo 99] (Figura20)

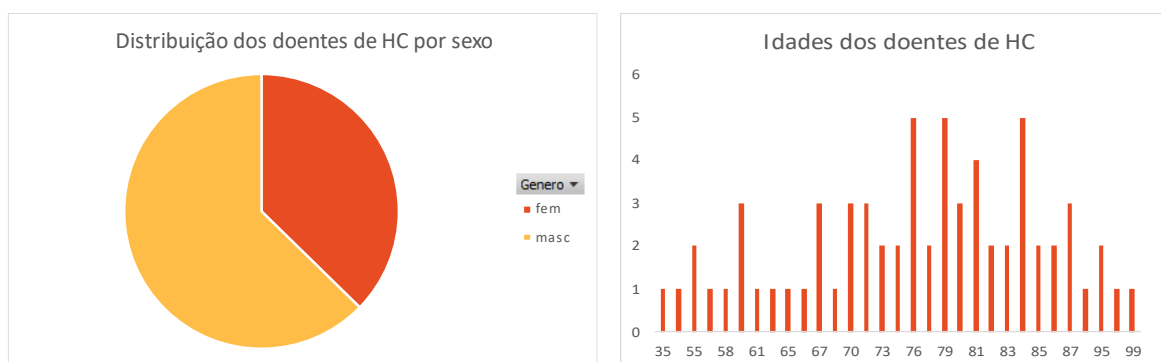


Figura 20: representação gráfica do sexo e da idade dos doentes de HC

Foi registado o grupo sanguíneo ABO, fenótipo Rh e o Atg Kell, para conhecermos o perfil antigénico destes doentes politransfundidos. Embora se trate de um grupo com um número pequeno de doentes, houve também o intuito de verificar a existência de alguma tendência ou predominância, que pudessem relacionar as diferentes patologias com o sistema sanguíneo ABO (Figura 21).

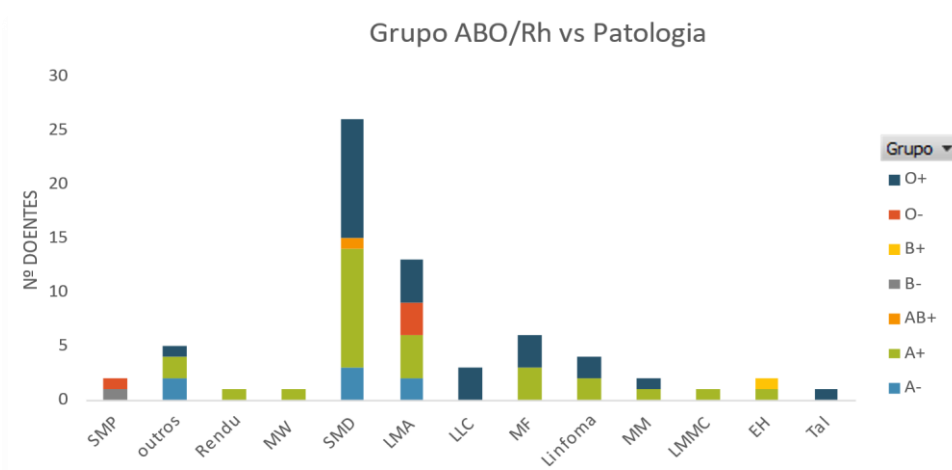


Figura 21: gráfico representativo da distribuição do grupo ABO/Rh por patologia de HC

Nesta população de doentes de HC, não se verificaram diferenças significativas com os dados publicados referentes à distribuição dos grupos sanguíneos na população portuguesa.

Foram registadas as frequências do fenótipo Rh (DCCeEe) dos doentes de HC, para comparar com os dados referentes à população de dadores, por um lado para confirmar a facilidade de obter os fenótipos compatíveis para estes doentes regularmente transfundidos, e por outro lado, para inferir da necessidade de alterações na gestão do nosso *stock* de CE, com o intuito de ter os fenótipos Rh e Kell disponíveis (Figura 22). O Atg Kell só foi identificado em 2 doentes, correspondendo a uma percentagem de 3% dos doentes de HC.

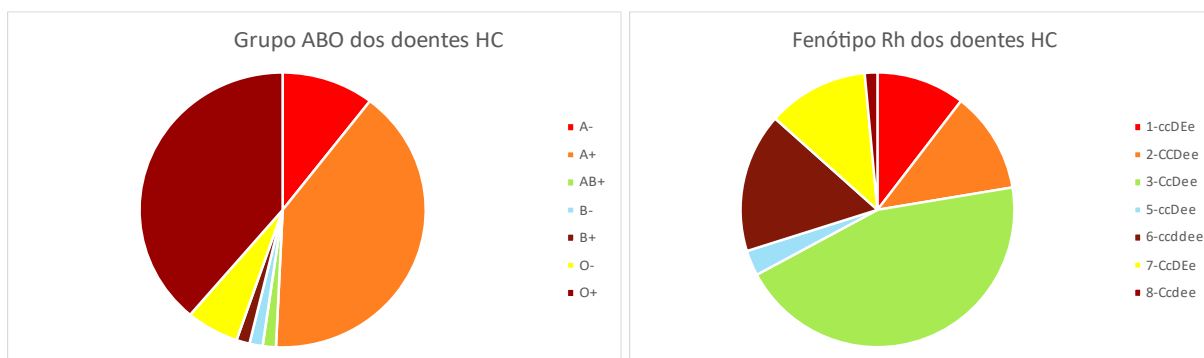


Figura 22: representação do grupo ABO e fenótipo Rh dos doentes de HC

A incidência das doenças hemato-oncológicas habitualmente tem uma representação diferente no sexo masculino e no feminino, com predomínio nos homens. Fomos analisar os dados da população de HC transfundida para verificar a distribuição por sexo.

Na LMA verificamos a existência do predomínio nas mulheres, e no caso da EH e da Talassemia só entraram neste estudo doentes do sexo feminino (Figura 23).

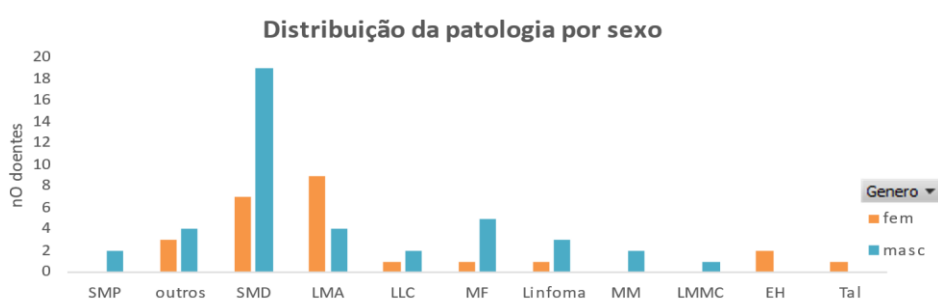


Figura 23: representação gráfica das diversas patologias por sexo

### População de doentes com pedidos pontuais

Dos 215 doentes contabilizados inicialmente, foram excluídos deste grupo os doentes com PAI positiva por Isoimunização com anti-D (18 doentes), um anti-E num R/N por transferência passiva do Atc da mãe, um auto anti-e relacionado com anemia hemolítica autoimune, e as PAI positivas dos 10 doentes de HC. A população incluída neste estudo, no período estabelecido, corresponde a 185 doentes com o resultado da PAI positiva.

Em 119 doentes foi possível identificar a especificidade do aloanticorpo, em 52 doentes o resultado dos testes de identificação não permitiu concluir a caracterização do Atc, e em 14 doentes não se prosseguiu estudo para a identificação do Atc (Figura 24).

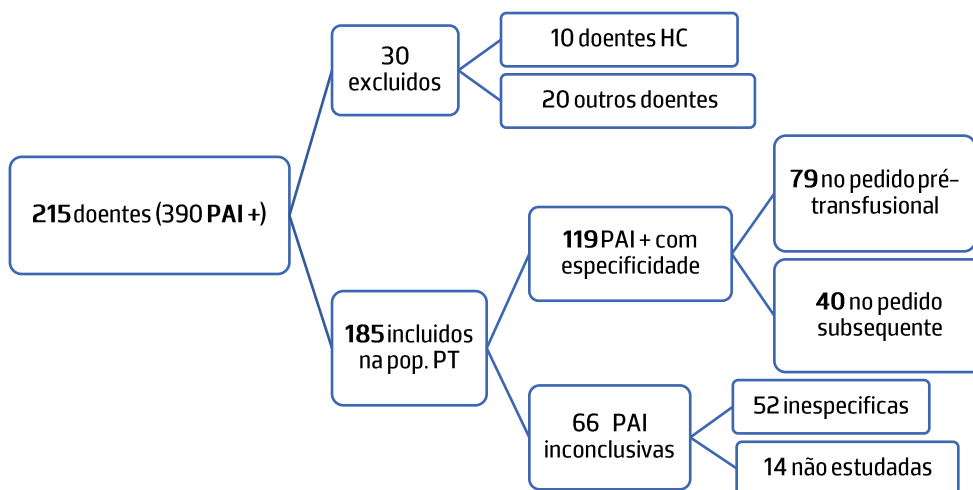


Figura 24: fluxograma representativo da população pontual com PAI+

Nos 119 doentes com anticorpos identificados, foram contabilizadas 155 imunoglobulinas com especificidade para os sistemas Rh (D,E,C<sup>w</sup>,c,e,C), Kell (Kell, Kp<sup>a</sup>), MNS (M,S,s), Duffy (Fy<sup>a</sup>), Kidd (Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>), Lewis (Le<sup>a</sup>) e Lutheran (Lu<sup>a</sup>).

A especificidade dos aloanticorpos, e os mais prevalentes encontrados nestes 119 doentes foram, anti-D (34)> anti-E (30)> anti-Kell (19)> anti-M (11)> anti-Fy<sup>a</sup> (7)> anti-c (6).

Na tabela 1 estão descritos os resultados obtidos, as especificidades encontradas, e a frequência absoluta e relativa dos anticorpos detetados e identificados (Tabela 1).

A percentagem de anticorpos dirigidos para os antígenos do sistema Rh nesta população foi de 66% (78/119). O sistema Kell esteve implicado em 20% (24/119) dos doentes com aloanticorpos.

Foi possível identificar em 23% (27/119) dos doentes pontualmente transfundidos, a presença de anticorpos anti-eritrocitários múltiplos: em 20 doentes a presença de 2 aloanticorpos, em 5 doentes 3 aloanticorpos, e em 2 doentes verificou-se a coexistência de 4 anticorpos.

O anti-D foi o Atc que mais vezes foi identificado nas situações de anticorpos múltiplos, na sua maioria associado a outros anticorpos igualmente do sistema Rh. Foi constatado neste estudo, que somente em 2 doentes com múltiplos aloanticorpos, não estavam associados os anticorpos relacionados com os antígenos D,C,c,E, e, do sistema Rh.

Nos doentes com presença de anticorpos múltiplos, a mistura D+C foi a maioritariamente encontrada. Foram todas identificadas na primeira PAI efetuada por este serviço laboratorial, não existindo nenhum registo de transfusão anterior realizada nesta instituição de Saúde.

Especificidade	Frequência	Total
Anti-D	8,02%	15
Anti-E	11,76%	22
Anti-kell	8,56%	16
Anti-C <sup>w</sup>	2,67%	5
Anti-M	5,35%	10
Anti-c	3,21%	6
Anti-e	1,60%	3
Anti-C	1,07%	2
Anti-Fy <sup>a</sup>	1,07%	2
Anti-Jk <sup>a</sup>	1,07%	2
Anti-Jk <sup>b</sup>	1,07%	2
Anti-Kp <sup>a</sup>	1,07%	2
Anti-Le <sup>a</sup>	0,53%	1
Anti-Le <sup>b</sup>	0,53%	1
Anti-Lu <sup>a</sup>	1,60%	3

Especificidade	Frequência	Total
Anti-D+C	6,42%	12
Anti-D+C+E	1,07%	2
Anti-D+E	0,53%	1
Anti-D+C+s	0,53%	1
Anti-C+kell	0,53%	1
Anti-D+Fy <sup>a</sup>	0,53%	1
Anti-E+Lu <sup>a</sup> +Kp <sup>a</sup>	0,53%	1
Anti-M+Fy <sup>a</sup>	0,53%	1
Anti-C <sup>w</sup> +Fy <sup>a</sup>	0,53%	1
Anti-D+C+E+kell	0,53%	1
Anti-E+Kp <sup>a</sup>	0,53%	1
Anti-E+Fy <sup>a</sup>	0,53%	1
Anti-E+Jk <sup>a</sup> +S	0,53%	1
Anti-Fy <sup>a</sup> +Jk <sup>b</sup>	0,53%	1
Anti-D+C+Kell+Kpa	0,53%	1

Tabela 1: representação da especificidade e frequência dos aloanticorpos detetados

Foi possível reconhecer em 33,6% (40/119) dos doentes pontualmente transfundidos, neste serviço e neste intervalo de tempo, uma relação da aloimunização, com o ato transfusional efetuado (Figura 25).

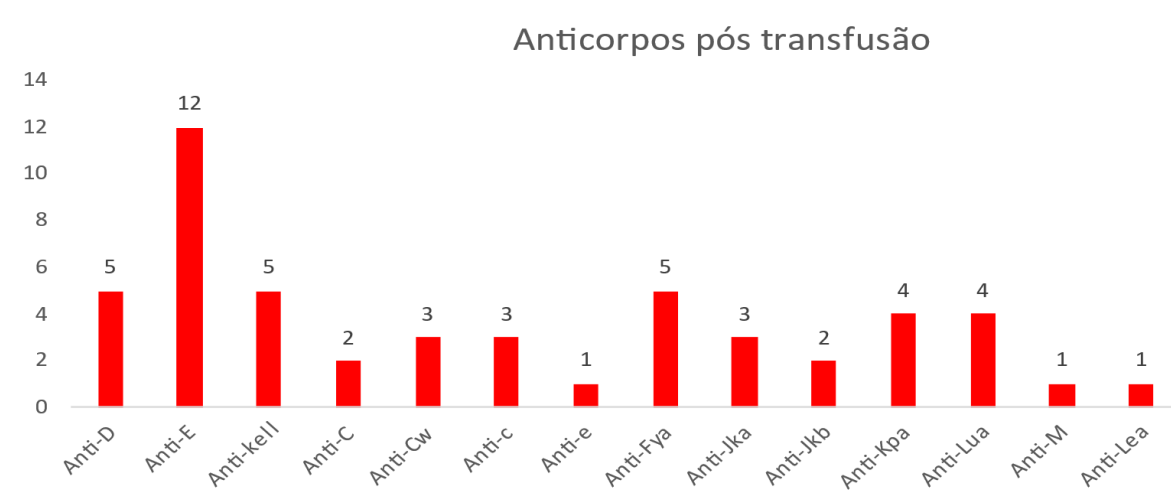


Figura 25: Representação gráfica dos anticorpos identificados após transfusão de componentes

A PAI sem anticorpos detetáveis nos testes pré-transfusionais, num pedido posterior, e após a transfusão de componentes sanguíneos, foi detetado e identificado em trinta e quatro doentes um anticorpo, em quatro doentes uma associação de dois anticorpos e em dois doentes foi identificada a presença de três anticorpos. Nestes quarenta doentes, foram identificados quarenta e oito aloanticorpos. Também foram identificados três novos anticorpos em dois doentes com a PAI positiva já no primeiro ato transfusional efetuado neste serviço, uma mistura anti-Jk<sup>a</sup>+Kp<sup>a</sup>, e um anti-Le<sup>a</sup>. Para a maioria dos anticorpos do sistema Rh e Kell, confirmou-se a transfusão de componentes com o Atg cognato.

Verificou-se uma prevalência significativa do anti-E nestes 40 doentes, e observamos que a quase totalidade dos aloanticorpos para os sistemas Duffy e Kidd identificados neste estudo, também estão relacionadas com a transfusão de componentes nestes doentes.

Podemos demonstrar a presença do Anti-D em 3 doentes Rh negativos após transfusão de componentes plaquetários Rh positivos. Os restantes 2 doentes em que foi detetado o anti-D foram transfundidos nesta instituição com componentes Rh negativos, e não foi possível esclarecer qual a origem da aloimunização para o Atg D. Uma possível suposição para esta identificação do Anti-D poderá ser uma classificação do dador como D negativo e tratar-se de uma variante D não detetada.

A taxa de aloimunização encontrada nos doentes pontualmente transfundidos foi de 4,2% (185/4 444), mas a taxa de aloimunização que efetivamente podemos dizer relacionada com a transfusão de componentes sanguíneos disponibilizados por este serviço foi de 0,9% (40/4 444).

Observamos também que em 28% (52/185) dos doentes com PAI positiva não foi possível a identificação de aloanticorpos. A análise do perfil de resultados obtidos foi inconclusiva (NID-não identificável), dado que não se obteve correspondência na tabela de antigénios específico do Painel de identificação utilizado.

Em 7,6% (14/185) das PAI positivas não se efetuaram os testes complementares para a identificação dos anticorpos.

## **5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

Os aspetos demográficos da população de Hematologia Clínica estudada estão em consonância com a literatura, na qual o sexo masculino predomina, e a faixa etária é superior a setenta anos (49).

Neste grupo específico de doentes de HC, com os dados obtidos referentes ao grupo sanguíneo ABO, verificou-se uma idêntica distribuição pelas distintas patologias Hematológicas. A sua frequência é igualmente semelhante na distribuição por sexos. Não observamos neste estudo nenhuma influência na aloimunização relacionada com o grupo ABO não tendo sido verificado nenhum predomínio dos antigénios ABO neste pequeno grupo de 10 doentes imunizados.

Comparando a resposta imune por sexos, nos doentes de HC constatou-se que 24% (6/25) das mulheres apresentaram a PAI+, e nos homens a percentagem foi de 9,2% (4/42), um significativo aumento de PAI+ no sexo feminino ( $\approx 3$  vezes superior). Estes dados vão de encontro a muitos estudos efetuados que referem o sexo feminino como fator predisponente da aloimunização. No entanto não é consensual esta afirmação, alguns estudos referem taxas idênticas de aloimunização e outros estudos referem ter verificado um aumento da aloimunização no sexo masculino (46,50,48,51).

Ao analisar os resultados gerais da taxa e especificidade da aloimunização, e comparando estes dois diferentes grupos observados, verificamos que, embora a taxa de aloimunização seja distinta, e significativamente superior no grupo de HC, a especificidade dos aloanticorpos identificados encontra-se maioritariamente dirigida para os sistemas Rh e Kell, descritos na literatura, como os antigénios dos sistemas de GSs mais imunogénicos (9,10,52).

Analisando os aloanticorpos identificados nas duas populações, verifica-se que a especificidade dos aloanticorpos identificados é muito diferente. No grupo PT além da grande variabilidade de aloanticorpos considerados clinicamente significativos, também identificamos a presença de múltiplos anticorpos.

Na população PT os nossos resultados identificaram como mais frequentes o anti-D, presente em 34 doentes, o anti-E em 30, o anti-Kell em 19, o anti-M em 11 e o anti-Fy<sup>a</sup> em 7 doentes. Estes dados estão em sintonia com o descrito na literatura, e outros estudos efetuados, que referem estes aloanticorpos como frequentes (9,56).

A ausência da proteína RhD na membrana do GR, poderá ser um fator determinante e explicar a alta imunogenicidade do Atg D quando comparado com os outros antigénios dos GSs, possivelmente devido ao facto de a estrutura de muitos antigénios antitéticos só diferir por uma substituição nucleotídica.

A alta prevalência do anti-E detetada na população PT poderá ter como explicação ser um Atg de baixa frequência, e a transfusão de componentes sanguíneos compatíveis para este antigénio habitualmente só ocorre em algumas situações específicas (doentes politransfundidos e/ou com as faixas etárias mais baixas).

A mistura de anticorpos D+C foi a mais prevalente, e já existia em todos os doentes antes do primeiro ato transfusional, nesta instituição. Tal como descrito na literatura é frequente e tem sido relacionada com a aloimunização induzida por gravidez. Também poderá ser um anti-G que estudos recentes demonstram ser serologicamente idêntico ao Anti-D+C (9). Não foi possível confirmar esta relação neste estudo.

Também é frequente encontrar alguns anticorpos do sistema Rh juntos. E os nossos resultados demonstram esse facto (9,48). No entanto a mistura Anti-E+c considerada frequente em virtude do fenótipo Ce ser igualmente muito frequente na população, não foi detetada neste estudo. Um Anti-c indetetável, ou a sua real inexistência poderá ser uma explicação para os nossos resultados (9).

A maioria dos anticorpos do sistema Duffy e Kidd detetados, estão relacionados com a transfusão de componentes efetuados por este serviço. Estes dados podem comprovar a sua imunogenicidade ou a sua rápida evanescência.

Importa pois questionar, o custo/benefício de incluir no perfil alargado para além do efetuado para os sistemas Rh e Kell, os antigénios Fy<sup>a</sup> e Jk<sup>a</sup> e Jk<sup>b</sup>, nos doentes jovens ou quando se prevê vir a ser necessário múltiplas transfusões (42).

Os nossos resultados mostraram também, que embora a taxa de aloimunização seja superior nos doentes de HC, transfundir os doentes com o fenótipo Rh e K compatível, antes da primeira transfusão, reduz as taxas de aloimunização, assim como a indução de múltiplos aloanticorpos, só identificados nos doentes da população pontualmente transfundida e transfundidos sem ter em conta estes antigénios (52,53,54,55).

Verificamos também que não existe uma relação direta entre o nº de transfusões efetuadas e a aloimunização dos doentes. Há doentes que induziram a formação de anticorpos após um ato transfusional, e doentes que após transfusão de centenas de componentes continuam com a PAI negativa.

Os fatores genéticos predisponentes da aloimunização, a tolerância imunológica do doente para os aloantigénios e os fatores relacionados com a homologia dos antigénios eritrocitários, poderão explicar as diferenças encontradas na aloimunização, independente do número de componentes transfundidos (57).

Nos doentes de HC não foram encontradas associações de anticorpos, embora sejam politransfundidos. Na população pontualmente transfundida, verifica-se uma grande percentagem de doentes com misturas de anticorpos. Esta alta percentagem de anticorpos múltiplos detetada poderá ser justificada pela resposta imune dos respondedores. Fatores clínicos e biológicos do doente podem contribuir para a aloimunização, e uma vez produzido um Atc, é muito provável que se produzam anticorpos adicionais, após cada novo estímulo (28).

Embora a população de doentes de HC seja pequena, as taxas de aloimunização encontradas estão abaixo das taxas descritas em outros estudos para este grupo específico de doenças (52,56,57).

Na população de doentes PT que se pode considerar muito heterogénea, proveniente das várias especialidades do Hospital Pedro Hispano, a taxa de aloimunização foi de 4,2%. No entanto, quando se determina a taxa de aloimunização que se verificou estar relacionada com a transfusão de componentes sanguíneos neste período estudado, esta desce para 0,9%. Esta diferença por nós descrita poderá ser uma explicação para as diferentes taxas de aloimunização encontradas e referidas em outros estudos (27,28).

As prevalências das especificidades e os vários aloanticorpos que foram identificados neste estudo, são similares a outros estudos publicados (45,47,58).

As taxas de aloimunização nos doentes PT poderão, no entanto, estar influenciadas pela existência de anticorpos irregulares de ocorrência natural, nomeadamente o anti-M, pois embora detetado em 11 doentes só o podemos relacionar com a transfusão num único doente (9).

Uma correspondência completa do fenótipo antigénico entre dador e recetor teoricamente eliminaria todas as aloimunizações induzidas por transfusão, mas alcançar isso envolve inúmeros desafios logísticos e financeiros. A melhor alternativa é selecionar unidades de dadores combinadas pelo menos para maioria dos antigénios imunogénicos e para doentes de alto risco que necessitem cronicamente de suporte transfusional (53,57,58).

Tal como descrito na literatura os antigénios do sistema Rh e Kell, são os mais imunogénicos, importante fator a considerar nos doentes em que se prevê virem a ser transfundidos ao longo do tempo. No que respeita ao Atg Kell, é fácil encontrar fenótipos compatíveis, é um Atg de baixa frequência na população, e o mesmo se verifica na nossa população de doentes de HC ( $\approx 3\%$  dos doentes). O mesmo já não se verifica com o fenótipo Rh, em que a necessidade urgente dos componentes nem sempre permite o envio do fenótipo análogo. Atrasos no envio de CE compatível pode agravar as complicações dos doentes sintomáticos.

Os componentes sanguíneos são um bem escasso, com um prazo de validade limitado, e nem sempre estão disponíveis os fenótipos pretendidos entre as várias combinações possíveis, limitando as escolhas de fenótipos Rh compatíveis.

A disponibilização de unidades de CE isogrupais para os antigénios do sistema Rh (CcEe) e Kell permite uma maior margem de segurança quanto ao sucesso da transfusão sanguínea, traduzida pela redução da ocorrência de reações transfusionais. As frequências dos grupos sanguíneos ABO e fenótipo Rh na população dos doentes de Hematologia foram comparadas com o estudo "DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS SANGUÍNEOS NA POPULAÇÃO PORTUGUESA", publicado na revista ABO nº 29 de 2007, no sentido de correlacionar a população de dadores e a população de doentes de HC. Verificou-se semelhanças nas frequências dos fenótipos Rh, entre os dadores e os recetores, o que facilita a gestão do stock dos componentes eritrocitários, e a disponibilidade de unidades com o fenótipo Rh e Kell compatíveis, sempre que forem necessárias (60).

Algumas PAI inconclusivas poderão ser explicadas pela evanescência do Atc. A pesquisa de anticorpos irregulares é, na maioria dos casos, realizada apenas antes de um novo evento transfusional e não efetuada de rotina após um período fixo. Consequentemente, muitos anticorpos podem não ser descobertos, quer porque não houve indicação de nova transfusão quer porque os anticorpos já desapareceram. Verificou-se igualmente a existência de aloanticorpos que num estudo subsequente não foram identificados, mas uma vez detetado o Atc, mesmo com o resultado da PAI negativa, deve ser sempre respeitado, para evitar RTH (61).

A existência de anticorpos para os antigénios de baixa incidência não representados nas células dos Painéis utilizados, poderá também ser uma causa para justificar as PAI positivas, sem identificação do Atc. Nestas situações as Provas de Compatibilidade são fundamentais para transfundir em segurança o doente (61).

O método de gel tem maior sensibilidade em comparação com os métodos em tubo, e se por um lado permite detetar com maior segurança os anticorpos clinicamente significativos, por outro lado acresce as reações inespecíficas ou indeterminadas que atrasam o envio da transfusão, e podem aumentar significativamente o tempo dispensado na investigação dos resultados. Uma grande percentagem dos nossos resultados inespecíficos pode ser devido a anticorpos frios, e sem significado clínico (61).

Ficámos a conhecer a realidade da aloimunização caracterizada pelo serviço de hemoterapia do Hospital Pedro Hispano, tal como era nosso propósito. Dentro dos limites da metodologia utilizada, foi possível obter informações a respeito da resposta imune por transfusão de componentes sanguíneos. Embora os dados sobre o número de transfusões e os períodos de acompanhamento não sejam normalmente distribuídos (pois o número de transfusões e o tempo de acompanhamento, variam substancialmente entre os dois grupos de doentes), e apesar do grupo da população de doentes PT ser muito heterogéneo, dentro das limitações do estudo foi possível concluir que a taxa de aloimunização é maior no grupo dos doentes de HC cronicamente transfundidos (14.9% versus 0,9%).

As variáveis não controladas e o facto de ser um estudo retrospectivo podem ter tido influência nos resultados detetados (27). Um estudo prospetivo da resposta imune relacionada com a transfusão, provavelmente esclareceria os efeitos de algumas das variáveis não controladas que descrevemos, e poderíamos obter outro valor de taxa e especificidades diferentes (32).

Dos dados recolhidos, as medidas a implementar para redução da aloimunização seriam, a nível clínico, a Isoimunização Rh dos doentes Rh negativos que recebem componentes sanguíneos Rh positivos, e a nível laboratorial, a realização da PAI cerca de 4 semanas após transfusão para deteção de reações tardias e/ou aparecimento de aloanticorpos.

## **6. CONCLUSÃO**

A transfusão de componentes sanguíneos, é o transplante de órgão mais antigo e mais amplamente utilizado. A descoberta da diversidade de GSs foi um passo fundamental no desenvolvimento de técnicas de transfusão de sangue seguras. Antígenos de GSs continuam a ser descobertos, por meio de técnicas serológicas e de biologia molecular.

O risco inerente mais comum relacionado com a transfusão de componentes sanguíneos é o desenvolvimento de aloanticorpos. As complicações da terapêutica transfusional diminuíram de frequência nos últimos anos devido também à implementação de normas de qualidade e de segurança, essenciais ao desenvolvimento da medicina moderna que exige componentes seguros, eficazes e disponíveis em tempo útil. As tecnologias são cada vez mais sofisticadas com o objetivo de diminuir a ocorrência de uma reação adversa.

A transfusão de sangue nunca foi tão segura. Atualmente os sistemas de Hemovigilância e de gestão de componentes sanguíneos, contribuem para reduzir os riscos associados. O resultado do uso ótimo do sangue é definido como uma utilização segura, clinicamente eficaz e eficiente, para o doente correto, no momento correto, nas condições corretas e de acordo com guidelines apropriadas.

A frequência e especificidade relatadas de aloimunização para os aloantígenos dos GSs, varia consideravelmente nos vários estudos documentados.

As diferenças no desenho dos estudos, nas diversas populações estudadas, e os números exatos de transfusões recebidas antes da formação de anticorpos podem explicar os diferentes resultados. É, no entanto, consensual, e podemos confirmar neste estudo, que a aloimunização mais frequente está relacionada com os sistemas Rh e Kell, e que o Atg D é o mais imunogénico (excluindo os antígenos do sistema ABO).

Nos doentes em que se prevê a aloimunização para os antígenos mais imunogénicos, nomeadamente do Sistema Rh e Kell, as unidades transfundidas devem ser compatíveis para esses antígenos, e assim diminuir eficientemente a indução de anticorpos e os riscos clínicos associados. A baixa taxa de aloimunização encontrada para os Atg C, c, E, e, Kell nos doentes da consulta de Hematologia Clínica, quando comparadas com as taxas encontradas na população pontualmente transfundida, justifica a relevância da implementação deste procedimento.

Concluimos também neste estudo, que será adequado implementar a rotina de imunização Rh nos utentes Rh negativos que recebem componentes sanguíneos Rh positivos.

Olhando para o futuro, poderemos esperar que quando a biologia molecular estiver implementada na rotina, com a sua elevada sensibilidade e especificidade, permitirá que todos os dadores e recetores possam vir a ser analisados para a maioria dos polimorfismos clinicamente significativos, tornando a correspondência eletrónica viável, e a Medicina Transfusional personalizada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Petz L, Swisher S, Kleinman S, Spence R SR. Clinical Practice of Transfusion Medicine. 3rd ed. 1996. 11–30 p.
2. American Red Cross–blood services. history–blood–transfusion [Internet]. [cited 2020 Mar 15]. Available from: <https://www.redcrossblood.org/learn-about-blood/history-blood-transfusion>
3. Pacheco F. Crise e risco na História da transfusão de sangue. ABO Rev Med Transfusional. 2003;16:12–22.
4. Watkins WM. The ABO blood group system : historical background. Transfus Med. 2001;11(June):243–65.
5. Daniels G, Reid ME. 50 TH ANNIVERSARY ARTICLE Blood groups : the past 50 years. Transfusion. 2010;50(February).
6. Reid ME, Mohandas N. Red Blood Cell Blood Group Antigens: Structure and Function. Semin Hematol. 2004;41(2):93–117.
7. ISBT. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology [Internet]. [cited 2020 Mar 1]. Available from: <https://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>
8. Storry JR, Clausen FB, Castilho L, Chen Q, Daniels G, Denomme G, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. Vox Sang. 2019;114(1).
9. Fung M, Grossman B, Hillyer C WC. Technical Manual. 18th ed. AABB, editor. New York; 2014.
10. Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. 2005 [cited 2020 Feb 21]. Available from: [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/pdf/Bookshelf\\_NBK2261.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/pdf/Bookshelf_NBK2261.pdf)
11. Batissoco AC, Novaretti MCZ. Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO. Rev Bras Hematol Hemoter [Internet]. 2003 Mar [cited 2020 Jun 28];25(1):47–58. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842003000100008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842003000100008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
12. Hosoi E. Biological and cliniceal aspects of ABO blood group system. J Med Investig. 2008;55(3–4):174–82.
13. Groot HE, Sierra LEV, Said MA, Lipsic E, Karper JC, Van Der Harst P. Genetically determined ABO blood group and its associations with health and disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020;(March):830–8.
14. Mattaloni SM, Arnoni C, Céspedes R, Nonaka C, Boggione CT, Brajovich MEL, et al. Clinical Significance of an Alloantibody against the Kell Blood Group Glycoprotein. Transfus Med Hemotherapy. 2017;44(1):53–7.
15. Westhoff CM. Blood group genotyping. Blood. 2019;133(17):1814–20.
16. Quirino MG, Colli CM, Macedo LC, Sell AM, Visentainer JEL. Methods for blood group antigens detection: cost-effectiveness analysis of phenotyping and genotyping. Hematol Transfus Cell Ther. 2019;41(1):44–9.

17. Monteiro F, Tavares G, Ferreira M, Amorim A, Bastos P, Rocha C, et al. Technologies involved in molecular blood group genotyping. *ISBT Sci Ser.* 2011;6(1):1–6.
18. Anstee DJ. Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood.* 2009;114(2):248–56.
19. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum Genet.* 2009;729–42.
20. Bonifácio SL, Novaretti MCZ. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;31(2):104–11.
21. Daniels G. Functions of red cell surface proteins<sup>1</sup>. Daniels G. Functions of red cell surface proteins. *Vox Sang.* 2007;93(4):331–40. *Vox Sang.* 2007;93(4):331–40.
22. Hoffbrand AV MP. Hoffbrand`s Essential Haematology. 7th ed. B WB, editor. 2016.
23. Marques F, Fonseca C, Nunes AR, Belo A, Brilhante D, Cortez J. Contextualizando a Elevada Prevalência de Anemia na População Portuguesa: Percepção, Caracterização e Preditores: Um Sub-Estudo do EMPIRE. *Med Interna (Bucur).* 2016;23(4):26–38.
24. Eccles MP, Grimshaw JM, Shekelle P, Schünemann HJ, Woolf S. Developing clinical practice guidelines: Target audiences, identifying topics for guidelines, guideline group composition and functioning and conflicts of interest. *Implement Sci.* 2012;7(1).
25. Mascaretti L, Riva M. Review The role of HLA in transfusion practice. *Blood Transfus.* 2004;6(2):247–62.
26. Zakharova MY, Belyanina TA, Sokolov A V., Kiselev IS, Mamedov AE. The contribution of major histocompatibility complex class II genes to an association with autoimmune diseases. *Acta Naturae.* 2019;11(4):4–12.
27. Hendrickson JE, Tormey CA. Understanding red blood cell alloimmunization triggers. *Hematology.* 2016;2016(1).
28. Gehrie EA, Tormey A. The Influence of Clinical and Biological Factors on and Non-Responders. *Transfus Med Hemotherapy.* 2014;(41):420–9.
29. Hudson KE, Lin E, Hendrickson JE, Lukacher AE, Zimring JC. Regulation of primary alloantibody response through antecedent exposure to a microbial T-cell epitope. *Blood.* 2010;115(19):3989–96.
30. Hendrickson JE. Red blood cell alloimmunisation: induction of immunity and potential mitigation strategies. *ISBT Sci Ser.* 2018;13(1):105–11.
31. Stack G, Tormey CA. Estimating the immunogenicity of blood group antigens: a modified calculation that corrects for transfusion exposures. *Br J Haematol.* 2016;175(1).
32. Tormey CA, Stack G. Immunogenicity of blood group antigens: A mathematical model corrected for antibody

- evanescence with exclusion of naturally occurring and pregnancy-related antibodies. *Blood*. 2009;114(19):4279–82.
33. Zimring JC, Hudson KE. Cellular immune responses in red blood cell alloimmunization. *Hematology*. 2016;2016(1).
  34. Poole J, Daniels G. Blood Group Antibodies and Their Significance in Transfusion Medicine. *Transfus Med Rev*. 2007 Jan;21(1):58–71.
  35. Brand A. Immunological complications of blood transfusions. *Press Medicale [Internet]*. 2016;45(7–8):e313–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lpm.2016.06.024>
  36. Tormey CA, Hendrickson JE. Transfusion-related red blood cell alloantibodies: induction and consequences. *Blood*. 2019;133(17):1821–30.
  37. Tormey CA, Stack G. The persistence and evanescence of blood group alloantibodies in men. *Transfusion*. 2009;49(3):505–12.
  38. Wendel S, Delaney M, Wendel S, Bercovitz RS, Cid J, Cohn C, et al. Transfusion reactions: prevention, diagnosis, and treatment. *Lancet [Internet]*. 2016;6736(July 2018). Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01313-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01313-6)
  39. Hendrickson JE, Tormey CA. Red Blood Cell Antibodies in Hematology/Oncology Patients: Interpretation of Immunohematologic Tests and Clinical Significance of Detected Antibodies. *Hematol Oncol Clin North Am [Internet]*. 2016;30(3):635–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2016.01.006>
  40. IMUNO-HEMATOLOGIA Recomendações [Internet]. Available from: [http://www.ipst.pt/files/IPST/INFORMACAO\\_DOCUMENTACAO/Imunohematologia.pdf](http://www.ipst.pt/files/IPST/INFORMACAO_DOCUMENTACAO/Imunohematologia.pdf)
  41. Zimring JC, Stowell SR, Johnsen JM, Hendrickson JE. Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on alloimmunization to transfused antigens: Current paradigms and future considerations. *Transfus Clin Biol [Internet]*. 2012;19(3):125–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2012.03.002>
  42. Körmöczi GF, Mayr WR. Responder individuality in red blood cell alloimmunization. *Transfus Med Hemotherapy*. 2014;41(6):446–51.
  43. Schonewille H, Haak HL, Van Zijl AM. RBC antibody persistence. *Transfusion*. 2000;40(9):1127–31.
  44. Schonewille H, Honohan Á, Van Der Watering LMG, Hudig F, Te Boekhorst PA, Koopman-Van Gemert AWMM, et al. Incidence of alloantibody formation after ABO-D or extended matched red blood cell transfusions: A randomized trial (MATCH study). *Transfusion*. 2016;56(2):311–20.
  45. Evers D, Middelburg RA, de Haas M, Zalpuri S, de Vooght KMK, van de Kerkhof D, et al. Red-blood-cell alloimmunisation in relation to antigens' exposure and their immunogenicity: a cohort study. *Lancet Haematol*. 2016;3(6):e284–92.

46. Zalpuri S, Zwaginga JJ, le Cessie S, Elshuis J, Schonewille H, van der Bom JG. Red-blood-cell alloimmunization and number of red-blood-cell transfusions. *Vox Sang.* 2012;102(2):144–9.
47. Schonewille H, Van De Watering LMG, Brand A. Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic alloimmunized patient cohort: Is it time to take precautionary measures? *Transfusion.* 2006;46(4):630–5.
48. Cruz R de O, Mota MA, Conti FM, Pereira RA d’Almeida, Kutner JM, Aravechia MG, et al. Prevalence of erythrocyte alloimmunization in polytransfused patients. *Einstein (São Paulo)* [Internet]. 2011 Jun [cited 2020 Apr 8];9(2):173–8. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-45082011000200173&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082011000200173&lng=en&tlng=en)
49. Singhal D, Kutyna MM, Chhetri R, Wee LYA, Hague S, Nath L, et al. Red cell alloimmunization is associated with development of autoantibodies and increased red cell transfusion requirements in myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 2017;102(12).
50. Ferreira BM, Paula Júnior MR de. Determinação da frequência de anticorpos irregulares pós-transfusionais. *Univ Ciências da Saúde.* 2015 Dec 7;13(2).
51. Pessoni LL, Ferreira MA, Silva JCR da, Alcântara KC de. Red blood cell alloimmunization among hospitalized patients: transfusion reactions and low alloantibody identification rate. *Hematol Transfus Cell Ther* [Internet]. 2018;40(4):326–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.04.001>
52. Rozovski U, Ben-tal O, Kirgner I, Mittelman M, Hareuveni M. Increased Incidence of Red Blood Cell Alloantibodies in Myelodysplastic Syndrome. *IMAJ.* 2015;17(october):2008–11.
53. Karafin MS, Westlake M, Hauser RG, Tormey CA, Norris PJ, Roubinian NH, et al. Risk factors for red blood cell alloimmunization in the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS-III) database. *Br J Haematol.* 2018;181(5):672–81.
54. Lin Y, Saskin A, Wells RA, Lenis M, Mamedov A, Callum J, et al. Prophylactic RhCE and Kell antigen matching: impact on alloimmunization in transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndromes. *Vox Sang.* 2017;112(1):79–86.
55. Makarovska-Bojadzieva T, Velkova E, Blagoevska M. The impact of extended typing on red blood cell alloimmunization in transfused patients. *Open Access Maced J Med Sci.* 2017 Apr 15;5(2):107–11.
56. Sanz C, Nomdedeu M, Belkaid M, Martinez I, Nomdedeu B, Pereira A. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leukemia. *Transfusion.* 2013;53(4):710–5.
57. Guelsin GAS, Rodrigues C, Visentainer JEL, Campos PDM, Gilli SCO, Saad STO, et al. Molecular matching for Rh and K reduces red blood cell alloimmunisation in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood Transfus.* 2015;(13):53–8.

58. Cruz RDO, Mota MA, Conti FM, Antônio R. Incidência de aloimunização eritrocitária em pacientes poli transfundidos Prevalence of erythrocyte alloimmunization in polytransfused patients. *Einstein (São Paulo)*. 2011;9:173–8.
59. Baía F, Correia F, Alves B, Martinez F, Koch C, Carneiro A, et al. Phenotyping Rh/Kell and risk of alloimmunization in haematological patients. *Transfus Med*. 2016 Feb 1;26(1):34–8.
60. Duran J, Chabert T, Rodrigues F PD. Distribuição dos grupos sanguíneos na população portuguesa. *ABO Rev Med Transfusional*. 2007;29:5–17.
61. Liu C, Grossman BJ. Antibody of undetermined specificity: Frequency, laboratory features, and natural history. *Transfusion*. 2013;53(5):931–8.

## ANEXOS

### ANEXOS I-II-III: As seguintes tabelas representam a nomenclatura dos antígenos (fonte: 7)

Table of blood group systems v6.0\_6th August 2019

No.	System name	System symbol	Gene name(s)*	Number of antigens	Chromosomal location	CD numbers
001	ABO	ABO	<i>ABO</i>	4	9q34.2	
002	MNS	MNS	<i>GYPA, GYPB, (GYPE)</i>	49	4q31.21	CD235a CD235b
003	P1PK	P1PK	<i>A4GALT</i>	3	22q13.2	CD77
004	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i>	55	1p36.11	CD240
005	Lutheran	LU	<i>BCAM</i>	25	19q13.2	CD239
006	Kell	KEL	<i>KEL</i>	36	7q33	CD238
007	Lewis	LE	<i>FUT3</i>	6	19p13.3	
008	Duffy	FY	<i>ACKR1</i>	5	1q21-q22	CD234
009	Kidd	JK	<i>SLC14A1</i>	3	18q11-q12	
010	Diego	DI	<i>SLC4A1</i>	22	17q21.31	CD233
011	Yt	YT	<i>ACHE</i>	5	7q22	
012	Xg	XG	<i>XG, MIC2</i>	2	Xp22.32	CD99†
013	Scianna	SC	<i>ERMAP</i>	7	1p34.2	
014	Dombrock	DO	<i>ART4</i>	10	12p13-p12	CD297
015	Colton	CO	<i>AQP1</i>	4	7p14	
016	Landsteiner-Wiener	LW	<i>ICAM4</i>	3	19p13.2	CD242
017	Chido/Rodgers	CH/RG	<i>C4A, C4B</i>	9	6p21.3	
018	H	H	<i>FUT1</i>	1	19q13.33	CD173
019	Kx	XK	<i>XK</i>	1	Xp21.1	
020	Gerbich	GE	<i>GYPC</i>	11	2q14-q21	CD236

Page 1 of 2

No.	System name	System symbol	Gene name(s)*	Number of antigens	Chromosomal location	CD numbers
021	Cromer	CROM	<i>CD55</i>	20	1q32	CD55
022	Knops	KN	<i>CR1</i>	9	1q32.2	CD35
023	Indian	IN	<i>CD44</i>	6	11p13	CD44
024	Ok	OK	<i>BSG</i>	3	19p13.3	CD147
025	Raph	RAPH	<i>CD151</i>	1	11p15.5	CD151
026	John Milton Hagen	JMH	<i>SEMA7A</i>	6	15q22.3-q23	CD108
027	I	I	<i>GCNT2</i>	1	6p24.2	
028	Globoside	GLOB	<i>B3GALNT1</i>	2	3q25	
029	Gill	GIL	<i>AQP3</i>	1	9p13	
030	Rh-associated glycoprotein	RHAG	<i>RHAG</i>	3	6p12.3	CD241
031	FORS	FORS	<i>GBGT1</i>	1	9q34.13-q34.3	
032	JR	JR	<i>ABCG2</i>	1	4q22.1	CD338
033	LAN	LAN	<i>ABCB6</i>	1	2q36	
034	Vel	VEL	<i>SMIM1</i>	1	1p36.32	
035	CD59	CD59	<i>CD59</i>	1	11p13	CD59
036	Augustine	AUG	<i>SLC29A1</i>	4	6p21.1	
037	KANNO	KANNO	<i>PRNP</i>	1	20p13	CD230
038	Sid	SID	<i>B4GALNT2</i>	1	17q21.32	
039*	CTL2	CTL2	<i>SLC44A2</i>	2	19p13.2	

\*As defined by the HUGO Gene Nomenclature Committee <http://www.genenames.org/>. †MIC2 product. ( ) no gene product on normal RBCs

\*Grey Indicates Provisional Status Only

Page 2 of 2

**Table of blood group collections**

Collection			Antigen		
No.	Name	Symbol	No.	Symbol	Incidence %
205	Cost	COST	205001	Cs <sup>a</sup>	95
			205002	Cs <sup>b</sup>	34
207	li	I	207002	i	*
208	Er	ER	208001	Er <sup>a</sup>	>99
			208002	Er <sup>b</sup>	<1
			208003	Er3	>99
210			210001	Le <sup>c</sup>	1
			210002	Le <sup>d</sup>	6
213		MN CHO	213001	Hu	
			213002	M <sub>1</sub>	
			213003	Tm	
			213004	Can	
			213005	Sext	
			213006	Sj	

\*By standard serological tests, may appear to be low incidence.

Obsolete collections: 201 Gerbich; 202 Cromer; 203 Indian; 204 Auberger; 206 Gregory; 209 GLOB; 211 Wright; 212 Vel

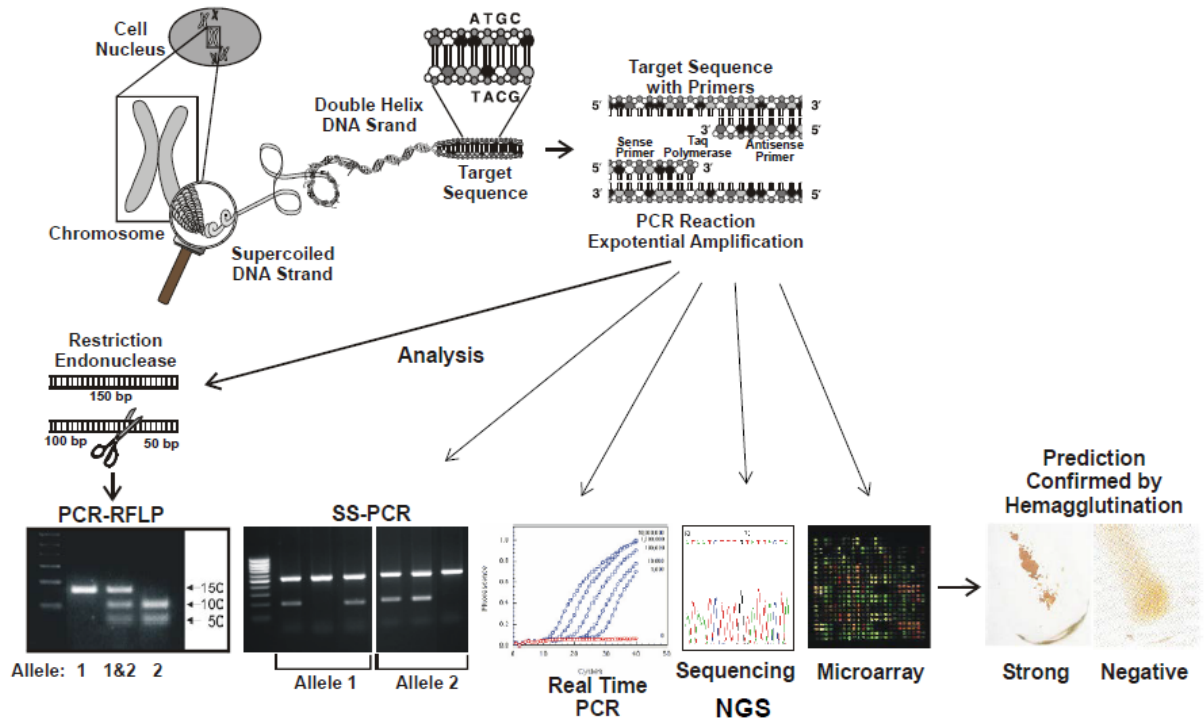
**Table of low incidence antigens (700 series)**

No.	Name	Symbol
700002	Batty	By
700003	Christiansen	Chr <sup>a</sup>
700005	Biles	Bi
700006	Box	Bx <sup>a</sup>
700017	Torkildsen	To <sup>a</sup>
700018	Peters	Pt <sup>a</sup>
700019	Reid	Re <sup>a</sup>
700021	Jensen	Je <sup>a</sup>
700028	Livesay	Lj <sup>a</sup>
700039	Milne	
700040	Rasmussen	RASM
700044		JFV
700045	Katagiri	Kg
700047	Jones	JONES
700049		HJK
700050		HOFM
700054		REIT

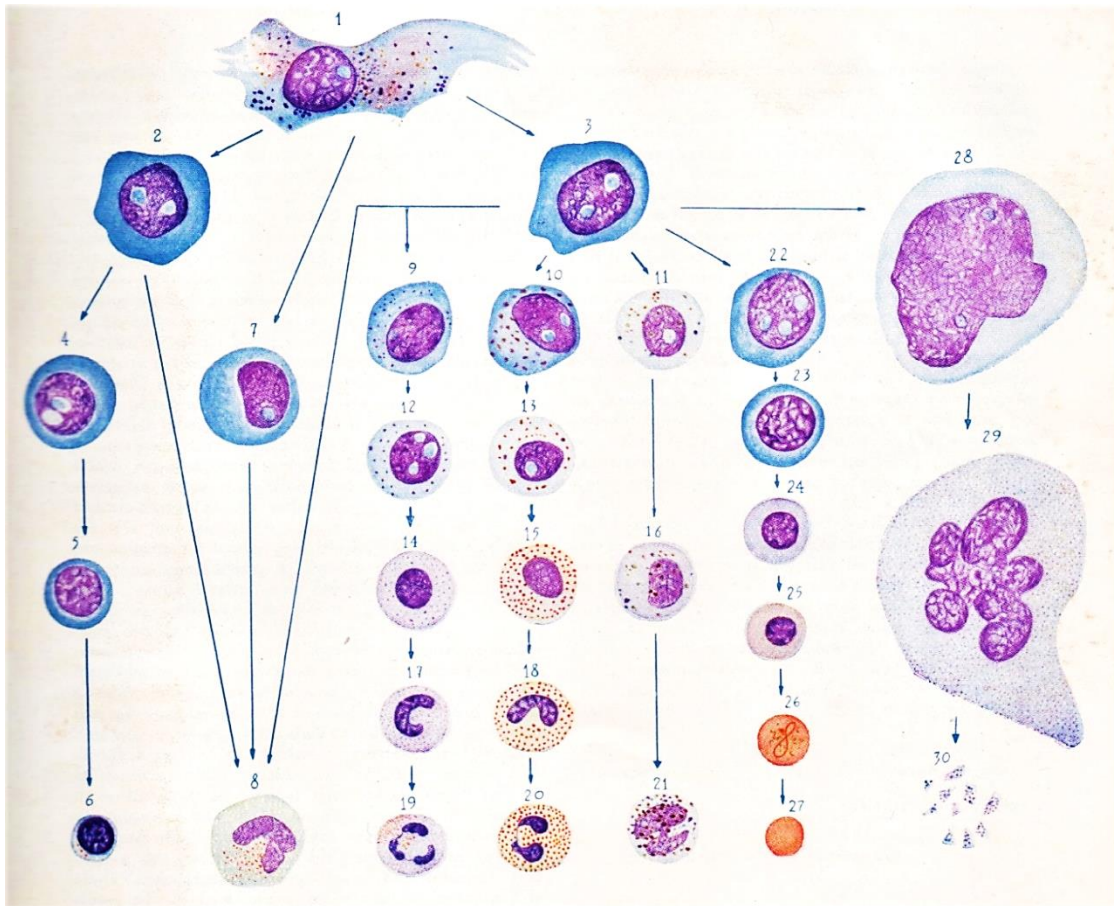
**Table of high incidence antigens (901 series)**

No.	Name	Symbol
901008		Emm
901009	Anton	AnWj
901012	Sid	Sd <sup>a</sup>
901014		PEL
901015		ABTI
901016		MAM
901017		LKE

**ANEXO IV: Metodologias para determinar os antígenos dos grupos sanguíneos**

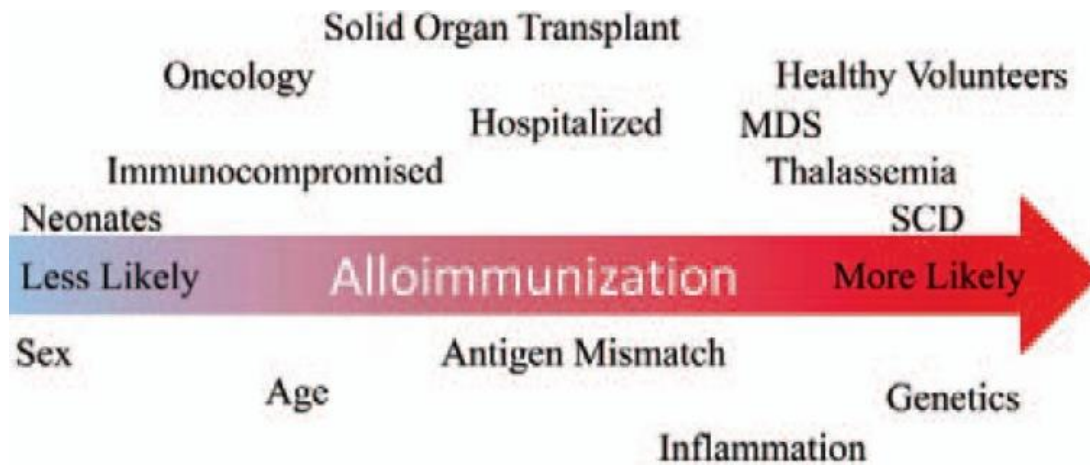


**Anexo V: Diagrama representativo da hematopoiese**

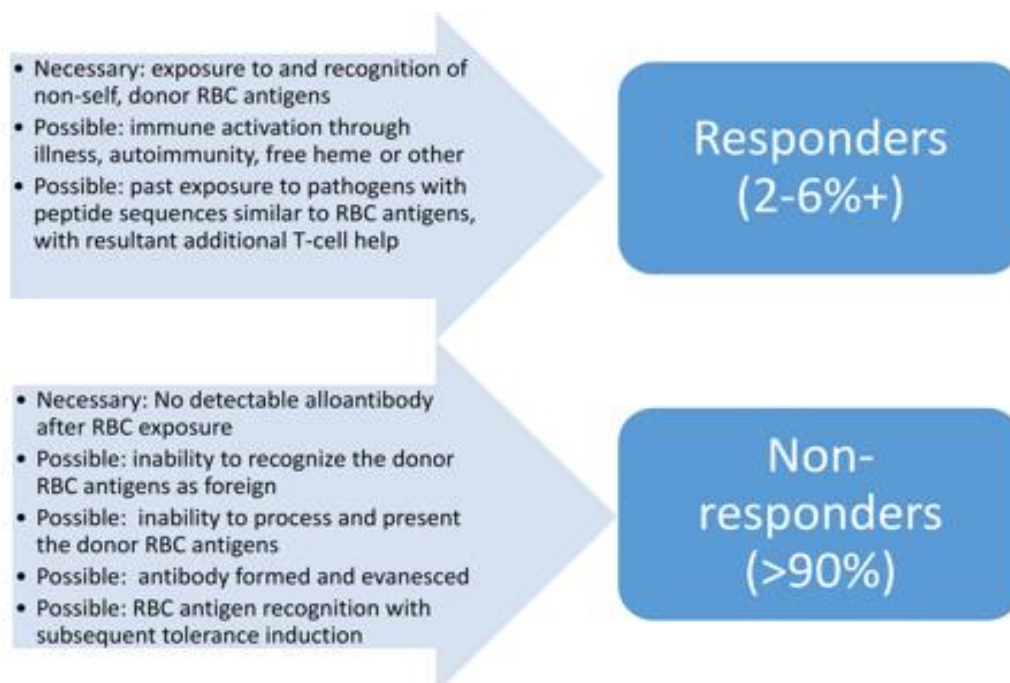


Legenda: 1: stem cell, 6: linfócito, 8: monócito, 19: neutrófilo, 20: eosinófilo, 21: basófilo, 27 glóbulo rubro, 30: plaquetas

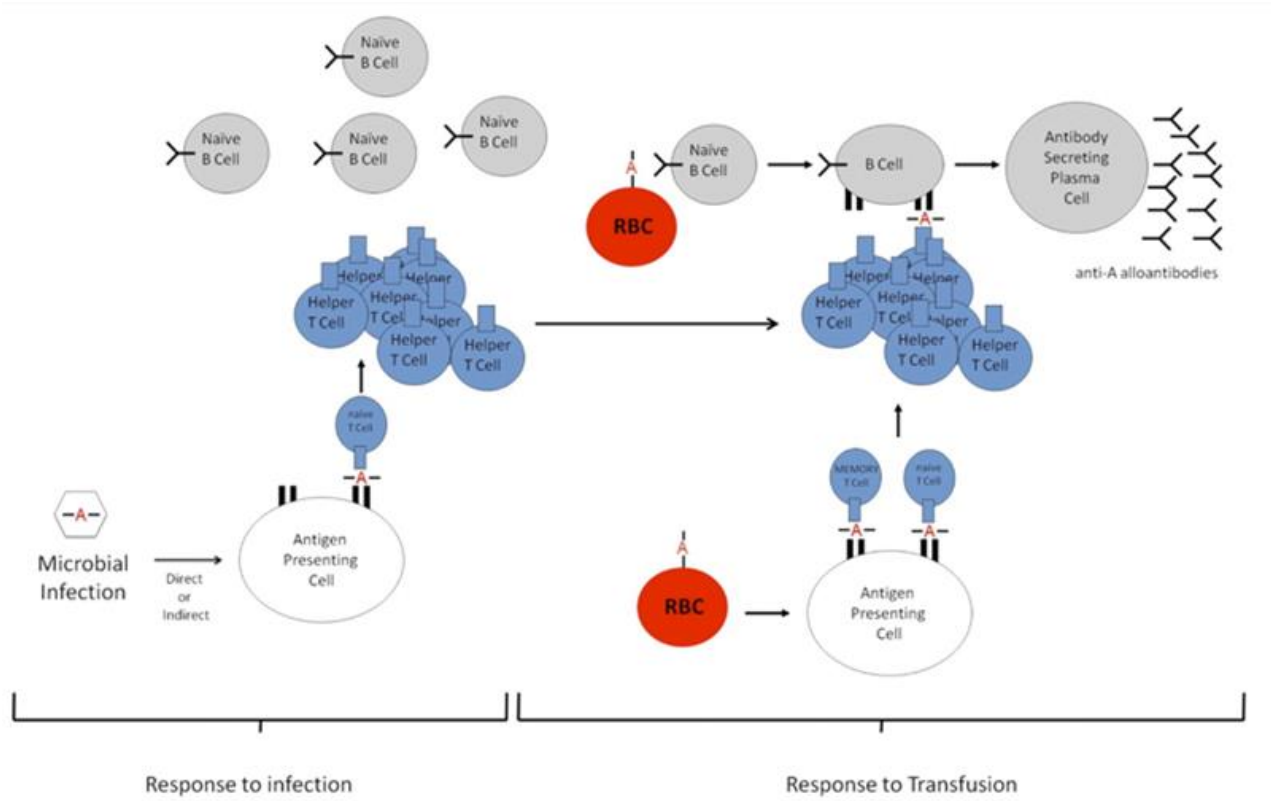
**Anexo VI:** Fatores predisponentes da aloimunização (fonte:28)



**ANEXO VII:** “Respondedores” e “não-respondedores” a aloantígenos transfundidos (fonte: 30)



**ANEXO VIII:** Esquema da proposta do aumento da aloimunização (fonte: 29)



Resposta à infecção. Os peptídeos contendo um polimorfismo (designado por A) de um microrganismo serão processados e apresentados pelas células apresentadoras de antígeno do hospedeiro; os peptídeos apresentados no MHC II serão reconhecidos pelas células T CD4. No entanto, na ausência de um epítipo, as células B não induzem a produção de anticorpo. Na resposta à transfusão. Após uma segunda exposição (por transfusão) que contém o Atg com o polimorfismo A ao ser apresentado no MHC II das células B ou às células T CD4 de memória produzidas contra a infecção microbiana, as células B são estimuladas para se diferenciar em células plasmáticas e produzir anticorpos contra o polimorfismo A.

**ANEXO IX: Taxas aproximadas de aloimunização para aloantígenos de grupo sanguíneo não ABO relatados em várias populações de doentes (fonte: 28)**

Population	Most common antibody specificity	Approximate alloimmunization rate	Exposure	Other notes/comments
General transfused population [6–10]	K, E	<1–4%	RBC transfusion	primarily retrospective studies; alloimmunization rates of 8–10% reported in prospective transfusion studies
Rh-negative healthy volunteers [21, 22]	D	83–93%	intravenous RBC infusion	anti-E, anti-C and/or anti-G also detected in some volunteers
Young children [23–28]	K, E	vanishingly rare	RBC transfusion	may be associated with severe infection or treatment with infliximab.
Hospitalized, non-oncology patients [14, 15]	primarily C, E, K	20-30%	RBC transfusion	military combat veterans may be at increased risk compared to civilians
SCD [29, 30, 32, 33]	primarily C, E, K	Up to 47%	RBC transfusion	several guidelines recommend the provision of C, E and K matched RBCs for transfusion in this population
Myelodysplastic syndromes [40–43]	Rh and K	Up to 58.6%	RBC transfusion	most studies utilized FAB criteria for diagnosis of MDS
Thalassemias [34-37]	Rh and K	Up to 37%	RBC transfusion	
Pregnancy (prior to RhIg) [86]	D	7.2%	fetal-maternal hemorrhage	substantially reduced by the introduction of Rh(D) immune globulin
AIDS [87]	–	none reported	RBC transfusion	further study needed

AABB = American Association of Blood Banks; FAB = French American British classification of hematologic diseases; MDS = myelodysplastic syndromes; SCD = sickle cell disease.

