



**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE BLOQUEIO DE ANTICORPOS IGG EM
ERITRÓCITOS COM TAD POSITIVO PARA FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA NA
HEMORREDE DE SANTA CATARINA**

Florianópolis

2017



FILIFE JOSÉ DE MATOS



**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE BLOQUEIO DE ANTICORPOS IGG EM
ERITRÓCITOS COM TAD POSITIVO PARA FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA NA
HEMORREDE DE SANTA CATARINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial da Universidade do Sul de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Especialista em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial.

Orientador: Everaldo José Schorner

Florianópolis

2017

FILIPE JOSÉ DE MATOS

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE BLOQUEIO DE ANTICORPOS IGG EM
ERITRÓCITOS COM TAD POSITIVO PARA FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA NA
HEMORREDE DE SANTA CATARINA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do título Especialista em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial e aprovado em sua forma final pelo Curso de Hematologia e Hemoterapia Laboratorial, da Universidade do Sul de Santa Catarina.

_____, _____ de _____ de 20____.
Local dia mês ano

Orientador: Everaldo José Schorner
Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina - HEMOSC

Prof. Eduardo Comeli Goulart Msc.
Universidade do Sul de Santa Catarina

RESUMO

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA – Campus Grande Florianópolis
Curso: Especialização em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial
Acadêmico: Filipe José de Matos
Florianópolis, 15 de dezembro de 2017.

MATOS. F.J. Validação da Técnica de Bloqueio de Anticorpos Igg em Eritrócitos com TAD Positivo para Fenotipagem Eritrocitária na Hemorrede de Santa Catarina. 2017. 30 f. Monografia. Universidade do Sul de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

A hemoterapia se caracteriza pelo emprego terapêutico do sangue e hemoderivados. Os programas de transfusões sanguíneas crônicas estão se tornando cada vez mais comuns em nosso meio devido às vantagens que acarretam. O aumento da segurança transfusional em pacientes politransfundidos está intimamente relacionado à fenotipagem eritrocitária precoce com o objetivo de conhecer o perfil antigênico, uma vez que transfusões com fenótipo mais compatível evitariam a aloimunização. Entretanto, a determinação da fenotipagem dos eritrócitos de pacientes que apresentam resultado de TAD Positivo, pode ser inviável devido ao fato dos eritrócitos estarem sensibilizados in vivo com imunoglobulinas. Desta forma objetiva-se validar na hemorrede de Santa Catarina a metodologia de Bloqueio de IgG em Eritrócitos com TAD Positivo para realização de fenotipagem eritrocitária. Nos estudos, foram analisados e selecionados amostras de pacientes e doadores que anteriormente foram realizados exames laboratoriais. Pode-se observar que as metodologias de Bloqueio de IgG em Eritrócitos com TAD Positivo e da técnica de Dissociação de anticorpos IgG dos Eritrócitos com TAD Positivo pela Cloroquina demonstraram eficácia na viabilidade das amostras e possibilitaram a realização da fenotipagem eritrocitária.

Palavras-chave: Hemoterapia. Fenotipagem. Coombs Direto. Bloqueio de IgG. Cloroquina.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	04
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
2.1 HISTÓRIA DA HEMOTERAPIA.....	06
2.2 ALOIMUNIZAÇÃO.....	08
2.3 FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA.....	10
2.4 SORO DE ANTIGLOBULINA HUMANA (AGH).....	12
2.5 TESTE DE COOMBS DIRETO (TAD).....	12
3 HIPÓTESE	14
4 OBJETIVOS	15
4.1 GERAL.....	15
4.2 ESPECÍFICOS	15
5 MATERIAL E MÉTODOS	16
5.1 AMOSTRAS	16
5.2 TÉCNICAS LABORATORIAIS.....	16
5.2.1 TÉCNICA DE COOMBS DIRETO (TAD).....	16
5.2.2 TÉCNICA DE FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA.....	16
5.2.3 TÉCNICA DE BLOQUEIO DE IGG EM ERITRÓCITOS COM TAD POSITIVO.....	17
5.2.4 TÉCNICA DE DISSOCIAÇÃO DE ANTICORPOS IGG DOS ERITRÓCITOS COM TAD POSITIVO PELA CLOROQUINA.....	17
5.3 ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS.....	18
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1 INTRODUÇÃO

A hemoterapia se caracteriza pelo emprego terapêutico do sangue e hemoderivados. No Brasil, ela assumiu papel de extrema importância na medicina moderna a partir da criação de uma legislação própria juntamente com o fim de doações remuneradas e com o surgimento dos Hemocentros e da Rede Pública Hemoterápica (JUNQUEIRA; ROSENBLIT; HAMERSCHLAK, 2005a).

Os programas de transfusões sanguíneas crônicas estão se tornando cada vez mais comuns em nosso meio devido às vantagens que acarretam, haja vista que, a infusão de eritrócitos aumenta a capacidade de carregamento de oxigênio e diminui a hipóxia tecidual, e desta forma melhora a condição clínica geral do paciente (SWERDLOW, 2006).

Entretanto, as complicações ocasionadas pelo tratamento que utilizam transfusões crônicas incluem riscos como infecções por agentes virais e bacterianos, a sobrecarga de ferro e principalmente a aloimunização eritrocitária, cuja frequência pode variar de 2,5 a 76% em certos Centros de Hematologia (FABRON, 2001).

A aloimunização por antígenos eritrocitários limita a disponibilidade de concentrados de hemácias compatíveis para futuras transfusões, além de apresentar risco de hemólise tardia e de quadros graves de anemia hemolítica. A aloimunização está relacionada frequentemente aos seguintes fatores: idade do paciente, número de gestações, número de transfusões recebidas e diferenças antigênicas entre pacientes e doadores (BETHESDA, 2005).

Os incidentes transfusionais ou reações transfusionais são agravos ocorridos durante ou após a transfusão sanguínea e a ela relacionados. A etiologia das reações transfusionais podem estar relacionadas a diversos fatores que vão desde reações contra antígenos presentes nos neutrófilos a contaminação bacteriana do sangue transfundido (BRASIL, 2007).

O aumento da segurança transfusional em pacientes politransfundidos está intimamente relacionado à fenotipagem eritrocitária precoce com o objetivo de conhecer o perfil antigênico, uma vez que transfusões com fenótipo mais compatível evitariam a aloimunização (LASALLE-WILLIAMS et al., 2011). Como a maioria dos títulos de anticorpos irregulares diminuem com o passar do tempo, reduzindo assim as chances de serem detectados, as transfusões com hemácias de fenótipos compatíveis ao paciente, permitiriam evitar uma resposta imune secundária, ou até

mesmo um resultado falso-negativo nos testes pré-transfusionais (prova de compatibilidade, pesquisa de anticorpos irregulares) (RYDER; ZIMRING; HENDRICKSON, 2014).

Além de reduzir o percentual de aloimunizações dos pacientes, principalmente os politransfundidos, a fenotipagem também tem papel fundamental no auxílio da identificação de fenótipos raros; fornece dados de prevalência dos fenótipos eritrocitários e contribui para encontrar fenótipo negativo quando há anticorpo formado em paciente já aloimunizado (ORLINA; SOSLER; KOSHY, 1991).

O método mais utilizado para fenotipagem de grupos sanguíneos se baseia no princípio da hemaglutinação em tubos ou por gelcentrifugação. É um teste de baixo custo e alta eficiência e está presente em grande parte das rotinas laboratoriais dos hemocentros (SILVA, 2016).

O Teste de Coombs Direto (TAD) é considerado um método simples, que permite detectar hemácias revestidas *in vivo* por imunoglobulinas e/ou frações do complemento. A realização do teste depende do soro antiglobulina humana (AGH), que pode ser obtido a partir da sensibilização de animais com globulinas humanas e/ou anticorpos monoclonais. O resultado do TAD Positivo, pode ser encontrado em pacientes recentemente transplantados, transfundidos e recebendo imunoglobulina intravenosa (BRASIL, 2014).

Entretanto, a determinação da fenotipagem dos eritrócitos de pacientes que apresentam resultado de TAD Positivo, pode ser inviável devido ao fato dos eritrócitos estarem sensibilizados *in vivo* com imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento ou ambos, e podem levar a resultados falso positivo nos testes que utilizam reagentes anti-IgG humano (EDWARDS; MOULDS; JUDD, 1982). Desta forma, para as hemácias sensibilizadas com anticorpos IgG, é necessário a utilização de reagentes de aglutinação direta e/ou de tratamento químico com difosfato de cloroquina para remover quantidade suficiente de IgG das hemácias afim de permitir que as mesmas sejam fenotipados (LEE et al., 2006).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRIA DA HEMOTERAPIA

A história da transfusão de sangue no mundo foi dividida por dois períodos: um empírico, que vai até 1900, e outro conhecido como período científico com início em 1900 até os dias atuais. São encontrados relatos por todo o mundo no período empírico, onde cientistas e médicos realizavam tentativas de transfusão sanguíneas como no ano de 1492 que se retirou sangue de três homens jovens e deu-se ao Papa Inocêncio VII, que se encontrava ferido, com esperança de cura; infelizmente, todos os quatro morreram (BORDIN, J. O.; LANGHI JÚNIOR, 2007).

Já em 1795, uma nota de rodapé publicada em uma revista médica relatava brevemente a realização da primeira transfusão entre humanos pelo médico Philip Syng Pysik (SCHMIDT, 1968).

A primeira transfusão de sangue cientificamente documentada, feita entre seres humanos, aconteceu em 26 de setembro de 1818 realizada por James Blundell. O paciente tinha em torno de 30 anos e era extremamente magro, em razão de uma obstrução pilórica causada por um carcinoma gástrico. Ele recebeu entre 12 a 24 onças de sangue em aproximadamente 30 a 40 minutos. Apesar de uma aparente melhora inicial, o paciente faleceu em dois dias após a transfusão (MAZDA; SHIMIZU, 2015).

Em 1869 foram relatadas várias tentativas para encontrar um anticoagulante atóxico e foi quando Braxton Hicks recomendou o fosfato de sódio, sendo este o primeiro exemplo de pesquisa de preservação do sangue. Enquanto isso, no Brasil, iniciava-se os relatos acadêmicos no ano de 1879 sobre hemoterapia, em uma tese de doutorado na Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, de autoria de José Vieira Marcondes (BORDIN, J. O.; LANGHI JÚNIOR, 2007).

Depois de grandes descobertas na fase empírica, encerra-se o período com Karl Landsteiner através da descoberta dos grupos sanguíneos ABO e explicando as sérias reações que acontecem com os resultados das transfusões incompatíveis. Ainda neste período foram feitos relatos de preservação do sangue por Hustin em 1914 que demonstrou de forma precisa o uso de citrato de sódio como solução anticoagulante para transfusões. Depois em 1915 Lewisohn determinou a quantidade mínima de citrato necessária para a coagulação e sua não toxicidade

celular, transformando as transfusões mais práticas e seguras para o paciente (JUNQUEIRA; ROSENBLIT; HAMERSCHLAK, 2005b).

No Brasil, em 1916, a pesquisadora Isaura Leitão defendeu a tese de doutoramento chamada “Transfusão Sanguínea”, na qual descreveu a realização de quatro casos bem sucedidos de transfusão em humanos. Nesse período, os doadores de sangue no Brasil eram remunerados para cada centímetro cúbico de sangue doado. Já no dia 7 de dezembro de 1942, foi fundado na cidade do Rio de Janeiro o primeiro banco de sangue, chamado Instituto Fernandes Figueira (JUNQUEIRA; ROSENBLIT; HAMERSCHLAK, 2005a).

A partir da criação do Banco de Sangue do Distrito Federal (1944), foi promulgada a Lei nº 1075 em 27 de Março de 1950, que dispõe sobre a doação voluntária de sangue sendo fundada a Associação de Doadores Voluntários do Brasil (BORDIN, J.O.; LANGUI JÚNIOR, D. M.; COVAS, 2007).

Devido ao fato dos hemocomponentes provenientes das doações remuneradas implicarem no risco aumentado de contaminação do receptor, pensou-se na implementação de uma política de doação voluntária. As principais razões para promover a doação voluntária baseiam-se na proteção do receptor, pois estes doadores têm menor prevalência de serem portadores de doenças infecciosas transmitidas pelo sangue (BRASIL, 2016).

O Programa Nacional de Doação Voluntária de Sangue promovido pela Gerência Geral de Sangue, Outros Tecidos, Células e Órgãos (GGSTO) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão federal responsável pela normatização e fiscalização da atividade de hematologia no país, considera a doação espontânea de sangue como objetivo a ser alcançado para se obter um sangue de qualidade. Esse Programa Nacional preconiza a modificação do perfil do doador “de repositores para espontâneos, transformando a doação em ação espontânea e constante, como ato de cidadania e solidariedade” (BRASIL, 2004).

Pela primeira vez, em 1968, a Portaria no 1, de 24 de maio de 1968 da Comissão Nacional de Hemoterapia Brasileira, conceituou o processo atualmente denominado “ciclo do sangue”(BRASIL, 1968).

Em 30 de abril de 1980, o Ministério da Saúde em conjunto com o Ministério da Previdência Social, expediram uma Portaria Interministerial MS/MPAS nº 7 que instituiu o Programa Nacional de Sangue e Hemoderivados – PRÓ-SANGUE, baseado no modelo francês para área assistencial de sangue, onde a partir de então

o governo brasileiro decidiu assumir a responsabilidade da manutenção do sistema de hemoterapia, garantindo a segurança, qualidade e a universalização do serviço (BRASIL, 1980).

2.2 ALOIMUNIZAÇÃO

Em 2009 foi apresentado estudos que definem a presença de anticorpos classificados como incompletos ou irregulares, oriundos, principalmente, de transfusões de fenótipos incompatíveis (aloanticorpos), e os anticorpos de ocorrência natural ou regulares, como aqueles pertencentes ao sistema ABO (Anti-A, Anti-B e Anti-AB) desenvolvidos pelo organismo por volta do sexto mês de vida (COSECHEN, 2009).

Os anticorpos são, em maioria, das classes IgG e IgM, sendo o IgG a molécula de maior importância transfusional por sua reatividade em 37°C (BAPTISTA; NARDIN; STINGHEN, 2014) (RODRIGUES et al., 2013).

A aloimunização eritrocitária dá-se quando um paciente produz anticorpos direcionados contra antígenos das hemácias do doador, considerados como estranhos ao organismo, pois esses não estão presentes nas hemácias do paciente. Os principais exemplos são as transfusões de sangue incompatível e as gestantes, cujos fetos expressam em suas células sanguíneas antígenos exclusivamente de origem paterna, os quais podem chegar à circulação materna durante a gestação ou durante parto. Esta última condição, pode levar ao desenvolvimento da doença hemolítica perinatal (DHPN) (NELSON, 1999).

A DHPN é caracterizada pela destruição das hemácias fetais por anticorpos da classe IgG presentes na circulação materna. Esses anticorpos, dirigidos contra antígenos eritrocitários presentes nas hemácias do feto, atravessam a barreira placentária e promovem a hemólise prematura dos eritrócitos e como consequência levando à anemia fetal (THAKRAL et al., 2010).

A aloimunização constitui um dos maiores riscos resultantes da terapia transfusional, além de limitar a disponibilidade de concentrados de hemácias que sejam compatíveis para futuras transfusões e também elevar o risco de reação hemolítica (RODRIGUES et al., 2013) (CAMPBELL-LEE; KITTLES, 2014).

Pacientes que necessitam de regime de transfusão regular, apresentam maior risco do desenvolvimento de reações transfusionais hemolíticas tanto imediatas quanto tardias. A reação hemolítica imediata ocorre no momento do início da transfusão, ou em alguns minutos ou horas após seu início (na maioria dos casos acontece por incompatibilidade ABO ou RhD entre doador e o receptor da transfusão), enquanto a reação hemolítica tardia se dá em cerca de 48 horas ou em até três semanas após a transfusão, como, por exemplo: reação anamnésica ao antígeno K por um paciente previamente sensibilizado (OLIVEIRA; COZAC, 2003).

Sabe-se que a maioria dos títulos de anticorpos irregulares diminuem com o passar do tempo, reduzindo assim as chances de serem detectados em posteriores análises. Desta forma, pacientes aloimunizados devem receber concentrado de hemácias com fenótipo compatível já determinado, com o propósito de evitar uma resposta imune hemolítica devido a um resultado falso-negativo nos testes pré-transfusionais (prova de compatibilidade, pesquisa de anticorpos irregulares) (YAZDANBAKHS; WARE; NOIZAT-PIRENNE, 2012)(ALVES et al., 2012)(RYDER; ZIMRING; HENDRICKSON, 2014).

Grande parte dos anticorpos contra antígenos eritrocitários podem ser classificados em um dos 36 sistemas de grupos sanguíneos já reconhecidos, sendo o sistema sanguíneo Rh o mais complexo e mais imunogênico após o sistema ABO. Em geral, todos os aloanticorpos reagem em um teste de antiglobulina indireto (teste de Coombs indireto) (FLEGEL, 2007) (STORRY, 2014).

O antígeno RhD do sistema Rh é o mais importante no que se diz respeito a aloimunização, devido ao seu envolvimento na doença hemolítica perinatal e nas reações transfusionais hemolíticas. Os aloanticorpos contra o antígeno D contribuem com cerca de 60% dos casos de Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) com fetos assintomáticos e 90% dos casos com anemia fetal grave (LAMBIN et al., 2002).

A imunoprofilaxia pós-natal com a imunoglobulina anti-Rh foi baseada em um trabalho no início dos anos 1960, sendo rapidamente aceita como oterapia para a prevenção da DHPN.

A terapia é baseada na administração de um concentrado predominantemente IgG anti-D, derivada de pools de plasma humano, entretanto, a administração de imunoglobulina Anti-D só é válida para DHPN por anti-D. Além disso, a imunização primária RhD não é suprimida com a Ig passiva anti-D, isto é, a terapia com antiglobulina não tem eficácia se a mulher já tenha produzido anti-D

anteriormente. Como consequência, a imunoprofilaxia anti-D reduziu drasticamente a incidência da aloimunização RhD durante a gestação. Apesar dessa redução, o anti-D continua a ser o anticorpo mais comum que conduz a morbidade e a mortalidade fetal e neonatal (CIANCIARULLO; CECCON; VAZ, 2003) (CIANCIARULLO, M. A.; CECCON, M. E. J.; VAZ, 2001).

2.3 ENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA

A fase científica que contempla o período de 1900 até os dias atuais, deu-se início com a descoberta dos grupos sanguíneos pelo pesquisador Karl Landesteiner e posteriormente a classificação, dos diferentes grupos de sangue, permitiram estabelecer as compatibilidades e incompatibilidades entre os indivíduos, estruturando-se a base para a utilização do sangue como agente terapêutico. Foi pela introdução de testes de compatibilidade, por Ottemberg no de 1907 e Moss em 1910, que a transfusão começou a adquirir bases científicas mais sólidas para a sua realização (VERRASTRO, 2005).

A fenotipagem das hemácias de pacientes e dos hemocomponentes a serem transfundidos, no intuito de realizar uma transfusão fenótipo compatível, constitui-se uma prática laboratorial indispensável na busca por uma terapia transfusional mais segura (GIRELLO, A. L.; KUHN, 2002).

Esta técnica é realizada através da análise dos antígenos presentes na membrana nas hemácias do paciente, utilizando antissoros específicos para cada antígeno, com a finalidade de selecionar unidades de hemácias com antígenos compatíveis ao receptor (BRANCH; PETZ, 1999).

Atualmente, mais de 250 antígenos de grupos sanguíneos são reconhecidos pela Internacional Society for Blood Transfusion (ISBT), sendo classificados em trinta e seis sistemas, seis coleções e duas séries de grupos sanguíneos (STORRY, 2014).

Os sistemas de grupos sanguíneos caracterizam-se pela expressão de antígenos protéicos e carboidratos na membrana eritrocitária, os quais são identificados por anti-soros específicos. Esses grupos têm importância prática, nas transfusões, na obstetrícia e na neonatologia (ALVES et al., 2003).

As coleções de antígenos de grupo sanguíneo são constituídas por conjuntos de antígenos com características sorológicas e bioquímicas similares e

conhecidas, mas com especificidades não relacionadas aos sistemas de grupos sanguíneos já estabelecidos. As séries de antígenos são constituídas por antígenos conhecidos sorologicamente e agrupados em baixa e alta frequência populacional sendo que os de baixa frequência é aquele encontrado em menos de 1% de uma dada população e de alta frequência é aquele encontrado em mais de 99% de uma dada população (BRASIL, 2011).

Os principais sistemas eritrocitários submetidos à fenotipagem são o Rh (antígenos D, C, c, E, e) e o Kell (antígeno K), por serem os que apresentam as maiores frequências de aloimunização

em pacientes (GODFREY et al., 2010).

A frequência do antígeno RhD está presente em torno de 85% dos indivíduos da raça branca, em 90 a 95% dos negros e praticamente em 100% dos amarelos e índios (AVENT et al., 2000) (MOISE, 2002).

Dentre os indivíduos que expressam o antígeno RhD, existem ainda variações no fenótipo dependentes de alterações de sua estrutura molecular, estes alelos são classificados como D parcial, D fraco e DEL (WESTHOFF, 2007).

As mudanças no perfil epidemiológico da população brasileira e os avanços técnico-científicos na área médica, que possibilitam procedimentos terapêuticos de alta complexidade, trouxeram um aumento na demanda por transfusões (LUDWIG; RODRIGUES, 2005).

Além disso, a frequência com que os antígenos aparecem numa determinada população varia de acordo com a sua composição racial (UGWU et al., 2015) (LASALLE-WILLIAMS et al., 2011). Sendo assim o aumento da segurança transfusional em pacientes politransfundidos está diretamente relacionado à fenotipagem eritrocitária precoce, uma vez que transfusões com fenótipo compatível evitariam a aloimunização bem como, forneceram informações que definem a prevalência fenotípica da região (GIRELLO, A. L.; KUHN, 2002) (LORENZI, 2003).

2.4 SORO DE ANTIGLOBULINA HUMANA (AGH)

O teste com antiglobulina humana (AGH) foi descrito em 1945 por Coombs e colaboradores. Assim, inicialmente o uso do soro de Coombs (antiglobulina humana) foi utilizado para detectar in vivo a sensibilização de hemácias por anticorpos,

ajudando no diagnóstico da doença hemolítica perinatal (DHPN) e anemia hemolítica auto-imune (RODRIGUES et al., 2015).

Desta forma, o soro de Coombs pode ser considerado como a mais importante descoberta da medicina transfusional depois do sistema de grupo sanguíneo ABO permitindo que outros anticorpos fossem detectados com seus respectivos antígenos, levando a descoberta e à caracterização de outros sistemas de grupos sanguíneos (BORDIN, J.O.; LANGUI JÚNIOR, D. M.; COVAS, 2007).

O soro de Coombs contém anticorpos contra IgG humana e contra frações do completo C3, mas apresenta pouca atividade contra IgM e IgA. Dessa maneira, faz-se necessário complementar o teste com reagente poliespecífico para IgG, IgM e IgA, a fim de detectar qual isótopo de imunoglobulina está revestindo as hemácias (ZEERLEDER, 2011).

2.5 TESTE DE COOMBS DIRETO (TAD)

O Teste de Coombs Direto (TAD) permite detectar in vivo a sensibilização das hemácias com anticorpos e realizar o Teste de Coombs Indireto ou Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) que detecta a presença de anticorpos irregulares no soro, com finalidade de elucidar anticorpos além dos esperados (anti-A e anti-B) (HARMENING, 2006).

A aglutinação no teste ocorre quando há uma diminuição das forças de repulsão entre as hemácias conhecido como potencial zeta até o valor crítico (potencial zeta crítico). Para que seja possível a visualização da reação, é necessário utilizar o soro antiglobulina humana (AGH) afim de diminuir o potencial zeta até o ponto crítico (GIRELLO, A. L.; KUHN, 2002).

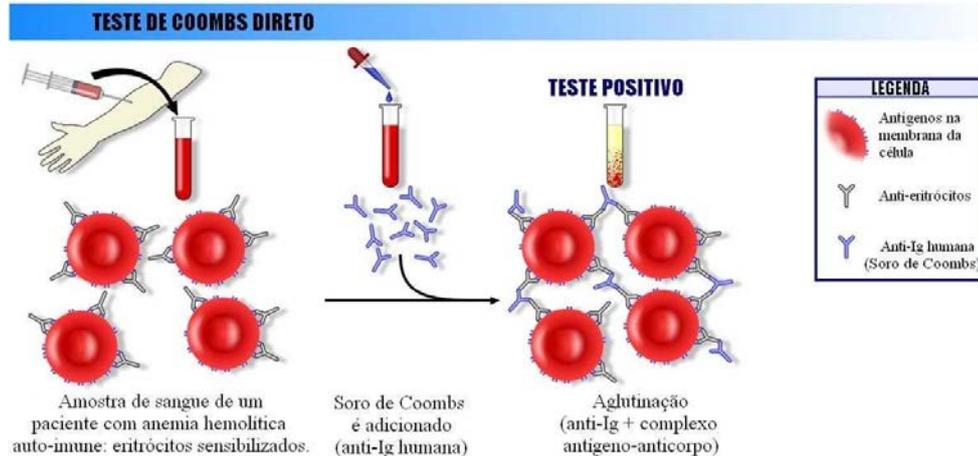


Figura 1: Teste de CoombsDireto
(<http://www.biomedicinapadrazo.com.br/2010/11/testede-coombs-direto.html>)

Usualmente, o TAD é realizado nas seguintes situações em que são necessários estudos imunohematológicos, quando os exames realizados rotineiramente são positivos ou discordantes; quando há discrepância na tipagem Rh(D) - pesquisa do antígeno e o controle Rh(D) positivos; na pesquisa de anticorpos irregulares positiva, onde se realiza a identificação de anticorpos irregulares (IAI) e TAD; e ainda, durante as provas pré-transfusionais, onde o concentrado de hemácias do doador é cruzado com soro/plasma do paciente, sendo todos os exames do paciente negativos (PAI e TAD), e suspeita-se de auto-anticorpo do doador (DOMEN, 2004).

As condições clínicas que podem resultar na sensibilização *in vitro* das hemácias com anticorpo e/ou complemento são: anemias hemolíticas autoimunes; anemias hemolíticas induzidas por drogas; doença hemolítica perinatal; reações hemolíticas transfusionais, transfusão de sangue ou componentes contendo plasma ABO-incompatível e em outras situações específicas que são detectadas após criteriosa avaliação clínica para identificar a causa do TAD positivo (HARMENING, 2006).

Além disso, anticorpos contra diversas drogas e aditivos também podem causar resultados positivos nos testes de anticorpos. As drogas podem resultar em ampla variedade de anormalidades hematológicas, incluindo teste de antiglobulina direto positivo. A causa mais comum destas reações positivas é a formação de auto-anticorpos (GARRATTY, 1976).

3 HIPÓTESE

Considerando que a sensibilização *in vivo* dos eritrócitos por imunoglobulinas impossibilita a realização da fenotipagem eritrocitária, a validação da técnica de Bloqueio de IgG em Eritrócitos com TAD Positivo para o tratamento de hemácias com Coombs Direto Positivo possibilitará a determinação da fenotipagem eritrocitária em pacientes TAD Positivo na hemorrede de Santa Catarina.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Validar na hemorrede de Santa Catarina a metodologia de Bloqueio de IgG em Eritrócitos com TAD Positivo para realização de fenotipagem eritrocitária.

4.2 ESPECÍFICOS

- Validar a técnica de Bloqueio de IgG em Eritrócitos com TAD Positivo em hemácias de pacientes no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina.
- Validar a técnica de Dissociação de anticorpos IgG dos Eritrócitos com TAD Positivo pela Cloroquina em hemácias de pacientes no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina.
- Realizar fenotipagem eritrocitárias das amostras previamente tratadas com a metodologia a ser validada.
- Verificar se há confiabilidade na metodologia a ser estudada através de análise estatística dos resultados encontrados com as devidas técnicas propostas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho consiste em um estudo de finalidade aplicada e de natureza experimental com forma de abordagem analítica.

5.1 AMOSTRAS

Para validação da técnica, foram obtidas amostras provenientes anteriormente de coletas para exames laboratoriais já realizados de pacientes do HEMOSC nos Hemocentros Coordenar e Regional de Criciúma no período de agosto a dezembro de 2017 onde foram realizados, anteriormente, testes pré transfusionais e como critério de inclusão, as que obtiveram resultado de Coombs Direto Positivo. Não será realizado coleta de amostras exclusivamente para a pesquisa proposta.

5.2 TÉCNICAS LABORATORIAIS

5.2.1 TÉCNICA DE COOMBS DIRETO (TAD)

Na rotina imuno-hematológica do Hemocentro, foram utilizadas as técnicas de coombs direto de acordo com o procedimento operacional padrão da instituição do referido POP FLN.03.05.18-R06 - TESTE DA ANTIGLOBULINA DIRETO. Para este teste, foram utilizados tubos de ensaio com suspensão de hemácias a serem testadas a 3-5%, em solução de cloreto de sódio 0,9%. Foram adicionadas 2 gotas de Soro Antiglobulina Humana Poliespecífico (AGH) a suspensão de hemácias. Posteriormente os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 3400 RPM durante 15 segundos seguidos da ressuspensão de forma suave do botão de hemácias e observando a ausência, presença e intensidade da aglutinação.

5.2.2 TÉCNICA DE FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA

Para a fenotipagem eritrocitária, também será realizada de acordo com o procedimento operacional padrão da instituição conforme POP HMR.03.05.01-R05 - FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA DE ANTÍGENOS DE GRUPOS SANGUINEOS. Referente a fenotipagem eritrocitária, se procederá com o preparo de uma suspensão

de hemácias a serem fenotipadas com diluição de 3-5%, em solução de cloreto de sódio 0,9%. Posteriormente será retirada uma gota da suspensão de hemácias e adicionado 1 gota do soro (reagente) específico relativo ao fenótipo a ser determinado, com o volume de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida procederá com a homogeneização e centrifugação a 3400 rotações por minuto (RPM) durante 15 segundos seguidos da ressuspensão de forma suave do botão de hemácias e observando a ausência, presença e intensidade da aglutinação.

5.2.3 TÉCNICA DE BLOQUEIO DE IGG EM ERITRÓCITOS COM TAD POSITIVO

A técnica de Bloqueio de IgG em Eritrócitos com TAD Positivo, será realizada de acordo com metodologia fundamentada na literatura (SERERAT; VEIDT; DUTCHED, 2000), onde as hemácias das amostras a serem testados foram previamente lavados e centrifugadas. Posteriormente foram utilizados tubos de ensaio contendo 01 gota das hemácias e adicionado 20 gotas do soro de Coombs Monoespecífico. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente (20-24 °C). em seguida, os tubos foram lavados 3 a 4 vezes em solução de cloreto de sódio 0,9%. Posteriormente será realizado o Teste de Coombs Direto (TAD) e observado a presença ou ausência de aglutinação. Caso TAD seja Positivo, deve ser repetido novamente o bloqueio. Quando TAD apresentar resultado negativo, os eritrócitos podem ser utilizados para fenotipagem eritrocitária. Amostras com TAD maior que 2+ devem ser tratadas previamente pelo difosfato de cloroquina.

5.2.4 TÉCNICA DE DISSOCIAÇÃO DE ANTICORPOS IGG DOS ERITRÓCITOS COM TAD POSITIVO PELA CLOROQUINA

Como técnica complementar, a Dissociação de Anticorpos IgG dos Eritrócitos com TAD Positivo pela Cloroquina, foi realizada em paralelo com a técnica de Bloqueio de IgG em Eritrócitos com TAD Positivo de acordo com adaptação da Associação Americana de Banco de Sangue (BETHESDA, 2005) onde as hemácias das amostras a serem testados foram previamente lavados e centrifugadas. Posteriormente foram utilizados tubos de ensaio contendo 10 gotas das hemácias adicionando 40 gotas de solução de difosfato de cloroquina 20%, onde foram

homogeneizadas e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente (20 a 24 °C). Em seguida será retirada uma pequena alíquota de eritrócitos-teste, onde foram lavados três vezes com solução salina e centrifugados por 1 minuto a 3.400 RPM. Posteriormente será realizado o Teste de Coombs Direto (TAD) e observado a presença ou ausência de aglutinação. Caso TAD seja positivo, deve-se continuar a incubação do tubo-teste, retirando alíquotas dos eritrócitos em intervalos de 30 minutos para repetição do TAD, até o máximo de duas horas de incubação. Quando TAD apresentar resultado negativo, os eritrócitos podem ser utilizados para fenotipagem eritrocitária.

5.3 ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS

A partir da análise dados obtidos, a técnica será considerada como validada quando verificado que as amostras testadas cujo eritrócitos apresentavam TAD com resultado positivo, obtiverem resultado do Coombs Direto Negativo devido a realização da técnica de Bloqueio de IgG em Eritrócitos com TAD Positivo.

Os dados foram discriminados na forma de gráficos e tabela. A análise estatística foi realizada através da utilização de métodos clássicos e dependerá do tipo de distribuição apresentado pelo conjunto dos dados. Assumindo que os dados tenham uma distribuição normal, será utilizada o teste t de *Student*. Análise estatística não paramétrica foi utilizada quando os dados não apresentem normalidade. Além disso, para a reprodução dos dados em gráficos e testes estatísticos, foi utilizado o programa Graph Pad Prism 6.0.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos estudos, foram analisados e selecionados amostras de pacientes e doadores que anteriormente foram realizados exames laboratoriais no HEMOSC durante o período de agosto a dezembro de 2017.

Neste período foram utilizadas 24 amostras que apresentaram TAD Positivo, onde os resultados das técnicas de bloqueio foram demonstradas as tabelas 1, 2, 3 e Figura 02.

A Tabela 01 apresenta os resultados provenientes da técnica de Bloqueio de IgG em Eritrócitos com TAD Positivo. Pode – se observar que a utilização do soro de coombs nas amostras levaram efetivamente ao bloqueio dos anticorpos. Sendo que 79% das amostras testadas foram bloqueadas sem necessidade da repetição da técnica, ao qual as amostras foram encubas por 20 minutos. A necessidade de nova repetição da técnica de bloqueio foi utilizada em 17% dos testes. Além disso foi observado que apenas uma das amostras não foi possível obter o bloqueio utilizando o reagente Soro de Coombs.

A Tabela 02 apresenta os resultados obtidos pela dissociação dos anticorpos IgG através da técnica da Cloroquina. Foi observado que o uso do foi capaz de dissociar 96% dos eritrócitos sensibilizados. Apenas uma amostra não demonstrou efetivamente a quebra da ligação IgG nas hemácias, entretanto, observou-se diminuição na intensidade da aglutinação após 120 minutos encubados com o reagente. Também pode - se observar que 25% das amostras utilizadas foram submetidas a 60 minutos de tratamento e 13% a 120 minutos

Tabela 01: Bloqueio com IgG em eritrócitos
TAD Positivo

Amostra	TAD Antes do Bloqueio com IgG		TAD Após Bloqueio com IgG		
	P	M	REP	P	M
1	1+	1+	1	0	0
2	1+	2+	1	0	0
3	1+	1+	1	0	0
4	1+	1+	1	0	0
5	2+	2+	1	0	0
6	2+	2+	2	0	0
7	1+	1+	1	0	0
8	3+	3+	6	1+	1+
9	(+)	(+)	1	0	0
10	3+	3+	2	0	0
11	2+	2+	1	0	0
12	4+	4+	2	0	0
13	3+	3+	2	0	0
14	(+)	(+)	1	0	0
15	3+	3+	1	0	0
16	1+	1+	1	0	0
17	1+	1+	1	0	0
18	2+	2+	1	0	0
19	2+	2+	1	0	0
20	3+	3+	1	0	0
21	3+	3+	1	0	0
22	4+	4+	1	0	0
23	4+	4+	1	0	0
24	2+	2+	1	0	0

TAD - Teste de Antiglobulina Direto; **P** - Soro antiglobulina humana poliespecífico; **M** - Soro antiglobulina humana monoespecífico; **REP** - Número de repetições da técnica.

Tabela 02: Dissociação de Anticorpos IgG em eritrócitos TAD Posito pela Cloroquina

Amostra	TAD Antes do Tratamento com DFC		TAD Após Tratamento com DFC		
	P	M	TEMPO (min)	P	M
1	1+	1+	30	0	0
2	1+	2+	30	0	0
3	1+	1+	60	0	0
4	1+	1+	60	0	0
5	2+	2+	60	0	0
6	2+	2+	60	0	0
7	1+	1+	30	0	0
8	3+	3+	120	1+	1+
9	(+)	(+)	30	0	0
10	3+	3+	60	0	0
11	2+	2+	60	0	0
12	4+	4+	120	0	0
13	3+	3+	120	0	0
14	(+)	(+)	30	0	0
15	3+	3+	30	0	0
16	1+	1+	30	0	0
17	1+	1+	30	0	0
18	2+	2+	30	0	0
19	2+	2+	30	0	0
20	3+	3+	30	0	0
21	3+	3+	30	0	0
22	4+	4+	30	0	0
23	4+	4+	30	0	0
24	2+	2+	30	0	0

TAD - Teste de Antiglobulina Direto; **P** - Soro antiglobulina humana poliespecífico; **M** - Soro antiglobulina humana monoespecífico; **REP** - Número de repetições da técnica; **DFC** - Difosfato de Cloroquina.

Após a determinação do bloqueio e dissociação do IgG em membrana de eritrócitos sensibilizados, foi realizado a fenotipagem do RhD conforme apresentado na Tabela 3. Foi observado que não houve diferença na intensidade e resultado da fenotipagem das amostras submetidas ao bloqueio com IgG quando comparada com as amostras quando tratadas com Cloroquina.

Tabela 03: Fenotipagem Eritrocitária Ante e Após

Amostra	Fenotipagem Eritrocitária RhD Antes do Tratamento			Fenotipagem Eritrocitária RhD Após o Bloqueio IgG / Dissociação DFC		
	D1	D2	CRh	D1	D2	CRh
1	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
2	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
3	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
4	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
5	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
6	2+	2+	2+	0/0	0/0	0/0
7	0	0	0	0/0	0/0	0/0
8	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
9	0	0	0	0/0	0/0	0/0
10	0	0	0	0/0	0/0	0/0
11	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
12	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
13	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
14	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
15	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
16	0	0	0	0/0	0/0	0/0
17	0	0	0	0/0	0/0	0/0
18	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
19	(+)	(+)	(+)	0/0	0/0	0/0
20	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
21	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
22	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
23	4+	4+	0	4+/4+	4+/4+	0/0
24	1+	1+	1+	0/0	0/0	0/0

D1 - Soro Anti-D monoclonal (RH1); **D2** - Soro Anti-D de procedência distinta do soro D1; **CRh** - Soro controle-Rh de mesma procedência do soro anti-D1; **DFC** - Difosfato de Cloroquina

Também foi observado que as amostras não apresentaram alteração na intensidade das reações após os tratamentos com IgG e Cloroquina. As amostras 06, 19 e 24 apresentaram fenotipagem inconclusiva antes dos tratamentos devido aos resultados positivos do CRh. Sendo assim, foi observado que após a realização tanto do bloqueio com IgG quanto a dissociação com Cloroquina, as hemácias tiveram sua fenotipagem RhD confirmada, haja vista que os controles de RhD apresentaram resultado negativo.

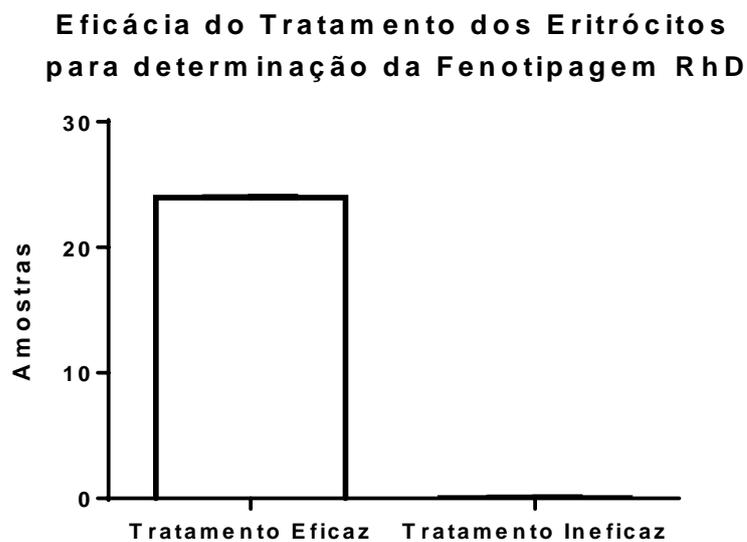


Figura 2: Eficácia do tratamento das Hemácias teste pelo Bloqueio com IgG e Difosfato de Cloroquina.

Através do Figura 2 foi possível observar que de forma geral, o tratamento dos eritrócitos com Soro Antiglobulina Humana e com Difosfato de Cloroquina foi eficaz para a realização da fenotipagem eritrocitária RhD. Os grupos foram divididos entre as amostras que após o tratamento foi possível a realização da fenotipagem eritrocitária (Tratamento Eficaz) e o grupo de amostras onde o tratamento não foi efetivo (Tratamento Ineficaz). A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa de acordo com o teste t de Student.

Os resultados demonstraram que os tratamentos foram eficazes para o bloqueio ou dissociação dos eritrócitos sensibilizados, entretanto, é recomendado que para a determinação da fenotipagem eritrocitária, a técnica de bloqueio de IgG seja adotada como preferência quando TAD apresentar intensidade até “2+” (SERERAT; VEIDT; DUTCHED, 2000). Também é recomendado que, em amostras com TAD

Positivo de intensidade “3+” ou mais, deve-se utilizar da técnica de dissociação com Cloroquina e posteriormente, se necessário, utilizar a técnica de bloqueio com IgG, já que os eritrócitos estão intensamente sensibilizados e apresentam elevado potencial de aglutinação (FERREIRA et al., 2014).

O sistema Rh é o mais importante no que se diz respeito a aloimunização, devido ao seu envolvimento na doença hemolítica perinatal. Desta forma, a fenotipagem eritrocitária para o sistema RhD em neonatos com TAD Positivo é de grande importância para elucidar casos que haja suspeita de incompatibilidade sanguínea materno-fetal afim de prosseguir com administração materna de imunoglobulina polivalente reduzindo a possibilidade da aloimunização por antígeno RhD e posteriormente no desenvolvimento da DHRN nas próximas gestações (BERLIN; SELBING; RYDEN, 1985). Em 1998, um estudo de um ano, fazendo screening neonatal em 22264 gestantes demonstraram a incidência do desenvolvimento de doença hemolítica neonatal, sendo que 70,9% dos anticorpos desenvolvidos pertencem ao sistema RhD e 29,1% como pertencentes a outros sistemas mais raros, demonstrando assim sua importância na aloimunização materna e doença hemolítica neonatal (HOWARD et al., 1998).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que as metodologias de Bloqueio de IgG em Eritrócitos com TAD Positivo e da técnica de Dissociação de anticorpos IgG dos Eritrócitos com TAD Positivo pela Cloroquina demonstraram eficácia na viabilidade das amostras e possibilitaram a realização da fenotipagem eritrocitária.

O estudo poderá futuramente ser aplicado de maneira mais ampla com a proposição da determinação da fenotipagem eritrocitária de outros grupos sanguíneos que sofrem interferência metodológica por anticorpos aderidos a superfície das hemácias.

Por fim, pode-se considerar que este estudo foi relevante principalmente por permitir o conhecimento, quantificação e validação das metodologias propostas com o intuito de posteriormente implementar as técnicas realizadas na hemorrede de Santa Catarina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, Renata T. et al. Avaliação do polimorfismo de grupos sanguíneos e fenótipo de hemoglobinas em um grupo de universitários de São José do Rio Preto, SP. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 69–71, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842003000100012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 9 dez. 2017.
- ALVES, Vitor Mendonça et al. Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 206–211, 2012. Disponível em: <<http://www.rbhh.org/?doi=10.5581/1516-8484.20120051>>
- AVENT, N. D. et al. Site directed mutagenesis of the human Rh D antigen: molecular basis of D epitopes. **Vox sanguinis**, [s. l.], v. 78 Suppl 2, p. 83–89, 2000.
- BAPTISTA, Maick William Guimarães; NARDIN, Jeanine Marie; STINGHEN, Sérgio Túlio. Aloimunização eritrocitária em pacientes de um hospital infantil atendido pelo instituto Paranaense de Hemoterapia e Hematologia, de 2007 a 2010. **Saúde**, [s. l.], v. 2, n. 6, 2014. Disponível em: <<http://revistas.unibrasil.com.br/cadernossaude/index.php/saude/article/view/106>>. Acesso em: 9 dez. 2017.
- BERLIN, Gösta; SELBING, Anders; RYDEN, Gunnar. RHESUS HAEMOLYTIC DISEASE TREATED WITH HIGH-DOSE INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN. **The Lancet**, [s. l.], v. 325, n. 8438, p. 1153, 1985. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673685924511>>
- BORDIN, J. O.; LANGHI JÚNIOR, D. M. ..Covas D. T. Hemoterapia – Fundamentos e prática. In: **Hemoterapia – Fundamentos e prática**. [s.l: s.n.]. p. 632.
- BORDIN, J.O.; LANGUI JÚNIOR, D. M.; COVAS, B. T. Hemoterapia fundamentos e prática. In: **Hemoterapia fundamentos e prática**. Atheneu ed. São Paulo. p. 535–540.
- BRANCH, D. R.; PETZ, L. D. Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. **Transfusion**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 6–10, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9920160>>. Acesso em: 9 dez. 2017.
- BRASIL. **Comissão Nacional de Hemoterapia. Portaria no 1, de 25 de abril de 1968. Estabelece os conceitos das operações desempenhadas pelos órgãos executivos de atividade hemoterápica, dos agentes hemoterápicos, do doador de sangue e receptor de transfusão**. Brasília: Diário Oficial da União, 1968.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria Interministerial no 7 Bsb., de 30 de abril de 1980. Aprova as diretrizes básicas do Programa Nacional de Sangue e Hemoderivados–Pró-Sangue. Define as atribuições da COMART, instituída pela Portaria Inter. In: Brasília: Diário Oficial da União, 1980. p. 826–8229.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Política Nacional de Sangue e hemoderivados do Ministério da Saúde**BrasíliaMinistério da Saúde, , 2004.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 1.353, de 13 de junho de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos**Diário Oficial da União Poder Executivo, , 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV. [s. l.], p. 56, 2016.
- CAMPBELL-LEE, Sally A.; KITTLES, Rick A. Red Blood Cell Alloimmunization in Sickle Cell Disease: Listen to Your Ancestors. **Transfusion Medicine and**

Hemotherapy, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 6–6, 2014. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/369513>>

CIANCIARULLO, M. A.; CECCON, M. E. J.; VAZ, F. A. C. Doença Hemolítica Neonatal: antígenos e anticorpos envolvidos. **Pediatria**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 257–257, 2001.

CIANCIARULLO, Marco Antonio; CECCON, Maria Esther Jurfest; VAZ, Flávio Adolfo Costa. Prevalência de marcadores imuno-hematológicos em recém-nascidos ao nascimento e em suas respectivas mães e incidência de Doença Hemolítica numa maternidade de São Paulo. **Rev Assoc Med Bras**, [s. l.], v. 49, n. (1), p. 45–53, 2003.

COSECHEN, V. Frequência de aglutininas Anti-A e Anti-B nos doadores de sangue do grupo “O” do Hemonúcleo de Guarapuava (PR). **Revista Guarapuava**, [s. l.], v. 3, p. 3–13, 2009.

DOMEN, Ronald E. Warm red blood cell autoantibodies and the direct antiglobulin test revisited. **American Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 122, n. 5, p. 673–674, 2004.

EDWARDS, J. M.; MOULDS, J. J.; JUDD, W. J. Chloroquine dissociation of antigen-antibody complexes. A new technique for typing red blood cells with a positive direct antiglobulin test. **Transfusion**, United States, v. 22, n. 1, p. 59–61, 1982.

FABRON, Antonio. Estudo da significância clínica de aloanticorpos eritrocitários em pacientes com anemia falciforme TT - Alloantibodies in patients with sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 121–122, 2001. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842001000200011&lang=pt>

FERREIRA, Ângela Melgaço et al. **Imuno-Hematologia Laboratorial**. 1. ed. Brasília. v. 1

FLEGEL, Willy A. The genetics of the Rhesus blood group system. In: BLOOD TRANSFUSION 2007, **Anais...** [s.l: s.n.]

GARRATTY, G. Problems in pre-transfusion tests related to drugs and chemicals. **The American journal of medical technology**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 209–19, 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/779471>>

GIRELLO, A. L.; KUHN, T. I. B. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. 3. ed. São Paulo: Senac, 2002.

GODFREY, Gwendolyn J. et al. Antibody development in pediatric sickle cell patients undergoing erythrocytapheresis. **Pediatric Blood & Cancer**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 1134–1137, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pbc.22647>>

HARMENING, Denise M. **Técnicas Modernas Em Banco de Sangue e Transfusão**. 4. ed. Rio de Janeiro.

HOWARD, H. et al. Consequences for fetus and neonate of maternal red cell allo-immunisation. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, [s. l.], v. 78, n. October 2008, p. F62–F66, 1998.

JUNQUEIRA, Pedro C.; ROSENBLIT, Jacob; HAMERSCHLAK, Nelson. História da Hemoterapia no Brasil TT - History of Brazilian Hemotherapy. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 201–207, 2005. a. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842005000300013&lang=pt>

JUNQUEIRA, Pedro C.; ROSENBLIT, Jacob; HAMERSCHLAK, Nelson. História da Hemoterapia no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s. l.], v. 27, n. 3, 2005. b. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-

84842005000300013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>

LAMBIN, Patrick et al. IgG1 and IgG3 anti-D in maternal serum and on the RBCs of infants suffering from HDN: Relationship with the severity of the disease. **Transfusion**, [s. l.], v. 42, n. 12, p. 1537–1546, 2002.

LASALLE-WILLIAMS, Michele et al. Extended red blood cell antigen matching for transfusions in sickle cell disease: A review of a 14-year experience from a single center (CME). **Transfusion**, [s. l.], v. 51, n. 8, p. 1732–1739, 2011.

LEE, E. et al. Efficacy of murine monoclonal antibodies in RBC phenotyping of DAT-positive samples. **Immunohematology**, United States, v. 22, n. 4, p. 161–165, 2006.

LORENZI, Therezinha F. **Manual de Hematologia: propedêutica e clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

LUDWIG, Sílvia Terra; RODRIGUES, Alziro César de Morais. Doação de sangue: uma visão de marketing. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 932–939, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2005000300028&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 9 dez. 2017.

MAZDA, Toshio; SHIMIZU, Masaru. Beginning Knowledge of Transfusion in Japan. **Yakushigaku zasshi**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 159–64, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27149781>>. Acesso em: 9 dez. 2017.

MOISE, Kenneth J. Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. **Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 100, n. 3, p. 600–611, 2002.

NELSON, J. L. Non-host cells in the pathogenesis of autoimmune disease: a new paradigm? **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 58, n. 9, p. 518–20, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10460182>>. Acesso em: 9 dez. 2017.

OLIVEIRA, Luciana C. O.; COZAC, Ana Paula C. N. .. C. REAÇÕES TRANSFUSIONAIS: DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, [s. l.], v. 36, n. 2/4, p. 431, 2003. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/758>>. Acesso em: 9 dez. 2017.

RODRIGUES, Romir et al. Aplicabilidade da Fenotipagem Eritrocitária em Doadores Voluntários e Pacientes Politransfundidos. **Saúde e Pesquisa**, [s. l.], v. 6, n. 3, 2013.

RODRIGUES, Romir et al. TESTE DA ANTIGLOBULINA HUMANA: UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 5, 2015. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/REF/article/view/33656>>. Acesso em: 9 dez. 2017.

RYDER, Alex B.; ZIMRING, James C.; HENDRICKSON, Jeanne E. **Factors influencing RBC alloimmunization: Lessons learned from murine models** *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2014.

SCHMIDT, Paul J. Transfusion in America in the Eighteenth and Nineteenth Centuries. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 279, n. 24, p. 1319–1320, 1968. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM196812122792406>>. Acesso em: 9 dez. 2017.

SERERAT, T. S.; VEIDT, D.; DUTCHED, A. A quick and simple method for phenotyping IgG-sensitized red blood cells. **Immunohematology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 154–6, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15373607>>. Acesso em: 20 maio. 2017.

STORRY, Jill. **Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology**. 2014. Disponível em: <<http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>>.

SWERDLOW, Paul S. Red cell exchange in sickle cell disease. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology**. American Society

- of Hematology. Education Program**, [s. l.], v. 2006, n. 1, p. 48–53, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124039>>
- THAKRAL, Beenu et al. Hemolytic disease of newborn due to anti-Jkb in a woman with high risk pregnancy. **Transfusion and Apheresis Science**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 41–43, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20558106>>. Acesso em: 9 dez. 2017.
- UGWU, N. I. et al. Red cell alloimmunization in multi-transfused patients with sickle cell anemia in Benin City, Nigeria. **Niger J Clin Pract**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 522–526, 2015.
- VERRASTRO, Therezinha. **Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica**. Atheneu ed. São Paulo.
- WESTHOFF, Connie M. The Structure and Function of the Rh Antigen Complex. **Seminars in Hematology**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 42–50, 2007.
- YAZDANBAKHSH, K.; WARE, R. E.; NOIZAT-PIRENNE, F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. **Blood**, [s. l.], v. 120, n. 3, p. 528–537, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22563085>>. Acesso em: 9 dez. 2017.
- ZEERLEDER, S. Autoimmune haemolytic anaemia - a practical guide to cope with a diagnostic and therapeutic challenge. **The Netherlands Journal of Medicine**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 177–184, 2011.