

**LARISSA BARBOSA LOPES**

**ESTUDO DE ALOANTICORPOS ANTI-HLA E ANTI-NEUTRÓFILOS EM  
DOADORAS DE SANGUE**

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

**SÃO PAULO**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LARISSA BARBOSA LOPES**

**ESTUDO DE ALOANTICORPOS ANTI-HLA E ANTI-NEUTRÓFILOS EM  
DOADORAS DE SANGUE**

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

**Orientador:** Prof. Dr. José Orlando Bordin

**SÃO PAULO**

**2008**

Lopes, Larissa Barbosa

**Estudo de aloanticorpos anti-HLA e anti-neutrófilos em doadoras de sangue**/Larissa Barbosa Lopes. - - São Paulo, 2008. xviii, 117f.

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

Anti-HLA and Anti-Neutrophils Alloantibodies Study in Female Blood Donors.

1. TRALI. 2. HLA. 3. Neutrófilos. 4. Insuficiência Pulmonar Aguda. 5. Doadoras de Sangue.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE ONCOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL**

**Chefe do Departamento:** Prof. Dr. José Orlando Bordin

**Coordenador do Curso de Pós-graduação:** Profa. Dra. Dayse Maria Lourenço

**LARISSA BARBOSA LOPES**

**ESTUDO DE ALOANTICORPOS ANTI-HLA E ANTI-NEUTRÓFILOS EM DOADORAS  
DE SANGUE**

**BANCA EXAMINADORA**

1. Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas
2. Prof. Dr. Hélio Moraes de Souza
3. Profa. Dra. Sara Terezinha Olalla Saad

**SUPLENTE**

1. Profa. Dra. Vânia Maris Morelli

## **Dedicatória**

### **A Deus**

*Por Sua presença em minha vida, pela capacidade a mim conferida e por ter me iluminado e inspirado durante todo este trabalho. Meu eterno amor.*

### **Aos meus amados pais, Luiz Antônio e Norma Maria**

*Pelo amor incondicional, pela confiança e exemplo de vida. Meu eterno agradecimento pelo incentivo e apoio, não me permitindo desanimar, pela compreensão, nas escolhas feitas por mim, e pela minha formação humana e intelectual, ensinando-me a buscar uma vida melhor.*

### **Aos meus estimados irmãos, Rodrigo e Alessandra**

*Pela presença, ajuda e carinho. Pela dedicação e determinação em alcançar seus objetivos, mostrando-me que não devo desistir dos meus sonhos. Por terem me amparado nas dificuldades e me proporcionado momentos de partilha e felicidade. Á vocês, minha grande admiração.*

### **Aos meus queridos avós, Zico e Nila, e Tia Célia**

*Pelo amor, torcida e orações. Por terem acreditado em mim e sempre estarem comigo. Minha gratidão pela sabedoria, ensinamentos de vida e carinho dedicados a mim.*

### **Aos meus eternos amigos, Bruna Thompson e Rafael Vieira**

*Pelo companheirismo, partilha e amizade. Por estarem sempre ao meu lado, pela compreensão e espera, quando meu tempo era dedicado apenas ao trabalho, e por todo carinho e força. A vocês, desejo grandes realizações e felicidade.*

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. José Orlando Bordin pela orientação e por todo conhecimento intelectual e de vida transmitido a mim durante este estudo. Por ter confiado em meu potencial e ter me educado na formação científica. Agradeço a sua compreensão, dedicação ao meu trabalho e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Antônio Fabron Junior por ter confiado a mim seus conhecimentos e acreditado em meu trabalho. Agradeço a sua disponibilidade, dedicação em ensinar e as oportunidades dadas a mim.

À Akemi Kuroda Chiba por toda a ajuda oferecida, tanto intelectual, quanto física na realização dos experimentos da minha pesquisa. Agradeço toda a paciência e dedicação a mim.

À Luciana Tojeiro Basso, professora de inglês, por todo ensinamento intelectual e dedicação em minhas dificuldades com a língua inglesa. Agradeço a paciência e a amizade.

Ao Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília e ao Laboratório de Imunologia de Marília por terem me estruturado na realização das metodologias empregadas no mestrado. Agradeço a oportunidade de estar com vocês e ao espaço e equipamentos cedidos.

Ao Hemocentro e Banco de Sangue da Universidade Federal de São Paulo por ter me ajudado na coleta do material estudado e por ter cedido espaço físico e os instrumentos necessários para o desenvolvimento da parte técnica do mestrado. Agradeço ao tempo que me acolheram, a paciência e ao espaço cedido.

Ao Departamento de Imunogenética da Universidade Federal de São Paulo por ter permitido a utilização de equipamentos que possibilitaram a realização dos testes.



## **Agradecimentos a FAPESP**

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pela bolsa conferida ao meu mestrado, processo 06/52745-6, e pelo financiamento ao projeto temático pelo processo 05/55237-9, em que se inclui meu trabalho. Agradeço a ajuda financeira, sem a qual não teria realizado meu mestrado.

## Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Agradecimentos à FAPESP.....	vii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
1 INTRODUÇÃO .....	01
1.1 Objetivos.....	03
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1 Epidemiologia de TRALI.....	05
2.2 Fisiopatologia de TRALI.....	07
2.3 Apresentação Clínica de TRALI.....	10
2.4 Diagnóstico Laboratorial de TRALI.....	12
2.5 Tratamento e Evolução de TRALI.....	13
2.6 Medidas Preventivas de TRALI.....	13
2.7 Justificativa.....	14
3 MÉTODOS .....	15
3.1 Casuística.....	16
3.2 Ensaio Imunoenzimático – ELISA.....	16
3.3 Teste de Aglutinação de Granulócitos – GAT.....	21
3.4 Teste de Imunofluorescência de Granulócitos – GIFT.....	23
3.5 Citometria de Fluxo – LABScreen .....	24
3.6 Estatística.....	26

4 RESULTADOS .....	27
4.1 Resultados do Teste LAT-M.....	28
4.2 Resultados do Teste LAT-1240.....	33
4.3 Resultados do Teste GAT.....	34
4.4 Resultados do Teste GIFT.....	34
4.5 Resultados do Teste LABScreen.....	38
5 DISCUSSÃO .....	39
6 CONCLUSÕES .....	47
7 ANEXOS.....	49
8 REFERÊNCIAS .....	78
Apêndice	
Bibliografia Consultada	

## Lista de Figuras

	pg.
<b>Figura 1.</b> Esquema da fisiopatologia de TRALI.....	09
<b>Figura 2.</b> Radiografia, antes (a) e depois (b) da transfusão de sangue, de um paciente com insuficiência pulmonar aguda associada à TRALI.....	10
<b>Figura 3.</b> Esquema demonstrativo da placa de Terazaki presente no kit LAT-M (One Lambda).....	18
<b>Figura 4.</b> Esquema demonstrativo da placa de Terazaki presente no kit LAT-1240 (One Lambda).....	20
<b>Figura 5.</b> Células fluorescentes de uma amostra positiva – foto da lâmina em microscopia de fluorescência.....	24
<b>Figura 6.</b> Gráfico da relação das doadoras testadas no LAT-M, segundo a presença de anticorpos anti-HLA.....	29
<b>Figura 7.</b> Células fluorescentes da amostra L9 – foto da lâmina em microscopia de fluorescência.....	35
<b>Figura 8.</b> Células fluorescentes da amostra L15 – foto da lâmina em microscopia de fluorescência.....	36
<b>Figura 9.</b> Células fluorescentes da amostra L93 – foto da lâmina em microscopia de fluorescência.....	36
<b>Figura 10.</b> Células fluorescentes da amostra L121 – foto da lâmina em microscopia de fluorescência.....	37

## Lista de Tabelas

	pg.
<b>Tabela 1.</b> Freqüência de aloanticorpos anti-HLA em componentes sangüíneos.....	06
<b>Tabela 2.</b> Critério para diagnóstico clínico de TRALI.....	11
<b>Tabela 3.</b> Relação das doadoras testadas no LAT-M.....	29
<b>Tabela 4.</b> Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpo anti-HLA, segundo idade, obtidos pelo teste LAT-M.	30
<b>Tabela 5.</b> Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (nulíparas e uma gestação), obtidos pelo teste LAT-M.....	30
<b>Tabela 6.</b> Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (nulíparas e duas gestações), obtidos pelo teste LAT-M.....	31
<b>Tabela 7.</b> Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (nulíparas e múltiparas), obtidos pelo teste LAT-M.....	31
<b>Tabela 8.</b> Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (uma e duas gestações), obtidos pelo teste LAT-M.....	31
<b>Tabela 9.</b> Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (uma gestação e múltiparas), obtidos pelo teste LAT-M.....	32
<b>Tabela 10.</b> Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (duas gestações e múltiparas), obtidos pelo teste LAT-M.....	32

<b>Tabela 11.</b>	Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (nulíparas e pelo menos uma gestação), obtidos pelo teste LAT-M.....	32
<b>Tabela 12.</b>	Especificidade dos anticorpos mais freqüentemente encontrados nas doadoras de sangue pelo LAT-1240.....	33
<b>Tabela 13.</b>	Distribuição das doadoras, por presença de anticorpos anti-neutrófilos, segundo o teste GAT.....	34
<b>Tabela 14.</b>	Distribuição das doadoras, por presença de anticorpos anti-neutrófilos, segundo o teste GIFT.....	35
<b>Tabela 15.</b>	Distribuição das doadoras de sangue, negativas para presença de anti-HLA, por número de gestação, segundo a presença de anticorpos anti-neutrófilos, obtidos pelo teste de GAT e GIFT .....	37
<b>Tabela 16.</b>	Especificidade dos anticorpos mais freqüentemente encontrados nas doadoras de sangue pelo LABScreen.....	38
<b>Tabela 17.</b>	Porcentagem de doadoras de sangue positivas e número de gestações em trabalhos da literatura <sup>9, 27-28</sup> .....	42

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

BSA	Albumina Bovina
EDTA	Ácido Etileno Tetra Acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FITC	Fluoriceína
GAT	Teste de Aglutinação de Granulócitos
GIFT	Teste de Imunofluorescência de Granulócitos
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HNA	Antígeno Neutrofílico Humano
H <sub>2</sub> O	Água
ICAM-1	Molécula de Adesão Celular – 1
IgG	Imunoglobulina G
Ic 95%	Intervalo de Confiança de 95%
IPA	Insuficiência Pulmonar Aguda
LAT-M	Lambda Antigen Tray – Mixed
LAT-1240	Lambda Antigen Tray – Class I & II
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de Amônio
OR	Odds Ratio
p	Probabilidade de a diferença observada ser casual
PBMC	Células Mononucleares
PBS	Tampão Salina Fosfato
PE	Ficoeritrina
PMN	Células Polimorfonucleares
rpm	Rotações por minuto
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SARA	Síndrome da Angustia Respiratória Aguda

TRALI            Insuficiência Pulmonar Aguda Associada à Transfusão  
UNIFESP        Universidade Federal de São Paulo  
 $\chi^2_{1gl}$             Qui Quadrado



## Resumo

**Objetivos:** O estudo teve como objetivo determinar a prevalência e a especificidade de anticorpos anti-HLA e a prevalência de anti-neutrófilos em doadoras de sangue brasileiras e avaliar o impacto da exclusão de doadoras multíparas positivas da doação de sangue. **Métodos:** Foram estudadas amostras de soro de 350 doadoras distribuídas em quatro grupos de acordo com o número de gestações que tiveram (50 nulíparas, 100 com uma gestação, 100 com duas gestações, e 100 multíparas). Para a pesquisa de anticorpos foi utilizada a metodologia do ELISA pelos kits LAT-M e LAT-1240 (One Lambda, Inc, EUA) que detectam e identificam anticorpos anti-HLA, classe I e II, respectivamente. Sessenta e cinco doadoras multíparas, com resultados positivos e negativos no ELISA também foram testadas pela metodologia do LABScreen (One Lambda, Inc, EUA) que fornece a especificidade de anticorpos anti-HLA. Além disso, foi utilizado o teste de Aglutinação de Granulócitos (GAT) e Imunofluorescência de Granulócitos (GIFT) para detectar anticorpos anti-neutrófilos específicos. **Resultados:** Oitenta doadoras das 350 mulheres estudadas (22,9%) foram positivas para anticorpos anti-HLA, sendo que 37% eram multíparas, 26% mulheres que tiveram duas gestações e 17% que tiveram uma gestação. Todas as amostras de doadoras nulíparas foram negativas para anti-HLA. A diferença de doadoras positivas em cada grupo foi estatisticamente significativa na prevalência de anti-HLA entre o grupo de nulíparas e de doadoras que tiveram no mínimo uma gestação ( $p < 0,001$ ). Os soros de doadoras positivas pelo teste LAT-M foram também testados pelo LAT-1240, e em sete casos os anticorpos não puderam ser identificados. Dezesete doadoras (28,3%), consideradas negativas pelo LAT-M, apresentaram resultados positivos pelo LABScreen. O GAT foi aplicado para investigação do soro de doadoras negativas para anti-HLA, sendo positivo em duas de 264 doadoras (0,8%). Entre as doadoras com GAT positivo uma entre 62 (1,6%) era multípara e uma doadora entre 71 (1,4%) teve duas gestações. O GIFT também foi aplicado para doadoras negativas para anti-HLA e apresentou positividade em quatro mulheres de 264 (1,5%), sendo que duas entre 62 (3,2%) eram multíparas e duas entre 71 (2,8%) tiveram duas gestações. **Conclusões:** Anticorpos anti-HLA são encontrados freqüentemente em plasma de doadoras de sangue brasileiras (22,9%), e se correlacionam estatisticamente com o maior número de gestações ( $p < 0,001$ ), aumentando a porcentagem de positividade com o aumento do

número de gestações. Apesar de apresentar uma menor frequência (1,9% do total de doadoras nos testes GAT e GIFT), os anticorpos anti-neutrófilos também são encontrados em doadoras, podendo este valor ser maior uma vez que as doadoras positivas para anti-HLA não foram testadas. O impacto da exclusão de doadoras múltiplas da doação de sangue corresponde a 4% do total de doadores. Em conclusão, anticorpos anti-HLA e anti-neutrófilos estão presentes no plasma de doadoras brasileiras e constituem fator de risco para desencadear TRALI em receptores de sangue com antígenos correspondentes.

## Abstract

**Purpose:** The aim of this study were to determine the prevalence and the specificity of anti-HLA, class I and II, antibodies and the prevalence of anti-neutrophil antibodies in Brazilians female blood donors and to assess the impact of excluding the positive multiparous blood donors from the blood donation. **Methods:** Serum samples from 350 Brazilians female blood donors, distributed according to the number of previous pregnancy (50 nuliparous, 100 one pregnancy, 100 two pregnancies, 100 multiparous), has been examined to detect and to identify anti-HLA, class I and II, antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), by LAT-M and LAT-1240 Kits (ONE LAMBDA, INC, EUA). Sixty-five multiparous female blood donors, between positive and negative by LAT-M, were tested by flow cytometry, by LABScreen Kit (ONE LAMBDA, INC, EUA), that provide the specificity of anti-HLA antibodies. Furthermore, the Granulocyte Agglutination (GAT) and Granulocyte Immunofluorescence (GIFT) Test were used to detect specific anti-neutrophil antibodies. **Results:** Anti-HLA antibodies, class I and/or II, have been found in 80 of 350 female blood donors (22.9%), from whom 37% were multiparous donors, 26% woman with two previous pregnancies, and 17% woman with one previous pregnancy. All the nuliparous blood donors were negative to anti-HLA antibodies. The difference among positive female blood donors in pregnancy groups was significant statistically in prevalence between nuliparous group and woman with at least one previous pregnancy ( $p < 0.001$ ). The serum of positive female blood donors by LAT-M test were also tested by LAT-1240 Test and in seven women the anti-HLA antibodies can not be identified. Seventeen female blood donors, that were considered negative by LAT-M, were positive for anti-HLA antibodies by LABScreen. The GAT was applied to investigate the serum of negative female blood donors to anti-HLA. Two women of 264 female blood donors (0.8%) were positive to anti-neutrophil, from whom 1.6% were multiparous (one of 62) and 1.4% were women with two previous pregnancies (one of 71). The GIFT was also applied to negative female blood donors to anti-HLA and the women were positive to anti-neutrophil in four of 264 female blood donors (1.5%), from whom two multiparous of 62 (3.2%) and two of 71 (2.8%) women with two previous pregnancy. **Conclusion:** Anti-HLA antibodies have often been found in plasma of Brazilian female blood donors (22.9%), and are statistically associated with the number of pregnancy ( $p < 0,001$ ). The percentage of positive women increases with

the number of pregnancy. Although the anti-neutrophil antibodies had less prevalence (1.9% of all women tested by GAT and GIFT), they are found in female blood donors. This value can be higher because the positive women to anti-HLA antibodies were not tested. The impact to exclude the positive multiparous blood donors to the blood donate is 4% of all blood donors. In conclusion, anti-HLA and anti-neutrophil antibodies are found in plasma of Brazilian female blood donors and they are considered risk factor to trigger TRALI in blood receptors with cognate antigen.

## **1 INTRODUÇÃO**

---

Insuficiência Pulmonar Aguda Associada à Transfusão (TRALI) foi reconhecida como entidade clínica em 1985 por Popovsky et Moore.<sup>1</sup> Embora não haja consenso definitivo, TRALI é uma séria complicação de hemoterapia caracterizada por insuficiência respiratória aguda, edema pulmonar bilateral e severa hipoxemia, sem comprometimento cardíaco, ocorrendo dentro de 6 horas de completada a transfusão ou durante a mesma.<sup>2-3</sup>

Nos Estados Unidos e Reino Unido, TRALI é considerada a maior causa de morbidade e mortalidade relacionadas à transfusão.<sup>2-4</sup> A exata frequência não é conhecida, no entanto, estima-se que 1 em 5000 transfusões contendo plasma possa desencadear TRALI, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 6% dos afetados.<sup>2</sup>

A fisiopatologia do TRALI é pouco conhecida, mas existem evidências que seja resultado de dois eventos independentes. O primeiro deles relata uma predisposição clínica do paciente, como cirurgia, trauma e infecção severa, que leva à produção de mediadores inflamatórios ativando o endotélio pulmonar, resultando em sequestro de neutrófilos para o pulmão. O segundo evento envolve a infusão de anticorpos específicos direcionados contra antígenos leucocitários humanos (HLA – *Human Leukocyte Antigen*) que estão presentes, em sua maioria, em componentes ricos em plasma provenientes de doadoras múltiplas (mulheres que tiveram três ou mais gestações) desencadeando uma reação imunológica; ou a infusão de lipídeos biologicamente ativos durante a transfusão de produtos sanguíneos estocados, desencadeando uma reação não imunológica. Os neutrófilos são ativados pelos anticorpos e lipídeos infundidos liberando radicais reativos de oxigênio e enzimas tóxicas que lesam as células endoteliais dos capilares pulmonares, seguidos de rompimento capilar e exsudação de fluidos e proteínas para dentro do alvéolo, resultando em edema pulmonar.<sup>2,5</sup>

TRALI representa, então, uma importante síndrome clínica e, embora muito se tenha aprendido, ainda é pouco entendida a sua patogênese, tratamento e prevenção.

## **1.1. Objetivos**

1. Determinar a prevalência e a especificidade de anticorpos contra antígenos HLA classe I e II no sangue de doadoras brasileiras não selecionadas;
2. Determinar a prevalência de anticorpos contra antígenos neutrofílicos no sangue de doadoras brasileiras não selecionadas;
3. Avaliar o impacto da exclusão de doadoras multíparas positivas da doação de sangue.

## ***2 REVISÃO DA LITERATURA***

---

---



Anticorpos contra Antígenos Leucocitários Humano (HLA – *Human Leukocyte Antigen*) e Antígenos Neutrófilicos Humano (HNA – *Human Neutrophil Antigen*) são frequentemente encontrados em mulheres com gestações prévias e indivíduos com histórico transfusional.<sup>6-7</sup> A maior incidência está presente em mulheres múltiparas<sup>8</sup> por causa da associação entre a presença de anticorpos anti-HLA e o número de gestações prévias.<sup>1,9</sup>

A associação entre anticorpos e número de gestações deve-se ao transporte materno-fetal, através da placenta, que permite a sensibilização da mãe pelos antígenos paternos presentes no feto, principalmente antígenos HLA, cuja frequência em gestações tem variado de 7% a 39%.<sup>10</sup>

As mulheres sensibilizadas, que vierem a doar sangue, podem transmitir os anticorpos contra antígenos HLA e HNA passivamente durante a transfusão sangüínea.<sup>5</sup> Esses anticorpos nos receptores podem causar efeitos imunológicos adversos, entre eles a Insuficiência Pulmonar Aguda Associada à Transfusão (TRALI – *Transfusion-related Acute Lung Injury*).<sup>6</sup>

Insuficiência Pulmonar Aguda Associada à Transfusão (TRALI) foi reconhecida como entidade clínica em 1985 por Popovsky et Moore.<sup>1</sup> Embora não haja consenso definitivo, TRALI é uma séria complicação de hemoterapia caracterizada por insuficiência respiratória aguda, edema pulmonar bilateral e severa hipoxemia, sem comprometimento cardíaco, ocorrendo dentro de 6 horas de completada a transfusão ou durante a mesma.<sup>2-3</sup>

## 2.1 Epidemiologia de TRALI

Nos Estados Unidos e Reino Unido, TRALI está entre as causas mais comuns de reações transfusionais, sendo considerada a maior causa de morbidade e mortalidade relacionadas à transfusão.<sup>2-4</sup> A exata incidência de TRALI não é conhecida e é provável que seja pouco diagnosticada.<sup>2</sup> Estima-se entre 0,014% e 0,08% por unidades de produtos sangüíneos alogênicos transfundidos ou entre 0,04% e 0,16% por paciente transfundido.<sup>3,11</sup> TRALI é uma complicação relativamente rara, ocorrendo em uma razão de 1 em 5000 unidades transfundidas e 1 de 625 pacientes transfundidos, com uma taxa de mortalidade estimada entre 5% a 10% dos casos.<sup>2,11</sup>

Entretanto, TRALI é uma reação pouco reportada e mal diagnosticada, podendo ser confundida com outros casos de insuficiência respiratória aguda, como a síndrome da angustia respiratória aguda (SARA) e sobrecarga respiratória associada à transfusão. Portanto, sua prevalência pode ser maior do que a estimada.<sup>2,11</sup>

A distribuição do TRALI entre os grupos de idade e sexo é uniforme e os fatores de risco que contribuem para desencadear a reação permanecem controversos. Contudo, determinadas condições clínicas graves, no momento da transfusão, podem ser favoráveis à síndrome, entre elas malignidades hematológicas e pacientes submetidos a cirurgias cardíacas.<sup>11</sup>

Os produtos implicados em casos de TRALI são hemocomponentes que contêm plasma, mas a maioria dos casos envolve o uso de sangue total, plasma fresco congelado, concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas e granulócitos coletados por aférese.<sup>12</sup> O plasma fresco congelado é o produto mais frequentemente envolvido nas reações, entretanto a severidade do TRALI não está relacionada com o hemocomponente transfundido.<sup>11</sup> O tempo de estoque do componente sanguíneo também está envolvido com a ocorrência da reação.<sup>13</sup>

Segundo Bray e colaboradores, em estudo sobre a freqüência de anticorpos anti-HLA, classe I e/ou II, o produto com maior porcentagem de anticorpos é o plasma fresco congelado, seguido pelo concentrado de hemácias, crioprecipitado e concentrado de plaquetas, como pode ser observado na tabela 1.<sup>14</sup>

Tabela 1 – Freqüência de aloanticorpos anti-HLA em componentes sanguíneos

Componente (n)	Classe I n (%)	Classe II n (%)	Classe I e II n (%)	Total n (%)
Concentrado de Hemácias (106)	7 (6,6)	8 (7,5)	3 (2,8)	18 (16,9)
Crioprecipitado (66)	3 (4,5)	3 (4,5)	10 (15,1)	16 (24,2)
Plasma Fresco Congelado (77)	9 (11,6)	4 (5,2)	9 (11,6)	22 (28,5)
Plaquetas (59)	7 (12)	5 (9)	1 (2)	13 (22)
Total (249)	19 (7,6)	15 (6,0)	22 (8,9)	56 (22,5)

Fonte: Modificado de Bray e colaboradores<sup>(14)</sup>

## 2.2. Fisiopatologia de TRALI

A exata etiologia de TRALI não é conhecida, mas existem crescentes evidências que esta reação pode ser desencadeada por dois mecanismos distintos. A teoria tradicional propõe uma reação mediada imunologicamente através da ligação de anticorpos provenientes do doador contra antígenos leucocitários do receptor. Um mecanismo alternativo tem sido sugerido, implicando moléculas inflamatórias, predominantemente produtos lipídicos da degradação celular acumulados durante a estocagem de produtos celulares sangüíneos, desencadeando uma reação não imunológica.<sup>15</sup>

Na reação TRALI mediada imunologicamente, anticorpos provenientes do doador são infundidos passivamente durante a transfusão sangüínea.<sup>5</sup> Esses anticorpos são direcionados contra antígenos HNA e antígenos HLA<sup>2</sup> e estão presentes, em sua maioria, em componentes ricos em plasma provenientes de doadoras múltiparas (mulheres que tiveram três ou mais gestações) que são freqüentemente imunizadas contra antígenos leucocitários durante a gravidez.<sup>3</sup> Em aproximadamente 6% dos casos de TRALI imunológico, os anticorpos são provenientes do receptor.<sup>2</sup>

Uma vez presentes no receptor de hemocomponentes, os aloanticorpos (anti-HLA e anti-neutrófilos) ativam a cascata do complemento resultando em ativação e sequestro de células polimorfonucleares (PMN) para a microcirculação pulmonar.<sup>5,11,16</sup> Os anticorpos anti-leucocitários podem induzir também uma resposta direta dos neutrófilos, mostrando que a ativação do complemento não é um pré-requisito obrigatório para indução de TRALI.<sup>4</sup>

Os neutrófilos ativados, presentes na microcirculação pulmonar, geram uma resposta oxidativa e citotóxica através da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) e citocinas que causam dano celular endotelial e aumento da permeabilidade vascular. Desta maneira, ocorre profundo vazamento capilar de fluidos dentro dos alvéolos, resultando em edema e insuficiência pulmonar.<sup>4-5,11-12,16</sup>

Em 11% a 39% dos incidentes de TRALI, nenhum anticorpo contra antígenos leucocitários está presente nem no doador, nem no receptor, sugerindo um mecanismo não imunológico que possa desencadear tal reação. Neste mecanismo, a reação é

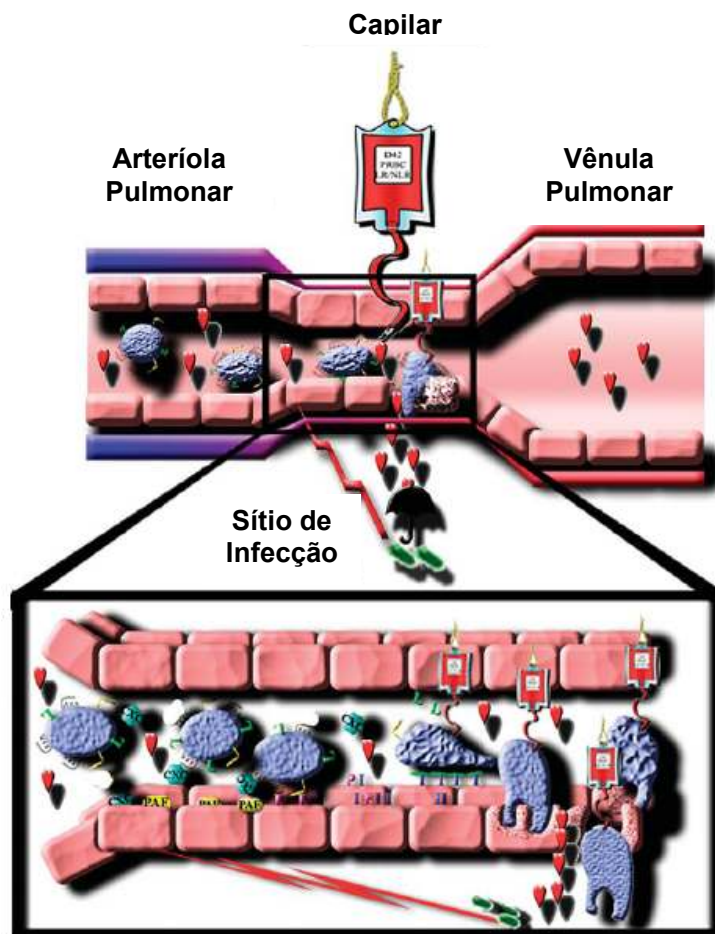
desencadeada pela infusão de lipídeos biologicamente ativos durante a transfusão de produtos sanguíneos estocados, geralmente em pacientes com complicações clínicas como doenças hematológicas e cardíacas.<sup>2</sup> Esses lipídeos são capazes de ativar granulócitos, desencadeando um processo oxidativo e lesão tecidual, resultando em edema e insuficiência pulmonar.<sup>12</sup>

Recente hipótese tem sugerido que TRALI seja causado por dois eventos independentes. O primeiro deles relata uma predisposição clínica do paciente, como trauma, recentes cirurgias, câncer, infecção severa ou inflamação, que resultam em produção de mediadores inflamatórios capazes de ativar o endotélio pulmonar, seqüestrando neutrófilos para o pulmão, através da ligação de moléculas de adesão entre neutrófilos e epitélio pulmonar.<sup>17</sup>

O segundo evento envolve a infusão de anticorpos específicos para antígenos de neutrófilos aderidos ao epitélio pulmonar ou à infusão de modificadores da resposta biológica, incluindo compostos lipofílicos, que também são capazes de ativar os neutrófilos aderidos.<sup>5,17</sup> Uma vez ativados, os neutrófilos liberam radicais reativos de oxigênio e enzimas tóxicas que lesam as células endoteliais dos capilares pulmonares, seguidos de rompimento capilar e exsudação de fluidos e proteínas para dentro do alvéolo, resultando em edema pulmonar.<sup>2</sup>

A figura 1 mostra um esquema do modelo de dois eventos de TRALI. Na primeira etapa, o sequestro dos neutrófilos ocorre através das moléculas de adesão L-selectina, responsável por diminuir a velocidade do neutrófilo no capilar pulmonar, P-selectina e E-selectina, responsáveis por aderir às células no endotélio. As moléculas de selectina são responsáveis pelo processo de rolamento dos neutrófilos, pois permitem que eles diminuam sua velocidade dentro do capilar pulmonar ficando mais próximos da parede dos vasos. Os neutrófilos tornam-se firmemente aderidos pela interação entre sua molécula  $\beta 2$ -integrina e a Molécula de Adesão Celular – 1 (ICAM-1), presente no endotélio. Ligados ao endotélio pulmonar, os neutrófilos estão sob ação de citocinas inflamatórias capazes de ativá-los.<sup>17</sup>

Os anticorpos anti-HLA e anti-neutrófilos específicos, oriundos da transfusão sanguínea, são capazes de ativarem os neutrófilos que, uma vez hiper-reativos, liberam um arsenal microbicida com substâncias citotóxicas, oxidativas e não-oxidativas, danificando o endotélio com conseqüente extravasamento de líquidos e TRALI.<sup>17</sup>



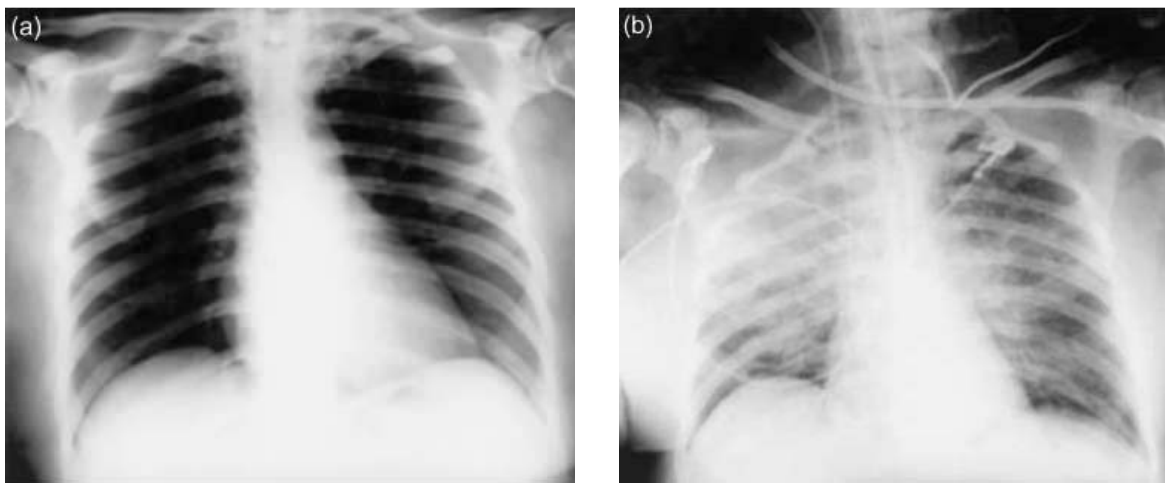
Fonte: Modificado de Silliman et al<sup>(17)</sup>

Figura 1 – Esquema da fisiopatologia de TRALI

Modelos animais têm sido propostos para estudar os mecanismos fisiopatológicos do TRALI. Através de um modelo pulmonar *ex vivo* de rato, Sachs e colaboradores<sup>4</sup> demonstraram que TRALI induzido por anticorpos anti-leucocitários é dependente da densidade de antígenos específicos, mas não necessariamente requer propriedades leucoaglutinantes dos anticorpos ou a presença de proteínas do complemento. Desta maneira, resposta celular direta mediada por anticorpo contribui para a patogênese de TRALI imunológico. Da mesma forma, a aplicação de lipopolissacarídeos de plasma ou lipídeos de sangue estocado em modelo pulmonar de rato leva à indução de TRALI mediado não imunologicamente. A ativação neutrofílica, então, leva à produção de espécies reativas de oxigênio, sugerindo ser um importante mecanismo patológico de TRALI e um processo central no dano endotelial e vazamento capilar.<sup>4</sup>

### 2.3 Apresentação Clínica de TRALI

TRALI é considerado um conjunto de sintomas clínicos que geralmente se desenvolvem durante ou dentro de 6 horas após a transfusão.<sup>2</sup> Caracteriza-se por manifestação de febre (com aumento na temperatura de  $> 1^{\circ}\text{C}$ ), taquipnéia, cianose, dispnéia<sup>2,12,18</sup>, hipoxemia aguda com  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 300$  mmHg e desaturação de oxigênio.<sup>5,18</sup> Nas primeiras horas, edema pulmonar bilateral pode ser observado em exames radiológicos do tórax, com progressão de infiltrado alveolar e intersticial<sup>2,12</sup> e sem comprometimento cardiogênico<sup>19</sup> (figura 2<sup>2</sup>). Em muitos pacientes, a reação pode ser resolvida dentro de 48 horas, com exames radiológicos normais em quatro dias, entretanto a hipoxemia e o infiltrado pulmonar persistem acima de sete dias na maioria dos pacientes.<sup>2,12</sup>



Fonte: Blackwell Publishing Ltd. Bux et al<sup>(2)</sup>

Figura 2 – Radiografia, antes (a) e depois (b) da transfusão de sangue, de um paciente com insuficiência pulmonar aguda associada à TRALI

TRALI pode ser confundido com outras reações de insuficiência respiratória aguda, como ocorre com a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) que é induzida por outras causas além da transfusão.<sup>2</sup> Autópsia pulmonar tem demonstrado extensa infiltração leucocitária com edema pulmonar intraalveolar e intersticial consistente com SARA. Em adição, estudos epidemiológicos sobre SARA têm demonstrado que a transfusão é a causa mais comum para a sua gênese, possibilitando um número desses pacientes apresentar casos severos de TRALI.<sup>5</sup>

Segundo a última Conferência de Consenso sobre TRALI<sup>20</sup> o diagnóstico é feito em pacientes com ocorrência de angústia respiratória aguda durante ou dentro de 6 horas da transfusão sangüínea, sem sinal de sobrecarga circulatória, com evidência de edema pulmonar bilateral e ausência de fatores de risco adicionais para a insuficiência pulmonar aguda. Os critérios para diagnóstico clínico de TRALI estão resumidos na tabela 2.<sup>2</sup> O diagnóstico diferencial de pacientes com insuficiência pulmonar aguda, não relacionada à TRALI, inclui sobrecarga circulatória associada à transfusão, edema cardiogênico, reações transfusionais alérgicas e anafiláticas e transfusão de componentes sangüíneos contaminados por bactérias.<sup>2</sup>

Tabela 2 – Critério para diagnóstico clínico de TRALI

Definição de TRALI pelo Centro de Hemovigilância Europeu

- Angústia respiratória aguda;
- Infiltração pulmonar bilateral em radiografia;
- Ocorrência durante ou dentro de 6 horas depois de completada a transfusão;
- Nenhuma evidência de sobrecarga circulatória associada à transfusão.

Critérios para diagnóstico de TRALI segundo Conferência de Consenso sobre TRALI (*Cosensus Conference Committee*) em Toronto, Canadá, 2004

- Hipoxemia ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$  ou saturação de  $\text{O}_2 < 90\%$  ou outras evidências clínicas);
- Nova insuficiência pulmonar aguda (IPA) e nenhum outro fator de risco para IPA presente, incluindo aspiração, trauma múltiplo, pneumonia, *bypass* cardiopulmonar, queimaduras, inalação tóxica, contusão pulmonar, pancreatite aguda, overdose por droga, afogamento, choque e sepse;
- Se um ou mais fatores de risco para IPA estão presentes, possível TRALI deveria ser diagnosticado.

Fonte: Modificado de Bux<sup>(2)</sup>

Apesar de a hipotensão ter sido relatada em muitos pacientes em estudos clínicos de TRALI, não é um descobrimento consistente<sup>5</sup> e geralmente não é responsiva à infusão de fluidos endovenosos. Embora a maioria dos casos de TRALI relatada na literatura se refere à forma clássica e tida como severa, na realidade TRALI representa uma variação de severidade clínica e casos mais leves têm sido relatados<sup>19</sup>, podendo também ocorrer formas atípicas de TRALI com o aparecimento dos sintomas tardios, após 48 horas da transfusão.<sup>2</sup>

## 2.4 Diagnóstico Laboratorial de TRALI

Não existe um teste rápido ou conclusivo para o diagnóstico laboratorial de TRALI<sup>11</sup>, apenas um diagnóstico clínico que é sustentado por evidências laboratoriais.<sup>16</sup> As investigações laboratoriais permitem um diagnóstico de TRALI mediado imunologicamente através da detecção de anticorpos.

Os testes podem ser feitos através da reação entre anticorpos do doador com antígenos do receptor. Caso ocorra ligação entre antígeno-anticorpo, confirma-se a suspeita de TRALI. Se o resultado for negativo, reação TRALI não imunológica pode apenas ser presumida em um contexto clínico apropriado.<sup>2</sup> Portanto, se houver concordância entre os anticorpos detectados com os antígenos de linfócitos e granulócitos, o diagnóstico de TRALI será claramente estabelecido. Entretanto, sem concordância, a presença de cada aloanticorpo é considerada ser forte evidência de TRALI.<sup>11</sup>

O diagnóstico laboratorial de TRALI deveria ser realizado se o receptor de componentes sangüíneos apresentar os sintomas apropriados dentro de 6 horas da transfusão, juntamente com a exclusão de outras causas de edema pulmonar<sup>11</sup>, ou se os doadores estiverem previamente implicados em casos de TRALI.<sup>16</sup> As informações a respeito do doador podem auxiliar na identificação de TRALI uma vez que doadoras múltiplas e receptores de transfusões anteriores são considerados alto risco para o desenvolvimento de anticorpos contra antígenos de granulócitos e linfócitos.<sup>16</sup>

A análise de todos os componentes sangüíneos alogênicos implicados em TRALI<sup>11</sup>, principalmente amostras de plasma fresco congelado e concentrado de plaquetas, podem ser testados por métodos imunoenzimáticos, citometria de fluxo ou imunofluorescência de linfócito, preferidos porque permitem também a detecção de anticorpos anti-HLA não citotóxicos.<sup>2</sup> Entretanto, a identificação de todos os anticorpos anti-HLA é difícil, resultando somente na identificação de alguns casos de TRALI mediado imunologicamente, sendo que muitos outros casos não serão diagnosticados.<sup>11</sup>

Os métodos diagnósticos acima descritos não são capazes de identificar TRALI mediado não imunologicamente ou causado por anticorpos presentes no receptor.<sup>16</sup> Como as reações TRALI causadas por anticorpos anti-leucocitários no receptor tem



sido descritas em transfusões de granulócitos incompatíveis, a presença de anticorpos no receptor deveria ser excluída antes da transfusão.<sup>2</sup>

## 2.5 Tratamento e Evolução de TRALI

Não existe um tratamento específico para TRALI, sendo primariamente suportivo. Recentemente a escolha de tratamento para TRALI foi discutida em Fórum Internacional.<sup>21</sup> Houve concordância na manutenção do equilíbrio hemodinâmico do paciente e na necessidade de aplicação de suporte ventilatório o mais precocemente possível.<sup>11,21</sup> Suporte de oxigênio suplementar é fornecido para pacientes com casos amenos de TRALI, enquanto que, para casos mais severos de TRALI, mais de 70% dos pacientes, é necessário intubação orotraqueal com ventilação mecânica.<sup>2,11</sup>

O tratamento da hipotensão pode ser realizado com o uso de medicamentos vasopressores. O uso de diuréticos permanece controverso e como alguns pacientes beneficiam-se com a administração de fluidos estes medicamentos não deveriam ser usados, pois podem ser prejudiciais.<sup>2,11</sup> O uso de corticosteróides, antiinflamatórios não esteroidais, surfactante, entre outros, não apresentam efeito estabelecido no tratamento do TRALI, assim como ocorre em insuficiência pulmonar aguda e SARA.<sup>5,11</sup>

TRALI tem um bom prognóstico, apesar de a mortalidade estar estimada em 5% a 10% dos casos.<sup>11-12,16</sup> Muitos pacientes melhoram clinicamente dentro de 48 a 96 horas do início da reação.<sup>11,16</sup> Em 80% dos pacientes há resolução do infiltrado pulmonar entre 1 a 4 dias<sup>11</sup>, entretanto hipoxemia e infiltrado pulmonar podem persistir acima de 7 dias na minoria dos pacientes.<sup>12</sup> A resolução de TRALI freqüentemente ocorre de maneira rápida, não existindo seqüelas em longo período.<sup>11-12</sup>

## 2.6 Medidas Preventivas de TRALI

Não há recomendações claras para a prevenção de novos casos de TRALI, principalmente pelo fato de a fisiopatologia e a etiologia não estarem totalmente elucidadas e, também, por não existir um teste diagnóstico.<sup>2</sup>

A Associação Americana de Bancos de Sangue (*American Association of Blood Banks*) defende a desqualificação temporária dos doadores implicados em reações TRALI até que testes para a detecção de anticorpos contra antígenos de alta

freqüência sejam realizados.<sup>5</sup> Há propostas de exclusão das doadoras múltiparas da doação de sangue, já que os componentes sangüíneos oriundos dessas mulheres são os mais fortemente implicados em casos de TRALI.<sup>2</sup> Entretanto, essas não seriam medidas razoáveis por apresentarem altos custos e diminuir substancialmente o número de doadores, respectivamente.<sup>2-3,5,11,22</sup>

Outras medidas têm sido sugeridas para a prevenção de reações TRALI, como: lavagem de componentes celulares para remoção de anticorpos, lipídeos e outros modificadores da resposta biológica da fração de plasma; o uso de produtos frescos, para reduzir o efeito dos lipídeos em pacientes de alto risco;<sup>5</sup> redução leucocitária antes da estocagem de produtos sangüíneos; testes de anticorpos contra antígenos HLA de mulheres múltiparas;<sup>22</sup> e o uso de concentrado de hemácias antes de 14 dias e concentrados de plaquetas antes de 2 dias, para evitarem o efeito dos componentes que são acumulados durante a estocagem.<sup>5</sup>

## **2.7 Justificativa**

Em virtude da morbidade e mortalidade, TRALI tem se tornado uma das mais sérias complicações de transfusões nos dias de hoje.<sup>2</sup> Como a fisiopatologia e a etiologia de TRALI ainda não estão totalmente elucidadas e por não existir um teste diagnóstico rápido, não há recomendações claras para a prevenção de novos casos de TRALI. E, embora nosso conhecimento sobre a apresentação clínica e fisiopatologia ter significativamente aperfeiçoado, muitas questões ainda estão sem respostas.<sup>2</sup>

Por isso, existe uma necessidade de pesquisas básicas e clínicas para aprimorar nosso entendimento, diagnóstico e tratamento de TRALI. Com isto, melhores estratégias podem ser designadas e implementadas para assegurar aos pacientes que receberão transfusões menor risco para o desenvolvimento desta complicação potencialmente fatal.<sup>13</sup>

Diante disso, julgamos adequado avaliar a prevalência de anticorpos contra antígenos HLA e neutrofílicos e determinar a especificidade dos anticorpos anti-HLA no sangue de doadoras brasileiras.



### 3.1 Casuística

Participaram da pesquisa 350 doadoras de sangue que compareceram ao Hemocentro da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), no período de setembro de 2004 a dezembro de 2006. As mulheres foram distribuídas em quatro grupos de acordo com o número de gestações que tiveram (50 nulíparas – mulheres que não engravidaram; 100 doadoras com uma gestação; 100 com duas gestações; e 100 multíparas – mulheres que tiveram três ou mais gestações).

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

A obtenção do material foi por mesma via de acesso da doação em tubo de 10 mL para coleta de soro (Tubo vacutainer para coleta de sangue, estéril, sem adição de anticoagulante) e em tubo de 5 mL com anticoagulante EDTA – ácido etileno diamino tetra acético (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*) (Tubo vacutainer para coleta de sangue, estéril, contendo EDTA, tubo 13x75mm). O tubo para coleta de soro foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos, o soro obtido foi aliqotado (Microtubos de 2,0 mL, polipropileno, com tampa tipo "snap", cor natural, livres de DNase, RNase e Pirogênios) e congelado a  $-30^{\circ}\text{C}$ . O sangue total também foi aliqotado em tubos de 2 mL e congelado a  $-30^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2 Ensaio Imunoenzimático – ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

#### 3.2.1 Lambda Antigen Tray – Mixed (LAT-M 20x5) (One Lambda, Inc, EUA)

O Teste LAT-M detecta a presença de anticorpos contra antígenos leucocitários humano HLA e os diferencia em classe I ou II. O kit possui cinco placas de Terazaki com capacidade para 100 testes em duplicata (20 testes por placa). Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante e aplicados para as amostras de soro das 350 doadoras incluídas na pesquisa.

### 3.2.1.1 Preparação dos Reagentes

O kit possui um soro controle que deve ser liofilizado com 0,1 mL de água deionizada (junto ao kit) 20 minutos antes de iniciar o teste. Conservar o soro controle liofilizado a temperatura ambiente e agitar o frasco ocasionalmente até solubilizar completamente o anticorpo. Em seguida diluir 8  $\mu$ L do soro controle liofilizado com 72  $\mu$ L do diluente do anticorpo (junto ao kit) e as amostras a serem testadas com diluente do anticorpo em igual quantidade, 25  $\mu$ L de cada amostra com 25  $\mu$ L do diluente. Os volumes descritos acima são utilizados para uma placa.

Para as lavagens de cada placa, diluir 5 mL do tampão Wash Buffer 10X (junto ao kit) com 45 mL de água deionizada (Água bidestilada para injeção).

Após a primeira lavagem, diluir 10  $\mu$ L do anticorpo secundário (AP-conjugated anti-human IgG, 100X – junto ao kit) com 990  $\mu$ L do diluente do anticorpo, por placa.

A solução enzimática deve ser preparada após a segunda lavagem misturando 500  $\mu$ L do Substrato A e 500  $\mu$ L do Substrato B (junto ao kit), por placa.

### 3.2.1.2 Procedimento do Teste

Adicionar 10  $\mu$ L das amostras diluídas (soro controle e soros testes) em cada cavidade de acordo com o esquema apresentado na figura 3. Vedar a placa e incubar por 1 hora a temperatura ambiente. Após a primeira incubação, remover o conteúdo das cavidades invertendo a placa sobre papel absorvente.

A primeira lavagem deve ser realizada com 20  $\mu$ L de solução Wash Buffer diluído 1X em cada cavidade. Remover o tampão e bater a placa em papel absorvente. Na segunda lavagem pode inverter o tampão sobre a placa, homogeneizar e remover o diluente, batendo a placa em papel absorvente.

Dispensar 10  $\mu$ L do anticorpo secundário diluído 1X em cada cavidade. Vedar a placa e incubar por 40 minutos a temperatura ambiente. Remover o conteúdo vertendo a placa e lavar duas vezes adicionando o tampão. Homogeneizar e remover o diluente. Bater a placa em papel absorvente e aguardar até completa secagem.

Dispensar em cada cavidade 10  $\mu$ L do Substrato de Enzima (Solução A e B) preparado previamente. Vedar a placa e incubar por 12 minutos a 37°C, protegido de

luz. Em seguida, dispensar 5 µL da Solução STOP (junto ao kit) em cada cavidade e ler em aparelho de ELISA (Leitora ELx800 NB, BIO TEK Instruments, Inc).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Diluyente do anticorpo (controle-)	Diluyente do anticorpo (controle-)	Soro controle	Soro controle	Soro controle	Soro controle	Soro controle	Soro controle
2			Diluyente do anticorpo (controle+)	Diluyente do anticorpo (controle+)	Diluyente do anticorpo (controle+)			
3	Soro teste 1	Soro teste 1	Soro teste 1	Soro teste 1	Soro teste 11	Soro teste 11	Soro teste 11	Soro teste 11
4	Soro teste 2	Soro teste 2	Soro teste 2	Soro teste 2	Soro teste 12	Soro teste 12	Soro teste 12	Soro teste 12
5	Soro teste 3	Soro teste 3	Soro teste 3	Soro teste 3	Soro teste 13	Soro teste 13	Soro teste 13	Soro teste 13
6	Soro teste 4	Soro teste 4	Soro teste 4	Soro teste 4	Soro teste 14	Soro teste 14	Soro teste 14	Soro teste 14
7	Soro teste 5	Soro teste 5	Soro teste 5	Soro teste 5	Soro teste 15	Soro teste 15	Soro teste 15	Soro teste 15
8	Soro teste 6	Soro teste 6	Soro teste 6	Soro teste 6	Soro teste 16	Soro teste 16	Soro teste 16	Soro teste 16
9	Soro teste 7	Soro teste 7	Soro teste 7	Soro teste 7	Soro teste 17	Soro teste 17	Soro teste 17	Soro teste 17
10	Soro teste 8	Soro teste 8	Soro teste 8	Soro teste 8	Soro teste 18	Soro teste 18	Soro teste 18	Soro teste 18
11	Soro teste 9	Soro teste 9	Soro teste 9	Soro teste 9	Soro teste 19	Soro teste 19	Soro teste 19	Soro teste 19
12	Soro teste 10	Soro teste 10	Soro teste 10	Soro teste 10	Soro teste 20	Soro teste 20	Soro teste 20	Soro teste 20

\*As duas primeiras colunas de cada amostra (A, B, E e F de 3 a 12) identificam anticorpos anti-HLA classe I e as duas segundas fileiras (C, D, G e H de 3 a 12) anticorpos anti-HLA classe II.

Figura 3 – Esquema demonstrativo da placa de Terazaki presente no kit LAT-M (One Lambda)

### **3.2.2 Lambda Antigen Tray – Class I & II (LAT 1240) (One Lambda, Inc, EUA)**

O Teste LAT-1240 fornece a especificidade de anticorpos contra antígenos HLA de classe I e II. O kit possui 20 placas de Terazaki com capacidade para 40 testes (dois testes por placa); cada cavidade possui antígenos diferentes de HLA classe I e II (anexo 4). Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante e aplicados para as amostras de soro de 80 doadoras que apresentaram resultados positivos no LAT-M.

#### **3.2.2.1 Preparação dos Reagentes**

O kit possui um soro controle que deve ser liofilizado com 0,2 mL de água deionizada (junto ao kit) 20 minutos antes de iniciar o teste. Conservar o soro controle liofilizado a temperatura ambiente e agitar o frasco ocasionalmente até solubilizar completamente o anticorpo. Em seguida diluir 8 µL do soro controle liofilizado com 72 µL do diluente do anticorpo (junto ao kit) e as amostras a serem testadas com diluente do anticorpo em proporção de 1:3 (soro teste : diluente do anticorpo). Os volumes descritos acima são utilizados para uma placa.

Para as lavagens de cada placa, diluir 5 mL do tampão Wash Buffer 10X (junto ao kit) com 45 mL de água deionizada.

Após a primeira lavagem, diluir 10 µL do anticorpo secundário (AP-conjugated anti-human IgG, 100X – junto ao kit) com 990 µL do diluente do anticorpo, por placa.

A solução enzimática deve ser preparada após a segunda lavagem misturando 500 µL do Substrato A e 500 µL do Substrato B (junto ao kit), por placa.

#### **3.2.2.2 Procedimento do Teste**

Adicionar 10 µL das amostras diluídas (soro controle e soro testes) em cada cavidade de acordo com o esquema apresentado na figura 4. Vedar a placa e incubar por 1 hora a temperatura ambiente. Após a primeira incubação, remover o conteúdo das cavidades invertendo a placa sobre o papel absorvente.

A primeira lavagem deve ser realizada com 20 µL de solução Wash Buffer diluído 1X em cada cavidade. Remover o tampão e bater a placa em papel absorvente. Na segunda lavagem pode verter o tampão sobre a placa, homogeneizar e remover o diluente, batendo a placa em papel absorvente.

Dispensar 10 µL do anticorpo secundário diluído 1X em cada cavidade. Vedar a placa e incubar por 40 minutos a temperatura ambiente. Remover o conteúdo da placa por inversão e lavar duas vezes adicionando o tampão. Homogeneizar e remover o diluente. Bater a placa em papel absorvente e aguardar até completa secagem.

Dispensar em cada cavidade 10 µL do Substrato de Enzima (Solução A e B) preparado previamente. Vedar a placa e incubar por 12 minutos a 37°C, protegido de luz. Em seguida, dispensar 5 µL da Solução STOP (junto ao kit) em cada cavidade e ler em aparelho de ELISA (Leitora ELx800 NB, BIO TEK Instruments, Inc).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Diluyente do anticorpo (controle+)	Diluyente do anticorpo (controle+)	Soro controle	Soro controle	Soro controle	Soro controle	Soro controle	Soro controle
2								
3		Classe I (1)						
4								
5					Classe II (1)			
6								
7								
8		Classe I (2)						
9								
10					Classe II (2)			
11								
12	Diluyente do anticorpo (controle+)	Diluyente do anticorpo (controle+)					Diluyente do anticorpo (controle-)	Diluyente do anticorpo (controle-)

\*Cada cavidade possui diferentes antígenos para os diferentes anticorpos anti-HLA de classe I e II, totalizando 28 antígenos de classe I e 12 antígenos de classe II.

Figura 4 – Esquema demonstrativo da placa de Terazaki presente no kit LAT-1240 (One Lambda)



### **3.3 Teste de Aglutinação de Granulócitos – GAT**

#### **3.3.1 Soluções**

##### **3.3.1.1 Polymorphoprep (AXIS-SHIELD PoC AS)**

Utilizada para a separação de células polimorfonucleares (PMN) do sangue total.

Durante o procedimento utilizam-se também as seguintes soluções:

- Solução 1: 0,85% de NaCl em 10 mM de HEPES-NaOH pH 7,4.
- Solução 2: 0,83% de NH<sub>4</sub>Cl em 10 mM de HEPES-NaOH pH 7,4.

##### **3.3.1.2 PBS-BSA 0,2%**

A solução é preparada com 5 mL de tampão salina fosfato - PBS (*Phosphate buffered saline*) concentrado 10x, 1 mL de albumina bovina - BSA (*Bovine serum albumin*, SIGMA - ref.: A-9418) concentrado 10x e Água Destilada (Água bidestilada para injeção) em volume suficiente para completar 50 mL de solução.

##### **3.3.1.3 Solução de Lise**

Esta solução de lise comercial (FACS Lysing solution, BD - Ref. 349202) é concentrada 10X e precisa ser diluída para 1X na proporção de 1 mL da solução de lise para 9 mL de Água Destilada para 100 µL de células (aproximadamente 5 mL de sangue total).

#### **3.3.2 Suspensão de Granulócitos**

Para a suspensão de granulócitos, foram coletados 5 mL de sangue, em tubo com EDTA, de indivíduo saudável de grupo sanguíneo O fator Rh<sup>+</sup>, previamente fenotipado para o sistema de antígenos neutrofílicos humano - HNA e positivo para os antígenos HNA-1a, HNA-1b, HNA-2a, HNA-3a e HNA-4a.

A separação dos granulócitos foi realizada em um tubo cônico de 15 mL (Tubos de centrífuga, poliestileno, cônico, graduado, com tampa rosqueada, estéril, capacidade 15mL) com 5 mL da solução de polymorphoprep. Acrescentar o sangue total coletado, cuidadosamente, para não misturar com a solução.

Em seguida, centrifugar a 2.000 rpm (rotação por minuto) por 35 minutos a 20°C, sem breque. Formam-se 2 nuvens após a centrifugação. A primeira nuvem é de células PBMC (Linfócitos, monócitos e células NK). A segunda nuvem é de PMN (Granulócitos e neutrófilos). As nuvens devem ser retiradas com auxílio de uma pipeta.

Como as células de interesse são os PMN, a segunda nuvem deve ser colocada em um tubo cônico de 15 mL contendo 5 mL da solução 1 e 5 mL de água destilada (a primeira lavagem é com a solução 1 diluída na proporção de 1:1). Homogeneizar e centrifugar a 2.000 rpm por 10 minutos a 20°C. Descartar o sobrenadante por inversão.

Após a primeira lavagem, acrescentar 5 mL da solução 1 (não diluída) e homogeneizar. Centrifugar a 2.000 rpm por 10 minutos a 20°C e descartar o sobrenadante por inversão.

Em seguida, acrescentar 3 mL da solução 2 e incubar por 7 minutos a 37°C. Após incubação, acrescentar 10 mL de PBS-BSA 0,2% e homogeneizar. Centrifugar a 2.000 rpm por 10 minutos a 20°C. Descartar o sobrenadante por inversão.

As hemácias que ainda permanecerem na solução devem ser lisadas com 10 mL da solução de lise pronta para uso, durante 5 minutos, agitando levemente. Em seguida, centrifugar a 1.800 rpm por 10 minutos e descartar o sobrenadante por inversão.

Lavar a suspensão celular duas vezes com 3 mL de PBS-BSA 0,2%, centrifugando a 1.800 rpm por 5 minutos. Descartar o sobrenadante por inversão, ressuspender em 1 mL de PBS-BSA 0,2% e fazer a contagem celular em aparelho para contagem de células sangüíneas (Coulter).

### **3.3.3 Aglutinação**

As amostras testadas nesta metodologia foram aquelas que apresentaram resultados negativos para a presença de anticorpos anti-HLA nos respectivos soros. Foram realizados dois experimentos por amostra.

Para a aglutinação, ajustar a concentração da suspensão de granulócitos para 5.000 células/ $\mu\text{L}$ .

Em uma placa de Terazaki (Placa de Terazaki branca, com 72 cavidades, poliestileno, com tampa, One Lambda) dispensar 3  $\mu\text{L}$  da suspensão celular e 3  $\mu\text{L}$  do soro controle positivo (anti-soro com anticorpos para antígenos neutrofílicos – American Red Cross) ou 3  $\mu\text{L}$  do soro controle negativo (soro de homem de tipo sanguíneo AB não transfundido) ou 3  $\mu\text{L}$  do soro teste. Incubar por 2 horas a 37°C.

Fazer a leitura em aglutinoscópio por dois observadores. São consideradas positivas as amostras que apresentarem aglutinação.

### **3.4 Teste de Imunofluorescência de Granulócitos – GIFT**

A suspensão de granulócitos é realizada pelo mesmo procedimento utilizado no GAT (itens 3.3.1 e 3.3.2).

Após a preparação da suspensão de granulócitos, incubar as células com 1 mL de paraformaldeído (formaldeído 10, metanol free, Polysciences - ref.: 4018) por 5 minutos. Em seguida lavar duas vezes com 3 mL de PBS-BSA 0,2% a 1.800 rpm por 5 minutos. Ressuspender com 1 mL de PBS-BSA 0,2%.

Em seguida, dispensar 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de granulócitos em tubo de 2 mL e acrescentar 50  $\mu\text{L}$  do soro controle positivo (anti-soro com anticorpos para antígenos neutrofílicos – American Red Cross) ou 50  $\mu\text{L}$  do soro controle negativo (soro de homem de tipo sanguíneo AB não transfundido) ou 50  $\mu\text{L}$  do soro teste. Incubar por 40 minutos a 4°C.

Após a primeira incubação, lavar a suspensão de granulócitos duas vezes com 1 mL de PBS-BSA 0,2% a 1.800 rpm por 5 minutos. Retirar o sobrenadante por inversão.

Durante a segunda lavagem, preparar o anticorpo secundário (anti-Human IgG – FITC Southern Biotec) com PBS concentrado 1X, na diluição de 1:10. Terminada as lavagens, adicionar 10  $\mu\text{L}$  do anticorpo secundário, pronto para uso, e incubar por 30 minutos a 4°C no escuro.

Após a segunda incubação, lavar a suspensão de granulócitos duas vezes com 1 mL de PBS-BSA 0,2% a 1.800 rpm por 5 minutos. Retirar o sobrenadante por inversão. Terminada as lavagens, não é necessário ressuspender as células.

Colocar 50 µL da suspensão final de granulócitos em lâmina, cobrir com lamínula e fazer a leitura em microscópio de fluorescência por dois observadores.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram 70% ou mais de células fluorescentes, devido aos anticorpos secundários (conjugados à fluoriceína – FITC) ligados aos anticorpos primários, anti-neutrófilos. A figura 5 mostra a diferença entre as células positivas (indicada pela seta branca), e as células negativas, que não apresentam fluorescência, (indicada pela seta vermelha).

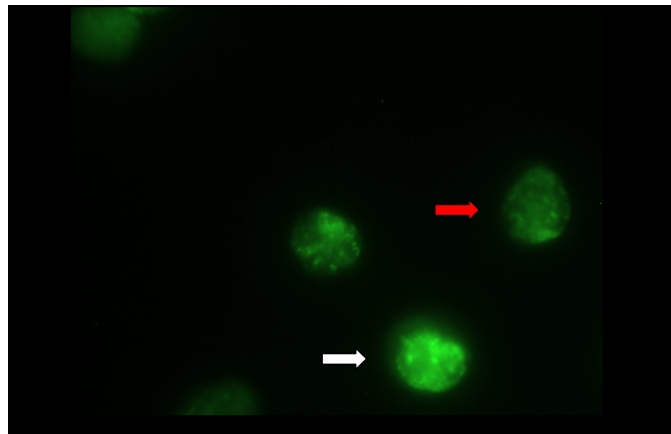


Figura 5 – Células fluorescentes de uma amostra positiva – foto da lâmina em microscopia de fluorescência

### 3.5 Citometria de Fluxo – LABScreen

Sessenta e cinco amostras das doadoras múltíparas, entre positivas e negativas para anticorpos leucocitários, foram testadas para a presença de anticorpos contra antígenos HLA, classe I e II, por Citometria de Fluxo utilizando três metodologias: LABScreen Mixed (One Lambda, Inc, EUA) que detecta simultaneamente anticorpos anti-HLA de classe I e II; LABScreen PRA Class I e LABScreen PRA Class II (One Lambda, Inc, EUA), que detectam e identificam anticorpos anti-HLA de classe I e classe II, respectivamente, fornecendo a porcentagem de reatividade contra o painel de células; LABScreen Single Antigen Class I e LABScreen Single Antigen Class II (One Lambda, Inc, EUA) que detectam e identificam anticorpos anti-HLA de classe I e classe II, respectivamente.

Cada kit possui os antígenos HLA ligados em pérolas e o tampão de lavagem. O anticorpo secundário anti-IgG humano (IgG – Imunoglobulina G) conjugado ao fluorocromo PE (Ficoeritrina) é fornecido em kits diferentes do LABScreen, pela própria One Lambda (PE-Conjugated Streptavidin – LT-SAPE, One Lambda, Inc, EUA). A sensibilidade dos testes é menor para o Mixed e maior para o Single Antigen, entretanto os testes LABScreen em citometria de fluxo são mais sensíveis que os testes LAT por ELISA. O procedimento é o mesmo para os três testes e segue-se conforme protocolo apresentado no item 3.5.1.

### **3.5.1 Protocolo Teste LABScreen**

As amostras dos soros a serem testados são centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos. Em seguida, retirar 10 µL do sobrenadante dos soros e colocar em microplacas (microplacas de PCR com 96 poços - Axygen). Acrescentar 1,5 µL das pérolas de cada uma das três metodologias (1,5 µL do Mixed; 1,5 µL do PRA classe I; 1,5 µL do PRA classe II; 1,5 µL do Single Antigen classe I; e 1,5 µL do Single Antigen classe II) em placas separadas para cada uma das amostras de soro. Homogeneizar e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro.

Após incubação, lavar as amostras três vezes com 200 µL do tampão de lavagem diluído para 1X, a 3.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante da centrifugação deve ser retirado invertendo a placa.

Durante a última lavagem, preparar o anticorpo secundário com 0,5 µL de conjugado concentrado 100X com 49,5 µL de tampão concentrado 1X (proveniente do kit do anticorpo secundário), para cada uma das amostras testes.

Terminada as lavagens, acrescentar 50 µL do anticorpo secundário em cada soro, homogeneizar e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Em seguida lavar três vezes com 200 µL do tampão de lavagem a 3.000 rpm por 5 minutos. Inverter a placa para retirar o sobrenadante.

Após as lavagens, ressuspender em 65 µL de PBS e transferir as amostras para a placa de leitura (placa de microtitulação transparente com 96 poços - Kartel). Fazer a aquisição no citômetro LABScan™ 100 Luminex (One Lambda, Inc, EUA) e a análise dos resultados no programa “Software Luminex 100 IS” (One Lambda, Inc, EUA).

### 3.6 Estatística

A análise estatística foi feita pelo *software* “Epi Info versão 6”, que mostra diferença significativa em resultados associados em tabela 2x2 pelo cálculo do “qui quadrado” com 1 grau de liberdade ( $X^2_{1gl}$ ). Nos casos em que os valores esperados das caselas da tabela 2x2 forem menores que 5, a estatística é feita pelo “teste Exato de Fisher”. O programa também calcula a “Odds Ratio” – OR (possibilidade do evento – presença de anticorpos – estar associado à exposição – gestação) e o valor de “p” (probabilidade de a diferença observada ser casual). São consideradas significativas as diferenças que possuírem  $X^2_{1gl} > 3,841$  e  $p \leq 0,05$ . Todos os cálculos foram feitos para um Intervalo de Confiança de 95% (Ic 95%).

## **4 RESULTADOS**

---

---

Foram analisadas amostras de soro de 350 doadoras do hemocentro da UNIFESP que foram distribuídas em quatro grupos de acordo com o número de gestações que tiveram (50 doadoras nulíparas; 100 com uma gestação; 100 com duas gestações; e 100 múltíparas). As doadoras foram nomeadas pela letra L e receberam uma numeração conforme a seqüência com que entraram no estudo. A análise estatística considerou as associações feitas entre a presença de anticorpos e o histórico transfusional, idade, tipo sangüíneo ou número de gestações das doadoras. Também foi analisado o tipo de doação (doação de repetição, com 68% dos casos, ou primeira vez, com 32%).

Todas as amostras foram testadas pelo LAT-M. As doadoras com resultados positivos foram testadas no LAT-1240 para identificar os anticorpos anti-HLA. As doadoras que apresentaram resultados negativos foram testadas no GAT e GIFT para a pesquisa de anticorpos anti-neutrófilos. Nestes testes foram utilizadas apenas amostras negativas para excluir a possibilidade de um resultado falso positivo devido à presença de anticorpos anti-HLA.

Sessenta e cinco doadoras múltíparas também foram testadas pela metodologia do LABScreen, por citometria de fluxo, para a pesquisa de anticorpos anti-HLA.

#### **4.1 Resultados do teste LAT-M**

O teste LAT-M revelou que as doadoras nulíparas não apresentaram anticorpos anti-HLA, mesmo no caso em que a doadora apresentou histórico de transfusão sanguínea (L8). As doadoras com uma gestação somaram 17% de positivas e as doadoras com duas gestações 26% das mulheres com anticorpos. As doadoras múltíparas apresentaram 37% de positividade. Em sete doadoras negativas, com histórico gestacional, as transfusões não induziram a formação de anticorpos.

Os anticorpos anti-HLA de classe I estão presentes em 8,6% de todas as doadoras e em 7% das doadoras com uma gestação, em 11% das mulheres com duas gestações e em 12% das múltíparas. Os anti-HLA de classe II apresentam-se em 10,3% do total de doadoras, sendo que 8% estão em doadoras com uma gestação, 11% em mulheres com duas gestações e 17% das múltíparas. Concomitantemente, anti-HLA classe I e II, os anticorpos aparecem em 2% das mulheres com uma



gestação, em 4% das doadoras com duas gestações e em 8% das multíparas, totalizando 4% do total de mulheres estudadas.

Os anticorpos anti-HLA, classe I e/ou II, estão presentes, então, em 22,9% (80 mulheres de 350) das doadoras que compareceram ao Hemocentro da UNIFESP e em 26,7% (80 mulheres de 300) das doadoras que tiveram no mínimo uma gestação.

A tabela 3 e a figura 6 mostram a relação dos resultados em cada grupo de gestações. Os dados detalhados de cada doadora estão presentes nos anexos 5, 6, 7, e 8, e fornecem características das doadoras como presença de anticorpos anti-HLA, classe I e/ou II, histórico de transfusão sangüínea e aborto, idade da doadora e tipo sangüíneo.

Tabela 3 – Relação das doadoras testadas no LAT-M

Número de Gestações	Número de Doadoras	Anticorpos Anti-HLA			Total (%)
		Classe I	Classe II	Classe I e II	
0	50	0	0	0	0
1	100	7	8	2	17
2	100	11	11	4	26
≥ 3	100	12	17	8	37
<b>Total</b>	<b>350</b>	<b>30 (8,6%)</b>	<b>36 (10,3%)</b>	<b>14 (4,0%)</b>	<b>80 (22,9%)</b>

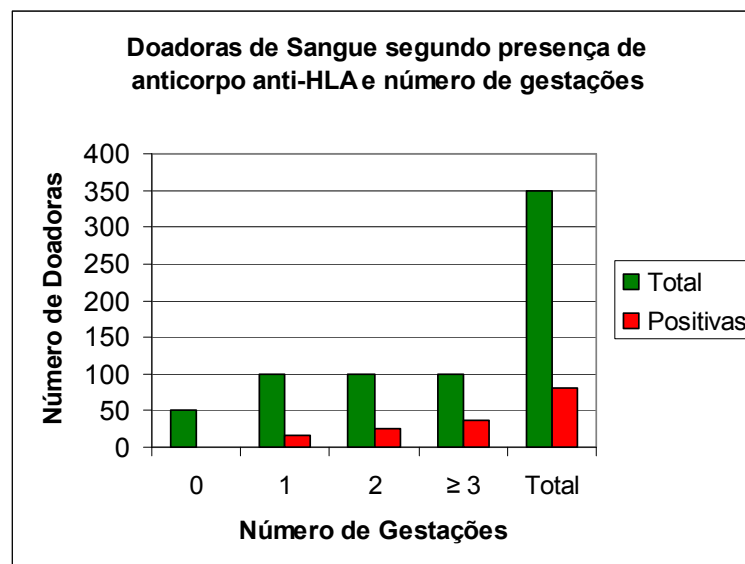


Figura 6 – Gráfico da relação das doadoras testadas no LAT-M, segundo a presença de anticorpos anti-HLA

A análise estatística dos resultados, feita pelo programa Epi Info, está esquematizada nas tabelas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. Foram analisadas as variáveis idade, cor da pele e histórico de gestação, associadas com a presença ou não de anticorpos anti-leucocitários, segundo os resultados obtidos em cada teste. A diferença estatística foi obtida pelo valor do  $X^2_{1gl}$ , p, OR e Ic 95%.

Tabela 4 – Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpo anti-HLA, segundo idade, obtidos pelo teste LAT-M

Idade	Presença de Anti-HLA		Total
	Sim	Não	
Até 40 anos	47	183	230
Acima de 40 anos	33	87	120
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>270</b>	<b>350</b>

$X^2_{1gl} = 2,23$     OR = 0,68  
P = 0,135    Ic 95% = 0,50 – 1,09

Tabela 5 – Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (nulíparas e uma gestação), obtidos pelo teste LAT-M

Histórico de Gestação	Presença de Anti-HLA		Total
	Sim	Não	
0	0	50	50
1	17	83	100
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>133</b>	<b>150</b>

$X^2_{1gl} = 17,40$     OR = 0,00  
P < 0,001    Ic 95% = -

Tabela 6 – Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (nulíparas e duas gestações), obtidos pelo teste LAT-M

Histórico de Gestação	Presença de Anti-HLA		Total
	Sim	Não	
0	0	50	50
2	26	74	100
<b>Total</b>	26	124	150

$X^2_{1gl} = 29,47$     **OR = 0,00**  
**P < 0,001**    **Ic 95% = -**

Tabela 7 – Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (nulíparas e múltíparas), obtidos pelo teste LAT-M

Histórico de Gestação	Presença de Anti-HLA		Total
	Sim	Não	
0	0	50	50
≥ 3	37	63	100
<b>Total</b>	37	113	150

$X^2_{1gl} = 46,83$     **OR = 0,00**  
**P < 0,001**    **Ic 95% = -**

Tabela 8 – Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (uma e duas gestações), obtidos pelo teste LAT-M

Histórico de Gestação	Presença de Anti-HLA		Total
	Sim	Não	
1	17	83	100
2	26	74	100
<b>Total</b>	43	157	200

$X^2_{1gl} = 2,40$     **OR = 0,58**  
**P = 0,121**    **Ic 95% = 0,38 – 1,13**

Tabela 9 – Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (uma gestação e multíparas), obtidos pelo teste LAT-M

Histórico de Gestação	Presença de Anti-HLA		Total
	Sim	Não	
1	17	83	100
≥ 3	37	63	100
<b>Total</b>	<b>54</b>	<b>146</b>	<b>200</b>

$X^2_{1gl} = 10,15$  OR = 0,35  
P = 0,001 Ic 95% = 0,28 – 0,76

Tabela 10 – Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (duas gestações e multíparas), obtidos pelo teste LAT-M

Histórico de Gestação	Presença de Anti-HLA		Total
	Sim	Não	
2	26	74	100
≥ 3	37	63	100
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>137</b>	<b>200</b>

$X^2_{1gl} = 2,80$  OR = 0,60  
P = 0,094 Ic 95% = 0,46 – 1,07

Tabela 11 – Distribuição de doadoras de sangue, por presença de anticorpos anti-HLA, segundo histórico de gestação (nulíparas e pelo menos uma gestação), obtidos pelo teste LAT-M

Histórico de Gestação	Presença de Anti-HLA		Total
	Sim	Não	
0	0	50	50
≥ 1	80	220	300
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>270</b>	<b>350</b>

$X^2_{1gl} = 32,98$  OR = 0,00  
P < 0,001 Ic 95% = -

Diferença estatística significativa foi observada entre os grupos das nulíparas e as doadoras que tiveram pelo menos uma gestação e entre o grupo das doadoras com uma gestação e as múltíparas.

#### 4.2 Resultados do teste LAT-1240

As doadoras positivas no LAT-M foram testadas no LAT-1240 para especificar os anticorpos encontrados. Os testes foram realizados de acordo com a classe do anticorpo encontrada, ou seja, as mulheres com anticorpos contra classe I foram testadas apenas para classe I, e o mesmo raciocínio segue para classe II. Sete doadoras consideradas positivas (L21, L132, L138, L175, L224, L237, L291) foram negativas no LAT-1240; estas amostras foram testadas em dois experimentos diferentes do LAT-1240 e permaneceram com resultados negativos.

As especificidades dos anticorpos mais freqüentes estão reunidas na tabela 12.

Tabela 12 – Especificidade dos anticorpos mais freqüentemente encontrados nas doadoras de sangue pelo LAT-1240

<b>Anti-HLA classe I</b>						
Lócus A	-A25	-A31	-A68			
Doadoras	11/80	10/80	12/80			
Positivas/Testadas	(13,8%)	(12,5%)	(15,0%)			
Lócus B	-B18	-B27	-B44	-B48	-B49	-B51
Doadoras	12/80	12/80	12/80	11/80	12/80	12/80
Positivas/Testadas	(15,0%)	(15,0%)	(15,0%)	(13,8%)	(15,0%)	(15,0%)
Lócus C	-CW12	-CW14	-CW17			
Doadoras	9/80	11/80	14/80			
Positivas/Testadas	(11,3%)	(13,8%)	(17,5%)			
<b>Anti-HLA classe II</b>						
Lócus DR/DQ	-DR8	-DR11	-DR15	-DQ7	-DQ8	
Doadoras	16/80	19/80	15/80	20/80	20/80	
Positivas/Testadas	(20,0%)	(23,8%)	(18,8%)	(25,0%)	(25,0%)	

Os anticorpos com menor frequência foram os anti-HLA-A11, -A23, -A74, -B50, -B81, -CW7, -CW15, -CW18, -DR9, -DR14, -DR18, -DQ4 e -DQ5. As especificidades dos anticorpos para cada doadora positiva estão reunidas nos anexos 9, 10 e 11.

#### 4.3 Resultados do teste GAT

Somente as doadoras negativas no LAT-M foram testadas no GAT porque os anticorpos anti-HLA podem reagir com neutrófilos e apresentar positividade mesmo na ausência de anticorpos neutrofílicos, gerando resultados falso-positivos.

A tabela 13 reúne os resultados obtidos no teste GAT.

Tabela 13 – Distribuição das doadoras, por presença de anticorpos anti-neutrófilos, segundo o teste GAT

<b>Número de Gestações</b>	<b>Número de Doadoras</b>	<b>Doadoras Positivas (%)</b>
<b>0</b>	49	<b>0</b>
<b>1</b>	82	<b>0</b>
<b>2</b>	71	<b>1 (1,4%)</b>
<b>≥ 3</b>	62	<b>1 (1,6%)</b>
<b>Total</b>	<b>264</b>	<b>2 (0,80%)</b>

#### 4.4 Resultados do teste GIFT

Foram testadas no GIFT doadoras que apresentaram resultados negativos para a presença de anticorpos anti-HLA para excluir resultados falso-positivos. A tabela 14 mostra os resultados do teste.

Tabela 14 – Distribuição das doadoras, por presença de anticorpos anti-neutrófilos, segundo o teste GIFT

Número de Gestações	Número de Doadoras	Doadoras Positivas (%)
0	49	0
1	82	0
2	71	2 (2,8%)
≥ 3	62	2 (3,2%)
<b>Total</b>	<b>264</b>	<b>4 (1,5%)</b>

As amostras positivas para o GIFT foram a L9 e L15 com três gestações, L93 e L121 com duas gestações. As figuras 7, 8, 9 e 10 mostram as células fluorescentes para cada uma das amostras positivas.

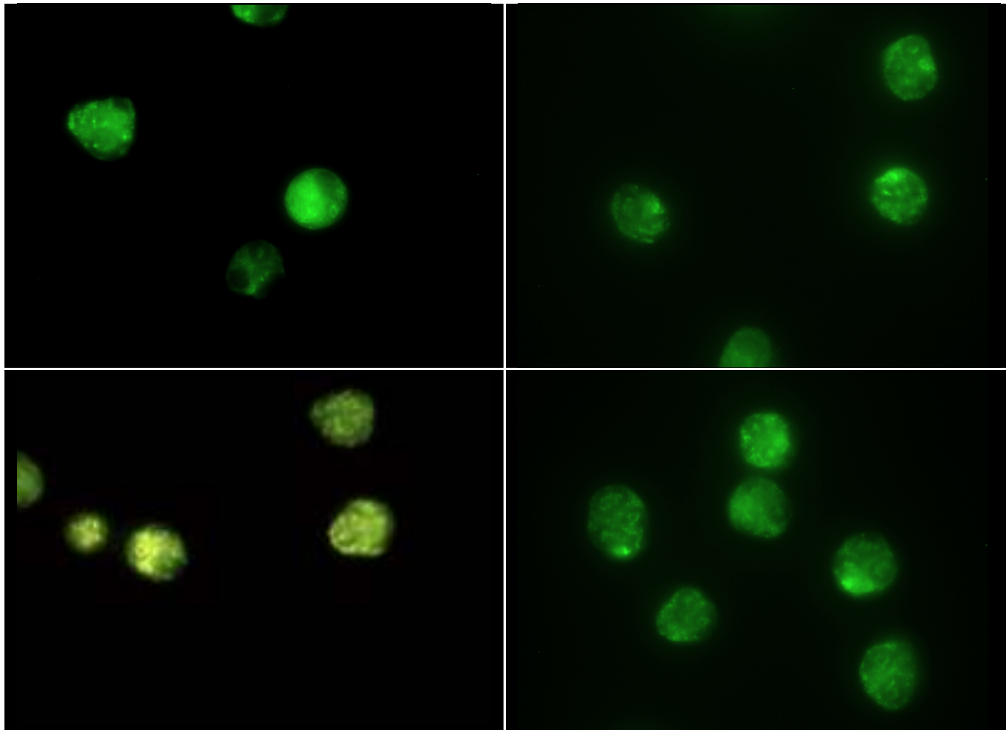


Figura 7 – Células fluorescentes da amostra L9 – foto da lâmina em microscopia de fluorescência

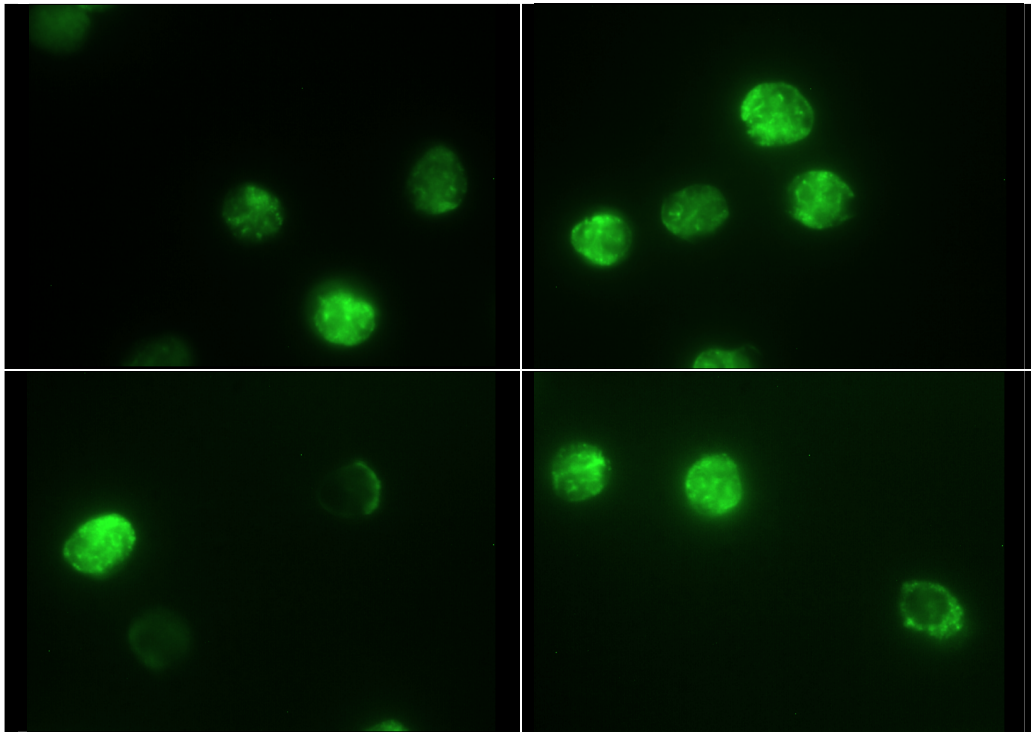


Figura 8 – Células fluorescentes da amostra L15 – foto da lâmina em microscopia de fluorescência

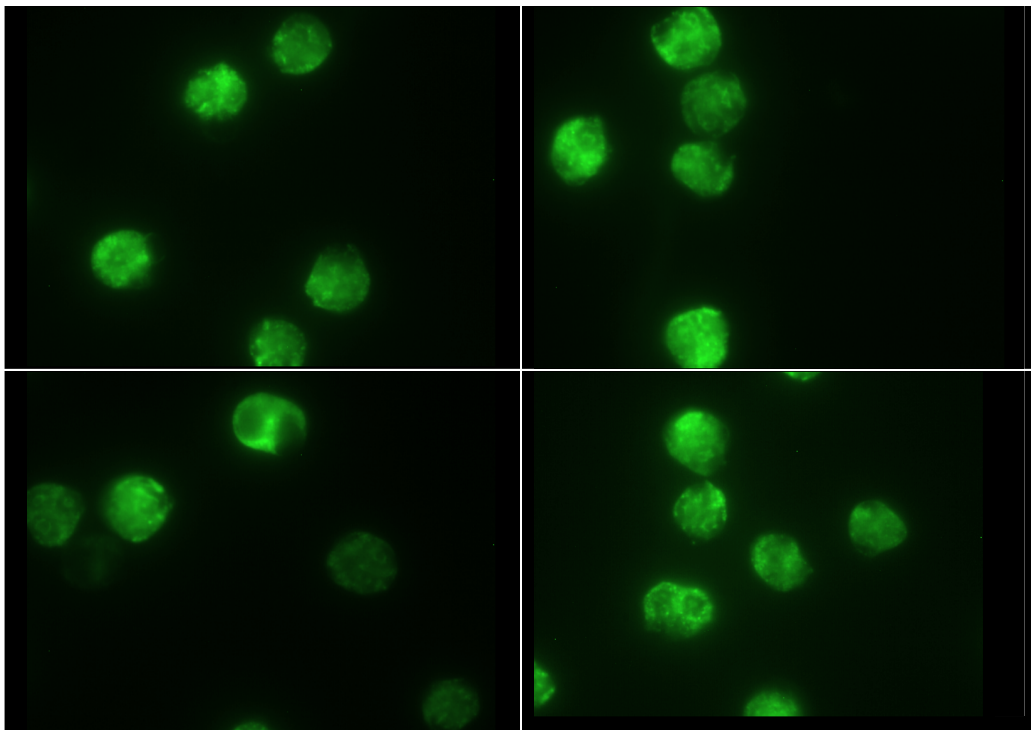


Figura 9 – Células fluorescentes da amostra L93 – foto da lâmina em microscopia de fluorescência



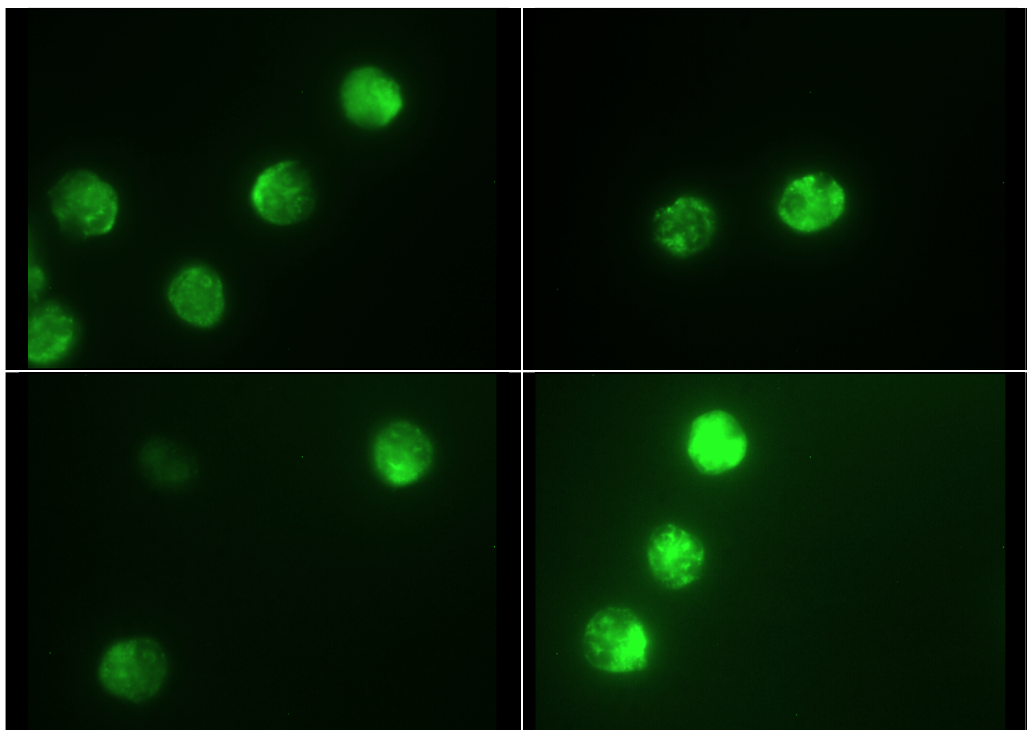


Figura 10 – Células fluorescentes da amostra L121 – foto da lâmina em microscopia de fluorescência

Comparando os testes GAT e GIFT, tem-se que uma única amostra (L9) foi positiva para ambos os testes e as demais doadoras foram positivas apenas para um deles (L15, L93 e L121 foram positivas no GIFT e L289 foi positiva no GAT). As doadoras positivas para anti-neutrófilos somam então, pelos dois testes, cinco mulheres, correspondendo a 1,9% do total de doadoras estudadas (Tabela 15).

Tabela 15 – Distribuição das doadoras de sangue, negativas para presença de anti-HLA, por número de gestação, segundo a presença de anticorpos anti-neutrófilos, obtidos pelo teste de GAT e GIFT

Número de Gestações	Número de Doadoras	GAT (%)	GIFT (%)	GAT + GIFT (%)
0	49	0	0	0
1	82	0	0	0
2	71	1 (1,4%)	2 (2,8%)	3 (4,2%)
≥ 3	62	1 (1,6%)	2 (3,2%)	2 (3,2%)
<b>Total</b>	<b>264</b>	<b>2 (0,8%)</b>	<b>4 (1,5%)</b>	<b>5 (1,9%)</b>

#### 4.5 Resultados do teste LABScreen

As 65 doadoras múltiplas, entre mulheres positivas e negativas para anticorpos anti-HLA, foram testadas pela metodologia do LABScreen, por citometria de fluxo. Esta metodologia é mais sensível que o teste LAT-M podendo revelar a presença de anticorpos não detectados pelo ELISA. O anexo 12 mostra a descrição das doadoras testadas por citometria de fluxo e o resultado comparativo com o teste LAT-M.

Pelo LABScreen cinco amostras confirmaram ser positivas e foram encontradas 17 novas amostras positivas, para pelo menos um dos três testes, que apresentavam resultados negativos no LAT-M. Essas doadoras foram consideradas positivas pelo fato de a metodologia do LABScreen ser mais sensível que o LAT-M.

As especificidades dos anticorpos mais freqüentes estão reunidas na tabela 12.

Tabela 16 – Especificidade dos anticorpos mais freqüentemente encontrados nas doadoras de sangue pelo LABScreen

<b>Anti-HLA classe I</b>							
Lócus A	-A1	-A2	-A26	-A29	-A34	-A68	-A80
Doadoras Positivas/Testadas	5/65 (7,7%)	5/65 (7,7%)	5/65 (7,7%)	7/65 (10,8%)	5/65 (7,7%)	5/65 (7,7%)	6/65 (9,2%)
Lócus B	-B8	-B42	-B49	-B51	-B52	-B53	-B63
Doadoras Positivas/Testadas	7/65 (10,8%)	5/65 (7,7%)	6/65 (9,2%)	5/65 (7,7%)	6/65 (9,2%)	5/65 (7,7%)	5/65 (7,7%)
Lócus C	-CW17						
Doadoras Positivas/Testadas	5/65 (7,7%)						
<b>Anti-HLA classe II</b>							
Lócus DR	-DR1	-DR7					
Doadoras Positivas/Testadas	5/65 (7,7%)	5/65 (7,7%)					

Os anticorpos em comum encontrados nos testes LAT-1240 e LABScreen (PRA e Single) foram os anti-HLA-A24, -A26, -A66, -B8, -B57, -B58 e -DR15. As demais especificidades e as características das 22 doadoras positivas no LABScreen estão contidas nos anexos 13 e 14.



Anticorpos contra antígenos HLA e neutrofílicos são freqüentemente encontrados em indivíduos com histórico transfusional e em mulheres com gestações prévias<sup>6-7</sup>, principalmente múltiparas (mulheres que tiveram três ou mais gestações).<sup>8,23</sup> As mulheres sensibilizadas, que vierem a doar sangue, podem transmitir esses anticorpos passivamente durante a transfusão sanguínea.<sup>5</sup>

Uma vez presentes nos receptores, os anticorpos podem causar efeitos imunológicos adversos, entre eles TRALI.<sup>6</sup> Atualmente, TRALI é considerada a principal causa de morte associada à transfusão nos Estados Unidos e Reino Unido<sup>24</sup>, tornando-se importante alvo de estudos. Entre as hipóteses propostas para o mecanismo fisiopatológico, a mais aceita é que anticorpos contra antígenos HLA e neutrofílicos, presentes nos hemocomponentes, podem desencadear uma resposta oxidativa pelos neutrófilos com formação de edema e insuficiência pulmonar.<sup>25</sup> Mediante a essa evidência, o estudo de aloanticorpos, sua prevalência na população e a maneira pela qual ativam os neutrófilos, poderá fornecer o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos e possíveis tratamentos e medidas preventivas.

O presente trabalho estudou, então, a presença de anticorpos anti-HLA e anti-neutrófilos em doadoras de sangue brasileiras e os associou ao número de gestações prévias. Cinquenta doadoras nulíparas, 100 mulheres com uma gestação, 100 com duas gestações e 100 múltiparas foram estudadas na pesquisa.

A análise das amostras de soro das 350 doadoras incluídas no trabalho revela que anticorpos anti-HLA, classe I e II, estão presentes em 22,9% das doadoras que compareceram ao Hemocentro da UNIFESP e em 26,7% das doadoras que tiveram no mínimo uma gestação. A maior prevalência encontra-se no grupo das múltiparas (37%), seguido pelo grupo das doadoras com duas gestações (26%) e com uma gestação (17%).

Analisando os resultados entre os grupos gestacionais estudados, observa-se diferença estatística significativa entre o grupo das doadoras nulíparas, que não apresentaram anticorpos, e o grupo das mulheres com histórico gestacional. Estão incluídos nesta análise os grupos de doadoras com uma gestação, com duas gestações, múltiparas e o grupo das mulheres com no mínimo uma gestação, sendo que os dados estatísticos confirmam ser a gestação a responsável pela formação dos anticorpos.

Além disso, os resultados revelam que quanto maior for o número de gestações tanto maior poderá ser a quantidade de anticorpos, e que a cada gestação aumenta a

possibilidade de a mãe ser sensibilizada pelos leucócitos fetais, elevando assim o risco de formação de aloanticorpos. Portanto, entre as doadoras com histórico gestacional, as mulheres múltíparas constituem um grupo de maior risco para desencadear reações transfusionais.

As análises acima descritas abordam a presença de todos os anticorpos, sem considerar separadamente as classes HLA I e II. Os anticorpos contra classe I estão presentes em 8,6% das doadoras e contra classe II em 10,3%. A presença concomitante dos anticorpos ocorre em 4,0% das mulheres estudadas e, embora não apresente diferença estatística, a presença de ambos os anticorpos também tende a aumentar conforme cresce o número de gestações.

Da mesma forma, nenhuma relação estatística foi observada entre a presença de anticorpos classe I ou II, separadamente. Os anticorpos de classe II possuem um número ligeiramente maior de casos (10,3%) e, apesar de não ser significativo, esta classe de anticorpos tem tido destaque na literatura.

Considerando ser a gestação a responsável pela formação dos anticorpos, o momento em que eles são formados passa a ter importância. O tempo de gestação para a formação dos anticorpos ainda não está estabelecido, entretanto eles podem ser formados durante os primeiros meses de gravidez, como é o caso da doadora com uma gestação, aborto espontâneo e sem histórico de transfusão (L127) que apresentou positividade para anticorpos anti-HLA-B48, -B51, -B54 e -CW17. Aqui deve ser considerado que as doadoras foram classificadas de acordo com o fato de terem ficado grávidas, sem necessariamente chegarem a termo.

Da mesma forma, não se tem estabelecido por quanto tempo esses anticorpos podem apresentar reatividade nas doadoras sem perder titulação. Sabe-se que os anticorpos podem permanecer por muito tempo como ocorre com a doadora L89 (positiva para anti-HLA classe II) que apresenta positividade mesmo depois de 28 anos em relação à última gestação (dados não mostrados).

Entretanto, a presença do anticorpo não está associada ao tempo em que foram formados e sim ao tipo de antígeno HLA, sua capacidade imunogênica e frequência populacional, uma vez que o gene HLA é extremamente polimórfico, podendo resultar em uma variedade de moléculas que diferem, não somente na estrutura, mas também na capacidade de induzir uma resposta imunológica.<sup>26</sup> Isso explica o porquê algumas mães desenvolvem anticorpos e outras não, e pode esclarecer também o fato de

pacientes que receberam anticorpos específicos para seus antígenos não apresentar nenhuma reação transfusional.

Os anticorpos anti-HLA encontrados apresentam grande variação, não se assemelhando às especificidades reportadas na literatura. Os anticorpos mais freqüentes foram os anti-HLA-A25, -A31, -A68, -B18, -B27, -B44, -B48, -B49, -B51, -CW12, -CW14, -CW17, -DR8, -DR11, -DR15, -DQ7 e -DQ8. Os anticorpos com maior freqüência apresentados na literatura foram os anti-HLA-A1, -A2, -A9, -A19, -B7, -B27, -B40, -DR4 -DR7, -DR8 e -DR11.<sup>8</sup> A diferença entre os tipos de anti-HLA vistos na literatura sugere que doadoras brasileiras apresentam maior miscigenação racial quando comparadas a outras populações. Mesmo assim, alguns anticorpos se repetem como o anti-HLA-B27, -DR8 e -DR11.

Trabalhos sobre a prevalência de anticorpos anti-HLA em doadoras de sangue e associação com o número de gestações tem sido alvo de estudos de outros pesquisadores. A conclusão é que os aloanticorpos podem ser formados durante a gravidez e que o aumento do número das gestações favorece a formação dos anticorpos anti-HLA. A tabela 18 reúne três trabalhos da literatura em comparação aos resultados do presente estudo.<sup>9,27-28</sup>

Tabela 17 – Porcentagem de doadoras de sangue positivas e número de gestações em trabalhos da literatura<sup>9,27-28</sup>

Número de Gestação	Porcentagem de aloimunização HLA			
	Densmore et al 1999 (332 doadoras) <sup>27</sup>	Insunza et al 2004 (144 doadoras) <sup>9</sup>	Triulzi et al 2007 (5700 doadoras) <sup>28</sup>	Doadoras Brasileiras (300 doadoras)
1	7,8%	9,4%	19,3%	17%
2	14,6%	17,7%	34,2%	26%
≥ 3	26,3%	24,0%	42,5%	37%

Densmore e colaboradores analisaram 332 doadoras de plaqueta por aférese, distribuídas em grupos de acordo com o número de gestações (zero, uma, duas ou três ou mais gestações), pelo Teste de Linfocitotoxicidade marcada por antiglobulina. Insunza e colaboradores estudaram anticorpos anti-HLA pela técnica de ELISA, através do kit LAT-M (One Lambda, Inc, EUA), no soro de 237 doadoras de plaquetas por aférese, também distribuídas de acordo com o número prévio de gestações. A

metodologia do LABScreen, por citometria de fluxo, foi utilizada por Triulzi e colaboradores para analisar 5700 doadoras, entre mulheres nulíparas, com uma ou duas gestações e múltiparas.

Embora ocorra variação entre o número de doadoras positivas em cada trabalho e a técnica utilizada, está claro que a porcentagem de anticorpos se eleva com o aumento do número de gestações. É evidente também que mulheres múltiparas constituem o grupo de grande probabilidade para a formação de anticorpos. Portanto, doadoras com três ou mais gestações possuem um fator de risco elevado para a transmissão de anticorpos durante a transfusão e, conseqüentemente, ocasionar reações no receptor de seus hemocomponentes.

Atualmente, existem duas hipóteses sobre a fisiopatologia de TRALI. A primeira considera a reação um evento mediado por anticorpos provenientes de doadoras com histórico gestacional, principalmente múltiparas, denominado TRALI imunológico. A segunda considera a reação TRALI o resultado de dois eventos independentes, denominada TRALI não-imunológico. O primeiro deles é a condição clínica do paciente (quadro inflamatório ou infeccioso) e o segundo é a infusão de lipídeos e citocinas presentes em componentes sanguíneos estocados.<sup>29</sup>

Na reação imunológica, os anticorpos, anti-HLA classe I e anti-neutrófilos, ligam-se aos seus receptores específicos na membrana dos neutrófilos, gerando resposta citotóxica com danificação endotelial e formação de edema pulmonar. Recentemente, anticorpos anti-HLA classe II têm sido associados a reações TRALI.<sup>30</sup> Entretanto, os antígenos HLA de classe II não são expressos constitutivamente na membrana celular, sendo expostos por células apresentadoras de antígenos quando ativas como linfócitos B, monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas.<sup>23</sup> Diante disso, discute-se por qual mecanismo os anticorpos de classe II são capazes de ativar as células uma vez que seus antígenos correspondentes somente são expressos após a ativação celular.

Há hipóteses sobre a ligação dos anticorpos anti-HLA de classe II com os antígenos de monócitos e macrófagos residentes no pulmão, já ativados em função de uma condição clínica do paciente, como traumas, cirurgias e infecções. Assim como ocorre com os monócitos e macrófagos, os neutrófilos já ativados, em função de um quadro inflamatório do paciente, passam a expressar antígenos de classe II e a se tornarem alvos dos anticorpos específicos, como sugere a hipótese dos dois eventos de TRALI.<sup>17,29</sup>

Por outro lado, o endotélio pulmonar é constituído por células que expressam antígenos de classe II constitutivamente. Portanto, a presença de anti-HLA classe II pode ativar as células endoteliais e a ativação resultar em produção de citocinas capazes de ativar PMNs e induzir resposta citotóxica.<sup>30-33</sup> Um exemplo do envolvimento do endotélio foi reportado por Dykes e colaboradores<sup>34</sup>, em um caso de TRALI em que anticorpos anti-HLA-B44 foram identificados no doador de sangue e o antígeno correspondente no endotélio do pulmão transplantado, entretanto o paciente não possuía antígenos HLA-B44.

A reação TRALI não-imunológica, em que nenhum anticorpo é detectado nem no doador nem no receptor de sangue, é explicada pela infusão de lipídeos biologicamente ativos e capazes de ativar neutrófilos. Entretanto, recente hipótese sugere que para esses casos, os anticorpos não puderam ser detectados devido à utilização de metodologias pouco sensíveis.<sup>35-36</sup> No presente estudo, 65 doadoras múltiparas, entre mulheres positivas e negativas para anticorpos anti-HLA, foram analisadas também por citometria de fluxo, pela metodologia do LABScreen, técnica mais sensível que o LAT-M, por ELISA.

Os resultados mostraram que das cinco doadoras positivas para anti-HLA classe I ou classe II (L20, L29, L31, L45 e L95) o teste do LABScreen confirmou o resultado e revelou a presença de anticorpos antes não detectados pelo LAT-M. Da mesma forma, 28,3% (17/60) mulheres, consideradas negativas no ELISA, apresentaram anticorpos na citometria de fluxo. O alto índice de positividade do LABScreen de amostras previamente negativas aumenta o grau de sensibilização de 37% para 65,3% nas mulheres múltiparas. São casos, portanto, com potencial para causar TRALI, entretanto seus anticorpos poderiam passar despercebidos dependendo da técnica utilizada. Por isso, o uso de técnicas mais sensíveis para identificar anticorpos tem sido proposto e podem justificar os casos de TRALI em que não foi detectado nenhum anticorpo no doador, nem no receptor de sangue.<sup>35</sup>

Apesar de grande importância, os anticorpos anti-HLA não são os únicos envolvidos em casos de TRALI. Com igual relevância apresentam os anticorpos contra antígenos de neutrófilos.<sup>37</sup> Em estudos de doadoras de sangue com histórico gestacional anticorpos reativos para granulócitos estavam presentes em 1% a 20% das mulheres, sendo que anticorpos específicos para granulócitos foram encontrados em apenas 0,2% a 2%. Embora com menor frequência, esses anticorpos estão envolvidos em casos de TRALI.<sup>38</sup>



Os anticorpos neutrofílicos, neste trabalho, foram estudados por duas metodologias descritas na literatura, GAT e GIFT<sup>39</sup>, que utiliza painel de indivíduos O+, para evitar resultado falso-positivo com a ligação de anticorpos eritrocitários. Os indivíduos O+ foram fenotipados para o sistema de antígenos neutrofílicos e foram utilizadas células positivas para todos os antígenos; desta forma nenhum anticorpo anti-neutrófilos deixou de ser detectado. Além disso, somente foram estudadas doadoras com resultados negativos para anti-HLA evitando possíveis reações cruzadas.

Pelas técnicas de GAT e GIFT foram encontradas cinco doadoras positivas (L9, L15, L93, L121 e L289) somando apenas 1,9% do total de doadoras. Uma doadora múltipara (1,6%) e uma doadora com duas gestações (1,4%) foram positivas no GAT (L9 e L289 respectivamente) somando 0,8% de todas as doadoras negativas para anti-HLA (duas em 264 doadoras). Duas doadoras múltiparas (3,2%) e duas mulheres com duas gestações (2,8%) apresentaram anticorpos pelo GIFT (múltiparas L9 e L15; duas gestações L93 e L121), que detectou positividade em 1,5% das doadoras negativas para anti-HLA (quatro em 264 mulheres). Apesar de não apresentar diferença estatística entre o grupo de gestações, esse resultado é concordante com a literatura, uma vez que anticorpos neutrofílicos apresentam baixa frequência populacional<sup>36</sup>, variando de 0,1% a 2%.<sup>7,40</sup>

Uma vez confirmada a associação entre número de gestações e anticorpos leucocitários, é preciso desenvolver medidas para impedir que tais anticorpos cheguem até os receptores e desencadeiem TRALI. Muitas medidas preventivas têm sido propostas, entre elas a exclusão de doadoras múltiparas da doação de sangue.<sup>2,17</sup> Entretanto, ocorreria uma perda de doadores que não apresentam risco para o desenvolvimento de TRALI, como é o caso das mulheres que não possuem anticorpos, que, neste estudo, somam 63% das doadoras múltiparas.

Para o Hemocentro da UNIFESP, as doadoras múltiparas correspondem a 10,6% do total de doadores. Considerando que 37% dessas mulheres apresentam anticorpos anti-HLA, excluir as doadoras múltiparas positivas da doação de sangue corresponde a perder 4% do total de doadores. Embora não representem à maioria dos casos, perder esse percentual é significativo aos bancos de sangue.

A Cruz Vermelha Americana propõem, então, o uso seletivo de plasma, na tentativa de não perder nenhum doador, inclusive os implicados em reações transfusionais. Como o plasma derivado do sangue total pode ser usado no

fracionamento, a proposta é a utilização do plasma proveniente das doadoras apenas para o fracionamento enquanto que o plasma de doadores é usado para a transfusão.<sup>41</sup>

Determinar a prevalência e especificidade de anticorpos leucocitários e avaliar o impacto da exclusão de doadoras positivas são medidas importantes para entender o comportamento desses anticorpos na população e avaliar os grupos de risco de transmiti-los aos receptores de hemocomponentes.

Para estudos futuros, sugere-se o acompanhamento dos hemocomponentes provenientes de doadoras múltíparas nas transfusões de sangue, para verificar qual porcentagem das doadoras positivas são capazes de desencadear TRALI em receptores de sangue.

## **6 CONCLUSÕES**

---

---

1. Os anticorpos anti-HLA são frequentemente encontrados no plasma de doadoras de sangue brasileiras somando 22,9% das doadoras que compareceram ao Hemocentro da UNIFESP e em 26,7% das doadoras que tiveram no mínimo uma gestação.
2. Há correlação estatisticamente significativa entre a presença do anticorpo anti-HLA e o número de gestações, com aumento da porcentagem na medida em que se eleva o número de gestações. Portanto a gestação favorece a formação do anticorpo, e, a cada gravidez, aumenta a possibilidade de a mãe ser sensibilizada pelos leucócitos fetais, elevando assim o risco de formação de aloanticorpos.
3. Apesar de apresentar uma menor frequência, com 1,9% do total de doadoras nos testes GAT e GIFT, os anticorpos anti-neutrófilos também são encontrados em doadoras de sangue, podendo este valor ser maior uma vez que as doadoras positivas para anti-HLA não foram testadas.
4. Em conclusão, anticorpos anti-HLA e anti-neutrófilos estão presentes no plasma de doadoras brasileiras e constituem fator de risco para desencadear TRALI em receptores de sangue com antígenos correspondentes.
5. Para o Hemocentro da UNIFESP, as doadoras múltiplas correspondem a 10,6% do total de doadores. Considerando que 37% dessas mulheres apresentam anticorpos anti-HLA, o impacto da exclusão de doadoras múltiplas positivas da doação de sangue corresponde a 4% do total de doadores.
6. Para estudos futuros, sugere-se o acompanhamento dos hemocomponentes provenientes de doadoras múltiplas nas transfusões de sangue, para verificar qual porcentagem das doadoras positivas são capazes de desencadear TRALI em receptores de sangue.



## Anexo 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### **Título do projeto: Estudo de aloanticorpos anti-HLA e anti-neutrófilos em doadoras de sangue**

O objetivo deste estudo é determinar a frequência e a especificidade de anticorpos, presentes no plasma de doadoras que já tiveram filhos, capazes de reagir com proteínas (HLA) dos glóbulos brancos do receptor, desencadeando TRALI (uma reação pós-transfusão caracterizada por insuficiência pulmonar).

Para a realização desse estudo será necessária a coleta de sangue (10 mL) de mulheres, que são doadoras de sangue, sem desconforto, uma vez que o sangue é obtido durante o processo de doação. O material será analisado para a presença desses anticorpos e sua relação com o número de gestação, uma vez que podem ser formados durante a gravidez. O sangue das mulheres que não tiveram filhos será usado como controle.

Em qualquer etapa do estudo, o participante terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas e resultados da pesquisa, sem ser divulgado a identificação de nenhum participante. O principal investigador é a aluna de mestrado Larissa Barbosa Lopes, que pode ser encontrada no endereço: Rua Pedro de Toledo, 740, 3º andar, Vila Clementino, Telefone (11) 55791550. Se o participante tiver alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572, 1º andar, cj 14,55711062, FAX: 55397162. E-mail: [cepunifesp@epm.br](mailto:cepunifesp@epm.br), Vila Clementino, São Paulo.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à doadora.

Não haverá benefício direto nem despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos nesse estudo, o participante tem direito a tratamento médico na instituição, bem como as indenizações legalmente estabelecidas.

O pesquisador tem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para essa pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo sobre determinação da freqüência de anticorpos contra HLA.

Eu discuti com a aluna Larissa Barbosa Lopes sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

-----

Assinatura da doadora

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante legal para a participação nesse estudo.

-----

Assinatura do responsável pelo estudo

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## Anexo 2

### Banco de Dados

Nome:

Endereço:

Bairro:

CEP:

Cidade:

Estado:

Telefone:

Data de Nascimento:

Nacionalidade:

Profissão:

Cor:

Peso:

Altura:

Estado Civil: solteira (0) casada (1) divorciada (2) outra (3)

Gestações: nenhuma (0) uma (1) duas (2) três (3) quatro ou mais (4)

- Mesmo marido: não (0) sim (1)

- Idade dos filhos:

Quanto tempo é doadora:

- menos de um ano (0)

- de um a dois anos (1)

- de dois a cinco anos (2)

- mais de cinco anos (3)

Já recebeu transfusão: não (0) uma vez (1) mais de uma vez (2)

Já teve alguma reação transfusional: não (0) sim (1)

Data da doação:

Número da Bolsa:

Tipo Sangüíneo: A (0) B (1) AB (2) O (3)

Rh- (0) Rh+ (1)

Número do Tubo para DNA:

Número do Tubo para soro:


Resultados:

- HLA: negativo (0) positivo (1)

- PRA:



## Anexo 3



UNIFESP  
PAULISTA

Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 24 de março de 2005.  
CEP 0140/05

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) LARISSA BARBOSA LOPES  
Co-Investigadores: José Orlando Bordin, Antonio Fabron Junior  
Disciplina/Departamento: Hematologia e Hemoterapia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: Recursos Próprios.

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL**


Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Estudo de prevalência de aloanticorpos anti-HLA e anti-neutrófilos em doadores de sangue e avaliação do risco de desenvolvimento de edema pulmonar não cardiogênico em receptores de hemocomponentes".

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Intervenção diagnóstica.  
**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** Sem risco, desconforto leve, decorrente de coleta de sangue..  
**OBJETIVOS:** Determinar a frequência e a especificidade de anticorpos contra antígenos de neutrófilos, HLA classe I e classe II, no plasma de doadores multiparas. Avaliar o papel da concentração de citocinas dos hemocomponentes obtidos do sangue de multiparas no desenvolvimento de TRALI. Calcular o risco potencial de componentes sanguíneos obtidos de doadoras multiparas no desenvolvimento de TRALI. Avaliar o impacto da exclusão de doadoras multiparas da doação de sangue..  
**RESUMO:** Meio de recrutamento: impressos ou cartazes. Serão analisadas amostras de plasma de 150 doadoras de sangue do Hemocentro da UNIFESP, distribuídos em 5 grupos: 30 mulheres que tiveram apenas uma gravidez; 30 que tiveram 2 gestações; 30 que tiveram 3 gestações; 30 que tiveram 4 ou mais gestações; 30 que não tiveram nenhuma gravidez. Serão analisadas também 500 doadoras multiparas ( $\geq 3$  gestações) do hemocentro da FAMEMA no período de 2005. Será aplicado um questionário. Após a doação, serão coletados 15 mL de sangue total e 5 mL de sangue em EDTA para genotipagem dos aloantígenos de neutrófilos, citocinas..  
**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Estudo fundamentado, realizado na disciplina de Hematologia e Hemoterapia, em parceria com o hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília. O estudo visa determinar presença de anticorpos contra antígenos de neutrófilos e leucócitos e relacioná-los com n de gravidez..  
**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritas as técnicas utilizadas na estudo, sendo aplicadas rotineiramente no laboratório da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP..  
**TCLE:** Adequado, contemplando todos os itens da resolução 196/96.  
**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** Sem financiamento externo - R\$ 27 822,70.  
**CRONOGRAMA:** 12 meses.  
**OBJETIVO ACADÊMICO:** Iniciação científica.  
**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 19/03/06 e 14/03/07.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente



**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

---

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil  
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162



**Anexo 5**

Distribuição das doadoras nulíparas, por presença de anticorpos anti-HLA, classe I e/ou II, segundo histórico de transfusão sanguínea e aborto, idade da doadora e sistema ABO

Doadoras	Anti-HLA classe I	Anti-HLA classe II	Histórico de Transfusão	Idade da Doadora	Sistema ABO
L3	-	-		23	O+
L4	-	-		29	A+
L5	-	-		24	O-
L6	-	-		19	A+
L7	-	-		18	A+
L8	-	-	1 Transfusão	54	AB-
L12	-	-		18	O+
L13	-	-		20	A+
L16	-	-		28	O-
L17	-	-		24	A+
L18	-	-		29	O+
L22	-	-		31	A+
L23	-	-		30	O+
L25	-	-		24	O+
L27	-	-		29	O+
L32	-	-		24	A+
L34	-	-		25	B+
L35	-	-		19	A+
L38	-	-		21	A+
L39	-	-		20	O+
L40	-	-		24	B+
L43	-	-		29	-
L44	-	-		20	B+
L46	-	-		28	A+
L47	-	-		30	A+
L49	-	-		23	O+
L50	-	-		23	B+
L51	-	-		18	O+
L54	-	-		19	A+
L55	-	-		29	O-
L56	-	-		25	B+
L57	-	-		22	A+
L58	-	-		30	A+
L59	-	-		19	O+
L60	-	-		22	A+
L61	-	-		33	A+
L62	-	-		28	AB+
L64	-	-		35	B+
L67	-	-		28	O+
L69	-	-		22	A+
L176	-	-		54	O+
L177	-	-		27	A+
L179	-	-		22	B+
L180	-	-		22	A+

Continua...

## ... Conclusão

L181	-	-	34	B-
L182	-	-	34	O+
L183	-	-	26	A-
L185	-	-	24	AB+
L189	-	-	29	A+
L191	-	-	20	O+

**Anexo 6**

Distribuição das doadoras com uma gestação, por presença de anticorpos anti-HLA, classe I e/ou II, segundo histórico de transfusão sangüínea e aborto, idade da doadora e sistema ABO

Doadoras	Anti-HLA classe I	Anti-HLA classe II	Histórico de Aborto e Transfusão	Idade da Doadora	Sistema ABO
L1	-	-		32	O+
L19	-	-	1 Transfusão	30	A+
L21	-	+		30	O+
L24	-	-		35	A+
L33	-	-		36	B+
L36	-	-		25	O+
L66	+	-		34	AB+
L70	-	-	1 Aborto	29	A+
L71	-	-		27	O+
L74	-	-		44	O+
L76	+	+		33	O+
L78	-	-		33	O+
L79	-	-		43	A+
L81	-	-		45	O+
L85	-	-	1 Transfusão	55	O-
L94	-	+		31	O+
L99	-	-		24	O+
L100	-	-		35	O+
L101	-	-		31	B+
L102	-	-		29	O+
L106	-	-		21	O+
L109	-	-		34	O+
L113	-	-		36	O+
L115	-	-		36	O+
L117	-	-	1 Aborto	38	O+
L120	-	-		40	A-
L122	-	-		40	A+
L124	-	-		22	A+
L125	-	-		36	A+
L127	+	-	1 Aborto	32	B-
L129	-	-		40	O+
L130	-	-		38	A+
L137	-	-		24	B+
L139	-	-		26	O+
L140	-	-		33	A+
L141	-	-		26	O+
L148	-	+		59	A+
L151	-	-		45	B+
L153	-	-		26	A-
L155	+	-		27	A+
L156	-	-		28	O+
L159	-	-		32	O+
L160	-	-		39	O+

Continua...

... Continuação

L164	-	-		22	O+
L166	-	-		42	A+
L169	-	+		19	O+
L192	-	-		27	B+
L197	-	-		26	A-
L202	-	-	1 Aborto	22	O+
L208	-	-		34	O-
L209	+	-		27	O+
L211	-	-		36	O+
L215	-	-		36	O+
L220	-	-		37	O+
L221	-	-		26	O+
L225	-	-		29	-
L227	-	-		18	O+
L229	-	-		35	O+
L233	-	-		26	A+
L234	-	-		19	O+
L236	-	-		29	O+
L238	-	-		39	A-
L246	-	-		45	B+
L255	-	-		33	O+
L257	-	-		32	O+
L260	-	-		26	A+
L261	+	-		34	O+
L262	-	-		28	O+
L263	-	-		25	O-
L267	-	-		26	A+
L274	-	-		21	A+
L279	-	-		34	B+
L283	-	-		22	A+
L287	-	-		30	B+
L302	-	-		35	A+
L310	-	+		31	A+
L313	-	-		39	A+
L314	-	-		37	A-
L315	-	-		59	A+
L318	-	-	1 Aborto	33	A+
L319	-	-		44	O+
L320	+	+		40	O-
L322	-	-		42	O+
L323	-	-		40	A+
L324	+	-		30	B+
L325	-	-		34	B+
L327	-	-		31	O-
L331	+	-	8 Transfusões	32	A+
L332	-	-		24	A+
L337	-	-		38	O-
L341	-	-		25	B+
L342	-	-		40	O-
L343	-	+		56	A+
L344	-	-	1 Transfusão	51	O-
L345	-	-		29	B+
L346	-	+		20	A+
L347	-	-		34	O+
L348	-	+		25	A+

Continua...

... Conclusão

L349	-	-	39	B+
L350	-	-	31	B+

**Anexo 7**

Distribuição das doadoras com duas gestações, por presença de anticorpos anti-HLA, classe I e/ou II, segundo histórico de transfusão sangüínea e aborto, idade da doadora e sistema ABO

Doadoras	Anti-HLA classe I	Anti-HLA classe II	Histórico de Aborto e Transfusão	Idade da Doadora	Sistema ABO
L2	-	-		37	A+
L10	-	-		52	O+
L11	-	-		45	B+
L26	-	-		35	O-
L28	-	-	1 Aborto	49	O+
L30	-	-		41	O+
L41	-	-		24	A+
L42	-	-		28	O+
L52	+	-		38	O+
L53	-	-		41	B+
L65	-	-	2 Abortos	29	O+
L68	-	-		26	A+
L72	+	-		29	A+
L73	-	-	1 Aborto	27	O+
L77	-	-	1 Aborto	32	O+
L83	-	-		35	O+
L84	-	-		46	O+
L86	-	-		48	O+
L88	-	-		30	O+
L89	-	+	2 Transfusões	56	O+
L90	-	-	1 Aborto	42	A+
L92	+	-		28	A+
L93	-	-		26	A+
L96	-	-		33	AB+
L97	-	-		63	O+
L103	+	-		32	B+
L105	-	+		22	A+
L110	-	-	2 Abortos	36	O+
L111	-	+		34	A+
L114	+	-		30	O-
L116	+	-		43	A+
L118	+	+		52	B+
L119	+	+		24	B+
L121	-	-		38	A+
L123	-	-	1 Aborto	19	O+
L142	-	-		41	O+
L144	-	-	1 Aborto	26	O+
L145	-	-	1 Aborto	23	O+
L147	-	-		34	A+
L149	-	-		41	O+
L152	-	-	1 Aborto	34	O+
L154	-	-		31	O+
L168	+	-		30	O+

Continua...



... Continuação

L172	-	-		29	B+
L175	-	+		34	A+
L178	-	-	1 Aborto	28	A+
L190	-	-		27	O+
L195	-	-		59	A-
L196	-	-	1 Aborto	37	O-
L198	-	-	1 Aborto	21	A+
L200	-	-		25	O+
L201	+	-		25	B+
L212	-	-		49	O+
L214	-	-	1 Aborto	47	A+
L217	-	-		24	O+
L219	-	-	1 Aborto	43	O+
L224	-	+		36	A+
L230	-	-	2 Abortos	24	A+
L232	-	-	1 Aborto	42	O+
L240	-	-	1 Aborto	35	A+
L245	-	+		44	O+
L250	-	-		40	A+
L251	-	-		40	B+
L252	-	-		43	O+
L259	-	+	1 Aborto	35	A+
L265	+	-		54	O+
L269	-	-		35	O+
L271	-	-	1 Aborto	27	A+
L275	-	-		30	B+
L276	-	-		23	O+
L278	-	-		26	B+
L281	+	+		59	A+
L282	-	-		32	A+
L284	-	-	1 Aborto	32	O+
L286	+	+		43	A+
L289	-	-		45	O+
L290	-	-		26	A+
L291	+	-		30	A+
L294	-	-		41	O+
L295	+	-		32	A+
L296	-	-		43	A-
L299	-	+		43	O+
L300	-	-		41	B+
L301	-	-		40	A+
L306	-	-		44	B+
L309	-	-		29	O+
L316	-	-		60	O-
L317	-	-		48	O-
L321	-	+		32	O-
L326	-	+		42	O+
L328	-	-		46	A+
L329	-	-		33	O-
L330	-	-	1 Aborto	24	O+
L333	-	-		27	O+
L334	-	+		32	O+
L335	-	-	1 Transfusão	63	O+
L336	-	-		58	A+
L338	-	-		44	A+

Continua...

... Conclusão

L339	-	-	43	A+
L340	-	-	44	O+

**Anexo 8**

Distribuição das doadoras múltiparas, por presença de anticorpos anti-HLA, classe I e/ou II, segundo histórico de transfusão sanguínea e aborto, idade da doadora e sistema ABO

Doadoras (n)	Anti-HLA classe I	Anti-HLA classe II	Histórico de Aborto e Transfusão	Idade da Doadora	Sistema ABO
L9 (4)	-	-		53	B+
L14 (3)	-	-	1 Aborto	43	A-
L15 (4)	-	-	1 Aborto	50	A+
L20 (4)	+	-		34	O+
L29 (8)	+	-	4 Abortos	52	O+
L31 (3)	+	-		46	B+
L37 (3)	-	-		28	O+
L45 (5)	-	+		44	A+
L48 (5)	-	-		42	O+
L63 (5)	-	-	1 Aborto	46	B-
L75 (5)	-	-		43	A-
L80 (3)	-	-	1 Aborto	55	A-
L82 (3)	-	-		33	O+
L87 (4)	-	-		30	O+
L91 (3)	-	-	1 Aborto 1 Transfusão	47	O-
L95 (4)	+	-		52	A+
L98 (3)	-	-		50	O+
L104 (7)	-	-	1 Aborto	55	A+
L107 (4)	-	-		53	B+
L108 (3)	-	-		50	A+
L112 (3)	-	-	1 Aborto	45	O+
L126 (5)	-	-		36	A+
L128 (7)	+	+	2 Abortos	54	A+
L131 (5)	-	+		50	O-
L132 (4)	-	+		49	O+
L133 (5)	-	+	3 Abortos	24	O+
L134 (6)	+	-		43	A+
L135 (3)	-	-		48	O+
L136 (3)	-	+		47	O+
L138 (3)	+	+		54	-
L143 (5)	-	-	3 Abortos	45	A-
L146 (3)	-	-		53	O+
L150 (3)	-	-		45	A+
L157 (3)	-	-	1 Aborto	42	O+
L158 (4)	+	-		56	AB+
L161 (3)	+	-	1 Aborto	34	O+
L162 (3)	+	-	2 Abortos	36	O+
L163 (3)	-	-	1 Aborto	36	O-
L165 (3)	-	+		38	O+
L167 (3)	+	-		29	B+
L170 (3)	-	-		43	O-
L171 (3)	-	-		35	A+

Continua...

... Continuação

L173 (4)	-	-	1 Aborto	40	O+
L174 (3)	-	+		38	A+
L184 (7)	-	-	1 Aborto	54	O+
L186 (3)	-	-		36	A+
L187 (3)	-	-		40	O+
L188 (3)	-	-		25	B+
L193 (5)	-	-	3 Abortos	38	O+
L194 (3)	-	-		38	A+
L199 (3)	-	+		49	O+
L203 (3)	-	-	2 Abortos	44	B+
L204 (8)	+	-	1 Transfusão	49	B+
L205 (4)	-	-		44	O+
L206 (3)	-	-		40	O+
L207 (3)	-	+		25	B+
L210 (4)	-	+		52	O+
L213 (4)	-	+		39	O+
L216 (5)	-	-	4 Abortos	30	AB+
L218 (3)	-	-		41	O+
L222 (5)	-	-	2 Abortos	43	A+
L223 (3)	-	-	1 Aborto	25	B-
L226 (3)	-	-		47	O+
L228 (5)	-	+	1 Aborto	39	O+
L231 (3)	+	+		50	AB+
L235 (5)	-	-	2 Abortos	45	O-
L237 (4)	-	+	1 Aborto	28	A+
L239 (4)	+	+	1 Aborto	37	A+
L241 (3)	-	+		39	A+
L242 (3)	-	-		51	B+
L243 (3)	-	-	1 Aborto	36	A+
L244 (3)	-	-		55	A+
L247 (3)	-	-		45	A+
L248 (4)	-	-		51	O+
L249 (3)	+	+		48	A+
L253 (8)	-	-		61	O+
L254 (5)	-	-	3 Abortos	52	O+
			1 Transfusão		
L256 (3)	-	-		50	A+
L258 (6)	-	+	3 Abortos	46	A+
L264 (3)	+	+		42	B+
L266 (3)	-	-	1 Aborto	58	B+
L268 (4)	+	-	1 Aborto	31	O+
			1 Transfusão		
L270 (4)	-	+		45	AB+
L272 (6)	-	-	3 Abortos	60	O+
			1 Transfusão		
L273 (3)	-	-	1 Aborto	30	A+
L277 (3)	-	-	1 Aborto	30	O+
L280 (3)	+	-		28	A+
L285 (5)	+	+	2 Abortos	52	O+
L288 (4)	-	-		50	O+
L292 (6)	+	+		41	O+
L293 (5)	-	+	2 Abortos	58	O+
L297 (3)	-	-		38	A+
L298 (5)	-	-	1 Aborto	50	O-
L303 (3)	-	-	1 Aborto	56	B-

Continua...

## ... Conclusão

L304 (3)	-	-	1 Aborto	55	O+
L305 (3)	-	-	1 Aborto	51	O+
L307 (3)	-	-		44	A+
L308 (4)	-	-	1 Aborto	42	A-
L311 (5)	-	-		50	O+
L312 (3)	-	-	1 Aborto	50	A+

**Anexo 9**

Distribuição das doadoras com uma gestação, por anticorpos anti-HLA, classe I e/ou II, segundo o teste LAT-1240

Doadoras	Anti-HLA classe I	Anti-HLA classe II
L21	–	–
L66	B45, B76	–
L76	A80, B51, B52, B62	DR11, DQ9
L94	–	DR11, DR12, DR15, DR17, DQ7
L127	B48, B51, B54, CW17	–
L148	–	DR10
L155	B48	–
L169	–	DR11, DR13, DR17, DQ6, DQ9
L209	B18	–
L261	B7, B27, B48, B57, B60	–
L310	–	DQ7, DQ8
L320	B48	DR11
L324	B48	–
L331	B8, B13, B18, B27, B38, B44	–
L343	–	DQ8
L346	–	DR10
L348	–	DR15

**Anexo 10**

Distribuição das doadoras com duas gestações, por anticorpos anti-HLA, classe I e/ou II, segundo o teste LAT-1240

Doadoras	Anti-HLA classe I	Anti-HLA classe II
L52	A3, A30, A31, A32, B7, B13, B27, B37, B55, B56, B57, B60, B61, B64, CW2	–
L72	A80	–
L89	–	DR1, DR7, DR8, DR11, DR12, DR13, DR15, DR17, DQ2, DQ6, DQ7, DQ8, DR52
L92	A2, A11, A24, A25, A68, A69, B18, B39, B44, B49, B51, B75	–
L103	A31, A36, B13, B37, B38, B44, B49, B53, B61, CW2	–
L105	–	DR8, DR11, DR12, DR13, DR17, DQ6, DQ7, DQ8, DR52
L111	–	DR1, DR4, DR7, DR8, DR11, DR12, DR13, DR15, DR17, DQ2, DQ4, DQ5, DQ6, DQ7, DQ8, DR51, DR52, DR53
L114	A34, A66, B45, B59, B72, CW5, CW17	–
L116	A25, A30, A31, A33, A68, B18, B35, B49, B51, B56, B58, B63, B71, B75, CW4, CW9, CW12, CW14, CW17	–
L118	B38	DQ8
L119	B49, CW12	–
L168	A1, A2, A24, A25, A29, A30, A31, A32, A33, A66, A68, A69, B7, B8, B13, B18, B35, B39, B44, B49, B51, B55, B56, B60, B66, B64, B71, B75, CW1, CW4, CW8, CW9, CW10, CW12, CW14, CW17, BW6	–
L175	–	–
L201	A36, B51, B53, B75	–

Continua...

## ... Conclusão

---

L224	–	–
L245	–	DQ7, DQ8
L259	–	DR16
L265	A25, A26, B18, B38, B46	–
L281	A23, B7, B37, B41, B48, B61, B64, CW2, CW16	–
L286	A34, A80, B38, B46, B48, B58, B72, CW5	DR15
L291	–	–
L293	B7, B27, B57, B76, CW17	–
L299	–	DR1, DR4, DR7, DR8, DR11, DR13, DR15, DR17, DQ4, DQ6, DQ7, DQ8, DR51
L321	–	DQ7
L326	–	DR7, DR8, DR11, DR12, DR15
L334	–	DR1, DR4, DR7, DR8, DR11, DR12, DR13, DR15, DR17, DQ2, DQ4, DQ5, DQ6, DQ7, DQ8, DR51, DR52, DR53

---



**Anexo 11**

Distribuição das doadoras múltiparas, por anticorpos anti-HLA, classe I e/ou II, segundo o teste LAT-1240

Doadoras (n)	Anti-HLA classe I	Anti-HLA classe II
L20 (4)	A80, B8, B48	–
L29 (8)	B27, B38, B48, B57, B58	–
L31 (3)	A3, A24, A29, B8, B18, B27, B39, B55, B56, B75, CW14, CW17	–
L45 (5)	–	DR15
L95 (4)	A26, A66, B76	–
L128 (7)	B46, B48, B58	DR1, DR7, DR8, DR11, DR12, DR13, DR15, DR17, DQ2, DQ6, DQ7, DQ8, DR52
L131 (5)	–	DR7, DR10, DQ2
L132 (4)	–	–
L133 (5)	–	DR1, DR4, DR11, DR12, DR13, DR15, DR17, DQ5, DQ6, DQ7, DQ8, DR51, DR52
L134 (6)	A2, A24, A25, A26, A31, A68, A69, B13, B18, B27, B44, B49, B57, B63, B71, CW9, CW12, CW14, CW17	–
L136 (3)	–	DQ9
L138 (3)	–	–
L158 (4)	A1, A2, A24, A25, A26, A32, A33, A68, B8, B18, B27, B44, B49, B51, B56, B57, B60, B63, B64, CW10, CW12, CW14, CW17	–
L161 (3)	A29, A33, B8, B18, B39, B51, B53, B55, B63, B64, B75, CW14, CW17	–
L162 (3)	A3, A25, A26, A31, A33, A66, A68, B8, B51, B56, B63, B71, B75, CW4, CW9, CW12, CW14, CW17	–
L165 (3)	–	DR15, DR17
L167 (3)	A1, A24, A25, A26, A31,	–

Continua...

... Continuação

	A32, A33, A68, B8, B13, B27, B44, B49, B51, B56, B57, B60, B63, B64, B71, CW6, CW9, CW10, CW12, CW14, CW17, BW4	
L174 (3)	–	DR1, DR4, DR7, DR8 DR11, DR12, DR15, DR17, DQ2, DQ7, DQ8, DR51, DR53
L159 (3)	–	DR1, DR4, DR7, DR8, DR11, DR12, DR13, DR15, DR17, DQ2, DQ4, DQ5, DQ6, DQ7, DQ8, DR51, DR52, DR53
L204 (8)	B18, B38	–
L207 (3)	–	DR1, DR10
L210 (4)	–	DR1, DR10
L213 (4)	–	DR7, DR8, DR11, DR12, DR15, DR17, DQ2, DQ7
L228 (5)	–	DR8
L231 (3)	A31, A32, A74, B13, B42, B54, B56, B60, B76	DQ8
L237 (4)	–	–
L239 (4)	A68, B44, B49	DR4, DR8, DR11, DQ7, DQ8
L241 (3)	–	DR1, DR4, DR12, DR15, DQ7, DQ8, DR51
L249 (3)	A25, A30, A31, A68, B8, B13, B18, B27, B35, B44, B46, B49, B56, B57, B63, B71, B75, CW4, CW9, CW12, CW14, CW17	DQ8
L258 (6)	–	DR7
L264 (3)	A2, A68, B44, B49	DR8, DR11, DR17, DQ7
L268 (4)	B38, B48, B57, B58	–
L270 (4)	–	DR1, DR15
L280 (3)	A34, A80, B38, B46, B47, B48, B58, B65, B72, CW5	–
L285 (5)	A24, A25, A32, A33, A68, A80, B27, B38, B44, B49, B51, B56, B57, B58, B60, B63, B64, CW10, CW12, CW14, CW17	DR8, DR11, DQ7, DQ8
L292 (6)	A1, A24, A25, A31, A32, A33, A68, B8, B13, B27, B38, B44, B49, B51, B52, B56, B57, B60, B63, B64, B71, CW9, CW10, CW12, CW14, CW17	DR1, DR7, DR8, DQ7, DQ8

Continua...

... Conclusão

---

L293 (5)	-	DR8, DR11, DR13, DR17, DQ6, DQ7, DQ8
----------	---	-----------------------------------------

---

**Anexo 12**

Doadoras múltiparas testadas no ELISA, pelo LAT-M e na citometria de fluxo, pelo LABScreen (Mixed, PRA e Single)

Doadoras	LAT-M Anti-HLA		LABScreen Anti-HLA					
			Mixed		PRA		Single	
	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II
L9 (4)	-	-	-	-	-	-	-	-
L14 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L15 (4)	-	-	-	-	-	-	-	-
L20 (4)	+	-	-	-	+	+	+	+
L29 (8)	+	-	-	-	+	-	+	-
L31 (3)	+	-	-	-	+	-	+	-
L37 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L45 (5)	-	+	-	-	+	+	+	+
L48 (5)	-	-	-	-	-	-	-	-
L63 (5)	-	-	-	-	-	-	-	-
L75 (5)	-	-	-	-	-	-	-	-
L80 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L82 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L87 (4)	-	-	-	-	-	-	-	-
L95 (4)	+	-	-	-	+	-	+	+
L98 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L104 (7)	-	-	-	-	-	-	-	-
L107 (4)	-	-	-	-	-	-	-	-
L108 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L112 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L126 (5)	-	-	-	-	-	-	-	-
L135 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L143 (5)	-	-	-	-	-	-	+	-
L150 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L157 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L163 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L170 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L171 (3)	-	-	-	+	-	+	-	-
L173 (4)	-	-	-	-	-	-	-	-
L184 (7)	-	-	-	-	-	-	-	-
L186 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L187 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L188 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L193 (5)	-	-	-	-	+	-	+	-
L194 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L203 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L205 (4)	-	-	-	-	+	+	-	-
L206 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L216 (5)	-	-	-	-	-	-	-	-
L218 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
L222 (5)	-	-	-	-	-	-	-	-
L223 (3)	-	-	+	-	+	-	+	-
L226 (3)	-	-	-	-	+	-	+	-

Continua...



**Anexo 13**

Doadoras múltiparas negativas no LAT-M e positivas no LABScreen (Mixed, PRA e Single)

Doadoras (n)	ELISA Anti-HLA		LABScreen Anti-HLA					
	Classe I	Classe II	Mixed		PRA		Single	
			Classe I	Classe II	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II
L143 (5)	-	-	-	-	-	-	+	-
L171 (3)	-	-	-	+	-	+	-	-
L193 (3)	-	-	-	-	+	-	+	-
L205 (4)	-	-	-	-	+	+	-	-
L223 (3)	-	-	+	-	+	-	+	-
L226 (3)	-	-	-	-	+	-	+	-
L242 (3)	-	-	+	-	+	-	+	-
L244 (3)	-	-	-	+	-	+	-	-
L254 (5)	-	-	-	-	+	-	+	-
L266 (3)	-	-	-	-	-	-	+	-
L272 (6)	-	-	-	-	-	+	-	-
L277 (3)	-	-	+	-	-	-	+	-
L297 (3)	-	-	-	-	-	-	+	-
L304 (3)	-	-	-	-	-	-	+	-
L305 (3)	-	-	-	-	+	+	+	-
L307 (3)	-	-	-	-	-	-	+	-
L308 (4)	-	-	-	-	+	-	+	-

**Anexo 14**

Especificidade dos anticorpos encontrados em 22 doadoras positivas pelo LABScreen  
(PRA e Single)

Doadoras	PRA		Single	
	Classe I	Classe II	Classe I	Classe II
L20 (4)	A1, A29, B8, B18, B37, B44, B45, B46, B64, B65, CW12, CW14	DR7, DR8, DR9, DQ7, DQ8, DQ9, DR51, DR53	A1, A29, A33, A36, A68, A80, B8, B13, B18, B37, B41, B42, B44, B45, B46, B54, B59, B63, B64, B65, B76, B82, CW1, CW2, CW4, CW5, CW6, CW7, CW8, CW9, CW10, CW12, CW14, CW15, CW16, CW17, CW18	DR4, DR7, DR8, DR9, DR11, DR12, DR13, DR15, DR16, DR18, DQ2, DQ7, DQ8, DQ9, DP10, DR52
L29 (8)	A2, A34, A68, B35, B49, B50, B51, B53, B56, B57, B58, B63, B71, B72, B75, B78	–	A2, A26, A68, A69, B35, B46, B49, B50, B51, B52, B53, B56, B57, B58, B62, B63, B71, B75, B77, B78, CW5, CW16, CW17, B4005	–
L31 (3)	A1, A23, A24, A25, A29, A30, A31, A32, A33, A36, A74, A80, B38, B61, B64, B73, CW12	–	A23, A24, A25, A32, B8, B38, B39, B41, B42, B45, B49, B51, B53, B54, B55, B56, B57, B58, B59, B63, B65, B67, B73, B76, CW2, CW4, CW5, CW6, CW14, CW15, CW17, CW18, B2708	–
L45 (5)	A2, A3, A24, A26, A29, A30, A31, A68, A69, B7, B27, B35, B38, B39, B42, B44, B45, B48, B50, B51, B52, B55, B56, B60, B61, B62, B63, B64, B67,	DR1, DR7, DR9, DR10, DR15, DR16, DQ5, DQ6, DQ9, DR51, DR103	A2, A24, A30, A34, A43, A68, A69, A80, B7, B8, B18, B27, B35, B39, B41, B42, B45, B46, B47, B48, B49, B50, B51, B52, B53, B54, B55, B56, B57,	DR1, DR4, DR7, DR9, DR10, DR12, DR15, DR16, DQ4, DQ5, DQ6, DQ8, DR51, DR52, DR103

Continua...

... Continuação

	B71, B72, B75, B76, B78, B81, CW2, CW7, CW10, CW12, CW18		B60, B61, B62, B63, B64, B65, B67, B71, B72, B73, B75, B76, B77, B78, B81, B82, CW1, CW2, CW4, CW5, CW6, CW7, CW8, CW9, CW10, CW12, CW14, CW15, CW16, CW17, CW18, B4005, B2708	
L95 (4)	A25, A26, A66	–	A25, A26, A34, A43, A66, B8, B41, B42, B57, B67, CW2, CW4, CW6, CW7, CW9, CW10, CW12, CW14, CW17, CW18	DR1, DR4, DR7, DR8, DR9, DR10, DR11, DR12, DR13, DR14, DR15, DR16, DR17, DR18, DQ2, DQ4, DQ6, DQ7, DQ8, DQ9, DP1, DP2, DP3, DP4, DP10, DP11, DP13, DP17, DR51, DR52, DR53, DR103
L143 (5)	–	–	B76	–
L171 (3)	–	DR1, DR7, DR103	–	–
L193 (5)	B63	–	B63	–
L205 (4)	+	DQ2	A2, A29, A43	–
L223 (3)	A25, A26, A34, B8, B39, B49, B52, B65, B67, Cw7	–	A68, B39, B54, B73	–
L226 (3)	A29, B38, B39	–	A11, A29, B52	–
L242 (3)	A1, A23, A24, A80, B35, B42, B49, B50, B51, B52, B53, B58	–	A2, B35, B49, B51, B52, B62, B75, B78, B4005	–
L244 (3)	–	DR1, DR4, DR7, DR9, DR15, DR16	–	–
L254 (5)	+	–	A1, A36	–
L266 (3)	–	–	A80	–
L272 (6)	–	DR8, DR11, DR12, DR13, DR14, DR17, DR18, DR52	–	–

Continua...



## ... Conclusão

L277 (3)	–	–	A29, B8, B73, B78	–
L297 (3)	–	–	B4005	–
L304 (3)	–	–	B46	–
L305 (3)	A1, A11, A23, A25, A26, A29, A31, A32, A34, A66, A68, A69, B27	DR1, DR10	A25, A26, B27	–
L307 (3)	–	–	A33	–
L308 (4)	A30, A31, B35, B49, B50, B51, B53, B62, B71, B72, B75	–	A2, A11, A80, B8, B35, B49, B51, B52, B53, B62, B72, B75	–

## **8 REFERÊNCIAS**

---

---

1. Popovsky MA, Abel MP, Moore SB. Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*. 1985;25:573-577.
2. Bux J. Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sanguinis*. 2005;89:1-10.
3. Sachs UJH, Kauschat D, Bein G. White blood cell-reactive antibodies are undetectable in solvent/detergent plasma. *Transfusion*. 2005;45:1628-1631.
4. Sachs UJH, Hattar K, Weissmann N, Bohle RM, Weiss T, Sibelius U, Bux J. Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood*. 2006;107:1217-1219.
5. Silliman CC, Ambruso DR, Boshkov LK. Transfusion-related acute lung injury. *Blood*. 2005;105:2266-2273.
6. Choo SY. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal*. 2007;48(1):11-23.
7. Zupanska B, Uhrynowska M, Guz K, Malanska K, Brojer E, Czestynska M, Radomska I. The risk of antibody formation against HNA 1a and HNA 1b granulocyte antigens during pregnancy and its relation to neonatal neutropenia. *Transfusion Medicine*. 2001;11:377-382.
8. Malanska K, Michur H, Zupanska B, Uhrynowska M, Now KJ. Leukocyte antibodies in blood donors and a look back on recipients of their blood components. *Vox Sanguinis*. 2007;92:247-249.
9. Insunza A, Ronson I, Gonzalez-Ponte ML, Hoyos A, Pastor JM, Iriondo A, Hermosa V. Implementation of a strategy to prevent TRALI in a regional blood centre. *Transfusion Medicine*. 2004;14:157-164.
10. Marín L, Torío A, Muro M, Fernandez-Parra R, Minguela A, Bosh V, Alvarez-Lopes MR, Garcia-Alonso AM. Alloimmune neonatal neutropenia and thrombocytopenia associated with maternal anti-HNA-1a, HPA-3b and HLA antibodies. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2005;16:279-282.
11. Webert KE, Blajchman MA. Transfusion-related acute lung injury. *Hematology*. 2005;12(6):480-487.
12. Tsalis K, Ganidou M, Blouhos K, Vasiliadis K, Betsis D. Transfusion-related acute lung injury: a life-threatening transfusion reaction. *Med Sci Monit*. 2005;11(5):19-22.
13. Shander A, Popovsky MA. Understanding the consequences of transfusion-related acute lung injury. *Chest*. 2005;128(suppl. 2):598-604.

14. Bray RA, Harris SB, Josephson CD, Hillyer CD, Gebel HM. Unappreciated risk factors for transplant patients: HLA antibodies in blood components. *Human Immunology*. 2004;65:240-244.
15. Gajic O, Moore SB. Transfusion-related acute lung injury. *Mayo Clinic Proceedings*. 2005;80(6):766-770.
16. Goldsmith WW, Pandharipande PP. Transfusion-related acute lung injury – does the anesthesiologist need to worry about this?. *Journal of Clinical Anesthesia*. 2005;17:366-368.
17. Silliman CC, McLaughlin NJD. Transfusion-related acute lung injury. *Blood Reviews*. 2006;20:139-159.
18. Toy P, Popovsky MA, Abraham E, Ambruso DR, Holness LG, Kopko PM, McFarland JG, Nathens AB, Silliman CC, Stroncek D. Transfusion-related acute lung injury: Definition and review. *Critical Care Medicine*. 2005;33(4):721-726.
19. Popovsky MA, Haley NR. Further characterization of transfusion-related acute lung injury: demographics, clinical and laboratory features and morbidity. *Immunohematology*. 2000;16:157-159.
20. Kleinmann S, Caulfield T, Chan P, Davenport R, McFarland J, McPhedran S, Meade M, Morrison D, Pinsent T, Robillard P, Slinger P. Towards an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion*. 2004;44:1774-1789.
21. Engelfriet CP, Reesink HW. Transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Vox Sanguinis*. 2001;81:269-283.
22. Ririe DG, Lantz PE, Glazier SS, Argenta LC. Transfusion-related acute lung injury in an infant during craniofacial surgery. *Anesth Analg*. 2005;101:1003-1006.
23. Kao GS, Wood IG, Dorfman DM, Milford EL, Benjamin RJ. Investigations into the role of anti-HLA class II antibodies in TRALI. *Transfusion*. 2003;43:185-91.
24. Sachs UJH. The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury and how to avoid this serious adverse reaction of transfusion. *Transfusion and Apheresis Science*. 2007;37:273-282.
25. Silliman CC, Curtis BR, Kopko PM, Khan SY, Kelher MR, Schuller RM, Sannoh B, Ambruso DR. Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event in vitro model. *Blood*. 2007;109:1752-1755.

26. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 5a ed. rev. e atual. São Paulo: Elsevier; 2005.
27. Densmore TL, Goodnough LT, Ali S, Dynis M, Chaplin H. Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. *Transfusion*. 1999;39(1):103-106.
28. Triulzi DJ, Kakaiya RM, Kleinman S, Busch MP, Norris P, Steele W, Hillyer CD, Schreiber GB. Relationship of HLA antibodies in blood donors to pregnancy and transfusion history [abstract]. *Transfusion*. 2007;47(S):2A.
29. Sachs UJH. Pathophysiology of TRALI: current concepts. *Intensive Care Med*. 2007;33(Suppl 1):S3-S11.
30. Kopko PM, Popovsky MA, Mackenzie MR. HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 2001;41:1244-8.
31. Lydaki E, Bolonaki E, Nikoloudi E, Chalkiadakis E, Iniotaki-Theodoraki A. HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury (TRALI). A case report. *Transfusion and Apheresis Science*. 2005;33:155-159.
32. Sakagawa H, Miyazaki T, Fujihara M, Sato S, Yamaguchi M, Fukai K, Morioka M, Kato T, Azuma H, Ikeda H. Generation of inflammatory cytokines and chemokines from peripheral blood mononuclear cells by HLA Class II antibody-containing plasma unit that was associated with severe nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion*. 2007;47:154-161.
33. Nishimura M, Hashimoto S, Takanashi M, Okazaki H, Satake M, Nakajima K. Role of anti-human leucocyte antigen class II alloantibody and monocytes in development of transfusion-related acute lung injury. *Transfusion Medicine*. 2007;17:129-134.
34. Dykes A, Smallwood D, Kotsimbos T, Street A. Transfusion-related acute lung injury (TRALI) in a patient with a single lung transplant. *Brit J Haematol*.2000;109:674-676.
35. Fabron A Jr, Ruiz M O, Lopes L B, Bordin J O. Detection of anti-HLA antibodies in plasma blood components may be increased by the application of techniques with high sensitivity rate [abstract 182]. *Transfusion*. 2007;47:106A. [Abstracts presentations from the AABB Annual Meeting and TXPO; 2007 – Oct 20-23; Anaheim, California, USA].
36. Vaidya S. Synthesis of New and Memory HLA Antibodies From Acute and Chronic Rejections Versus Pregnancies and Blood Transfusions. *Transplantation Proceedings*. 2005;37:648-649.
37. Han TH, Chey MJ, Han KS. A Case of Neonatal Alloimmune Neutropenia Associated with Anti-Human Neutrophil Antigen-1a (HNA-1a) Antibody. *J Korean Med Sci*. 2006;21:351-4.

38. Curtis BR, McFarland JG. Mechanisms of transfusion-related acute lung injury (TRALI): Anti-leukocyte antibodies. *Critical Care Medicine*. 2006;34(Suppl.):S118-S123.
39. Lucas GF. Prospective Evaluation of the Chemiluminescence Test for the Detection of Granulocyte Immunofluorescence Test. *Vox Sanguinis*. 1994;66:141-147.
40. Eder AF, Herron R, Strupp A, Dy B, Notari EP, Chambers LA, Dodd RY, Benjamin RJ. Transfusion-related acute lung injury surveillance (2003-2005) and the potential impact of the selective use of plasma from male donors in the American Red Cross. *Transfusion*. 2007;47:599-607.
41. Muniz M, Sheldon S, Schuller RM, Young NS, Klein HG, Leitman SF, Stroncek DF. Patient-specific transfusion-related acute lung injury. *Vox Sanguinis*. 2008;94:70-73.

***APÊNDICE***

---

---

## **Produção Bibliográfica**

1. Lopes LB, Fukasawa JT, Fabron AJ, Kuroda A, Bordin JO. Hemocomponentes obtidos de doadoras múltiplas brasileiras constituem um fator de risco para a indução de TRALI?. Rev Bras Hematol Hemot. 2005;27(Supl 2):285.
2. Fabron AJr, Ruiz MO, Fukasawa JT, Lopes LB, Bordin JO. Uso de técnicas mais sensíveis e específicas na pesquisa de anticorpos anti-HLA em doadoras de sangue pode facilitar o diagnóstico sorológico de TRALI. Rev Bras Hematol Hemot. 2006;28(Supl 2):323-324.
3. Fabron AJr, Lopes LB, Bordin JO. Insuficiência Pulmonar Aguda Associada à Transfusão (TRALI). J Bras Pneumol. 2007;33(2):206-212.
4. Fabron AJr, Ruiz MO, Lopes LB, Bordin JO. Detection of anti-HLA antibodies in plasma blood components may be increased by the application of techniques with high sensitivity rate. Transfusion. 2007;47:106A.
5. Fabron AJ, Ruiz MO, Lopes LB, Bordin JO. A aplicação de técnicas mais sensíveis pode aumentar a detecção de anticorpos anti-HLA no plasma de hemocomponentes. Rev Bras Hematol e Hemot. 2007;29(Supl 3):313.
6. Lopes LB, Kuroda A, Abbas S, Fabron AJ, Bordin JO. O plasma de doadoras de sangue brasileiras contém anticorpos anti-HLA e anti-neutrófilos específicos e pode constituir fator de risco para a indução de TRALI. Rev Bras Hematol Hemot. 2007;29(Supl 3):366.
7. Lopes LB, Fabron AJ, Chiba AK, Ruiz MO, Bordin JO. Detection of Anti-HLA Antibodies in Plasma Blood Components May Be Increased by the Application of Techniques with High Sensitivity Rate. Em redação.



***BIBLIOGRAFIA CONSULTADA***

---

---

Chun H, Cipolone K, Procter J, Stroncek DF. Granulocyte storage and antigen stability. *Transfusion*. 1999;39:983-990.

Fabron AJ, Lopes LB, Bordin JO. Transfusion-related acute lung injury. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007;33(2):206-212.

Prachayasittikul V, Isarankura-na-Ayudhya C, Tantimongcolwat T, Nantasenamat C, Hans-Joachim Galla HJ. EDTA-induced Membrane Fluidization and Destabilization: Biophysical Studies on Artificial Lipid Membranes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2007;39(11):901-913.

Pratelli A. Comparison of serologic techniques for the detection of antibodies against feline coronaviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2008;20(1):45-50.

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2a ed. rev. e atual. São Paulo: BC Gráfica e Editora Ltda; 2005.

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

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)